

***In vitro*-Studien zur Biofunktionalität von Betanin und
Indicaxanthin sowie von Extrakten aus der Kaktusfeige
(*Opuntia ficus indica*)**

Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Thomas Wickert
aus Mainz

Würzburg 2006

Eingereicht am:
bei der Fakultät für Chemie und Pharmazie

1. Gutachter:
2. Gutachter:
der Dissertation.

1. Prüfer:
2. Prüfer:
3. Prüfer:
des öffentlichen Promotionskolloquiums.

Tag des öffentlichen Promotionskolloquiums:
Doktorurkunde ausgehändigt am:

Für Sabine, Rosel, Alfred,
Claudia und Michael

A	Einleitung und Problemstellung.....	1
B	Kenntnisstand.....	8
1	Bioaktivitätsstudien	8
1.1	<i>In vivo</i> -Studien.....	13
1.2	<i>Ex vivo</i> -Studien.....	20
1.3	<i>In vitro</i> -Studien.....	22
2	Zellkulturen.....	25
2.1	Allgemeines	25
2.1.1	Human Colon Epithelial Cells (HCEC).....	32
2.1.2	HepG2-Zellen	33
2.1.3	HT29-Zellen.....	33
2.1.4	Caco2-Zellen.....	33
2.2	Chemosensitivität – Cytotoxizität.....	34
2.2.1	Trypan-Blau-Methode	37
2.2.2	MTS-Methode.....	37
2.2.3	Neutralrot-Methode	38
2.3	Der Zellzyklus.....	39
2.4	Die Apoptose	41
3	Fremdstoffmetabolismus	44
3.1	Cytochrom P450-Isoenzyme.....	50
3.2	Glutathion-S-Transferase.....	52
3.3	UDP-Glucuronosyltransferase.....	54
3.4	Sulfotransferase	56
3.5	NAD(P)H:Chinon-Oxidoreduktase	58
4	Betalaine	60
4.1	Chemische Eigenschaften der Betalaine.....	65
4.2	Bioaktivität der Betalaine	66
5	Die Kaktusfeige – <i>Opuntia ficus indica</i>	69

Inhalt

C Ergebnisse und Diskussion	75
1 Zielsetzung	75
2 Gewinnung von Referenzstanzen	76
2.1 Einführung	76
2.2 Indicaxanthin	76
2.3 Betanin	78
2.4 Gewinnung eines Kaktusfeigen-Extrakts	80
2.5 Fraktionierung des Kaktusfeigen-Extrakts	81
2.6 Indicaxanthinfreier Kaktusfeigen-Extrakt	83
2.7 Diskussion	83
3 Hemmung der Proliferation humaner permanent Zell-Linien	84
3.1 Betanin	86
3.1.1 Diskussion	89
3.2 Indicaxanthin	91
3.2.1 Diskussion	93
3.3 Kaktusfeigen-Extrakt	95
3.3.1 Diskussion	99
3.4 Indicaxanthinfreier Kaktusfeigen-Extrakt	100
3.4.1 Diskussion	103
3.5 Fraktionierter Kaktusfeigen-Extrakt	104
3.5.1 Diskussion	108
3.6 Diskussion der Studien zur Proliferationshemmung	109
4 Induktion von Apoptose und Beeinflussung des Zellzyklus durch Kaktusfeigen-Extrakt	114
4.1 Induktion von Apoptose durch Kaktusfeigen-Extrakt	114
4.1.1 Diskussion	117
4.2 Beeinflussung des Zellzyklus durch Kaktusfeigen-Extrakt	118
4.2.1 Diskussion	120
4.3 Zusammenfassung der Apoptose- und Zellzyklusergebnisse	120

5	Einfluss von Kaktusfeigen-Extrakt, Betanin und Indicaxanthin auf ausgewählte Phase I- und II-Enzyme	121
5.1	Quantifizierung der mRNA chemopräventiv bedeutender Enzyme	122
5.1.1	Beeinflussung der COX-II-Expression in HT29-Zellen	123
5.1.2	Beeinflussung der Cytochrom P450-Expression in HT29-Zellen	124
5.1.3	Beeinflussung der Glutathion-S-Transferase Expression in HT29-Zellen	126
5.1.4	Diskussion	127
5.2	Beeinflussung der <i>in vitro</i> Aktivität ausgewählter Phase II-Enzyme	128
5.2.1	Glutathion-S-Transferase-Aktivität	128
5.2.2	UDP-Glucuronosyltransferase (UGT)-Aktivität	131
5.2.3	Sulfotransferase (SULT)-Aktivität	134
5.2.4	NAD(P)H:Chinon-Oxidoreduktase (NQO)-Aktivität	136
5.3	Diskussion der Enzymstudien	139
D	Material und Methoden	141
1	Material	141
1.1	Chemikalien	141
1.2	Untersuchungsmaterial	141
1.3	Verbrauchsmaterial	141
1.4	Säulenchromatographie	141
1.5	Zell-Linien	141
1.6	Zellkulturmaterial	142
1.7	Puffer- und Salzlösungen	144
2	Geräte	147
2.1	Analytische Hochleistungsflüssigchromatographie-Diodenarray (HPLC-DAD)	147
2.2	Semi-präparative Hochleistungsflüssigchromatographie (Prep-HPLC)	147
2.3	Hochleistungsflüssigchromatographie-Elektrospray-Tandem-Massenspektrometrie (HPLC-ESI-MS/MS)	148
2.4	Sonstige Geräte	148

Inhalt

3	Methoden.....	149
3.1	Extraktion der Testsubstanzen.....	149
3.1.1	Extraktion von Indicaxanthin.....	149
3.1.2	Extraktion von Betanin.....	150
3.1.3	Herstellung des Kaktusfeigen-Extrakt.....	150
3.1.4	Herstellung der Kaktusfeigen-Extrakt-Fraktionen.....	151
3.1.5	Herstellung von indicaxanthinfreiem Kaktusfeigen-Extrakt.....	151
3.2	Zellkultur.....	152
3.2.1	Medien-Herstellung und -Lagerung.....	152
3.2.2	Auftauen und Einfrieren (Kryokonservierung) der Zell-Linien.....	153
3.2.3	Kultivierung und Passagierung.....	154
3.2.4	Bestimmung der Zellzahl/Cytotoxizität.....	155
3.2.5	Bestimmung des Zellzyklus.....	161
3.2.6	Bestimmung des Anteils apoptotischer Zellen.....	161
3.3	Enzymaktivitäts-Bestimmungen.....	162
3.3.1	Herstellung der Zellhomogenate.....	162
3.3.2	UDP-Glucuronosyltransferase-Enzymtest (UGT).....	163
3.3.3	NAD(P)H:Chinon-Oxidoreduktase Enzymtest (NQO).....	164
3.3.4	Sulfotransferase-Test (SULT).....	165
3.3.5	Glutathion-S-Transferase (GST)-Test.....	165
3.4	RNA-Extraktion zur Bestimmung der mRNA von Enzymen des Fremdstoffmetabolismus und COX II.....	166
3.5	reverse transcriptase PCR (rt PCR).....	167
3.6	Statistische Analyse.....	170
E	Literatur.....	171

Abkürzungsverzeichnis

λ	Wellenlänge
Abb.	Abbildung
allg.	allgemein
bp	Basenpaare
C18	unpolares Material mit C18-Alkylketten für stationäre Phasen
cDNA	komplementäre DNA (komplementär zur mRNA)
CVD	<i>cardio vascular disease</i>
d(NTP)	Desoxynukleotidtriphosphat
DAD	diode array detector
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dt.	deutsch
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
ESI	Elektrospray-Ionisierung
et al.	et alii = und andere
eV	Elektronen-Volt
engl.	englisch
Glc	Glucose
GSH	Glutathion
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunden
HDL	<i>high density lipoproteine</i>
HPLC	Hochdruck-Flüssigchromatographie
HTS	<i>high throughput screening</i>
i.D.	Innendurchmesser
KG	Körpergewicht
LDL	<i>low density lipoproteine</i>
M	Molarität, mol/l
m/z	Masse/Ladungsverhältnis

Abkürzungsverzeichnis

MeCN	Acetonitril
MeOH	Methanol
min.	Minuten
mind.	mindestens
M _r	Molekularmasse (relative Molmasse)
mRNA	Boten-RNA
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
MTS	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxy-methoxy-phenyl)-2-(4-sulfo-phenyl)-2H-tetrazolium)
MTT	3-(4,5-dimethylthiazolyl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
N	Normalität
NQO	NAD(P)H:Chinon-Oxidoreduktase
o.a.	oben angeführt
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PMS	Phenazine Methosulfate
pNP	para-Nitrophenol
RNA	Ribonukleinsäure
RP18	Umkehrphase mit C18-Alkylketten (<i>reversed phase</i>)
rpm	Umdrehungen/min (<i>rounds per minute</i>)
rt PCR	reverse transcriptase Polymerase Chain Reaction
RT	Retentionszeit
sign.	signifikant
SIM	<i>selected ion monitoring</i>
s.o.	siehe oben
SPS	sekundäre Pflanzenstoffe
SULT	Sulfotransferase
Tab.	Tabelle
TFA	Trifluoressigsäure
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan

Abkürzungsverzeichnis

UDP	Uridindiphosphat
UGT	UDP-Glucuronosyltransferase
u.v.a.	und viele andere
UV	Ultraviolett
v.a.	vor allem
V	Volumen
v/v	Volumen/Volumen-Verhältnis
Vf	Verdünnungsfaktor
vgl.	vergleiche
VIS	sichtbares Licht (in der Spektroskopie)
z.B.	zum Beispiel

Zusammenfassung

Bei den Bioaktivitätsstudien von Betalain-Farbstoffen sowie von Kaktusfeigen- (*Opuntia ficus indica*) Extrakt standen mit Indicaxanthin und Betanin die beiden wichtigsten Vertreter der Betalaine im Vordergrund.

Die Durchführung der Studien erfolgte in folgenden Schritten:

- Isolierung der Referenzsubstanzen Betanin und Indicaxanthin sowie Herstellung von Kaktusfeigen-Extrakt und daraus gewonnener Fraktionen,
- Untersuchung der Cytotoxizität von Betanin, Indicaxanthin und Kaktusfeigen-Extrakt in humanen permanent Zell-Linien,
- Beeinflussung der Apoptose und des Zellzyklus durch Betanin, Indicaxanthin und Kaktusfeigen-Extrakt in humanen permanent Zell-Linien,
- Beeinflussung von Enzymen des Fremdstoffmetabolismus durch Betanin, Indicaxanthin und Kaktusfeigen-Extrakt in humanen permanent Zell-Linien.

Die Gewinnung von Indicaxanthin (aus Kaktusfeigen), Betanin (aus Rote Beete-Konzentrat) sowie Kaktusfeigen-Extrakt erfolgte anhand literaturbekannter Methoden.

Die mit der Trypanblau-, MTS- und Neutralrotmethode ausgeführten Cytotoxizitätsstudien wurden in humanen permanent Zell-Linien aus dem Gastrointestinaltrakt (HT29 und Caco2) und der Leber (HepG2) durchgeführt. Für Betanin wurde in Caco2-Zellen ein IC₅₀-Wert von 100 µM (72 h Inkubation) ermittelt. In HT29-Zellen war eine signifikante Proliferationshemmung um ca. 30 % feststellbar. Für Indicaxanthin war – bei schwacher proliferationshemmender Wirkung – kein IC₅₀-Wert determinierbar. Die Versuche mit HT29- und Caco2- sowie HepG2-Zellen zeigten eine signifikante, mit steigender Konzentration zunehmende Proliferationshemmung durch methanolischen Kaktusfeigen-Extrakt (72 h Inkubation). Die beobachteten IC₅₀-Werte lagen bei 4,8 mg/ml (Caco2) und 8 mg/ml bzw. 9 mg/ml in (HepG2- bzw. HT29-Zellen).

Da nach Inkubation von HT29-, Caco2- und HepG2-Zellen mit Kaktusfeigen-Extrakt-Fractionen im Gegensatz zu den Versuchen mit Gesamtextrakt keine Proliferationshemmung beobachtet wurde, liegt der Gedanke einer synergistischen Wirkung der Extraktbestandteile nahe, wie er in der Literatur am Beispiel von Rotweinpolyphenolen bereits experimentell belegt worden ist.

In nachfolgenden Studien an HT29- und Caco2-Zellen wurde das Auftreten von Apoptose und die Beeinflussung des Zellzyklus untersucht. Für beide Phänomene war jedoch keine Beeinflussung durch Kaktusfeigen-Extrakt oder Betanin und Indicaxanthin festzustellen. Da weder in HT29-, noch in Caco2-Zellen Apoptose oder ein Zellzyklusblock nachweisbar waren, musste davon ausgegangen werden, dass die beobachtete Proliferationshemmung durch eine Verlängerung der Generationszeit der behandelten Zellen verursacht wurde. Eine andere Erklärung ist in einer durch die Testsubstanzen ausgelösten Differenzierung der Zellen zu sehen, wodurch diese ihre Teilungsfähigkeit verlieren und spezielle Eigenschaften erlangen.

Die Beeinflussung von Enzymen des Fremdstoffmetabolismus (Phase I- und Phase II-Enzyme) in HT29- und Caco- Zellen durch Betanin, Indicaxanthin und Kaktusfeigen-Extrakt wurde anhand der Enzymaktivität der Phase-II-Enzyme Glutathion-S-Transferase (GST), UDP-Glucuronosyltransferase (UGT), Sulfotransferase (SULT) und der Phase-I-Enzyme Cytochrom P450-Monooxygenase und NAD(P)H:Chinon-Oxidoreduktase (NQO) untersucht. Es wurde mit zwei verschiedenen Messparametern gearbeitet: a) Isolierung der das jeweilige Enzym codierenden mRNA und b) Bestimmung der Enzymaktivität mittels eines Standardsubstrats. Bei den Experimenten in den Zellkulturen konnte keine Beeinflussung der mRNA-Expression der Cytochrom P450-Isoenzyme 2c, 3A4 und 3A5, der Cyclooxygenase II und der Glutathion-S-Transferase μ 3 beobachtet werden. Bei den Aktivitätsstudien mit GST, UGT, SULT und NQO-1 wurde hingegen eine Beeinflussung der Enzymaktivität durch die Testsubstanzen festgestellt. Im Einzelnen wurde durch Kaktusfeigen-Extrakt in Caco2-Zellen die GST- (+195%) und die UGT- (+550%) Aktivität konzentrationsabhängig gesteigert.

Auch das als Positivkontrolle eingesetzte tert. Butylhydrochinon (TBHQ) induzierte die GST (+78%) und die UGT (+70%) in Caco2-Zellen. Die NQO-1- und die SULT-Aktivitäten ließen sich in Caco2-Zellen durch Kaktusfeigen-Extrakt und TBHQ nicht signifikant beeinflussen.

In HT29-Zellen wurde durch Kaktusfeigen-Extrakt keine Zunahme der GST-Aktivität beobachtet, während TBHQ eine Aktivitätszunahme um +35% verursachte. Die UGT-Aktivität wurde, ebenso wie die SULT- und NQO-1-Aktivitäten, in HT29-Zellen durch Kaktusfeigen-Extrakt nicht signifikant beeinflusst.

Zusätzlich wurden in HT29-Zellen noch Betanin und Indicaxanthin getestet. Indicaxanthin steigerte die UGT-Aktivität um +70%, hatte aber keinen Einfluss auf die NQO-1-Aktivität. Betanin bewirkte eine Verringerung der UGT-Aktivität (-80%). Die NQO-1-Aktivität stieg bei Inkubation mit 25 µM Betanin an, um mit höheren Konzentrationen wieder auf das Niveau der Kontrolle (100%) zu sinken. Da der Betanin-gehalt im eingesetzten Kaktusfeigen-Extrakt nur zwei Drittel der im Einzeltest wirksamen Betanin-Konzentration betrug, ist es möglich, dass die Wirkung von Betanin auf die UGT- und die NQO-1-Aktivitäten im Kaktusfeigen-Extrakt von anderen bioaktiven Substanzen überdeckt wurde.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass Kaktusfeigen-Extrakt und Betanin einen schwachen hemmenden Einfluss auf die Proliferation von HT29-, Caco2- und HepG2-Zell-Linien haben und außerdem in HT29- und Caco2-Zellen die Aktivität von Phase II-Enzymen steigern können. Zur Anwendung als bioaktiv wirksame Substanzen sind sowohl Kaktusfeigen-Extrakt als auch Betanin damit nicht geeignet. Umgekehrt belegen die erarbeiteten Ergebnisse, soweit dies anhand der eingesetzten Methodik beurteilbar ist, die gesundheitliche Unbedenklichkeit des Kaktusfeigen-Extrakts sowie von Betanin und Indicaxanthin.

Summary

For the bioactivity studies of betalain colorants and prickly pear extracts the most important members of the betalain family, i.e. betanine and indicaxanthine, were in the center of interest.

The studies were conducted as follows:

- Isolation of the reference substances betanine and indicaxanthine as well as the preparation of the prickly pear extract and fractions herefrom,
- study of the cytotoxicity of betanine, indicaxanthine and prickly pear extract in human permanent cell cultures,
- study of the influence of betanine, indicaxanthine and prickly pear extract on apoptosis and cell cycle in human permanent cell cultures,
- study of the influence of betanine, indicaxanthine and prickly pear extract on enzymes of the xenobiotic metabolism in human permanent cell cultures.

The preparation of indicaxanthine (from prickly pear fruits), betanine (from red beet concentrate) and prickly pear extract was carried out on the basis of published methods.

The cytotoxicity assays performed with the trypanblue-, MTS- and neutralred method were conducted in human permanent cell-lines from the gastrointestinal tract (HT29 and Caco2) and the liver (HepG2). For betanine used in Caco2 cells an IC₅₀-value of 100 µM (72 h incubation) was determined. In HT29 cells a significant inhibition of cell proliferation by 30% was detectable. Although indicaxanthine caused a weak inhibition of cell proliferation no IC₅₀-value was measurable. The experiments with HT29 and Caco2 as well as HepG2 cells showed a significant, with increasing concentration growing, inhibition of cell proliferation through prickly pear extract (72 h incubation). The detected IC₅₀-values were 4,8 mg/ml (Caco2) as well as 8 mg/ml and 9 mg/ml (HepG2 and HT29 cells, respectively).

In contrast to the experiments with the whole extract, we detected no inhibition of cell proliferation after incubation of HT29, Caco2 and HepG2 cells with prickly pear extract fractions. From this data we proposed that synergistic effects of extract components were responsible for this behaviour. A similar behaviour has already been proven in experiments with polyphenols from red wine.

In Addition we performed further studies with HT29 and Caco2 cells looking for apoptosis and changes in the cell cycle. For both phenomena neither an effect of prickly pear extract nor of betanine and indicaxanthine was detectable. Due to the lack of apoptosis or of cell cycle changes, the detected inhibition of cell proliferation could be caused by an increasing generation time of the treated cells. Another explanation could be found in the differentiation of the treated cells, through which they loose the ability to proliferate and gain specific properties.

Enzymes from the xenobiotic metabolism system, the phase I enzymes Cytochrome P450 monooxygenase (CYP) and NAD(P)H:Quinone-oxidoreductase-1 (NQO-1) and the phase II enzymes Glutathione-S-transferase (GST), UDP-Glucuronosyltransferase (UGT), Sulfotransferase (SULT), were examined in HT29 and Caco2 cells. For the measurement of the enzyme activity two methods were used: a) the isolation of the specific enzyme coding mRNA and b) the direct measurement of the enzymatic activity via a standard substrate. During the experiments in cell cultures no influence on the mRNA expression of CYP-isoenzymes 2c, 3A4 and 3A5, on Cyclooxygenase II and on GST μ 3 could be detected. However, in enzyme activity studies with the enzymes GST, UGT, SULT and NQO-1 an influence of the test compounds betanine, indicaxanthine and prickly pear extract on the enzyme activity was found. In detail prickly pear extract induced GST activity (+195%, 10 mg/ml) and UGT activity (+550%, 10 mg/ml) in Caco2 cells. The positive control tert. Butylhydroquinone (TBHQ) induced GST in Caco2 cells by +78% (80 μ M) and UGT in these cells by +70% (40 μ M). SULT and NQO-1 activities were not affected by prickly pear extract and TBHQ in Caco2 cells. In HT29 cells no induction of GST activity through prickly

pear extract was observed, but still TBHQ induced a higher GST activity (+35%). UGT, SULT and NQO-1 activities were not influenced by prickly pear extract in HT29 cells.

In further experiments we examined betanine and indicaxanthine in HT29 cells. We found that indicaxanthine increased the UGT activity by +70% (360 μ M) but did not effect the NQO-1 activity. However betanine (100 μ M) altered the UGT activity by -80%. In contrast thereto the NQO-1 activity increased after incubation with 25 μ M betanine and fell back to normal activity levels when incubated with higher concentrations.

Because in HT29 experiments the betanine concentration in the prickly pear extract was two thirds from the effective concentration in the isolated test, it was possible that the effect of betanine was overridden by other bioactive extract components.

So it can be summarised that betanine and prickly pear extract showed a weak inhibiting effect on cell proliferation of HT29, HepG2 and Caco2 cells and further had an effect on the phase II enzyme activity in HT29 and Caco2 cells. Thus prickly pear extract as well as betanine are not appropriate for the use as bioactive substances. On the other hand the safety of prickly pear extract and betanine and indicaxanthine was proven by the presented results, as far as it can be judged from the used methods.

A Einleitung und Problemstellung

In den vergangenen Jahren haben sich zunehmend wissenschaftliche Hinweise ergeben, dass die Ernährung eine maßgebliche Rolle bei der Entstehung von Krankheiten wie Fettleibigkeit, Herz-Kreislaufkrankungen und Krebs spielt (World Cancer Research Fund 1997 (dt. Kommentar: Boeing und Kroke 1999), WHO 2002, WHO 2003). Als Folge dieser Erkenntnisse war der ernährungsphysiologische Nutzen von Lebensmitteln neu zu definieren. Damit ist gemeint, nicht länger nur den in der Nahrung enthaltenen Anteil lebensnotwendiger (primärer) Nährstoffe, wie z.B. Kohlenhydrate, Fette, Proteine und Vitamine zu beachten, sondern auch den Gehalt an anderen Inhaltsstoffen, wie z.B. Ballaststoffe und Antioxidantien, die für den Erhalt der Körperfunktionen nicht essentiell sind, diese aber günstig beeinflussen können. Solche Lebensmittelinhaltsstoffe ohne Nährstoffcharakter werden oft als „bioaktive Substanzen“ bezeichnet, wobei dieser unspezifische Begriff eine Wirkfunktion dieser Substanzen auf den menschlichen Organismus zum Ausdruck bringen soll.

Wissenschaftliche Studien zum ernährungsphysiologischen Nutzen von Lebensmitteln, z.B. zur Vorbeugung von Krebs oder Herz-Kreislaufkrankungen (*cardiovascular disease* - CVD), gewannen in den letzten Jahrzehnten an Bedeutung, da sich diese Krankheiten zu einem gesellschaftlichen Problem vor allem der Industrieländer, in zunehmendem Maße aber auch der Schwellenländer, entwickelt haben (WHO 2003). Solche Untersuchungen werden im Allgemeinen unter dem Schlagwort „Bioaktivitätsstudien“ zusammengefasst. Dieser Oberbegriff wird häufig mit dem Begriff „Chemoprävention“ in Zusammenhang gebracht. Damit wird zum Ausdruck gebracht, dass mittels chemisch wirkender Lebensmittelinhaltsstoffe ein vorbeugender Schutz vor Erkrankungen möglich sein kann.

Dies hatte man für den Verzehr von Obst und Gemüse durch die Auswertung von 156 epidemiologischen Studien aus 17 Ländern durch das National Cancer Institute der USA belegt. Die Studienauswertung erbrachte die Erkenntnis, dass ein hoher Anteil Obst und Gemüse in der Ernährung der Vorbeugung von Krebserkrankungen dienen kann (Steinmetz und Potter 1991 a+b, Block et al. 1992).

In der Folge legte der World Cancer Research Fund 1997 einen Bericht vor, in dem festgestellt wurde, dass Obst und Gemüse die Ernährungsfaktoren mit dem größten tumorprotektiven Effekt sind. Der Bericht bewertet die Tumorprotektion von Obst und Gemüse als evident zur Vermeidung der Tumorentstehung z.B. der Lunge, des Magens oder des Kolons (Boeing und Kroke 1999). Neuere Studien bestätigen die prinzipielle Aussage einer Krebsprävention durch eine ausgewogene Ernährung (Gaßmann und Frankhänel 2001; Kampman 2003). Den aktuellsten Beleg für diese These erbrachten Studien auf der Grundlage einer vergleichenden Risikoanalyse (*engl.* comparative risk assessment, CRA), die ergaben, dass durch den Verzehr von 600 g Obst und Gemüse pro Tag (Erwachsene) weltweit das Risiko, an CVD zu erkranken, um ca. 30% und das Risiko, an Krebs zu erkranken, um ca. 2-20% (je nach Krebsart) gesenkt werden könnte (Lock et al. 2004).

In allen Industrienationen zählen global nach wie vor das Rauchen (mit 21% der Krebstoten) und der Konsum von Alkohol neben Übergewicht und Fettleibigkeit, gepaart mit geringem Verzehr von Obst und Gemüse, zu den zentralen Risikofaktoren für die Entstehung von Krebserkrankungen (Ezzati et al. 2005). Eine Risikominimierung kann nach Ezzati und Mitarbeiter in der Reduzierung der oben genannten Risikofaktoren kombiniert mit erhöhtem Verzehr von Obst und Gemüse und körperlicher Bewegung bestehen.

Es muss jedoch nach gängiger aktueller Datenlage davon ausgegangen werden, dass bis heute kein ausreichender epidemiologischer Zusammenhang zwischen der Reduzierung einzelner Krebsarten und einem erhöhten Ballaststoff-Verzehr (Park et al. 2005) oder dem Verzehr von sekundären Pflanzenstoffen wie Polyphenolen (Scalbert et al. 2005) existiert.

Bezüglich CVD ist die Weltgesundheits-Organisation (WHO) nach der Auswertung mehrerer Studien zu ähnlichen Ergebnissen gekommen: Eine an Obst und Gemüse reiche Ernährung hat eine große Evidenz zur Blutdrucksenkung und verringert auf diese Weise das CVD-Risiko. Bezüglich der Beeinflussung anderer Risikofaktoren wie z.B. die Cholesterinsenkung werden zur Zeit noch Studien durchgeführt und ausgewertet (WHO 2003).

Als Folge dieser epidemiologischen Erkenntnisse wurden in den USA und später auch in Europa Kampagnen mit dem Ziel durchgeführt, den Obst- und Gemüseverzehr zu steigern. So sollen die Bürger fünf mal am Tag Obst oder Gemüse in beliebiger Form zu sich nehmen, um Krankheiten wie Krebs und CVD vorzubeugen. Allerdings sollte dadurch die Gesamtkalorienzufuhr nicht gesteigert werden, um Fettleibigkeit zu vermeiden.

Spätestens seit 1991 wird die gesundheitliche Bedeutung von Obst und Gemüse, die über deren Gehalt an Vitaminen hinaus geht, verstärkt erforscht. Durch unterschiedliche Bioaktivitätsassays wurden Verbindungen aus verschiedenen chemischen Gruppen, z.B. Ballaststoffe¹, Isothiocyanate², Polyphenole³ und Carotinoide⁴, als ernährungsphysiologisch wertvolle Verbindungen identifiziert (Kris-Etherton 2002). Die Studien zeigen allerdings auch, dass nicht alle Verbindungen dieser Gruppen die gleichen positiven Wirkungen haben (Römpf online 2006). Daher ist eine detaillierte Untersuchung der potentiell chemopräventiven Substanzen zum einen wegen der Struktur-Wirkungs-Beziehungen (*engl.* structure activity relationship, SAR) wichtig, zum anderen müssen die Grenzen der Unbedenklichkeit dieser Verbindungen aufgezeigt werden⁵. Dies wird umso wichtiger, da inzwischen nicht nur traditionelle Nahrungspflanzen, sondern auch viele exotische Pflanzen auf das Vorkommen bioaktiver Verbindungen untersucht werden.

¹ Im Dünndarm unverdauliche Polysaccharide, die den Verdauungsbrei viskos halten (=physikalische Wirkung); werden von der Dickdarmflora verwertet (Prebiotika); dadurch entstehen z.B. kurzkettige Fettsäuren wie Butyrat, durch welches Darmzellen beeinflusst werden können (=chemische Wirkung) (Römpf online 2006).

² sog. Senföle; Abbauprodukte der v.a. in Kohlgemüse (Brassicaceen und Cruciferen) enthaltenen Glucosinolate; Aktivierung von Phase I und Phase II – Enzymen des Fremdstoffmetabolismus (Römpf online 2006).

³ in praktisch allen pflanzlichen Lebensmitteln vorkommende natürliche Antioxidantien (Römpf online 2006)

⁴ in vielen pflanzlichen und wenigen tierischen Lebensmitteln vorkommende Antioxidantien (Römpf online 2006)

⁵ z.B. wirken Isothiocyanate in größeren und regelmäßigen (mehrmals pro Woche) Mengen goitrogen (kropfbildend) (Römpf online 2006).

Den oben genannten Obst- und Gemüseinhaltsstoffen ist mit Ausnahme der Ballaststoffe gemeinsam, dass sie in die große Gruppe der pflanzlichen Sekundärmetabolite (sekundäre Pflanzenstoffe, SPS) eingeordnet werden.

Die SPS entstammen dem Sekundärstoffwechsel, in dem Reaktionen katalysiert werden, die im Gegensatz zum Primärstoffwechsel, in dem alle lebensnotwendigen Reaktionen ablaufen, nicht dem Energiegewinn oder der Synthese von neuem Gewebe dienen. Während der Sekundärmetabolismus als taxonomisches Merkmal für die Unterteilung in Stämme, Gattungen, Arten oder – seltener – ganze Pflanzenfamilien herangezogen werden kann, verläuft der Primärstoffwechsel bei vielen Organismen im Wesentlichen gleich.

Eine klare Abgrenzung der beiden Stoffwechselsysteme ist allerdings nicht möglich, da die Synthese der SPS in der Regel von Primärmetaboliten ausgeht, und viele Enzyme des Primärstoffwechsels, quasi als Nebenaktivität, diese Synthesen katalysieren (Nuhn 1997, Römpf online 2006).

Die Biosynthese von SPS lässt sich aus einer geringen Anzahl von Primärmetaboliten, z.B. α -Aminosäuren, Acetyl-Coenzym A, (R)-Mevalonsäure und Intermediaten des Shikimisäure-Wegs ableiten. Die SPS werden je nach Ausgangsverbindung in isoprenoide (z.B. aus Mevalonsäure), aromatische (Shikimisäure-Weg in Pflanzen, Polyketid-Weg in Mikroorganismen) und alkalische Verbindungen gegliedert. Davon gesondert stehen Kohlenhydrate. Oligopeptide werden wegen des enthaltenen Stickstoffs in Untergruppen der Alkaloide eingeteilt. Tabelle A-1 gibt eine Übersicht über die Einteilung ausgewählter SPS nach ihrer chemischen Herkunft.

Tabelle A-1 Auflistung einiger bedeutender sekundärer Pflanzenstoffe nach ihrem Biosyntheseweg (Nuhn 1997).

Isoprenoide SPS	Aromatische SPS	Alkaloide SPS	Kohlenhydrat SPS
Carotinoide	Polyphenole	Xanthinderivate	Fructane
Apocarotinoide	Phytoöstrogene	Betalaine	Pektine
Terpene		Lectine	Schleimstoffe

Für Pflanzen, Pilze oder Tiere⁶ hat die Bildung von Sekundärmetaboliten vielfältige vorteilhafte Funktionen. Diese können für deren Alltag, die Fortpflanzung und allgemein für die Evolution der Arten wichtig sein (Harborne 2000, Singh 2003).

Hierzu zählen:

- Abwehrreaktion nach außen (Fraßverhinderung durch Phytoalexine),
- Angriffsreaktion nach außen (Hemmung von Konkurrenten, z.B. Walnuss),
- Kommunikation (Lockstoff, Wachstums- oder Reifehormone, z.B. Ethylen),
- zufällige Entstehung neuer Enzyme (akzidentielle Synthese),
- Verwertung überschüssiger Zwischenprodukte mit Hilfe von Enzymen,
- im Rahmen der Phylogenese unabgeschlossener Selektionsvorgang.

Die zahlreichen SPS wurden und werden vom Menschen vielfältig verwendet, z.B. als Gift, Aromastoff und Würzmittel, pflanzliches Arzneimittel (Phytopharmakon) sowie als Farbstoff, wie z.B. die Anthocyane oder die Betalaine.

Die Anthocyane sind glykosidisch vorliegende Pflanzenfarbstoffe, die bei Früchten z.B. aus roten Weintrauben und Heidelbeeren bekannt sind. Chemisch gehören sie zur Gruppe der Polyphenole (Römpp online 2006). Ebenfalls zu den SPS gehören die Betalaine, das sind stickstoffhaltige Farbstoffe, die z.B. aus der Roten Beete und aus den Blüten und den Früchten von Kakteen bekannt sind. Am Beispiel der Anthocyane und der Betalaine zeigt sich die taxonomische Bedeutung der SPS, da sich die Anthocyane und Betalaine in Pflanzen gegenseitig ausschließen. Die Aufgaben, die die beiden Farbstoffklassen in der Pflanze erfüllen, sind nicht vollständig geklärt, scheinen aber ähnlich zu sein. Hierzu gehören die Lockfunktion durch auffällige Färbung und Abwehrmechanismen gegen Fraßfeinde und Parasiten (Delgado-Vargas et al. 2000).

Für eine chemopräventive Bedeutung sowohl der Anthocyanidinglykoside (Anthocyane) als auch Anthocyanaglykone sprechen die Ergebnisse vieler *in vivo*-, *ex vivo*- und *in vitro*-Studien. Mit *in vitro*- und *ex vivo*-Studien wurden z.B. antioxidative

⁶ Tiere produzieren vielfältige Sekundärmetaboliten z.B. Gifte zur Abwehr von Fraßfeinden oder Farbstoffe zur Tarnung (Nuhn 1997)

Eigenschaften der Anthocyane oder ihr Einfluss auf zelluläre Wachstumsfaktoren ermittelt (Pool-Zobel et al. 1999, Delgado-Vargas et al. 2000; Römpp online 2006; Marko et al. 2004). Durch *in vivo*-Studien wurde die Bioverfügbarkeit von Anthocyanen im Menschen sowie der Anstieg der antioxidativen Kapazität im Blutplasma nach Anthocyan-Aufnahme untersucht (Scalbert und Williamson 2000, Matsumoto et al. 2001, Manach et al. 2005).

Wegen der taxonomischen Bedeutung dieser beiden SPS und ihren ähnlichen Aufgaben in Pflanzen liegt die Frage nahe, ob Betalaine für den Menschen ebenfalls ernährungsphysiologisch von Bedeutung sind. Die ersten analog zu Studien mit Anthocyanen durchgeführte Versuche deuten jedenfalls auf chemopräventive Eigenschaften der Betalaine hin (siehe Kapitel B–4.2).

Allerdings bleibt in der Literatur im Falle der Betalaine die Frage unbeantwortet, ob die an isolierten Substanzen beobachtete Wirkung auch bei Verwendung der ganzen Frucht in gleichem Maße auftritt. Diese Frage ist von großer Bedeutung, da die Chemoprävention nicht durch den Verzehr von Pflanzenextrakten und -konzentraten, die bioaktive Substanzen enthalten, sondern durch den üblichen Verzehr von Obst und Gemüse im Rahmen einer ausgewogenen und abwechslungsreichen Ernährung erreicht werden soll⁷ (vgl. die 5 am Tag-Kampagne).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte die Bioaktivität der Betalaine näher untersucht werden. Als Betalainquelle wurden Früchte von *Opuntia ficus indica* (deutsch: Kaktusfeige, englisch: Prickley Pear), eine Gattung aus der Familie *Cactaceae* eingesetzt. Diese wasserreichen, mild schmeckenden Früchte werden in mediterranen Ländern sowie in ihrem Heimatland Mexiko häufig verzehrt und sind auch in Deutschland aus dem Obstsortiment nicht mehr wegzudenken.

⁷ z.B. verfügt der Gesetzgeber, dass auf Nahrungsergänzungsmitteln (NEM), von denen viele auf pflanzlichen Extrakten basieren und die der Chemoprävention dienen sollen, Hinweise angebracht werden müssen, nach denen eine ausgewogene Ernährung nicht durch NEM ersetzt werden kann (§ 4 Abs. 2 Satz 1 Nahrungsergänzungsmittelverordnung vom 24.Mai 2004, BGBl I S. 1011).

Mit *in vitro*-Methoden waren die aus Kaktusfeigen isolierten Farbstoffe, die Betalaine Indicaxanthin und Betanin sowie der Direktsaft der Kaktusfeigen und daraus gewonnene Fraktionen in Zellkulturen zu untersuchen.

Als *in vitro*-Testsystem dienten verschiedene permanente humane Krebs-Zell-Linien, wie HT29, Caco2 und HepG2.

Als biologische Endpunkte wurden

1. toxikologische Parameter, wie die Wachstumshemmung und die Induktion von Apoptose,
2. die Beeinflussung von Enzymsystemen, vor allem des Phase II – Fremdstoffmetabolismus

untersucht.

Zellkulturstudien sind neben Versuchen zur Charakterisierung der antioxidativen Eigenschaften die ersten Schritte zur Identifikation bioaktiver Substanzen.

Über die Bedeutung von Bioaktivitätsstudien und der Strategie bei deren Durchführung sowie über die an Kaktusfeigen gewonnenen Ergebnisse informieren die weiteren Kapitel.

B Kenntnisstand

1 Bioaktivitätsstudien

Der Begriff Bioaktivität bezeichnet alle denkbaren, positiven wie negativen, Wechselwirkungen einer Substanz mit ihrer Umwelt. Diese Wechselwirkungen werden in verschiedenen wissenschaftlichen Disziplinen mit unterschiedlichen Ansätzen untersucht. In den „Lebenswissenschaften“, darunter fallen z.B. die Ernährungswissenschaft, Biochemie, Medizin, Toxikologie, Pharmazie und Lebensmittelchemie, haben Bioaktivitätsstudien eine große Bedeutung. Wichtige Anwendungsgebiete für Bioaktivitätsstudien sind z.B. die Toxikologie⁸ und die Pharmazie⁹.

Seit man erkannt hatte, dass eine an Obst und Gemüse reiche Ernährung der Vorbeugung von Krankheiten, wie Krebs und Herz-Kreislaufkrankungen dienen könnte (Steinmetz und Potter 1991 a+b, Block et al. 1992), wurden vermehrt Studien zum ernährungsphysiologischen Nutzen und damit zum chemopräventiven Potential von meist pflanzlichen Lebensmitteln bzw. bestimmter Inhaltsstoffe durchgeführt. Bioaktivität wird in diesem Zusammenhang mit chemopräventiven Eigenschaften gleich gesetzt. Allerdings sollte dabei nicht vergessen werden, dass Bioaktivität prinzipiell „in zwei Richtungen weist“ und nicht zwangsläufig „gut“ sein muss.

Die Chemoprävention hingegen ist immer „gut“. Schon 1979 wurde Chemoprävention als ein Prozess, der Krebs in der prämaligen Phase inhibieren, verlangsamen oder zurückbilden, ja die ganze Krebsentstehung zurückdrängen soll, definiert (Sporn und Newton, 1979). Erreicht werden soll dies durch nicht-toxische Lebensmittel oder Pharmazeutika.

Inzwischen umfasst die Chemoprävention auch die Vorbeugung anderer Krankheiten oder Belastungen des Organismus wie Herz-Kreislaufkrankungen (*cardiovascular disease* - CVD) und oxidativen Stress sowie dadurch hervorgerufene Schäden (Römpf online 2006).

⁸ z.B. Studien zum Vorkommen, zum Verzehr und zur Wirkung von pflanzlichen/bakteriellen Toxinen, Pestiziden und anderer Kontaminanten und antinutritiver Substanzen

⁹ Studien zur Identifikation, zur Kinetik und zum Wirkprofil von Pharmaka

Als chemopräventiv werden Verbindungen bezeichnet, die im Körper z.B. Reparaturmechanismen induzieren, in geschädigten Zellen Apoptose (Kapitel B-2.4) auslösen, schädliche Substanzen abfangen oder in anderer Form zu deren Inaktivierung bzw. zur Vermeidung von Zellschäden beitragen können. Allerdings kann nicht pauschal ausgeschlossen werden, dass hohe Dosen chemopräventiver Verbindungen nicht auch unerwünschte Reaktionen begünstigen oder auslösen.

Wissenschaftler gehen dieses Problem mit aus der Pharmakologie bekannten Nutzen/Risikobetrachtungen an. Stopper und Mitarbeiter (2005) haben z.B. publizierte Studien zur Genotoxizität einiger Flavonoide, Isoflavonoide und Anthocyane wie u.a. Resveratrol, Quercetin, Fisetin, Genistein und Pelargonidin ausgewertet. Sie fanden, dass einige dieser Verbindungen *in vitro* ein genotoxisches Potenzial aufweisen und schlossen daraus, dass die Einnahme großer Mengen solcher Verbindungen in konzentrierter Form ohne weitere Untersuchung ihrer toxikologischen Eigenschaften nicht empfohlen werden kann.

Mennen et al. (2005) empfehlen den Verzehr polyphenolreicher Nahrungsergänzungsmittel in Mengen, die so viele Polyphenole zuführen wie durch den Verzehr von Trauben, Wein oder Sojaprodukten erreichbar wäre. Die Autoren gehen davon aus, dass in diesem Konzentrationsbereich keine oder vernachlässigbare, unerwünschte Effekte auftreten. So sind von einigen Polyphenolen schädliche Einflüsse auf den menschlichen Körper wie die Schilddrüsenfunktion, die Eisenaufnahme oder die Nierenfunktion bekannt.

Bei der Chemoprävention werden zwei Wege unterschieden. Erstens die primäre Chemoprävention, die das Entstehen von Krankheiten verhindern soll und zweitens die sekundäre Chemoprävention, die das Voranschreiten (die sog. Progression) von Krankheiten eindämmen soll. Mögliche Angriffspunkte der primären Chemoprävention sind u.a. Transportvorgänge in und zwischen Zellen, der Zellmetabolismus, das Zellwachstum (Proliferation) oder die Stabilisierung der DNA-Struktur im Zellkern. Angriffspunkte der sekundären Chemoprävention sind u.a. die Apoptose, die Signalweiterleitung zwischen verschiedenen Zellen und Geweben oder anti-

entzündliche (antiinflammatorische) Vorgänge. In Tabelle B-1 sind einige Angriffspunkte der Chemoprävention aufgelistet (Knasmüller et al 1998, Gaßmann und Frankhänel 2001, Krzystyniak et al. 2002, Mersch-Sundermann et al. 2004, DeFlora und Ferguson 2005).

Tabelle B-1 Zuordnung wichtiger chemopräventiver Effekte (DeFlora und Ferguson 2005).

Primäre Chemoprävention	Sekundäre Chemoprävention
Transmembrantransport	Apoptose
Metabolismus	Antiinflammatorische Aktivität
Abfangen reaktiver Verbindungen	Signaltransduktion
Proliferationshemmung	Inhibierung von Proteasen
Erhalt der DNA-Struktur	Proliferationshemmung
Verändern von Reparaturmechanismen	Zelldifferenzierung
Beeinflussung der Gen-Expression	Abfangen genotoxischer Verbindungen

Bioaktivitätsstudien zur Chemoprävention bauen auf den schon bekannten Methoden und Ansätzen der o.a. „Lebenswissenschaften“ auf, verbinden sie und entwickeln neue Vorgehensweisen. So können z.B. Experimente, die ursprünglich dem Nachweis von toxischen Verbindungen dienten, durch Co- oder Pre-Inkubation mit sekundären Pflanzenstoffen (SPS) zur Identifikation von chemopräventiv wirksamen Substanzen genutzt werden. Wenn durch die Co- oder Pre-Inkubation mit SPS das Ausmaß der Schäden verringert werden kann, so ist ein chemopräventiver Effekt zu vermuten (Knasmüller et al. 2002).

Diese Verbindung lebensmittelchemischer, toxikologischer und pharmakologischer Methoden und Denkansätze in Chemopräventionsstudien führt zum Grenzübergang zwischen Lebensmitteln¹⁰ und Arzneimitteln¹¹, da vielfach SPS untersucht werden,

¹⁰ gemäß § 2 Abs. 2 Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuch sind Lebensmittel Lebensmittel im Sinne des Artikels 2 der Verordnung EG 178/2002, also Stoffe, die dazu bestimmt sind, in verarbeitetem, teilweise verarbeitetem oder rohem Zustand vom Menschen aufgenommen zu werden, oder von denen dies nach vernünftigem Ermessen zu erwarten ist (BGBl. I, Nr. 55, S. 2618 vom 01.09.2005).

die bislang wenig oder keine Rolle als Lebensmittel spielten, oder weil die untersuchten Parameter einen pharmazeutischen Charakter haben, also zur Therapie von Krankheiten dienen können.

Ein Beispiel hierfür sind die in „Rotem Reis“¹² enthaltenen Statine, die durch die Fermentation von Reis mit dem Pilz *Monascus purpureus* entstehen. Diese Pilzstatine werden als Monacoline bezeichnet, und eine Verbindung, das Monacolin K, ist mit dem als verschreibungspflichtigen Cholesterinsenker eingesetzten Arzneimittelwirkstoff Lovastatin strukturell identisch (Dubbels 2002). Aus diesem Grund und weil bei der Fermentation von Rotem Reis auch das Toxin Citrinin gebildet wird und damit die Unbedenklichkeit der farbgebenden Pigmente noch nicht gesichert ist, werden Lebensmittel, die mit „Rotem Reis“ gefärbt wurden, in Europa kritisch und in den USA zum Teil als Arzneimittel betrachtet (Becker-Brüser et al. 2001).

In diesem Zusammenhang muss auch berücksichtigt werden, dass große regionale Unterschiede bei der Zusammensetzung der Nahrung bestehen. Lebensmittel, die in asiatischen, afrikanischen oder südamerikanischen Ländern traditionell zur Vermeidung von Krankheiten verzehrt werden, werden von den Behörden und Wissenschaftlern in „westlichen“ Kulturen häufig kritisch betrachtet, da aus ihrer Sicht unklar ist, wie sich ein gesteigerter Verzehr auf gesundheitlich auswirken könnte.

Als Beispiel für den Einfluss von Bioaktivitätsstudien auf die Lebensmittelproduktion und damit auf die Konsumenten kann die Gruppe der Phytosterine wie z.B. Stigmasterin oder β -Sitosterin¹³ angeführt werden. Der cholesterinsenkende Effekt dieser SPS ist durch wissenschaftliche Studien belegt worden (Colgan et al. 2004; Katan et al. 2003), was dazu führte, dass Phytosterine im industriellen Maßstab in Margarine (als Novel Food) eingearbeitet wurden.

¹¹ gemäß § 2 Abs. 2 Satz 1 Arzneimittelgesetz sind Arzneimittel Stoffe oder Zubereitungen, die dazu bestimmt sind, Krankheiten, Leiden, Körperschäden oder krankhafte Beschwerden zu heilen, zu lindern, zu verhüten oder zu erkennen (BGBl. I Nr. 73 S. 3394 vom 15.12.2005).

¹² wird in asiatischen Ländern in vielfach zum Färben von Lebensmitteln eingesetzt (Dubbels 2002)

¹³ kommen in vielen Pflanzen vor; in größeren Mengen (ca. 500mg/100g) in Sonnenblumenkernen und Sesamsaat sowie unraffiniertem Sojaöl (Watzl et al. 2001)

Da es für die Forschung nicht von Bedeutung ist, ob ein pflanzlicher Wirkstoff später als Lebensmittel oder Arzneimittel vermarktet wird - die meisten Ergebnisse werden prophylaktisch patentiert - soll die Abgrenzung Lebensmittel/Arzneimittel hier nicht weiter diskutiert werden.

Neben der Umsetzung in marktfähige Produkte haben Bioaktivitätsstudien mit Lebensmittelinhaltsstoffen und kompletten Lebensmitteln mittel- bis langfristigen Einfluss auf die Ernährung der Bevölkerung, da die Ernährungsempfehlungen der Fachverbände auf solchen Studien basieren. So ist z.B. die „5 am Tag“ – Kampagne u.a. von der Deutschen Gesellschaft für Ernährung (DGE) auf der Grundlage der o.a. Veröffentlichungen von Steinmetz und Potter sowie Block und Mitarbeitern aus dem Jahr 1991 bzw. 1992 gestartet worden (Steinmetz und Potter 1991, Block et al. 1992).

Die in den „Lebenswissenschaften“ angewandten wissenschaftlichen Untersuchungsmethoden basieren auf epidemiologischen, pharmakologischen und toxikologischen Ansätzen. Diese werden auch zur Ermittlung chemopräventiv wirksamer Verbindungen herangezogen. Zum Beispiel werden aus diesen Fachgebieten bekannte biologische Endpunkte (oder auch Biomarker), wie Bioverfügbarkeit, Glucosespiegel, Cholesterinspiegel, antioxidatives Potential, DNA-Schäden, Genotoxizität/ Mutagenität u.v.a. untersucht (vgl. auch Tabelle B-1).

Verschiedene Ansätze von Bioaktivitätsstudien werden je nach Herkunft des im Testsystem verwendeten Untersuchungsmaterials unterschieden:

1. Studien am lebenden Organismus (*in vivo*),
2. Studien mit „frisch“ gewonnenem Untersuchungsmaterial (*ex vivo*),
3. Studien mit Modellsystemen (*in vitro*).

Üblicherweise wird die Suche nach chemopräventiv wirksamen Verbindungen mit einem *in vitro*-Screening ausgewählter Substanzklassen oder Lebensmittel begonnen. Bioaktive Verbindungen werden anschließend mit weiteren *in vitro*-Modellen

zusätzlich charakterisiert. Mit *ex vivo*-Studien kann versucht werden, die *in vitro*-Ergebnisse zu präzisieren, während *in vivo*-Studien dazu dienen, die als Folge der vorhergehenden Experimente aufgestellte Hypothese im lebenden Organismus zu bestätigen (Abbildung B-1).

In den folgenden Kapiteln werden diese Grundtypen an Beispielen erläutert.

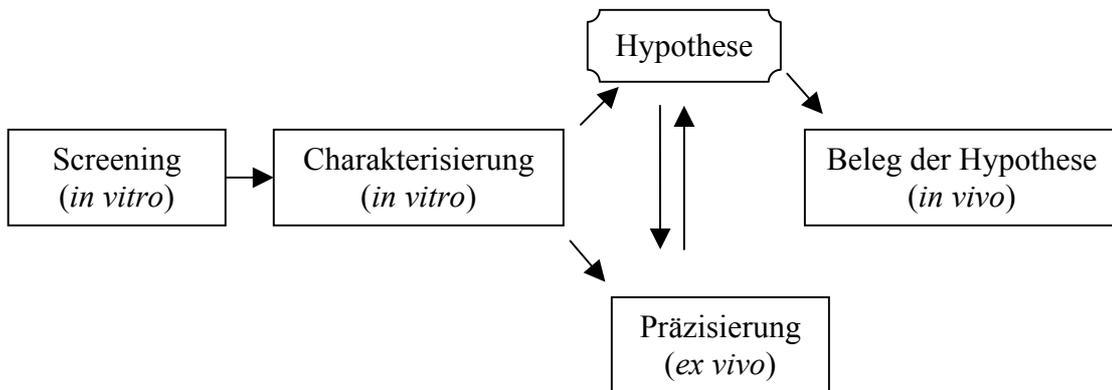


Abbildung B-1 Strategie zur Identifikation chemopräventiv wirksamer Substanzen (nach Knasmüller et al. 1998, 2002).

1.1 *In vivo*-Studien

Unter *in vivo*¹⁴-Studien werden allgemein medizinisch-naturwissenschaftliche Experimente am lebenden Organismus verstanden (Römpp online 2006).

Sie dienen der experimentellen Bestätigung einer meist nach Modellversuchen aufgestellten Hypothese zur bioaktiven Wirksamkeit oder Verfügbarkeit von Stoffen oder Stoffgemischen. Unter lebenden Organismen werden im Allgemeinen Tiere (v.a. Wirbeltiere) und Menschen verstanden. In der Vorbereitungsphase werden ein oder mehrere Endpunkte, die Testmethoden und Studienbedingungen festgelegt sowie die Probanden informiert. Außerdem muss die Unbedenklichkeit der Testverbindungen be-

¹⁴ „im Lebenden“

legt sein. Diese Bedingungen müssen vor Beginn einer *in vivo*-Studie von einer Ethikkommission überprüft und genehmigt werden.

Je nach Art des Studiendesigns werden verschiedene Typen von *in vivo*-Studien unterschieden. Die beiden Grundtypen für Studien am Menschen sind *analytische Studien* und *experimentelle Studien*, die beide wiederum in verschiedene Untertypen gegliedert sind (Tabelle B-2).

Tabelle B-2 Gliederung und Definition von *in vivo*-Studien-Modellen (Römpf online 2006).

analytische Studien	experimentelle Studien	
Ein oder mehrere Risikofaktor(en) (Exposition) wird/werden mit einem Endpunkt korreliert. Der Untersucher hat keinen Einfluss auf die Exposition	Ein oder mehrere Risikofaktor(en) (Exposition) wird/werden mit einem Endpunkt korreliert. Der Untersucher kontrolliert die Studienbedingungen von der Exposition bis zum Endpunkt	
Kohorten- oder prospektive Studie (ermittelt die Exposition und prüft das Auftreten des Endpunkts innerhalb einer definierten Probandengruppe; kann zeitabhängig begrenzt sein.)	Klinische Studien	Community Trial
	Auf Individuen bezogen	Auf Gruppen bezogen (z.B. Diabetiker)
Fall/Kontroll- oder retrospektive Studie (ermittelt die Exposition von Erkrankten und Gesunden in der Vergangenheit; die Auswahlkriterien für die Probanden müssen definiert werden)	„Offene“ Studie (keine Placebogruppe)	
	Blindstudie (der Experimentator kennt die Placebogruppe)	
	Randomisierte Doppelblindstudie (die Probanden werden zufällig in die Placebo- und Verumgruppe verteilt. Auch für den Experimentator ist die Verteilung codiert)	
Querschnittstudie (Exposition und Endpunkt werden zum gleichen Zeitpunkt ermittelt; die Auswahlkriterien für die Probanden müssen definiert werden)	cross-over studie (die Probanden werden nach ausreichender Auswaschphase mehrmals exponiert)	

Bei *analytischen Studien* definiert der Experimentator die Grundbedingungen (Exposition¹⁵, Endpunkt/Biomarker, Untersuchungszeitraum) und analysiert deren Veränderung, er hat aber keinen aktiven Einfluss auf diese Veränderung (Römpp online 2006).

Bei *experimentellen Studien* versucht der Experimentator durch eine definierte Veränderung (Intervention, daher auch Interventionsstudien) der Exposition eine Beeinflussung des Endpunkts zu erreichen (Römpp online 2006).

Tierversuche werden im Grunde nach den gleichen Prinzipien durchgeführt. Allerdings kann bei Tieren häufig das Problem der Futterverweigerung infolge des Geruchs oder Geschmacks der Testsubstanzen auftreten. Daher muss für Tiere eine geeignete Futterzubereitung bzw. Zuführung der Wirkstoffe berücksichtigt werden.

Mit Hilfe von *in vivo*-Studien kann der direkte Einfluss von SPS auf den lebenden Organismus untersucht werden. Erst durch *in vivo*-Studien zeigt sich, ob und in welcher Ausprägung die zuvor in *in vitro*-Studien (siehe Kapitel B-1.3) beobachteten Effekte auch im lebenden Organismus auftreten.

Wenn SPS zum Beispiel das Wachstum von Krebszellen in der Kultur hemmen, kann mit *in vivo*-Studien an Tieren geprüft werden, ob SPS auch bestimmte, z.B. durch Chemikalien induzierbare Tumore hemmen können.

Dieser nötige Abgleich wird bei der Interpretation von *in vitro*-Studien jedoch häufig vergessen, da viele Autoren aus Einzelergebnissen, die mitunter in wenig aussagekräftigen Modellen, mit zu hohen Testkonzentrationen oder nicht authentischen Testsubstanzen gewonnen wurden, ungerechtfertigte Erwartungen ableiten (Kroon et al. 2004, Scalbert et al. 2005).

¹⁵ = Kontakt mit Testsubstanz. Das Einwirken der Testsubstanz(en) kann z.B. auf verschiedenen Wegen, mit unterschiedliche Dosierungen oder über verschieden lange Zeiträume erfolgen

Kataoka et al. (1997) fanden z.B., dass fermentierte Soja-Sauce in weiblichen ICR-Mäusen durch Benzo[α]pyrene induzierte Neoplasien¹⁶ reduzierte. Als wirksame Einzelsubstanzen wurden 4-Hydroxy-2-ethyl-5-methyl-3(2H)-furanon (HEMF, Homofuraneol), 4-Hydroxy-5-methyl-3(2H)-furanon (HMF, Norfuraneol) und 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanon (HDMF, Furaneol®) identifiziert.

Ein anderes Beispiel sind Flavonoide und Polyphenole aus Granatapfelsaft, die *in vitro* die LDL¹⁷-Oxidation inhibierten und in arteriosklerotischen Mäusen die Entstehung von arteriosklerotischen Läsionen¹⁸ hemmten (Aviram et al. 2002).

Ein gutes Beispiel für die Übertragung von *in vitro*- zu *in vivo*- Ergebnissen ist die Fähigkeit von Hispidulin (4',5,7-Trihydroxy-6-methoxyflavon) als Agonist an den Benzodiazepinrezeptor zu binden. Dies konnte *ex vivo*, u.a. am Oozyten-Modell gezeigt werden (Kavvadias et al. 2003). *In vivo* wurde dieses Ergebnis nach oraler Gabe von Hispidulin an mongolische Gerbils, bei denen Hispidulin antikonvulsiv wirkte, bestätigt (Kavvadias et al. 2004).

Mit *in vivo*-Studien am Menschen kann z.B. die Bioverfügbarkeit von SPS untersucht werden. Diese Studien zeigen, z.B. in welchem Maß die erwünschten SPS nach oraler Zufuhr aus dem Gastrointestinaltrakt resorbiert werden und im Blut nachweisbar sind. Von großer Bedeutung für die Abschätzung der Bioverfügbarkeit von SPS ist auch der Vergleich von isoliert aufgenommenen SPS mit aus der Lebensmittelmatrix resorbierten SPS. In eine Matrix eingebettete SPS können durch die Wechselwirkung mit anderen Lebensmittelbestandteilen, z.B. Proteinen oder Kohlenhydraten, eine von der isolierten Verbindung abweichende Bioverfügbarkeit haben. Für die Carotinoide

¹⁶ allg. Neubildung von Gewebe; meist i.R. der Regeneration, aber auch als Neoplasma (bei gestörter oder verllorener Wachstumsregulation)

¹⁷ *Low-Density-Lipoprotein*: cholesterinhaltiges Konjugat aus Lipiden und Protein, dass im Blutplasma am Transport und Stoffwechsel von Fetten sowie am Aufbau der Zellmembranen beteiligt ist. Hohe LDL-Werte sind ein Risikofaktor für Arteriosklerose.

¹⁸ Schädigung des Gefäßendothels u.a. durch Ausfällung von Lipoproteinen und gesteigert auftretende Kollagensynthese

Lycopin und β -Carotin ist z.B. belegt, dass isolierte Verbindungen etwas schneller, aber vor allem zu einem höheren Prozentsatz vom Körper aufgenommen werden können (Yeum et al. 2002, Riso et al. 2003).

Es gilt in zukünftigen *in vivo*-Studien zu ermitteln, welches Maß an Chemoprävention durch Lebensmittel und nicht nur durch einzelne Extrakte oder Isolate erreicht werden kann. Auch der Einfluss verschiedener Zubereitungsarten der Lebensmittel sollte nicht unterschätzt und langfristig bei Studien berücksichtigt werden. So ist z.B. für Carotinoide belegt, dass β -Carotin aus rohen Karotten nur zu 3% resorbiert wird, während es aus erhitzten Karotten zu ca. 50% aufgenommen werden kann (Yeum et al. 2002).

Weitere Endpunkte für *in vivo*-Studien sind die Verteilungskinetik¹⁹ der SPS im Blutkreislauf, ihre Metabolisierung²⁰ und die Ausscheidungskinetik²¹ der Metabolite oder der ursprünglichen Verbindung. Dieser gesamte Ansatz wird in der Pharmazie als ADME-Studie²² bezeichnet. Als Untersuchungsmaterial dient bei solchen Studien das Blut, der Urin und die Faeces der Probanden, sowie in Einzelfällen auch die ausgeatmete Luft, die auf SPS und deren Metabolite untersucht werden.

Walle et al. fanden in einer ADME-Studie an Menschen, denen oral ¹⁴C-markiertes Quercetin (3,3',4',5,7-Pentahydroxyflavon) verabreicht worden war, den größten Teil (23–81%) der Radioaktivität im CO₂ der ausgeatmeten Luft, während in Urin und Faeces jeweils maximal 5% der Radioaktivität wiedergefunden wurden. Die Autoren schließen daraus, dass die Metabolisierung von Quercetin im Menschen komplex verläuft und mehrere Stoffwechselwege einbezieht und so u.a. auch in der Atmungskette enden kann (Walle et al. 2001). Allerdings lag die ¹⁴C-Markierung auf dem 4-C-Atom von Quercetin, von dem bekannt ist, dass es im Rahmen des Metabolismus

¹⁹ ab wann sind SPS im Blut nachweisbar; wann ist die Maximalkonzentration (sog. Peak) erreicht

²⁰ welche Metabolite treten auf; wo und wie werden sie gebildet

²¹ wann sind SPS oder Metabolite im Urin messbar; wann in Faeces; wie ist die Relation zur Aufnahmemenge

²² *Absorption* (auch Resorption: Aufnahme), *Distribution* (Verteilung), *Metabolism* (Metabolisierung), *Excretion* (Ausscheidung)

decarboxyliert werden kann (vgl. Abbildung B-2; Labib et al. 2004). Über den Weg des restlichen Quercetin-Moleküls (A- und B-Ring) konnten Walle und Mitarbeiter keine Angaben machen.

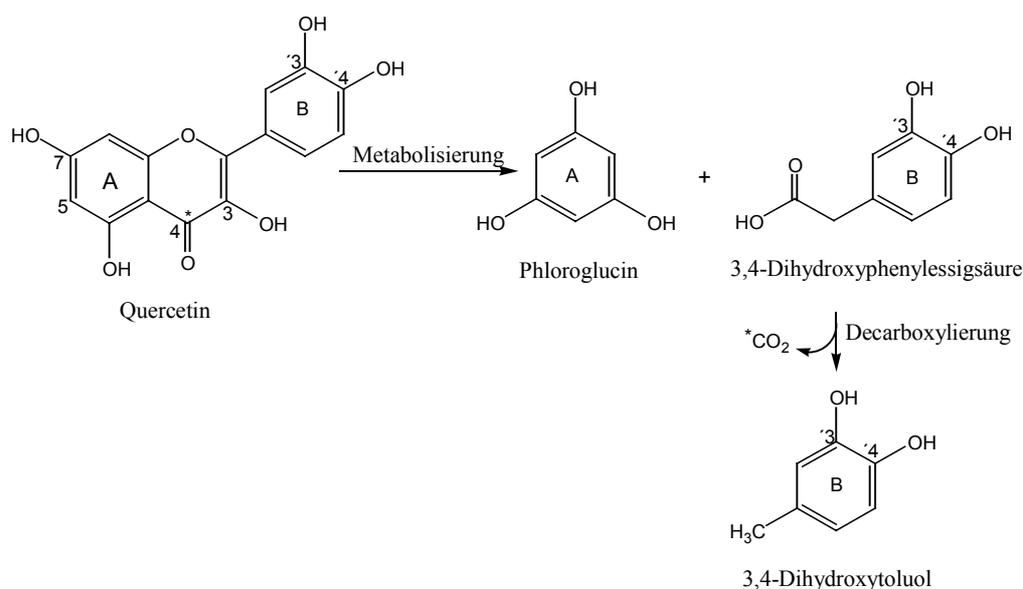


Abbildung B-2 Metabolisierung von Quercetin. Quercetin kann enzymatisch zu Phloroglucin und 3,4-Dihydroxyphenylacetic acid abgebaut werden. 3,4-Dihydroxyphenylacetic acid wird leicht decarboxyliert (nach Walle et al. 2001, Labib et al. 2004).

Hadley et al. (2003) zeigten für Lycopin aus handelsüblichen Tomatenprodukten (Suppen und Säfte), dass sich der Plasma-Lycopinspiegel durch den täglichen Verzehr dieser Produkte signifikant erhöhen ließ. Broekmans et al. (2000) fanden in einer vierwöchigen parallelen Interventionsstudie an 47 Probanden, dass eine Zufuhr von 500 g Obst und Gemüse am Tag zu höheren Plasmaspiegeln an Carotinoiden und Vitamin C führte als in der Vergleichsgruppe (100 g Obst und Gemüse). Außerdem war in der 500 g-Gruppe der Plasmaspiegel von Homocystein (Risikofaktor für Arteriosklerose) um durchschnittlich 15% niedriger²³.

²³ Anmerkung: 500g Obst und Gemüse entsprechen in etwa der von den Ernährungsfachgesellschaften vorgeschlagenen Menge aus der 5 am Tag Kampagne (Broekmans et al. 2000).

Außer der Ermittlung von ADME-Parametern wird mit *in vivo*-Studien untersucht, wie sich die Aufnahme von SPS aus der Nahrung auf Oxidations-Biomarker, die für die Entstehung von Krankheiten wie Arteriosklerose/koronare Herzkrankheit, Alzheimer und Krebs bedeutsam sein können, auswirkt. Geeignete Biomarker sind z.B. die DNA-Oxidation in weißen Blutkörperchen, die LDL-Oxidation im Blut, der Malondialdehyd- und F2-Isoprostan-Gehalt im Blut oder der Anteil an Thiobarbitursäure-reaktiven Substanzen (TBARS) im Blut.

Viele *in vivo*-Studien zur Ermittlung dieser Biomarker wurden z.B. mit grünem und schwarzem Tee durchgeführt. Die Ergebnisse deuten auf eine Reduzierung der LDL-Oxidation im Blut durch Inhaltsstoffe des grünen Tees hin (Hodgson et al. 2000, Duffy et al. 2001).

Das Ausmaß der Effekte in den verschiedenen Studien fällt jedoch sehr heterogen aus, was auf den individuellen Stoffwechsel, der bei keinem Lebewesen absolut identisch abläuft, zurück zu führen ist (Rietveld und Wiseman 2003). Daher werden zur statistischen Absicherung von *in vivo*-Studien größere Kollektive herangezogen. Die HOPE-Studie (**H**eart**O**utcome**P**revention**E**valuation)²⁴, bei der 9541 Risikopatienten über einen Zeitraum von 4,5 Jahren mit täglich 400 IU²⁵ Vitamin E supplementiert wurden, verdeutlicht die für statistisch plausible Aussagen nötige Größenordnung der Probandenzahl (Hoogwerf und Young 2000, Yusuf et al. 2000). Um erste Hinweise auf ein chemopräventives Potential zu erhalten, werden meist kleinere Kollektive mit ca. 6–60 Probanden gewählt.

²⁴ Mit der HOPE-Studie konnte für Vitamin E kein vorbeugender Effekt gegen akute arteriosklerotische Krankheiten und deren Folgen in Risikopatienten ermittelt werden (Yusuf et al. 2000)

²⁵ 268mg RRR α -Tocopherol; 1mg = 1,49IU (International Unit (IU) = internationale Einheit (IE))

1.2 *Ex vivo*-Studien

Mit dem Begriff *ex vivo*²⁶-Studien werden Reaktionen bzw. Abläufe, bei denen aus dem Organismus frisch entnommene, lebende „Gewebe“ (z.B. Eizellen, Transplantate, Flüssigkeiten und Sekrete) isoliert unter Laborbedingungen getestet bzw. manipuliert werden, bezeichnet. Prinzipiell sind solche Versuche *in vitro*-Studien (Kapitel B-1.3), wobei allerdings aufgrund der authentischen (frisch gewonnen, oder tiefgefroren) Herkunft des Untersuchungsmaterials *ex vivo* von *in vitro* unterschieden wird.

Mit *ex vivo*-Studien wird nicht allein der Gehalt eines vorliegenden Biomarkers gemessen, sondern die außerhalb (*ex vivo*) des Körpers induzierte Veränderung eines Biomarkers. Die Testsubstanzen können auf zwei Wegen appliziert werden:

1. durch Intervention vor der „Gewebe“-Entnahme:
Dadurch ist das Testmodell authentisch, da ADME-Vorgänge zwar nicht kontrollierbar sind, aber berücksichtigt werden.
2. durch direkte Zugabe in das Reaktionsgefäß nach der „Gewebe“-Entnahme:
So werden Wechselwirkungen im Körper ausgeschlossen. Allerdings ist nicht sicher gestellt, dass Testsubstanzen auch bei oraler Aufnahme in der entsprechenden Konzentration das Gewebe erreichen würden.

Mit solchen *ex vivo*-Studien können Ergebnisse aus *in vitro*-Studien erweitert und Hypothesen verbessert werden, die sich nachfolgend mit weiterführenden *in vivo*-Untersuchungen verifizieren lassen (vgl. Strategie in Abbildung B-1).

Der Vorteil von *ex vivo*-Studien ist die Nähe zum lebenden Organismus, die durch authentisches Untersuchungsmaterial und die gleichzeitige Kontrollierbarkeit aller Versuchsbedingungen ermöglicht wird. Das Untersuchungsmaterial muss nach der Gewinnung aus dem Organismus unter physiologischen oder möglichst vergleichbaren Bedingungen in einem geeigneten Medium aufbewahrt werden. Die anschließenden Experimente sollten ebenfalls in diesem Medium durchgeführt werden.

²⁶ „aus dem Lebenden“

Je nach Testsystem und untersuchtem Aspekt sind die gewonnenen Ergebnisse jedoch nur bedingt mit anderen Daten vergleichbar und nicht direkt auf den Menschen übertragbar, da in *ex vivo*-Studien die physiologischen Unterschiede einzelner Individuen nicht berücksichtigt werden. Wie bei *in vivo*-Studien kann dieses Problem durch eine ausreichend große Probandenzahl und eine statistische Auswertung der Untersuchungsergebnisse relativiert werden.

Ein Beispiel für *ex vivo*-Studien sind Versuche mit der Mikroflora des tierischen oder humanen Dickdarms, die z.B. aus frischer Faeces oder Colonabschnitten gewonnen werden. Eingesetzt wird z.B. das Schweine-Caecum-Modell, bei dem die Bakterien aus schlachtfischem Schweinecaecum unter anaeroben Bedingungen aufgearbeitet und anschließend mit SPS inkubiert werden. Aus diesen Studien werden Erkenntnisse zum mikrobiellen Metabolismus von SPS gewonnen, da die Zusammensetzung der Darmflora des Schweins der humanen sehr ähnlich ist (Pond 1978).

Labib et al. (2004) fanden, dass Chrysin (5,7-Dihydroxyflavon) in diesem Modell nicht metabolisiert wird, während Quercetin (3,3',4',5,7-Pentahydroxyflavon) langsam zu Phloroglucin und 3,4-Dihydroxy-phenylelessigsäure abgebaut wird. Letztere wurde im Verlauf der Inkubation weiter zu 3,4-Dihydroxytoluol decarboxyliert. Naringenin (4',5,7-Trihydroxyflavon) wurde im Gegensatz zu Quercetin schnell zu 3-(4-Hydroxyphenyl)-propionsäure und 3-Phenylpropionsäure umgesetzt, während Hesperetin (3',5,7-Trihydroxy-4-methoxyflavon) ebenfalls schnell zu Phloroglucin, Eriodictyol und 3-(3-Hydroxyphenyl)-propionsäure verstoffwechselt wurde.

Diese Daten stimmten mit Ergebnissen aus Inkubationen von Flavonoiden mit Rattenfaeces und mit den Daten aus der Inkubation von Flavonen und Flavonolen mit *Eubacterium ramulus*, einem strikten Anaerobier aus dem menschlichen Darm, überein (Griffiths et al. 1972, Blaut et al. 2003).

Auch der Einfluss von SPS auf die LDL-Oxidation wird mittels *ex vivo*-Studien untersucht. Hierbei werden SPS in entnommenes Blutplasma appliziert und Cu^{2+} -Ionen zugesetzt, die von den Antioxidantien bzw. LDL reduziert werden. Hier fand

man, dass grüner und schwarzer Tee die LDL-Oxidation um mehr als 3% verringern konnte (Hodgson et al 2000). Eine andere Gruppe ermittelte für Grüntee-Extrakt eine LDL-Oxidations-Abnahme von mehr als 23% (Miura 2000).

1.3 *In vitro*-Studien

*In vitro*²⁷-Studie ist die Bezeichnung für medizinisch-naturwissenschaftliche Experimente unter künstlichen Bedingungen (Römpp online 2006). *In vitro*-Studien dienen z.B. der Charakterisierung und Klassifizierung von Substanzen nach objektiven Kriterien. *In vitro*-Studien werden u.a. auch bei der Aufklärung von Wirkmechanismen eingesetzt und dienen der Ermittlung von Struktur-Wirkungs-Beziehungen (Eisenbrand et al. 2002).

Im Falle der SPS können dies objektive Kriterien wie die chemische Struktur, ihr Vorkommen in Lebensmitteln, ihre antioxidative Kapazität²⁸ oder ihre Chemosensitivität (die Reaktion bestimmter Testorganismen auf die SPS) sein. *In vitro*-Experimente sollen effizient aufgebaut sein, damit sie schnell Daten zu einer Klassifizierung von Testsubstanzen liefern. Das macht *in vitro*-Studien zu einem wichtigen Werkzeug der Pharma- und Lebensmittelindustrie.

Der Vorteil von *in vitro*- gegenüber *in vivo*-Experimenten besteht in der Möglichkeit zur schnellen und reproduzierbaren Untersuchung eines Endpunkts (Biomarker) ohne Berücksichtigung komplexer Wechselwirkungen und Stoffwechselfvorgänge. Dieser Vorteil ist zugleich ihr größter Nachteil, da mit *in vitro*-Experimenten gewonnene Daten, je nach der Qualität des gewählten Modells, eine eingeschränkte Aussagekraft hinsichtlich der Übertragbarkeit auf das Verhalten der SPS im lebenden Organismus haben.

Um die Aussagekraft von *in vitro*-Studien zu verbessern, werden standardisierte und validierte Methoden zur Durchführung von *in vitro*-Studien benötigt. Daher werden

²⁷ „im Glas“ - Reagenzglas

²⁸ Fähigkeit von Substanzen, freie Radikale abzufangen oder reaktive Sauerstoffspezies (ROS) zu inaktivieren.

für fast jeden etablierten Endpunkt robuste Testkits angeboten (Boehringer Mannheim 1998). Da diese für den gleichen biologischen Endpunkt oft auf unterschiedlichen Mechanismen basieren und jeder Untersuchungsmethode durch den zugrunde liegenden Mechanismus Grenzen gesetzt sind, ist in den wenigsten Fällen ein direkter Vergleich der mit verschiedenen Testkits gewonnenen Ergebnisse möglich. Daher ist es sinnvoll, einen Endpunkt mit unterschiedlichen Methoden zu untersuchen, um eine möglichst umfassende Charakterisierung der Bioaktivität eines SPS zu ermöglichen (mehr dazu auch im Kapitel B-2 Zellkulturen).

Allerdings ist nicht nur die Wahl der Biomarker, sondern auch die Auswahl authentischer Testverbindungen und Substanzkonzentrationen für den Erfolg von *in vitro*-Studien von Bedeutung. An den gut untersuchten Polyphenolen ist das leicht erkennbar, da viele Wissenschaftler z.B. nicht die meist in Lebensmitteln vorkommenden Polyphenolglykoside, sondern die kommerziell verfügbaren Aglykone verwenden, oder die Testsubstanzen in Konzentrationen einsetzen, die *in vivo* aufgrund einer geringen Resorption der Testverbindung nicht auftreten (Kroon et al. 2004). Daher ist für aussagekräftige *in vitro*-Studien nicht nur das Testmodell, sondern auch die Planung der Untersuchungsbedingungen von großer Bedeutung.

Eines der wichtigsten Anwendungsgebiete von *in vitro*-Experimenten ist das Finden von Substanzen mit bestimmten Eigenschaften, wie z.B. die Chemosensitivität gegenüber Zell- oder Bakterienkulturen, die Beeinflussung von Enzymsystemen, die Membran-Durchgängigkeit oder die Bindung an Proteine. Im industriellen Maßstab wird dieses Vorgehen *HighThroughput-Screening* (HTS) genannt, da in kurzer Zeit möglichst viele Testsubstanzen untersucht werden müssen.

Wichtige Hilfsmittel sind neben künstlichen Modellen, wie z.B. synthetischen Membranen für Transportstudien oder Assays zur antioxidativen Kapazität, auch Bakterienkulturen und tierische oder menschliche Zellkulturen. Vor allem Letztere haben an Bedeutung gewonnen, da in ihnen Stoffwechselforgänge mehr oder weniger authentisch studiert werden können.

In Tabelle B-3 sind ausgewählte *in vitro*-Methoden aufgeführt (Knasmüller et al. 1998, Aubry 1999, Garrett et al. 1999, Lindl 2002, Eisenbrand et al. 2002, Rietveld und Wiseman 2003).

Tabelle B-3 Häufig eingesetzte *in vitro*-Methoden (Knasmüller et al. 1998, Aubry et al. 1999, Garrett et al. 1999, Lindl 2002 Eisenbrand et al. 2002, Rietveld und Wiseman 2003).

Methode	Medium	Endpunkt
TEAC (Trolox Equivalent Antioxidative Capacity)	Wasser, Blutplasma,	antioxidative Kapazität
TBARS (ThioBarbituric Acid Reactive Substances)	Wasser, Blutplasma	antioxidative Kapazität
ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity)	Wasser, Blutplasma	antioxidative Kapazität
Antimikrobielle Aktivität	Bakterienkultur	Wachstumshemmung
MTT-Assay	Zellkultur	Wachstumshemmung
Annexin V – Assay	Zellkultur	Apoptose
DNA-Leiter	Zellkultur	Apoptose
SCGE (Single Cell Gel Electrophoresis)	Zellkultur, Lymphozyten	DNA-Schädigung
Glutathion-S-Transferase-ELISA	Zellkultur, Blutkörperchen	Aktivität des Fremdstoffmetabolismus
Mikrosomen Inkubation	Rattenleberhomo- genat, Zellkultur	Metabolismus
Caco2 – Transport	Zellkultur	Membrantransport/ Bioverfügbarkeit
Ames-Test	Bakterienkultur	Genotoxizität
Sister Chromatid Exchange	Zellkultur	DNA-Schädigung
Micro Nucleus	Zellkultur	DNA-Schädigung
6-Thioguanine Resistance	Zellkultur	DNA-Schädigung

Tab. B-3, Fortsetzung

Methode	Medium	Endpunkt
PCR	Zellkultur, Blutkörperchen	mRNA-Gehalt
Enzymaktivität	Zellkultur, Blutkörperchen	Zellstatus

In der vorliegenden Arbeit wurden mit Zellkulturen und SPS biologische Endpunkte wie Wachstumshemmung, Apoptose und Fremdstoffwechsel untersucht. Die Zellkulturtechnik und die untersuchten Endpunkte werden in Kapitel B-2 näher erläutert, auf den zugrundeliegenden Fremdstoffmetabolismus wird in Kapitel B-3 eingegangen. In diesen Kapiteln werden auch die im Rahmen der vorliegenden Arbeit angewandten Methoden erläutert.

2 Zellkulturen

2.1 Allgemeines

Mit der Zellkulturtechnik werden pflanzliche, tierische oder menschliche Zellen außerhalb des Organismus künstlich am Leben erhalten. Unter optimalen Bedingungen ist auch eine Vermehrung der Zellen in der Kultur möglich. So können *in vitro*-Studien reproduzierbar durchgeführt werden, deren Endpunkte im Gesamtorganismus nicht oder nicht leicht zu beobachten wären oder für die der nötige Aufwand (z.B. bei Tierversuchen) verringert werden kann, wie z.B. Versuche zur Zelltoxizität (Cytotoxizität), zur Transfektion mit fremden Genen, zur Klonierung bestimmter Zelltypen oder zur Vermehrung von Viren (O'Brien et al. 2000, Lindl 2002).

Zellkulturtechniken werden vor allem in der Medizin, der Pharmazie und der Toxikologie angewandt, wo sie als Ersatz für Tierversuche in den Bereichen allgemeine Toxikologie²⁹ und Chemosensitivität³⁰ eingesetzt werden. In der Praxis wird der Ter-

²⁹ *in vitro*-Toxizitätsstudien an Zellkulturen werden als Cytotoxizitätsstudien bezeichnet

minus Chemosensitivität häufig mit Cytotoxizität gleichgesetzt, da hier vergleichbare Methoden und Endpunkte genutzt werden (vgl. Kapitel B-2.2, Tabelle B-6). Zellkulturtechniken werden auch zum Screening potentieller Therapeutika, zur Beantwortung immunologischer und genetischer Fragen sowie zur Aufklärung von intra- und interzellulärer Kommunikation verwendet (O'Brien et al. 2000, Lindl 2002). Industriell werden Zellkulturtechniken auch zur Produktion bestimmter Signalstoffe wie z.B. Interferon eingesetzt (Lindl 2002).

Durch die Verwendung von Zellkulturen werden viele der komplexen Wechselwirkungen im Organismus (v.a. Adsorption, Verteilung, Ausscheidung und zum Teil auch Metabolisierung von Nährstoffen, sowie die Wirkung vieler Boten- und Signalstoffe), die bei *in vivo*-Studien nicht oder kaum kontrolliert werden können, ausgeschaltet, da der Zelltyp isoliert vorliegt. Die verwendeten Zellen stellen kein Gewebe dar, besitzen aber häufig einzelne, für das ursprüngliche Gewebe typische Eigenschaften, so dass sich bei guter Planung und sauberer Durchführung Korrelationen mit *in vivo*-Experimenten erzielen lassen (Pischetsrieder 2001). In den folgenden Ausführungen stehen menschliche Zellen im Mittelpunkt. Die Aussagen gelten jedoch entsprechend auch für tierisches Material.

Die zur Kultivierung eingesetzten menschlichen Zellen werden aus bei Operationen anfallendem Material gewonnen.

Es können zwei Zellkulturtypen unterschieden werden (Tabelle B-4) (Lindl 2002):

1. die Normal-Zellkultur (engl. auch primary cell culture)
2. die Permanent-Zellkultur (engl. cell line).

³⁰ zur Auswahl des richtigen Chemotherapeutikums werden diese an Zellkulturen des Tumors getestet; zur allg. Erprobung werden Chemotherapeutika auch an verschiedenen Zellkulturen getestet.

Tabelle B-4 Parameter zur Unterscheidung von Normal- und Permanent-Zellkultur (Knasmüller et al. 1998, Lindl 2002, Marian 2002).

Normal-Zellkultur	Permanent-Zellkultur
aus gesundem Gewebe	Zellen aus Tumorgewebe
sehr gute Übertragbarkeit der Ergebnisse	mäßige Übertragbarkeit der Ergebnisse
spezielle Kulturmedien	Standard-Kulturmedien
zu 100% metabolisch kompetent	nicht 100% metabolisch kompetent
nicht genetisch degeneriert ³¹	genetisch degeneriert ³²
Differenzierung möglich	manchmal Differenzierung induzierbar
Verlust der metabolischen Kompetenz nach kurzer Kulturzeit	Abschwächung der metabolischen Kompetenz durch weitere Degeneration möglich
wenige, manchmal keine Zellteilungen	viele Zellteilungen
nach ca. 1 Woche in Seneszenz	über viele Wochen passagierbar
nicht kryo-konservierbar	kryo-konservierbar

Bei **Normal**-Zellen handelt es sich um gesunde Zellen, die aus operativ entferntem Gewebe isoliert werden. Es können endo- und epitheliale Zellen ebenso wie Muskelzellen, Blutkörperchen und Nervenzellen kultiviert werden. Solche Zellen zeigen die gleichen Eigenschaften wie das Ursprungsgewebe: Sie weisen die gleiche Enzymaktivität auf, die Signalwege entsprechen einander und die Genexpression verhält sich analog zum Ursprungsgewebe. Normal-Zellen sind daher ideal für *in vitro*-Studien und werden häufig für mechanistische³³ Studien eingesetzt (Knasmüller et al. 1998, Lindl 2002). Die Nachteile von Normal-Zellkulturen sind die Notwendigkeit der Verwendung spezieller Kulturmedien und die geringe Anzahl kultivierbarer Zellen, die aus dem Gewebe gewonnen werden kann. Ebenfalls stören die kurze Lebensdauer

³¹ normaler diploider Chromosomensatz

³² mehrere Kopien einzelner Chromosomen oder verstümmelte/fehlende Chromosomen – Polyploidie/Aneuploidie

³³ z.B. Aufklärung der Signaltransduktion

der Zellen und deren geringe Teilungsrate, die nach ca. einer Woche in Kultur in die Seneszenz³⁴ übergehen und sterben.

Für die **Permanent**-Zellkultur werden immortalisierte³⁵ Zellen genutzt. Diese können aus Tumorgewebe gewonnen oder durch Transformation³⁶ normaler Zellen erzeugt werden (Lindl 2002). Es lassen sich endo- und epitheliale Zellen ebenso wie Muskelzellen und Blutkörperchen kultivieren. Solche immortalisierten Zellen zeigen eine große Ähnlichkeit mit normalen Zellen.

Die beiden Zellarten unterscheiden sich vor allem in ihren Proliferationseigenschaften, der Chromosomenzahl und damit in ihrer Genexpression sowie in ihren Differenzierungseigenschaften. Immortalisierte Zellkulturen haben in der Regel eine hohe Teilungsrate und eine lange Kulturdauer, jedoch können im Laufe der Kulturdauer Verunreinigungen, Mutationen oder Degeneration der Zellen oder das selektive Wachstum von Subtypen der jeweiligen Zell-Linie zu Veränderungen der Zellkultur führen. Daher ist es für Zellkulturstudien wichtig, authentisches Zellmaterial von offiziellen Zelldatenbanken wie DSMZ oder ATCC einzusetzen (Lindl 2002).

Permanent-Zell-Linien werden in Zell-Sammlungen, wie der **Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ)** oder der **Amerikanin Type Culture Collection (ATCC)** untersucht, bevorratet und Forschern zur Verfügung gestellt.

Trotz ihrer Nachteile hinsichtlich Authentizität und Übertragbarkeit sind sie die bislang effizienteste Alternative zu *in vivo*-Studien (Knasmüller et al. 1998 und 2002).

Für Studien zur Chemoprävention von Lebensmitteln bieten sich Zellkulturen aus dem Gastrointestinaltrakt sowie aus Lebergewebe an, da diese Gewebe im menschlichen

³⁴ nur bei Zellen von Wirbeltieren: Nach einer gewissen von Zelltyp zu Zelltyp variierenden Anzahl Zellteilung sterben die Zellen aufgrund einer Telomerenverkürzung bei jeder Teilung ab; nicht zu verwechseln mit Apoptose (Kapitel 2.7)

³⁵ = unsterblich; solche Zellen teilen sich oft, bevor sie absterben

³⁶ z.B. Immortalisierung durch Transfektion mit dem SV40-Virus oder dem Epstein-Barr-Virus, Behandlung mit Gammastrahlen; dabei wird die Zellzyklusregulation verändert, so dass viele Teilungen möglich werden, bevor Zellen absterben (Lindl 2002)

Körper die erste Barriere nach der Aufnahme von Lebensmitteln darstellen und vielfältige Stoffwechselläufe besitzen (Quaroni und Hochman 1996, Halliwell et al. 2000). Die Funktion des Gastrointestinaltrakts z.B. geht über die Absorption von Nährstoffen und Elektrolyten hinaus. Die Epithelzellschicht der Darmschleimhaut stellt z.B. die primäre Barriere gegen Antigene und Pathogene aus dem Darmlumen dar (Löffler und Petrides 1990, Eisenbrand 2005, Booth und Potten 2000). Die Oberfläche der Darmwand wird durch viele Einstülpungen (Zotten) vergrößert und ist mit ca. 200 m² eine der größten Kontaktflächen des Körpers. Sie hat für die physiologische Integrität des Körpers eine zentrale Bedeutung, da im Darm wichtige Bestandteile des Immunsystems gebildet bzw. aktiviert werden (Eisenbrand 2005, Tukey und Strassburg 2000). Dieses sog. Darm-assoziierte Immunsystem besteht aus Lymphfollikeln (Peyer-Plaques), Lymphocyten, Plasmazellen und Makrophagen, die in der Darmschleimhaut (Mucosa) verteilt sind. Während die Lymphocyten die Immunantwort initiieren, produzieren die Plasmazellen Immunglobulin A (IgA), welches Bakterien und Viren agglutinieren und Toxine neutralisieren kann. Die Makrophagen phagozytieren (verdauen) unerwünschte Moleküle und infizierte Zellen (Löffler und Petrides 1990, Römpf online 2006, Pschyrembel 2002).

Die Epithelzellschicht des menschlichen Darms besteht aus einer sich ständig erneuernden Einzelzellschicht. Die Zellen entstammen undifferenzierten epithelialen Stammzellen, die an der Basis der so genannten Lieberkühnschen Krypten³⁷ lokalisiert sind. Nach der Teilung dieser Stammzellen migriert eine der neu entstandenen Epithelzellen entlang der Krypten-Lumen-Achse und differenziert sich während des Wegs an die Spitze der Darmzotte (Booth und Potten 2000). Differenzieren bedeutet für Zellen das Erlangen charakteristischer Eigenschaften. Für Darmepithelzellen gehört hierzu z.B. die apikale³⁸ Vergrößerung der Zelloberfläche durch Einstülpungen (*engl. brush borders*), die Fähigkeit, Schleim abzusondern, Carrierproteine für das Ein- und Ausschleusen von Substanzen auszubilden sowie Enzyme des Fremdstoff-

³⁷ Epitheleinsenkung zur Oberflächenvergrößerung und Sekretion

³⁸ dem Darmlumen zugewandte Epithelzelleseite.

metabolismus zu exprimieren. Die ausdifferenzierten Zellen sind nicht mehr teilungsfähig und erreichen binnen weniger Tage die Abschilferungszone, von wo sie nach ihrem Zelltod in das Darmlumen abgegeben werden (Abbildung B-3). Der Tod der intestinalen Epithelzellen wird nach 3-5 Tagen durch Induktion von Apoptose³⁹ ausgelöst (Rochette-Egly et al. 1988, Booth und Potten 2000, Pschyrembel 2002, Römp online 2006).

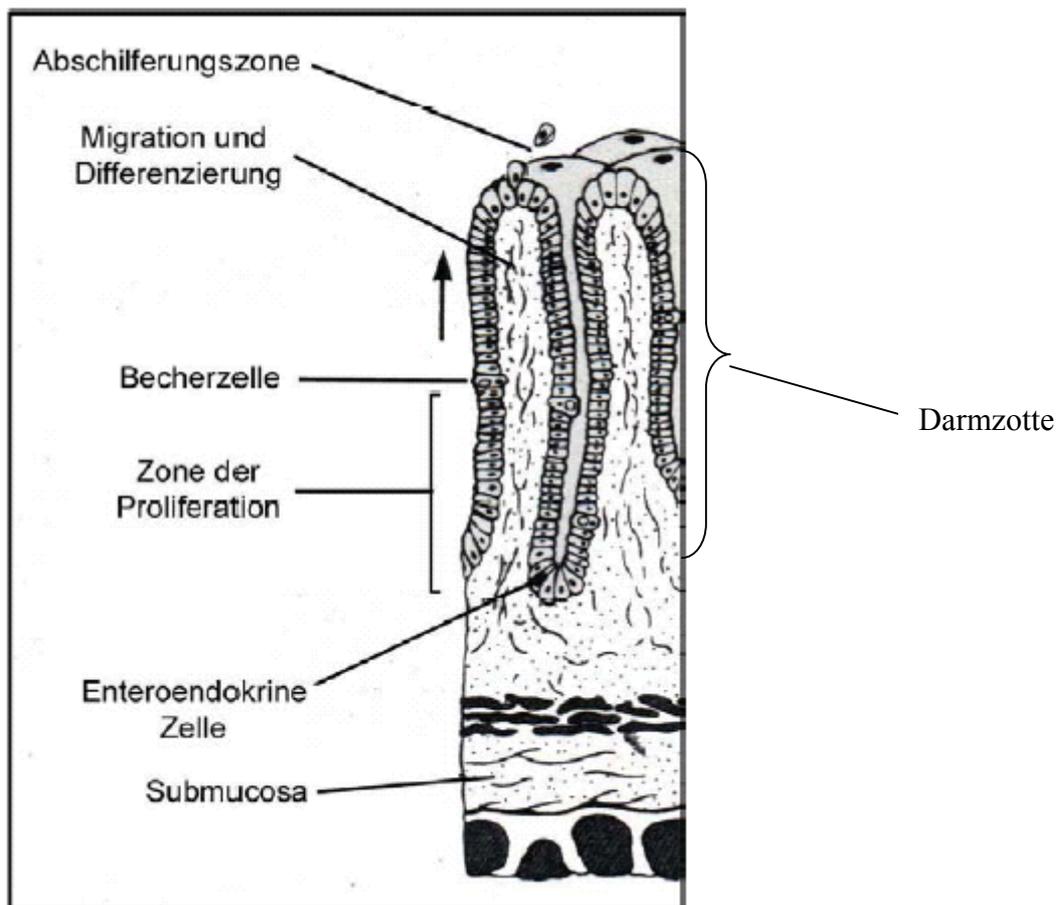


Abbildung B-3: Wanderung und Differenzierung von Kolon-Epithelzellen entlang der Krypten-Lumen-Achse, (nach Caspary und Strater 1999). Der Raum zwischen den Darmzotten sind die sog. Lieberkühn'schen Krypten. Die enteroendokrinen Zellen sind auch als Paneth-Zellen bekannt und sezernieren z.B. Lysozym. In der Zone der Proliferation sind die teilungsfähigen epithelialen Stammzellen angesiedelt. Die Becherzellen sezernieren den das Darmepithel schützenden Schleim (Mucus).

³⁹ programmierter Zelltod (Kapitel B-2.3)

Außer für Cytotoxizitätsassays werden Zell-Linien aus dem Gastrointestinaltrakt u.a. für Studien zur Expression von Enzymen und RNA und für Untersuchungen der Aktivität von Genen des Fremdstoffmetabolismus (Kapitel B-3), von Membraneigenschaften und Transportmechanismen sowie zum Resorptionsvermögen und für immunologische Fragestellungen eingesetzt (Quaroni und Hochman 1996, Knasmüller et al. 1998 und 2002, Walgren et al. 2000, Wenzel et al. 2000, Mersch-Sundermann et al. 2004).

Neben dem Gastrointestinaltrakt ist die Leber für Chemopräventionsstudien sehr interessant, da sie das zentrale Stoffwechselorgan des Körpers darstellt. Die Funktionsfähigkeit der Leber ist die Voraussetzung für das problemlose Arbeiten der meisten anderen Organe, da ungenügend oder falsch metabolisierte Substanzen ausgehend von der Leber im ganzen Körper verteilt werden (Löffler und Petrides 1990, Römpf online 2006).

Die Zellen des Leberparenchyms sind regenerationsfähig, weshalb Leberschädigungen/-funktionsstörungen oft erst im fortgeschrittenen Krankheitsstadium diagnostiziert werden, trotzdem aber meist noch therapierbar sind (Löffler und Petrides 1990, Pschyrembel 2002). Die beherrschende Rolle der Leber im Intermediärstoffwechsel beruht auf dort ablaufenden Reaktionen des Fett-, Protein- und Kohlenhydratstoffwechsels. Einen Überblick über die wichtigsten in der Leber ablaufenden Stoffwechselreaktionen verschafft Tabelle B-5.

Die im Gastrointestinaltrakt resorbierten Nahrungsbestandteile werden über die Pfortader direkt in die Leber geleitet, wo sie verstoffwechselt werden (Fremdstoffmetabolismus, Kapitel B-3). Außerdem dient die Leber als Speicherorgan u.a. für Glykogen, Proteine und die Vitamine A und B12 (Löffler und Petrides 1990, Römpf online 2006, Pschyrembel 2002).

Tabelle B-5 Häufigste in der Leber ablaufende Stoffwechselreaktionen (Löffler und Petrides 1990, Pschyrembel 2002).

Kohlenhydratstoffwechsel	Glykogenese Glykogenolyse Glukoneogenese
Fettstoffwechsel	Fettsäureabbau/beta-Oxidation
Proteinstoffwechsel	Bildung von Plasmaproteinen (alpha- und beta-Globuline) Bildung Gerinnungsfaktoren (u.a. Prothrombin und Fibrinogen) Desaminierung Harnstoffsynthese
Fremdstoffmetabolismus	Glucuronidierung Sulfatierung
andere	Cholesterolsynthese Phosphatidsynthese

Für Studien zur Chemoprävention werden Leberzellen (Hepatozyten) aufgrund ihrer Enzymausstattung hauptsächlich zur Metabolismusaufklärung von Xenobiotika und für Studien der *in vitro*-Genotoxizität eingesetzt (Knasmüller et al. 2004). Aber auch für Studien zur Enzyminduktion (gesteigerte Expression eines enzymcodierenden Gens), vor allem von Enzymen des Fremdstoffmetabolismus, sind Leberzellen interessant (Knasmüller et al. 1998, 2002, 2004).

Im Folgenden werden die verschiedenen Zell-Linien aufgeführt, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendet wurden.

2.1.1 Human Colon Epithelial Cells (HCEC-Zellen)

Die HCEC-Zell-Linie ist eine adhärent⁴⁰ wachsende Dünndarm-Epithelzell-Linie, die von Mitarbeitern des Nestlé-Research-Center, Lausanne etabliert wurde. Diese Human Colon Epithelial Cells wurden aus einem Abschnitt gesunden Darmgewebes präpariert und mit dem Virus SV40⁴¹ immortalisiert. Diese Zell-Linie dient als Modell

⁴⁰ die Zellen bilden einen fest haftenden Rasen auf einer Unterlage – Gegensatz: Suspensionskulturen

⁴¹ simian virus 40 (vgl Fußnote 34, Transformation)

für gesunde (normale) Enterozyten. Bislang konnte keine Differenzierung oder Polarisierung von HCEC-Zellen beobachtet werden (US Patent Nr.839271, 1997).

2.1.2 HepG2-Zellen

Die HepG2-Zell-Linie ist eine adhärent wachsende Zell-Linie, die ursprünglich aus dem Hepatoblastom⁴² eines 11-jährigen argentinischen Jungen isoliert wurde (Aden et al. 1979). Die Morphologie der Zellen ist Epithel-ähnlich, was dem normalen Leberparenchym nahekommt. Die HepG2-Zellen synthetisieren und sekretieren viele der Plasmaproteine, die für gesunde Leberzellen charakteristisch sind. Auch die Enzyme des Fremdstoffmetabolismus sind in HepG2-Zellen präsent (Tabelle B-5). Allerdings ist die Aktivität dieser Enzyme etwas geringer als in gesunden Zellen (Knasmüller et al. 1998).

2.1.3 HT29-Zellen

Die HT29-Zell-Linie ist eine adhärent wachsende humane Kolon-Adenokarzinom-Zell-Linie, die ursprünglich aus dem Primärtumor einer 44-jährigen Frau isoliert wurde. Sie repräsentiert die nicht differenzierten Zellen der Kolonkrypten. Von dieser Zell-Linie ist bekannt, dass sie z.B. durch Natriumbutyrat differenziert werden kann. (Fogh 1975, Kuntz et al. 1999). Diese Zell-Linie wird häufig als robustes Modell zu Cytotoxizitätsstudien eingesetzt.

2.1.4 Caco2-Zellen

Die Caco2-Zell-Linie ist eine adhärent wachsende humane Kolon-Karzinom-Zell-Linie, die ursprünglich aus dem Primärtumor eines 72-jährigen Patienten isoliert wurde (Fogh et al. 1977 a+b). Nach Erreichen der Konfluenz können die Caco2-Zellen spontan differenzieren: Konfluente Zellkulturen weisen sowohl die morphologischen als auch die meisten funktionellen Merkmale des *in vivo*-Zelltyps auf. So bildet sich z.B. ein Bürstensaum, auch Enzyme und Transporterproteine zeigen die ty-

⁴² Lebergeschwulst; eigenständiges ungebremstes Wachstum von körpereigenem oder parasitärem Gewebe (Pschyrembel 2002)

pische polarisierte Verteilung. Aufgrund ihrer Differenzierungseigenschaften werden die Caco2-Zellen zur Beantwortung verschiedenster Fragestellungen als *in vitro*-Modell für reife Enterozyten des Dünndarms eingesetzt (Pinto et al. 1983, Albin und Tappenden 2001, Buesen et al. 2003).

2.2 Chemosensitivität – Cytotoxizität

Die Untersuchung der Chemosensitivität beschäftigt sich allgemein mit der Reaktion von Indikatororganismen auf Testsubstanzen. Die Cytolyse ist eine der Zielreaktionen, mit der Indikatororganismen in Studien antworten. Substanzen, die eine Cytolyse oder allgemein den Zelltod auslösen, werden als cytotoxisch bezeichnet. Bestimmt wird die Cytotoxizität über die Veränderung der Zellproliferation (Zellteilung, -wachstum) im Verlauf der Inkubation mit einer Testsubstanz. Daher sind die Bestimmung der Zellzahl und die Unterscheidung toter und lebender Zellen die wichtigsten Endpunkte von Cytotoxizitätsstudien. Eine Übersicht über verschiedene Methoden zur Bestimmung der Zellzahl gibt Tabelle B-6 (Lindl 2002).

Tabelle B-6 Ausgewählte Methoden zur Bestimmung der Zellzahl (Proliferationsmessung⁴³) (Lindl 2002).

Methoden	Agens	biologischer Endpunkt
Proteingehaltsbestimmung	Bicinchoninsäure (BCA)	Proteinsynthese-Inhibition
Exklusionsmethoden	Trypanblau*	Membranintegrität
Inklusionsmethoden	Neutralrot*	Membranintegrität
pH-Wert-Messung		Membranintegrität
Chrom-Freisetzungstest	⁵¹ CrCl ₃ (radioaktiv)	Membranintegrität
Enzymfreisetzung	Lactatdehydrogenase	Membranintegrität
Detachmentassay ⁴⁴		Zellmorphologie

⁴³ Die in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Methoden sind mit * gekennzeichnet

⁴⁴ Ablösungsassay; die auf dem Gefäßboden anhaftenden Zellen werden abgelöst und gezählt

Tab. B-6, Fortsetzung

Methode	Agens	biologischer Endpunkt
Nucleotideinbau	Thymidin, Uridin (radioaktiv) Bromdesoxyuridin	DNA-/RNA-Synthese
Immuno-Assays	Ki-67	Zellzyklus
mitochondriale Aktivität	MTS*	Metabolismus
kombinierte Fluoreszenz	Fluoreszeindiacetat und Ethidiumbromid	Membranintegrität und Metabolismus

Andere Endpunkte von Chemosensitivitätsstudien sind z.B. Änderungen in der Zellmorphologie oder das Auftreten von DNA-Schäden oder Mutationen (Lindl 2002). Bei Chemopräventionsstudien mit Lebensmitteln und Lebensmittelinhaltsstoffen wird neben den antioxidativen Eigenschaften zunächst die Cytotoxizität der Testsubstanz gegenüber Indikatorzellen (häufig: HT29-, Caco2-, MCF7 (human-Zell-Linien und Hepa1c1c7-Zellen (Maus-Zell-Linie) ermittelt. Der erste zu untersuchende Endpunkt der Cytotoxizität ist die Proliferationshemmung. Zeigt sich unter den gegebenen Bedingungen keine Proliferationshemmung, dann ist die Testsubstanz im Testsystem vermutlich unkritisch. Ist jedoch eine Proliferationshemmung messbar, so stellen sich Fragen nach der Art der Hemmung:

1. Ist eine Abhängigkeit der Proliferationshemmung von der Konzentration der Testsubstanz erkennbar?
2. Liegen viele onkotische/nekrotische Zellen vor?

Die erste Frage ist quantitativer Natur und ermittelt das Dosis/Wirkungsprofil der Testsubstanz. Die zweite Frage ist qualitativer Natur und bestimmt die Ursache der beobachteten Proliferationshemmung. Diese sind im Folgenden zusammengefasst:

1. Onkose⁴⁵/Nekrose: viele tote Zellen; weniger lebende Zellen als in der Kontrolle; meist konzentrationsabhängig (Kapitel B-2.2)

⁴⁵ griech.: Schwellung – Zelltod durch äußere physikalische oder chemische Einflüsse

2. Zellzyklusblockade: wenig/keine tote Zellen; weniger lebende Zellen als in der Kontrolle; meist konzentrationsabhängig (Kapitel B-2.3)
3. Apoptose: einige bis viele tote Zellen; weniger lebende Zellen als in der Kontrolle; meist konzentrationsabhängig (Kapitel B-2.4)
4. Seneszenz: einige tote Zellen; gleiche Zellzahl wie in der Kontrolle; konzentrationsunabhängig = keine Proliferationshemmung.

Anhand der o.a. Fragen kann ein Fließschema für die Untersuchung der Cytotoxizität erstellt werden, bevor weitere Endpunkte angegangen werden (Abbildung B-4).

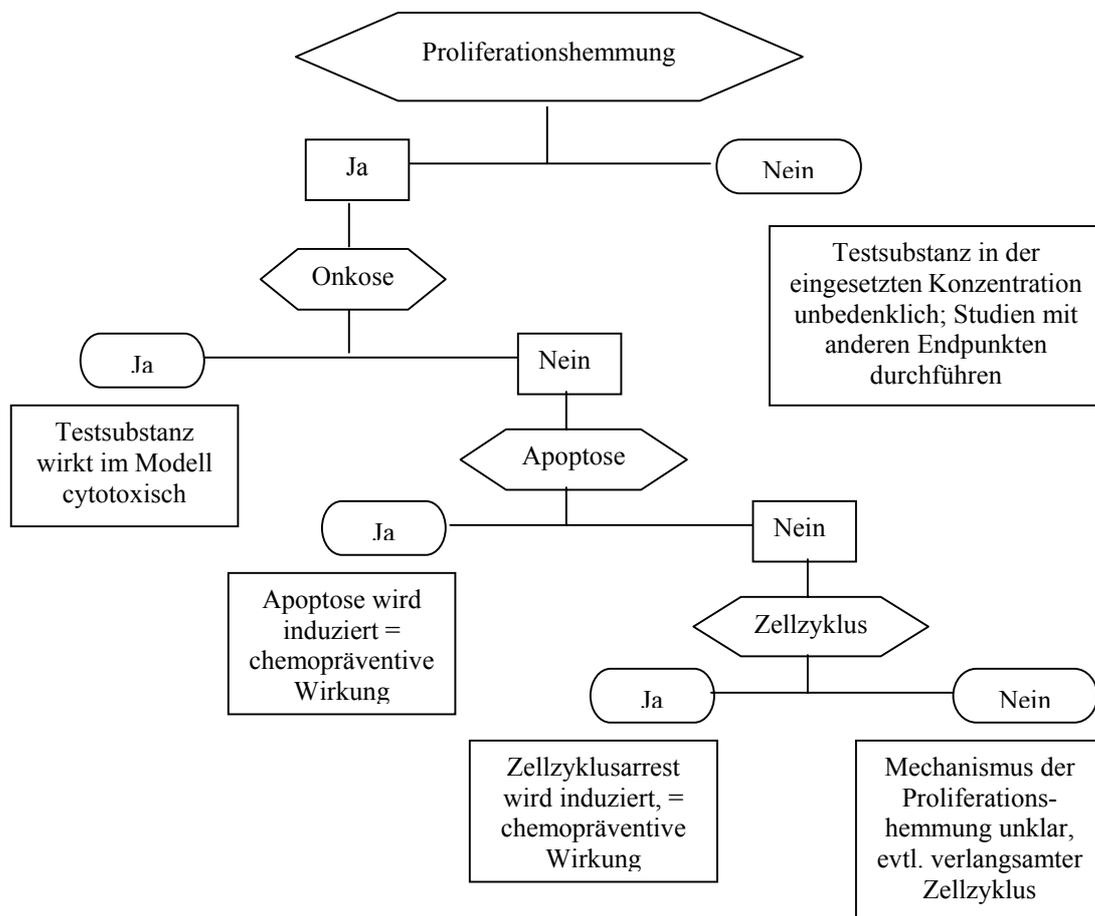


Abbildung B-4 Fließschema zum Endpunkt Proliferationshemmung (nach Boehringer Mannheim 1998).

2.2.1 Trypan-Blau-Methode

Diese Methode ist ein klassisches Verfahren zur Bestimmung der Anzahl lebender Zellen in Zellkulturen. Der Farbstoff Trypanblau [CAS Nr. 72-57-1] (Abbildung B-5) kann durch geschädigte Zellmembranen, wie sie bei toten Zellen auftreten, in die Zellen eindringen und sich in deren DNA einlagern. Dadurch werden tote Zellen blau angefärbt. Lebende Zellen mit intakten Membranen nehmen diesen Farbstoff aufgrund der Molekülgröße nicht auf und können so unter dem Lichtmikroskop deutlich von den toten Zellen unterschieden werden.

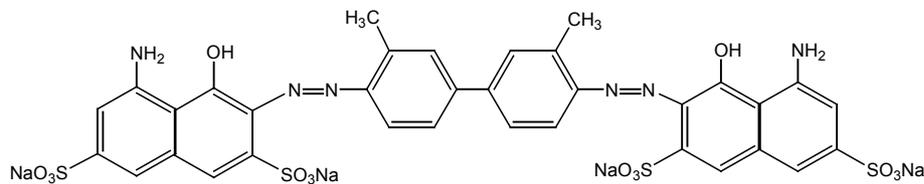


Abbildung B-5 Trypanblau 3,3'-[(3,3'-Dimethyl[1,1'-biphenyl]-4,4'-diyl)] bis (azo) bis [5-amino-4-hydroxy-2,7-naphthalinsulfonsäure], Tetranatriumsalz [CAS Nr. 72-57-1]

2.2.2 MTS-Methode

Diese Methode stellt eine Weiterentwicklung der MTT-Methode dar und ist ein Verfahren zur Bestimmung der Anzahl lebender Zellen in der Zellkultur. Das innere Tetrazoliumsalz 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxy-methoxy-phenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium) (MTS) wird von vor allem in den Mitochondrien lebender Zellen, aber auch in Peroxisomen und im Cytosol lokalisierten Oxidoreduktasen unter NAD(P)H-Verbrauch zu einem farbigen Formazanderivat reduziert (Barltrop et al. 1991) (Abbildung B-6).

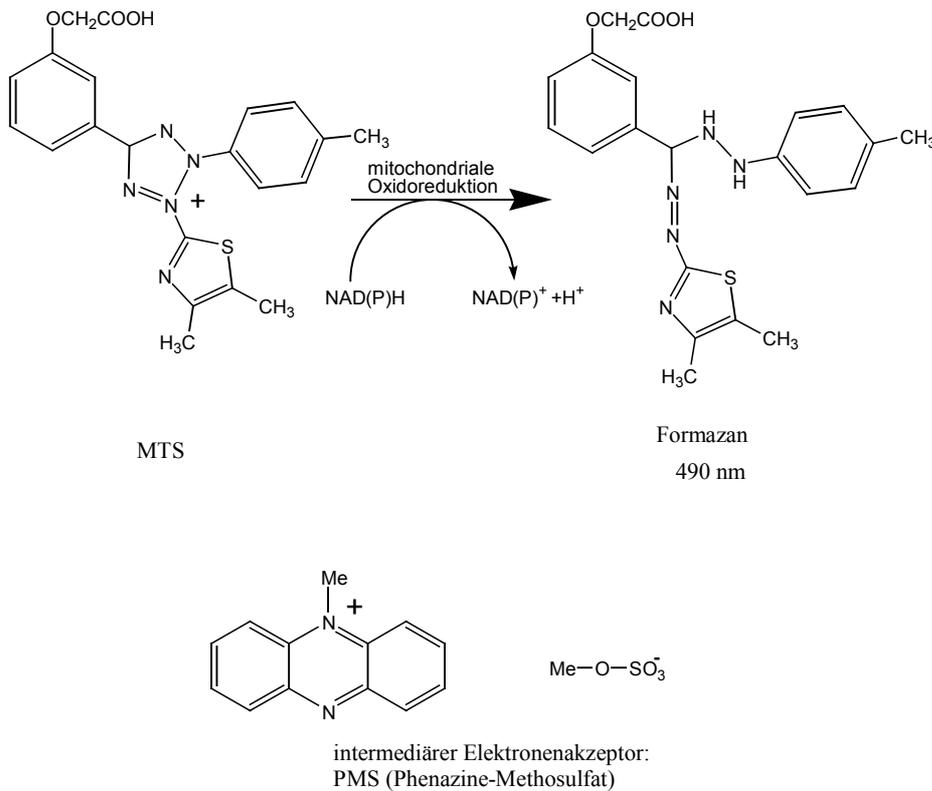


Abbildung B-6 Mitochondriale Oxidoreduktion von MTS [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxy-methoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium] zu Formazan. Die Formazanbestimmung erfolgt photometrisch bei 490 nm mittels ELISA-Plattenleser (Barltrop et al. 1991).

2.2.3 Neutralrot-Methode

Die Neutralrot-Methode ist eine der am weitesten etablierten Methoden zur Vitalfärbung von Zellen. Sie dient der Ermittlung der vitalen Zelldichte adhärenter Zellkulturen. Das Neutralrot-Molekül (3-Amino-7-dimethylamino-2-methylphenazin-hydrochlorid) liegt bei pH 7,4, dem im Inkubationsmedium und im Cytosol und Kulturmedium herrschenden pH-Wert, undissoziiert vor und kann die Zellmembran lebender Zellen passieren (Abb. B-7). In der Zelle wird Neutralrot in die Lysosomen und zum Teil in die proliferierende DNA eingelagert. Da in den Lysosomen ein pH-Wert < 5 herrscht, wird das Neutralrotmolekül dissoziiert und kann die Lysosomen und damit

die Zelle nicht verlassen. Tote Zellen lagern kein Neutralrot ein, da sie keine intakten Lysosomen und keine proliferierende DNA besitzen.

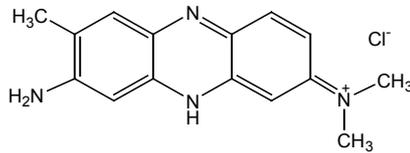


Abbildung B-7 Neutralrot (3-Amino-7-dimethylamino-2-methylphenazin-hydrochlorid).

2.3 Der Zellzyklus

Im sogenannten Zellzyklus sind die Steuerungsmechanismen des Zellwachstums (Zellteilung) zusammengefasst. Die meisten humanen Zellen durchlaufen ihn vor ihrer endgültigen Differenzierung oder bei ihrem Übergang in die Seneszenz oder Apoptose mehrfach. Durch den Zellzyklus wird die DNA-Synthese, die Bildung identischer Chromosomen-Kopien und die korrekte Chromosomen-Verteilung auf die beiden Tochterzellen kontrolliert. Der Zellzyklus beginnt mit der G₀/G₁-Phase, mit gewissermaßen neu geborenen Zellen (Abbildung B-8). Dann folgt die S-Phase, in der neue DNA für eine zweite Zelle gebildet wird. In der G₂-Phase hat die Zelle mit ihrem nun verdoppelten Genom eine kurze Ruhephase, bevor in der M-Phase die Zellteilung (Mitose) stattfindet. Am Ende der M-Phase hat sich die Zelle geteilt, und die beiden entstandenen Zellen befinden sich in der G₀-Phase (Voet und Voet 1994, Sherr 1996).

In der G₀-Phase entscheidet sich, ob eine Zelle weiter proliferiert, sich differenziert oder in Apoptose übergeht. Dafür gibt es im Zellzyklus verschiedene Kontrollmechanismen⁴⁶, die durch extrazelluläre Signale beeinflusst werden können. Es gibt mehr als 100 Faktoren, die im Rahmen dieser Kontrollmechanismen zusammenwirken. Je nach Gewebezugehörigkeit der jeweiligen Zelle haben diese Faktoren eine unterschiedlich

⁴⁶ daran sind u.a. die Cycline A, B, D, E, die cyclinabhängigen Kinasen (cdk) 1, 2, 4, 6 sowie das Retinoblastom-Tumorsuppressur-Protein (RB) beteiligt. Spezielle Inhibitoren der CDK4 und CDK6 (sog. INK4-Proteine) verursachen einen Zellzyklusblock in der G₁-Phase (Sherr 1996, Levine 1997).

starke Bedeutung. Hat die Zelle einige der Kontrollschritte für eine weitere Teilung hinter sich, dann befindet sie sich in der G₁-Phase. Nach dem Passieren weiterer Kontrollereignisse, die unter anderem der Überprüfung der DNA-Integrität dienen, durchläuft die Zelle in der späten G₁-Phase den „*restriction point*“. Nach dem Passieren reagiert die Zelle bis zur nächsten G₀/G₁-Phase nicht mehr auf extrazelluläre Signale, nur die intrazellulären Kontrollmechanismen funktionieren dann weiter (Sherr 1996).

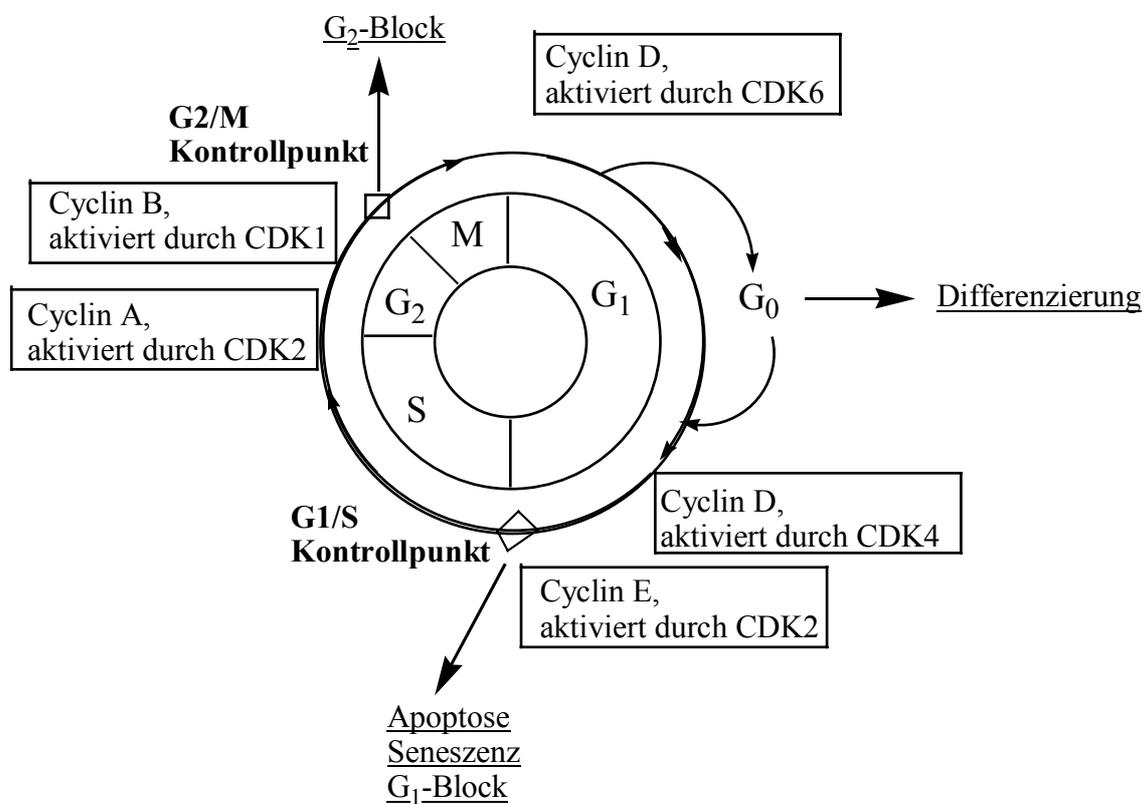


Abbildung B-8 Schematische Darstellung des Zellzyklus (G₀ bis M-Phase) und der den Phasenübergang steuernden Kontrollschritte (Voet und Voet 1994, Sherr 1996).

Wurden vor Erreichen des „*restriction point*“ durch die Kontrollmechanismen Schäden in der zellulären-DNA identifiziert, so kann die Zelle durch Aktivierung pro-

apoptotischer Gene wie Bak⁴⁷ oder Bax⁴⁸ in die Apoptose (Kapitel B-2.3) überleitet werden. Durch Aktivierung von Reparaturmechanismen, wie der SOS-Box⁴⁹ oder gadd45⁵⁰, kann aber auch die Behebung der DNA-Schädigung initiiert werden (Voet und Voet 1994, Levine 1997).

Die Zellzyklus-Kontrollmechanismen sind ein Ziel chemopräventiv wirksamer Substanzen, da durch das Aufrechterhalten der Kontrollfunktionen veränderte Zellen an der Proliferation und damit an der Vervielfältigung des Fehlers gehindert werden können. Lebensmittelinhaltsstoffe oder deren Metabolite, die einen Zellzyklusblock in der G₁-Phase auslösen, sind z.B. Butyrate⁵¹, Ellagsäure oder Produkte der Maillard-Reaktion (Janson et al. 1997, Narayanan et al. 1999, Marko et al. 2003). In der Zelle kann nach der Blockade des Zellzyklus durch Butyrat in der G₁-Phase die Differenzierung, die Apoptose oder die DNA-Reparatur ausgelöst werden.

2.4 Die Apoptose

Die Apoptose, auch genetisch programmierter Zelltod genannt, ist ein gezieltes, induziertes Ereignis zur Beseitigung einzelner Zellen oder Zellgruppen. Dieser Vorgang ist für das Überleben des Gesamtorganismus sehr wichtig, da durch ihn geschädigte oder „alte“ Zellen schonend eliminiert werden. So wirkt die Apoptose im oben beschriebenen Darmepithel: In den Epithelzellen an der Spitze der Darmzotte wird Apoptose ausgelöst und der Nahrungsbrei schabt die sterbenden und toten Zellen ab, die durch eine nachgerückte Epithelzellschicht ersetzt werden. Andere Wirkungsbereiche der Apoptose sind die Embryonalentwicklung, das Immunsystem, die Selektion

⁴⁷ Abkürzung für **Bcl-2 Antagonist/Killer**. Bcl-2 (B-Zell-Lymphom 2) ist ein apoptose-hemmendes Protein, durch Bak wird es gebunden und die Apoptose möglich (Genomics 1997, 44:195-200).

⁴⁸ Abkürzung für **Bcl-2 Associated x protein**. Existiert in vier Isoformen, die an Bcl-2 binden und dessen antiapoptotische Wirkung verhindern (Cell 1993, 74:609-619).

⁴⁹ Etwa 20 bp große DNA-Sequenz, die als Start-Operator für das Expressieren von DNA-Reparaturproteinen dient (Voet und Voet 1994).

⁵⁰ Mitglieder der gadd45-Genfamilie sind am Zellzyklus und der Apoptose, an der DNA-Reparatur und der genomischen-Stabilität und am angeborenen Immunsystem beteiligt (Gupta 2006)

⁵¹ Salze einer kurzkettigen Fettsäure (C₄), die von der Darmflora durch Fermentation von Ballaststoffen gebildet wird; dient der Darmflora, aber auch dem Darmepithel als Nahrung

tion von Lymphozyten und die Bekämpfung von Autoimmunerkrankungen und Viren (Tomei und Cope 1991, Booth und Potten 2000).

Die Apoptose ist von der Onkose (von griechisch „oncos“ = Schwellung) zu unterscheiden, bei der der Zelltod durch äußere chemische oder physikalische Einflüsse verursacht wird, und die im Gewebe durch unkontrollierte Verteilung der Zellinhaltsstoffe zu Entzündungsreaktionen führt (Tomei und Cope 1991, Majno und Noris 1995, Trump und Berezski 1998). In der Literatur wird anstelle des Begriffs Onkose meist der Begriff Nekrose verwendet. Im Gegensatz zur Onkose beschreibt die Nekrose jedoch die Veränderungen der Zelle nach dem Eintreten des Zelltods, unabhängig davon, ob dieser durch Apoptose oder Onkose ausgelöst wurde. Trotzdem wird im Folgenden der in der Literatur übliche Begriff Nekrose für den nicht-apoptotischen Zelltod verwendet.

Die Verläufe von Apoptose und Nekrose können mikroskopisch unterschieden werden. Die unterschiedlichen Verläufe zeigt Abbildung B-9. Nach dem Apoptose-signal (1) kondensiert zunächst das Chromatin und lagert sich in der Nähe der Kernhülle ab (2). Anschließend schrumpft die Zelle und löst sich durch Abschnüren sogenannter „apoptotic bodies“ selbst auf (3). Diese Vesikel sind charakteristisch für die Apoptose und werden meist durch Phagozytose entfernt (4). Bei der Onkose laufen nach dem Todessignal (1) alle zellulären Prozesse sehr ungeordnet ab. Das Chromatin kondensiert in undefinierter Form (5), und die Zelle sowie ihre Organellen schwellen bis zum Zerplatzen an (6) (Tomei und Cope 1991, Majno und Noris 1995).

Das Startsignal für die Apoptose geht häufig von den Mitochondrien aus (Kroemer und Reed 2000). Liegen in den Mitochondrien mehr pro-apoptotische Proteine⁵² als anti-apoptotisch wirkenden Proteine⁵³ vor, so werden in der Mitochondrienmembran Poren gebildet, durch die Signalstoffe, wie Cytochrom C und Apaf-1 (*engl. apoptosis*

⁵² pro-apoptotische Proteine: z.B. Bad, Bak, Bax, Bcl-X_s (Sherr 1996, Levine 1997)

⁵³ anti-apoptotische Proteine: z.B. NFκB, Bcl-2, Bcl-X_L, Mcl-1 (Sherr 1996, Levine 1997)

activating faktor – Apoptose aktivierender Faktor) ins Cytoplasma gelangen und dort weitere Apoptoseschritte auslösen (Tomei und Cope 1991, Levine 1997).

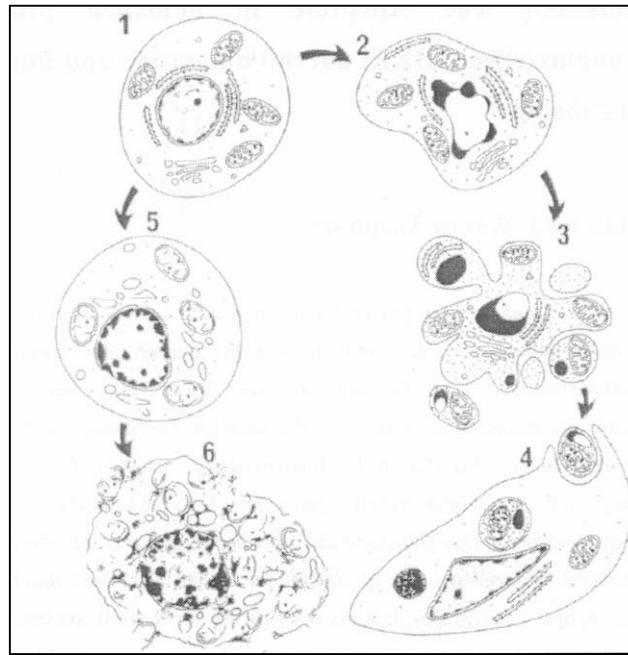


Abbildung B-9 mikroskopische Unterscheidung von Apoptose (2-4) und Onkose (5-6) (Tomei und Cope 1991).

In der frühen Phase der Apoptose geht die asymmetrische Verteilung von Phosphatidylserin, einem Bestandteil der Zellmembran, verloren: In lebenden Zellen befindet sich Phosphatidylserin auf der Innenseite der Zellmembran. Diese Verteilung wird in lebenden Zellen durch die Magnesium- und ATP-abhängige Aminophospholipid-Translokase aufrecht erhalten. In apoptotischen Zellen ist diese Asymmetrie des Phosphatidylserins nicht mehr existent. Hier tritt Phosphatidylserin auch auf der Außenseite der Zellmembran auf, wodurch die Zelle für Makrophagen markiert und durch diese kontrolliert zerstört wird (Fadok et al. 1992, Verhoven et al. 1995). Die Phosphatidylserin-Externalisierung der Zelle tritt im Verlauf der Apoptose zeitlich vor den morphologischen Veränderungen und vor dem DNA-Abbau auf (Kuypers et al. 1996).

Eine andere Signaltransduktionskette, die so genannte Kaspasen-Kaskade⁵⁴ führt z.B. zum Abbau der nukleären DNA (Wyllie 1980, Enari et al. 1996).

Da man weiß, dass die Apoptose auch durch extrazelluläre Signale verhindert oder induziert werden kann, z.B. durch Viren wie den SV40-Virus (s.o.), der Apoptose verhindert (Wyllie 1998), ist die Apoptose für die Chemoprävention von Bedeutung. So besteht die Möglichkeit, irreparabel beschädigte Zellen frühzeitig zu erkennen und zu zerstören. Dazu wird nach Verbindungen gesucht, die möglichst nur in degenerierten oder geschädigten Zellen Apoptose auslösen. Dies soll über eine Hochregulierung der pro-apoptischen oder Erniedrigung der anti-apoptischen Faktoren erfolgen (Krammer 2000).

Eine weitere Möglichkeit zum Auslösen von Apoptose ist eine direkte Kaspasen-Aktivierung durch Induktion des Proteins Bax (Reed 1997, Thornberry und Lazebnik 1998).

3 Fremdstoffmetabolismus

Unter dem Begriff Fremdstoffmetabolismus werden Reaktionen zusammengefasst, durch die körperfremde Stoffe (Xenobiotika), aber auch durch den Metabolismus gebildete Stoffe ausgeschieden werden. Abhängig vom Zeitpunkt der Metabolisierungsschritte unterscheidet man die daran beteiligten Enzyme als Phase I – und Phase II – Enzyme.

Durch metabolisierte Endprodukte und Xenobiotika können Zellstrukturen, z.B. durch Oxidation und Reduktion, durch elektrophile und nukleophile Substitution, sowie durch Additionsreaktionen, oder aber durch kompetitive Hemmung von Enzymsystemen geschädigt werden. Selbst chemisch inerte Verbindungen können Zellschä-

⁵⁴ Kaspasen sind Cystein-Proteasen, die ihre Substrate am Carboxyterminalen Ende von L-Aspartat-Resten spalten. Die erste Kaspase (meist die Kaspase 8) kann durch extrazelluläre oder intrazelluläre Faktoren aktiviert werden. Diese Kaspase aktiviert eine weitere Kaspase und so fort. Wird die Kaspase 3 aktiviert, ist diese ihrerseits in der Lage Endonukleasen zu aktivieren, die die nukleäre DNA in charakteristische Stücke schneiden (DNA-Leiter) (Wyllie 1980, Enari et al. 1996).

digungen bewirken, da sich der osmotische Druck zwischen Zellinnerem (intrazellulär) zum Zwischenzellraum (interzellulär) durch die Einlagerung von Verbindungen ändern und die Zelle zum Platzen bringen kann (Buckberry und Teesdale 2001). Eine Übersicht über mögliche Angriffspunkte von Metaboliten und Xenobiotika in einer Zelle, deren Beeinflussung schädlich sein kann, zeigt Tabelle B-7. Schädliche Metabolite und Xenobiotika werden als Toxine bezeichnet.

Tabelle B-7 Beispiele von Angriffspunkten einiger Toxine in Zellen (Eisenbrand 2005, Römpp online 2006).

Angriffsort	Agens	Angriffsziel
Mitochondrien	Fluorid	Oxidative Phosphorylierung
Plasmamembran	Tenside, Peroxide	Membranlipide
Endoplasmatisches Retikulum	Tenside, Peroxide	Membranlipide
Glykolyse	Arsen	Pyruvatdehydrogenase
DNA-Synthese	Mykotoxine (z.B. Mycophenolsäure)	Inosin-Monophosphat-Dehydrogenase
RNA-Synthese	Mykotoxine (z.B. Amatin)	RNA-Polymerase II
Ionenkanäle	Tetrodotoxin	spannungsabhängiger Na ⁺ -Kanal

Das Inaktivieren oder Entfernen unerwünschter exogener und endogener Verbindungen ist daher von enormer Bedeutung für den Organismus und stellt eine Herausforderung für ihn dar, da Substanzen unterschiedlichster Struktur inaktiviert bzw. ausgeschieden werden müssen. Polare Substanzen mit einer Molekülmasse < 350 Da werden vorwiegend über die Niere in den Urin abgegeben und ausgeschieden, Verbindungen mit einer Molekülmasse > 500 Da vor allem über den Gallensaft in den Darm und damit in die Faeces. Um diese Molekülmasse zu erreichen, werden niedermolekulare Verbindungen mit Glutathion und/oder Glucuronsäure konjugiert (Eisenbrand 2005, Buckberry und Teesdale 2001).

Der Fremdstoffmetabolismus arbeitet nicht nach dem klassischen „ein Enzym – ein Substrat“-System, da dieses zu unflexibel wäre, und zu viele Enzyme notwendig wären. Vielmehr gibt es einige weniger spezifische Enzymfamilien, die aktiv sind. Diese Enzyme sind hauptsächlich in der Leber und der Niere lokalisiert, aber auch im Darm, in der Lunge, in der Haut und im Blutplasma konnte die Aktivität solcher Enzyme nachgewiesen werden (Eisenbrand 2005, Schwab 2003, Sonoda 2003).

Phase I–Enzyme katalysieren die Aktivierung von z.B. lipophilen und/oder hochmolekularen Substanzen. Die vorwiegend ablaufenden Reaktionstypen sind die Oxidation, die Reduktion und die Hydrolyse. Viele der Oxidationsreaktionen werden durch die membranständigen Enzyme aus der Cyp P450–Familie katalysiert. Von dieser Isoenzymfamilie sind im Menschen z.Zt. 21 verschiedene mischfunktionelle Oxidasen bekannt, die überwiegend im endoplasmatischen Retikulum lokalisiert sind (Hayes und Pulford 1995, Buckberry und Teesdale 2001). Allerdings kann die Schädlichkeit von Verbindungen durch die von Phase I–Enzymen katalysierten Reaktionen auch verstärkt werden (Eisenbrand 2005) – die sog. „Giftung“. Dieser Vorgang ist in Abbildung B-10 am Beispiel des Arzneimittels Paracetamol illustriert. Tabelle B-8 gibt eine Übersicht über die wichtigsten Phase I-Enzyme.

Tabelle B-8 Übersicht der wichtigsten Phase I– und Phase II–Enzyme (Knasmüller et al. 1998, Eisenbrand 2005).

Phase I–Enzyme (funktionalisierende Enzyme)	Phase II–Enzyme (konjugierende Enzyme)
Cytochrom P450-Isoenzyme	Glucuronsäure-Transferasen
Hydroxylasen (z.B. Esterasen und Peptidasen)	Sulfotransferasen
Alkohol- und Aldehyd-Dehydrogenasen	Glutathion-S-Transferasen
Glutathionperoxidase	Epoxid-Hydrolase
Glucosidasen	Catechol-O-Methyltransferase
Nitroreduktase	N-Acetyltransferasen

Tabelle B-8, Fortsetzung

Phase I–Enzyme (funktionalisierende Enzyme)	Phase II–Enzyme (konjugierende Enzyme)
Katalase	
Peroxidase	
NAD(P)H:Chinon-Oxidoreduktasen (lt. Knasmüller 1998 Phase I)	
N-Demethylase	
Cytochrom P450 Reduktase	

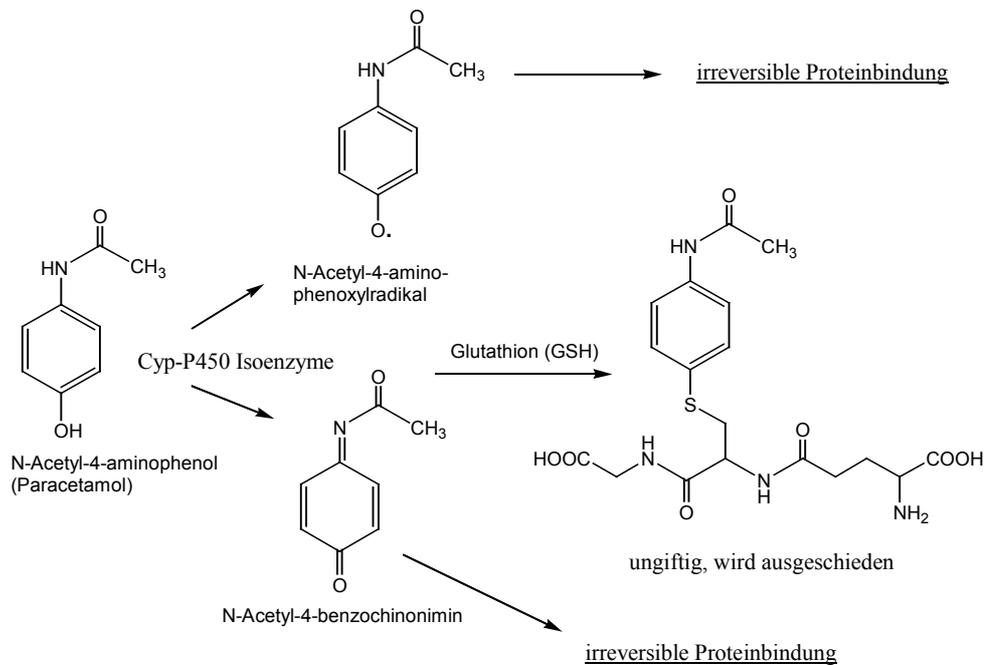


Abbildung B-10 „Giftung“ von Paracetamol: Ab einem Glutathionspiegel von weniger als 30% des Normalwerts werden die reaktiven Metabolite nicht vollständig entgiftet. Die überschüssigen Metabolite lagern sich irreversibel an Proteine an und schädigen die Leber dosisabhängig (Eisenbrand 2005).

Phase II–Enzyme katalysieren z.B. die Funktionalisierung aktivierter oder nukleophiler Verbindungen durch Konjugation mit elektrophilen Molekülen wie Glucuronsäure oder Sulfat-Resten. Das nucleophile Glutathion dient zur Konjugation elektrophiler Verbindungen. Durch die Konjugation werden z.B. die durch Phase I–Reaktionen aktivierten Verbindungen in der Regel inaktiviert und polarer, so dass sie anschließend leichter über die Niere und die Galle ausgeschieden werden können.

Andere Umsetzungen wie die Methylierung, die Acetylierung und die Aminoacetylierung dienen der Maskierung funktioneller Gruppen wie -SH, -OH und -NH, wodurch die Reaktivität der Verbindungen herab gesetzt werden kann (Eisenbrand 2005; Buckberry und Teesdale 2001). Eine Übersicht über wichtige Phase II-Enzyme gibt Tabelle B-8. Eine grafische Übersicht zum Zusammenwirken einiger Phase I- und II-Enzyme gibt Abbildung B-11. Im Zentrum ist ein Chinon abgebildet, auf das mittels der NAD(P)H:Chinon-Oxidoreduktase (NQO-1) zwei Elektronen übertragen werden, wodurch die Entstehung von *reactive oxygen species* (ROS) aus Ein-Elektronen-Transfers vermindert wird. Elektrophile Verbindungen wie das Chinon können durch Glutathion-S-Transferasen (GST) mit Glutathion (GSH) konjugiert werden, während nukleophile Verbindungen wie das Hydrochinon durch Sulfotransferasen (SULT) mit Sulfonsäure oder durch UDP-Glucuronosyltransferasen (UGT) mit Glucuronsäure konjugiert werden können (Abb. B-11).

Beim Einsatz von Zytostatika⁵⁵ wurden in den letzten Jahren ATP-hydrolysierende Transporter-Proteine identifiziert, die relativ unspezifisch Stoffe aus den Zellen in den Extrazellularraum ausschleusen. Diese Proteine wurden zu einer weiteren Gruppe, den Phase III–Enzyme zusammengefasst. Sie führen zu einer räumlichen Trennung von Giftstoff und „Schadort“, wodurch die Schadwirkung potenzieller Giftstoffe gemindert wird. Beispiele für solche Phase III-Enzyme sind p-Glykoprotein und der Multi-Drug-Resistance-Komplex (mrp) (Buckberry und Teesdale 2001, Römpp online 2006, Sonoda et al. 2003).

⁵⁵ Heterogene Gruppe cytotoxischer Substanzen, die als Medikamente bei der Krebsbehandlung (Chemotherapie) dienen

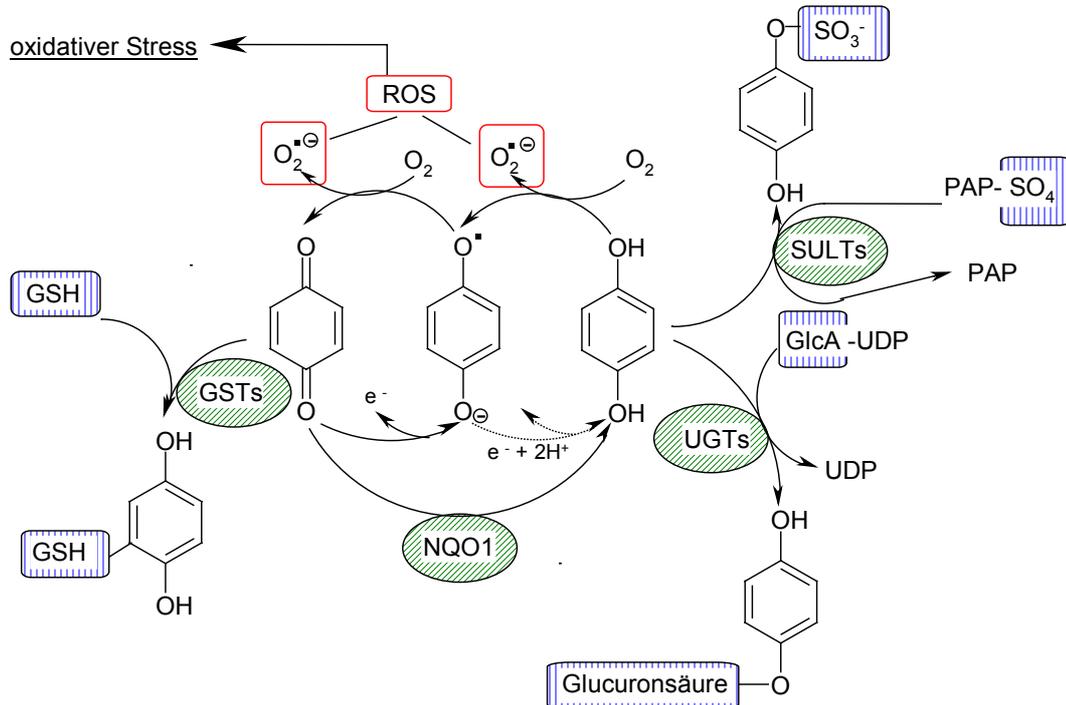


Abbildung B-11 Übersicht zur Wirkung von Phase II-Enzymen. Folgende Abkürzungen gelten: Glutathion (GSH), Glutathion-S-Transferasen (GST), NAD(P)H:Chinon-Oxidoreduktase (NQO1), *radical oxygen species* (ROS), Sulfotransferase (SULT), UDP-Glucuronosyltransferase (UGT), Phospho-adenosinphosphat (PAP), UDP-Glucuronsäure (GlcA-UDP) (nach Brooks et al. 2002, Sonoda et al. 2003).

In einigen Studien wurde gezeigt, dass die Enzyme des Fremdstoffmetabolismus durch z.B. Antioxidantien wie tert. Butylhydroxyanisol (BHA) oder tert. Butylhydroxychinon (TBHQ), aber auch durch andere Verbindungen wie Phenobarbital, Clofibrat und Ethanol induziert werden können (Münzel et al. 1999). Dabei werden bestimmte Sequenzen in der DNA, wie das ARE (engl. *antioxidant response element*) und das XRE (engl. *xenobiotic response element*) aktiviert, die eine Signalkaskade auslösen, als deren Folge Enzyme des Fremdstoffmetabolismus verstärkt exprimiert werden können (Münzel et al. 1999, Valerio et al. 2001, Sonoda et al. 2003).

Verbindungen, die nur Enzyme aus einer der beiden Enzymgruppen induzieren, werden monofunktionale Induktoren genannt. Substanzen, die eine Expression von

Phase I- und II-Enzyme anregen können, werden als bifunktionale Induktoren bezeichnet (Prochaska und Talalay 1998, Miranda et al. 2000). Bekannte monofunktionale Induktoren sind z.B. tert. Butyl-hydrochinon und andere phenolische Antioxidantien sowie allgemein Verbindungen, die Michael-Reaktion-Akzeptoren darstellen (Münzel et al. 1999, Brooks et al. 2002).

Die Bedeutung des Fremdstoffmetabolismus für die Chemoprävention ist groß, da sich Zellschäden verringern oder vermeiden lassen, wenn die Schadstoffe schnell inaktiviert oder ausgeschieden werden können. Daher ist es das Ziel von Chemopräventionsstudien, isolierte Verbindungen, Lebensmittelinhaltsstoffe oder Lebensmittel als solche zu identifizieren, die monofunktionale Induktoren von Phase II-Enzymen darstellen (Bartsch et al. 1997, Tukey und Strassburg 2000, Krzystyniak 2002, Sonoda et al. 2003).

Die Aktivität von Enzymen kann auf verschiedene Weise beeinflusst werden:

1. Exprimierung einer größeren oder kleineren Menge des entsprechenden Enzyms
2. Beeinflussung der post-translationalen Modifikation des Enzyms
3. Beeinflussung der Enzymaktivität durch allosterische Modifikation
4. Beeinflussung der Enzymaktivität durch kompetitive Hemmung.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Beeinflussung der Expression von Phase II – Enzymen durch Messungen der Enzymaktivität beurteilt. Für einzelne Enzyme wurde der mRNA-Gehalt in den Zellen bestimmt, um eine Beeinflussung der Enzymexpression fest zustellen. Die untersuchten Phase II – Enzyme werden im Folgenden näher beschrieben.

3.1 Cytochrom P450-Isoenzyme

Die Cytochrome sind Häm-haltige Enzyme der Atmungskette und gehören funktionell zu den Monooxygenasen. Lokalisiert sind die Cytochrome in der inneren Mitochon-

drienmembran. Sie werden nach ihren UV-Absorptionsbanden in die drei Gruppen a (Maximum bei 600 nm), b (Maximum bei 560 nm) und c (Maximum bei 550 nm) eingeteilt.

Die Cytochrom P450-Isoenzyme (Cyp P450) werden zur b-Gruppe gezählt. Sie unterscheiden sich von den anderen Enzymen ihrer Gruppe durch Kohlenmonoxid als Ligand, woraus ihr charakteristisches Absorptionsspektrum entsteht, das ein Maximum bei 450 nm aufweist. Die Cyp P450-Isoenzymfamilie⁵⁶ umfasst mehr als 20 Enzyme, die zum Teil konstitutionell, zum Teil aber auch induzierbar vorliegen. Das Cytochrom-Enzymsystem besteht aus einem Flavoprotein mit der Häm-Gruppe und einem Phospholipid. Möglicherweise ist auch Nicht-Hämeisen gebunden (Voet und Voet 1994, Römpp online 2006).

Die Funktion der Cyp P450-Isoenzyme ist die Katalyse der Hydroxylierung von aliphatischen und aromatischen Substraten sowie Aminen, der Epoxidierung von Doppelbindungen, der oxidativen Desalkylierung von N-, O- u. S-Alkylen, der oxidativen Desaminierung von Aminen und der Oxidation von Thioethern zu Sulfoxiden, wie in Abbildung B-12 schematisch dargestellt ist (Eisenbrand 2005). Für die Katalyse dieser Reaktionen benötigen die Cyp P450-Isoenzyme $\text{NADPH} + \text{H}^+$ als Kosubstrat.

Die Hauptbedeutung der Cyp P450-Isoenzyme liegt in der Umsetzung lipophiler körpereigener Stoffe, sekundärer Pflanzeninhaltsstoffe, mikrobieller Abbauprodukte und Xenobiotika (z. B. Pharmaka, Pestizide). Durch die Katalyse von Cyp P450-Isoenzymen werden die genannten Substanzen hydrophiler und können direkt ausgeschieden werden, oder sie werden aktiviert, so dass andere Enzymsysteme sie weiter metabolisieren können. Diese Umsetzungen können für den Organismus erwünschte oder schädliche Wirkungen haben. Betroffene Verbindungen sind Pharmaka, z.B. Codein, Lidocain, Propranolol oder Xenobiotika, z.B. Benzo[α]pyren, Coumarin, Aflatoxin B₁ (Eisenbrand 2005, Römpp online 2006, Quattrochi und Guzelian 2001).

⁵⁶ Enzyme mit gleicher Reaktionsspezifität und genetisch determinierten Unterschieden in der Primärstruktur (Römpp online 2006) – auch Polymorphismus

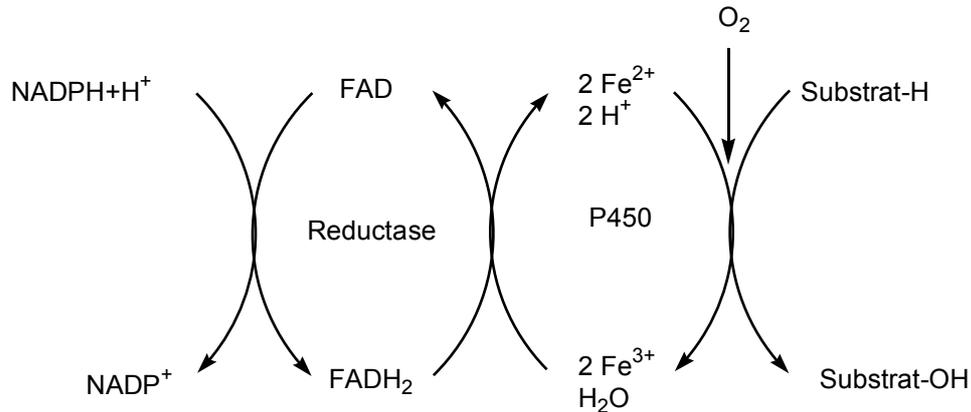


Abbildung B-12 Schematischer Ablauf der Mono-Oxygenierung durch Cyp P450-Isoenzyme (Römpp online, 2006).

3.2 Glutathion-S-Transferase

Die Glutathion-S-Transferasen (GST) sind eine Familie cytosolischer Enzyme, durch welche die Konjugation meist hydrophober elektrophiler Substrate mit Glutathion (GSH) katalysiert wird, wie am Beispiel von 2-Chlor-1,4-dinitrobenzol (CDNB) in Abbildung B-13 aufgezeigt wird. Das hydrophile Konjugat wird weiter metabolisiert (Mercaptursäure-Weg). Die resultierenden Mercaptane können über die Niere ausgeschieden werden (Molekulargewicht < 300 Da). Im Zuge des Mercaptursäure-Wegs kann es jedoch durch β -Spaltung auch zur Bildung von Ammoniak und Thiolat-Anionen kommen, die im Einzelfall toxisch sein können (Buckberry und Teesdale 2001).

Die Glutathion-S-Transferasen (GST) zeigen, wie auch andere Enzyme des Fremdstoffmetabolismus, einen deutlichen Polymorphismus. Dies bedeutet, dass innerhalb einer Spezies (hier: Mensch) interindividuelle Unterschiede in der metabolischen Kompetenz von >1% auftreten (Eisenbrand 2005, Hayes und Strange 2000).

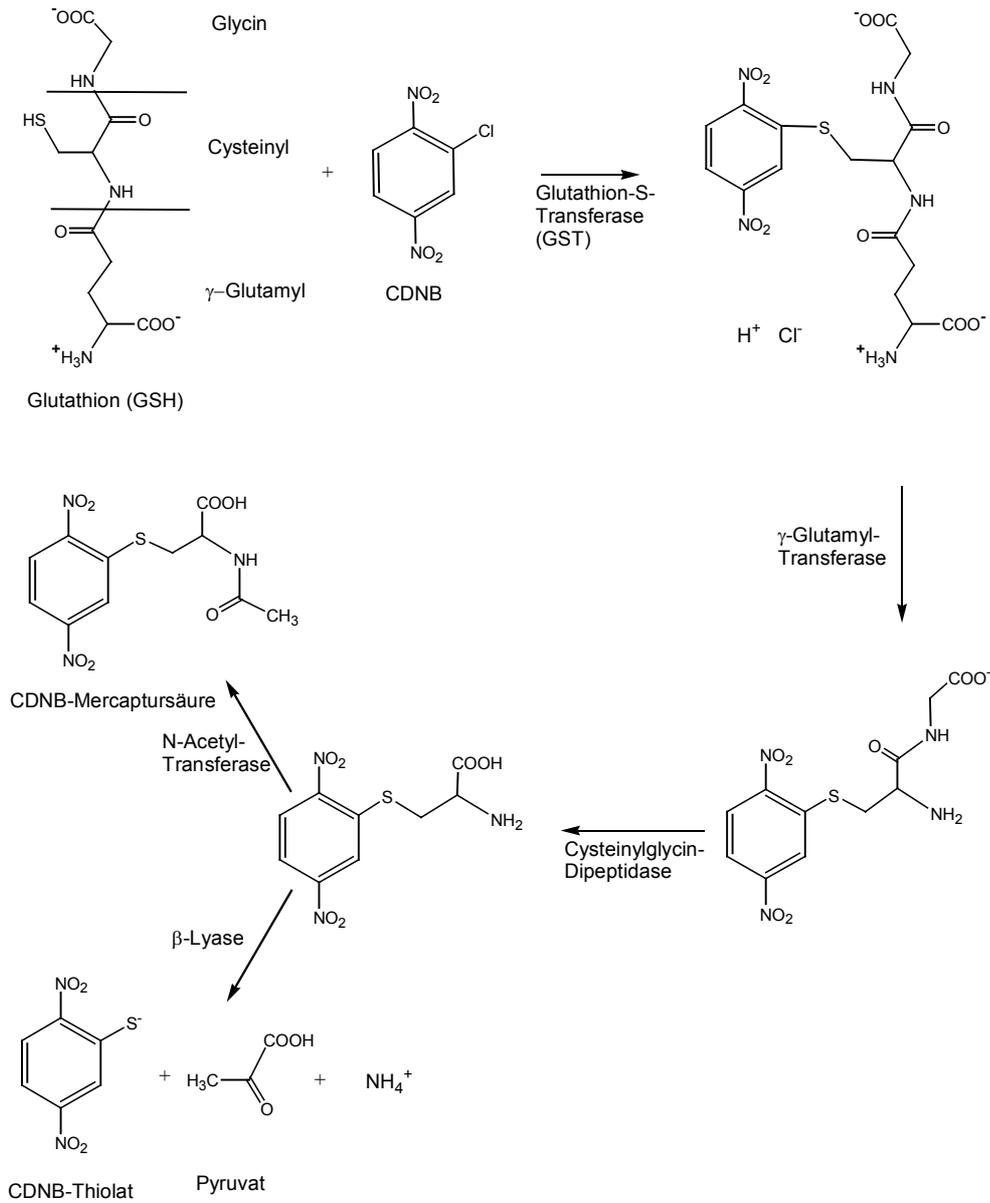


Abbildung B-13 Konjugation von Glutathion mit 2-Chlor-1,4-dinitrobenzol (CDNB) und nachfolgendem Mercaptursäure-Weg (Habig 1974, Buckberry und Teesdale 2001).

Inzwischen wurden mehr als 20 GST-Isoenzyme beschrieben, die sich außer in ihrer Funktion vor allem in der Sekundär-, Tertiär- und Quartärstruktur ähnlich sind. Die

Übereinstimmung in der Primärstruktur beträgt jedoch nur ca. 50% (Buckberry und Teesdale 2001).

In Darmgewebe wurden die GST-Isoenzymfamilien A4, μ 3, T1, MGST-I, MGST-I like I, MGST II und FLAP nachgewiesen (Hayes und Strange 2000), während in Lebergewebe die GST-Isoenzyme A1, A2, A4, K1, μ 1, T1, O1, MGST-I, MGST-II und LTC₄S beschrieben wurden (Hayes und Pulford 1995, Hayes und Strange 2000).

Wegen ihrer Fähigkeit zur direkten Entgiftung sind GST für den Organismus essentiell. Das Ziel der Chemoprävention ist die Identifizierung von Verbindungen, die diese Enzyme *in vivo* induzieren können. *In vitro* wurde u.a. in Caco2- und HT29-Zellen bereits gezeigt, dass GST-Isoenzyme durch Isothiocyanate, Flavonoide, Chalcone und Melanoidine induziert werden können (Kirlin et al. 1999, Fiander et al. 2000, Faist et al. 2002).

3.3 UDP-Glucuronosyltransferase

Die UDP-Glucuronosyltransferasen (UGT) sind eine Familie membranständiger Enzyme, die UDP-Glucuronsäure auf nukleophile funktionelle Gruppen (-OH, -COOH, -SH, -CO, -NH₂, -NHR, -NR₂) übertragen können, wie in Abbildung B-14 schematisch dargestellt ist. Durch die Glucuronidierung wird die Ausscheidung der Substanzen über die Galle ermöglicht. Das bekannteste Substrat ist das Abbauprodukt des Häms, das Bilirubin. Insgesamt wurden bisher mehr als 350 Substrate identifiziert (Eisenbrand 2005, Tukey und Strassburg 2000).

Bislang sind 15 menschliche UGTs bekannt, die sich in 2 Unterfamilien gliedern lassen. Beide Familien werden jedoch von einem einzelnen Gen mit mehreren Exons codiert und unterscheiden sich nur in den Aminosäuren am N-Terminus. Am Carboxylende sind alle humanen UGTs wenigstens zu 40% identisch (Tukey und Strassburg 2000).

Die Einteilung der beiden UGT-Unterfamilien wird anhand der Anzahl der codierenden Exone getroffen:

1. UGT1-Familie: 8 Mitglieder, codiert durch 5 Exone
2. UGT2-Familie: 7 Mitglieder, codiert durch 6 Exone.

Die UGTs werden in den Zellen gewebespezifisch exprimiert. Das wichtigste Organ ist die Leber, in der zehn der 15 bekannten UGTs vorkommen. In anderen Geweben, die Fremdstoffen ausgesetzt sind, werden ebenfalls UGTs exprimiert. Im Dün- und Dickdarm treten acht der 15 UGT-Isoenzyme auf (Tabelle B-9).

Die in Leber und Kolon identifizierten Isoformen UGT1-A6, UGT1-A9 und UGT2-B7 können in Caco2-Zellen *in vitro* durch Antioxidantien wie z.B. BHA oder TBHQ und das Flavonoid Chrysin induziert werden (Münzel et al. 1999, Galijatovic et al. 2000). In Ratten wurde eine *in vivo*-Induktion von UGT-Aktivität nach oraler Aufnahme der Kaffee-Bestandteile Kahweol und Cafestol beobachtet. Die Aktivitätssteigerung war am stärksten in Niere und Leber, weniger stark im Kolon der Versuchstiere ausgeprägt (Huber et al. 2002).

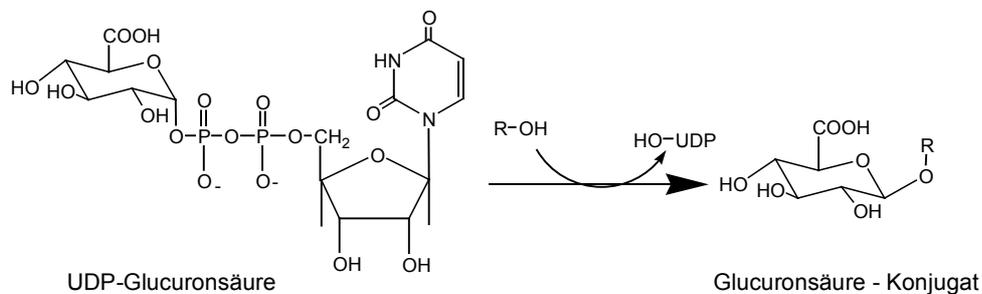


Abbildung B-14 Allgemeiner Mechanismus der Glucuronidierung von Alkoholen (hier R-OH, mit R für beliebigen Alky- oder Aryl-Rest) (Eisenbrand 2005).

Tabell B-9 Bislang in Darm und Leber identifizierte UGT-Isoenzyme (Tukey und Strassburg 2000).

Isoenzym	Gewebe
UGT1-A1	u.a. Leber, Kolon ⁵⁷
UGT1-A3	u.a. Leber, Kolon
UGT1-A4	u.a. Leber, Kolon
UGT1-A6	u.a. Leber, Kolon
UGT1-A8	u.a. Jejunum ⁵⁸ , Ileum ⁵⁹ , Kolon
UGT1-A9	u.a. Leber, Kolon
UGT1-A10	u.a. Dünndarm, Kolon
UGT2-B4	u.a. Leber
UGT2-B7	u.a. Leber, Dünndarm, Kolon
UGT2-B10	u.a. Leber
UGT2-B11	u.a. Leber
UGT2-B15	u.a. Leber

3.4 Sulfotransferase

Sulfotransferasen (SULT) katalysieren die Übertragung eines Sulfonsäurerests auf nukleophile Akzeptoren. Dadurch werden reaktive Verbindungen inaktiviert bzw. polarer, so dass sie (meist renal) ausgeschieden werden können. Ferner können einige Verbindungen Substrate für den interzellulären Multi-Drug-Resistance-Komplex (mrp) werden, durch den Xenobiotika aktiv aus der Zelle geschleust werden. Infolge der Derivatisierung von Xenobiotika durch SULT-Isoenzyme werden jedoch auch Verbindungen gebildet, die potentielle DNA-Addukte darstellen (Glatt et al. 1998, Coughtrie und Johnston 2001). Die Bedeutung der SULT ist also ambivalent.

⁵⁷ mittleres Stück des Dickdarms

⁵⁸ mittleres Stück des Dünndarms

⁵⁹ hinteres Ende des Dünndarms

Die Sulfotransferasen sind cytosolische Enzyme. Als Sulfatüberträger fungiert 3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat (PAPS), für dessen Bildung zwei Moleküle ATP verbraucht werden (Abbildung B-15) (Coughtrie et al. 1998). Die beim Menschen bislang bekannten 11 Isoenzyme werden nach ihrer Substratspezifität in drei Unterfamilien gegliedert:

1. Aryl-Sulfotransferasen (SULT1) – akzeptieren Phenole, Katechole und Hydroxylamine als Substrat
2. Hydroxysteroid-Sulfotransferasen (SULT2) – akzeptieren Steroide als Substrat
3. Estron-Sulfotransferasen (SULT4) – akzeptieren Estradiole als Substrat.

Die SULT werden gewebespezifisch exprimiert. Das wichtigste Organ ist die Leber, aber auch in Darmzellen und anderen Geweben wurde Sulfotransferase-Aktivität nachgewiesen. Die in Leber und Darm exprimierten Isoenzyme sind in Tabelle B-10 aufgeführt.

In einer *in vivo*-Studie wurde in Ratten eine Induktion von SULT durch Tamoxifen beobachtet (Maiti und Chen 2003). Andere Polyphenole wie Resveratrol, Kaffeesäure oder Epicatechingallat hemmten jedoch die Aktivität von isolierten rekombinanten SULT1-Isoenzymen *in vitro* (Coughtrie und Johnston 2001). Die Ergebnisse zeigen, dass Nahrungsfaktoren einen Einfluss auf die SULT-Aktivität haben können, ein Faktum, dass aufgrund der Ambivalenz der Konjugate von grundsätzlichem Interesse ist.

Tabelle B-10 Bislang in Leber und Darm identifizierte Sulfotransferase-Isoenzyme (SULT) (Coughtrie et al. 1998, Coughtrie und Johnston 2001, Chen und Chen 2003).

Familie-Isoenzym	Gewebe
SULT1-A1	u.a. Leber, Darm
SULT1-A2	u.a. Leber
SULT1-A3	u.a. Leber, Jejunum
SULT1-B1	u.a. Leber, Darm
SULT1-E1	u.a. Leber, Jejunum
SULT2-A1	u.a. Leber, Jejunum

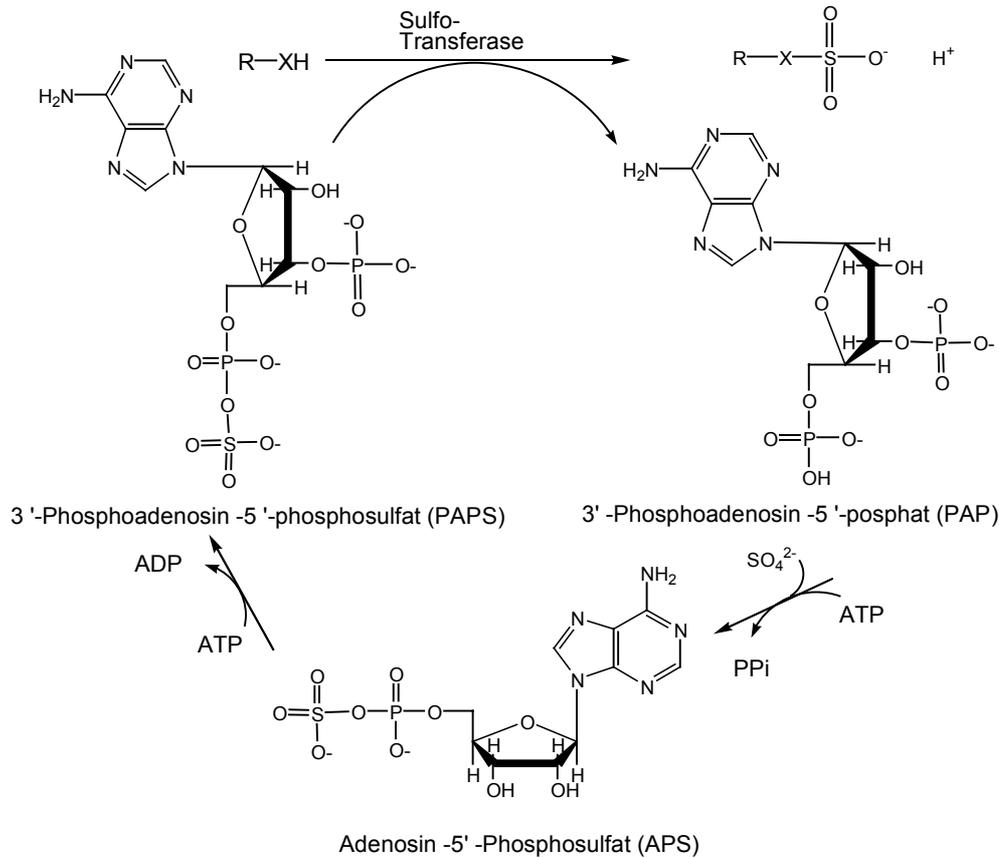


Abbildung B-15 Allgemeiner Mechanismus der Sulfotransferase-Katalyse von Alkyl- oder Arylresten. X kann für die chemischen Elemente Sauerstoff, Stickstoff und Schwefel stehen. Der untere Teil der Grafik zeigt den Regenerationskreislauf für den Sulfonsäure-Donor 3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat (PAPS). ATP steht für Adenosintriphosphat, ADP für Adenosindiphosphat, PP_i für Diphosphat, (Coughtrie und Johnson 1998).

3.5 NAD(P)H:Chinon-Oxidoreduktase

Die NAD(P)H:Chinon-Oxidoreduktase (NQO) ist ein cytosolisches Flavoprotein, das die Reduktion von vielen Chinonen und Chinoniminen katalysiert. Das natürliche Substrat der NQO ist Vitamin K (Menadion), das in der Leber zu Menadiol reduziert und dadurch aktiviert wird. Diese Reaktion ist in Abbildung B-16 dargestellt. Die NQO schützt die Zellen vor toxischen Verbindungen, indem es die obligatorische Zwei-Elektronen-Reduktion der Chinone katalysiert und so das Auftreten von Ein-Elektronen-Transfers, aus denen radikale Sauerstoffverbindungen hervorgehen können, vermindert. Die reduzierten Chinone werden sulfoniert (durch *SULT*, s.o.) oder

glucuronidiert (durch UGT, s.o.) und ausgeschieden, bevor sie reoxidiert werden können (Miranda et al. 2000, Brooks et al. 2002). Ähnlich wie bei der Cytochrom P450-Isoenzymfamilie und den Sulfotransferasen sind auch einige Verbindungen nach Umsetzung durch NQO stärker toxisch als die Ausgangsverbindung. So können z.B. einige Chinone/Hydrochinone direkt an die zelluläre DNA binden und Schäden verursachen (Winski 2002).

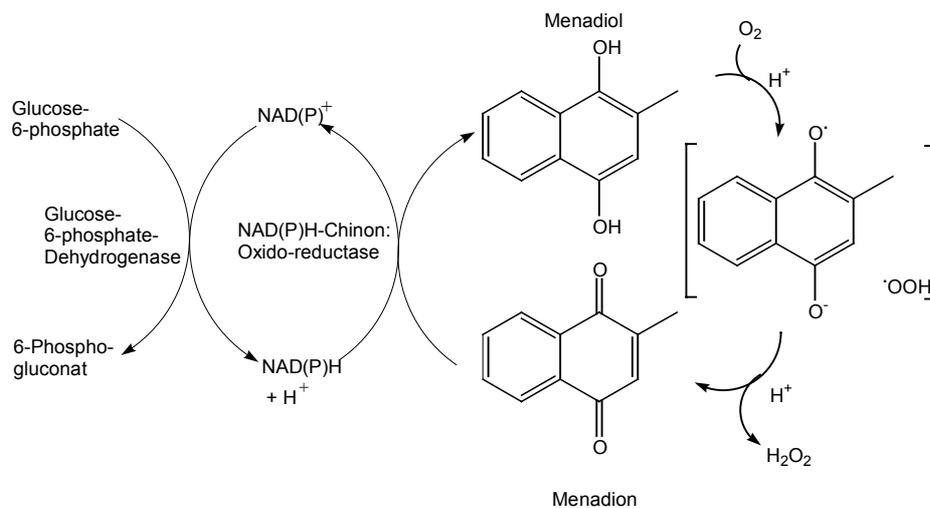


Abbildung B-16 Schematische Darstellung der NAD(P)H-Chinon:Oxidoreduktase (NQO)-Reduktion des natürlichen Substrats Menadion. Menadion wird unter NAD(P)H-Verbrauch (wird durch die Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase regeneriert) zu Menadiol reduziert. Menadiol kann in saurem Milieu durch Sauerstoff über ein intermediäres Radikal wieder zu Menadion oxidiert werden (Prochaska und Santamaria 1988).

Die NQO kommt hauptsächlich in der Leber vor, ist aber auch in anderen Geweben wie z.B. Darmepithelzellen nachgewiesen worden (Winski 2002). Man unterscheidet zwei Isoformen: NQO1 und NQO2, die von unterschiedlichen Genen codiert werden. Die Induktion von NQO1 durch Chemikalien und Lebensmittel wurde *in vitro* im Hepa1c1c7⁶⁰-Zellkulturmodell gezeigt und als Marker für die Induktion von Phase II-Enzymen angesehen (Prochaska und Santamaria 1988).

⁶⁰ permanente Zell-Linie aus Mäuseleber, wird häufig zur Untersuchung der NAD(P)H-Chinon-Oxidoreduktase als Marker für Phase II-Enzyme eingesetzt.

4 Betalaine

Die Betalaine sind eine Gruppe stickstoffhaltiger Pflanzenfarbstoffe. Ihre Farbverteilung reicht von gelb über orange und rot bis rotviolett. Die roten Betalaine werden Betacyane, die gelben Betaxanthine genannt. Eine Übersicht über die Grundstruktur der Betalaine sowie über wichtige Betacyane und Betaxanthine gibt Abbildung B-17. Betalaine kommen nur in Pflanzen der Ordnung Caryophyllales vor. In diesen Pflanzen treten gleichzeitig keine Anthocyane⁶¹ auf. Eine Ausnahme sind die Familien der Caryophyllaceae und der Molluginaceae, in denen Anthocyane, aber keine Betalaine auftreten. Außer in höheren Pflanzen sind Betalaine auch in einigen Pilzen wie *Amanita* und *Hygrosporus* zu finden. In den Pflanzenzellen werden Betalaine in der Vakuole gespeichert (Stintzing et al. 2001, Mabry 2001). Ihnen wird Bedeutung als Phytoalexine, Attraktantien und beim UV-Schutz zugeschrieben (Delgado-Vargas et al. 2000).

Die Struktur von Betalainen wurde ab 1950 erforscht. Zu dieser Zeit kannte man schon die Grundstrukturen der Anthocyane und Anthocyanidine (Abbildung B-18). Man wusste damals, dass Betalaine Stickstoff enthalten und kannte zwei Abbauprodukte des roten Betanins. Daher nahm man für das bekannteste Betalain, das Betanin aus der Roten Beete (*Beta vulgaris*), eine den Anthocyanen ähnliche Struktur an (Mabry 2001, Abbildung B-19). Durch die Arbeiten von Wyler, Dreiding und Mabry wurde in den frühen 60er Jahren die Grundstruktur des allen Betalainen gemeinsamen Chromophors, die der Betalaminsäure (Abbildung B-17), aufgeklärt.

⁶¹ Familie von blau-roten Pflanzenfarbstoffen aus der Familie der Flavonoide. Anthocyane liegen in Pflanzen meist als Glykosid vor. Die Aglykone heißen Anthocyanidine (Römpp online 2006).

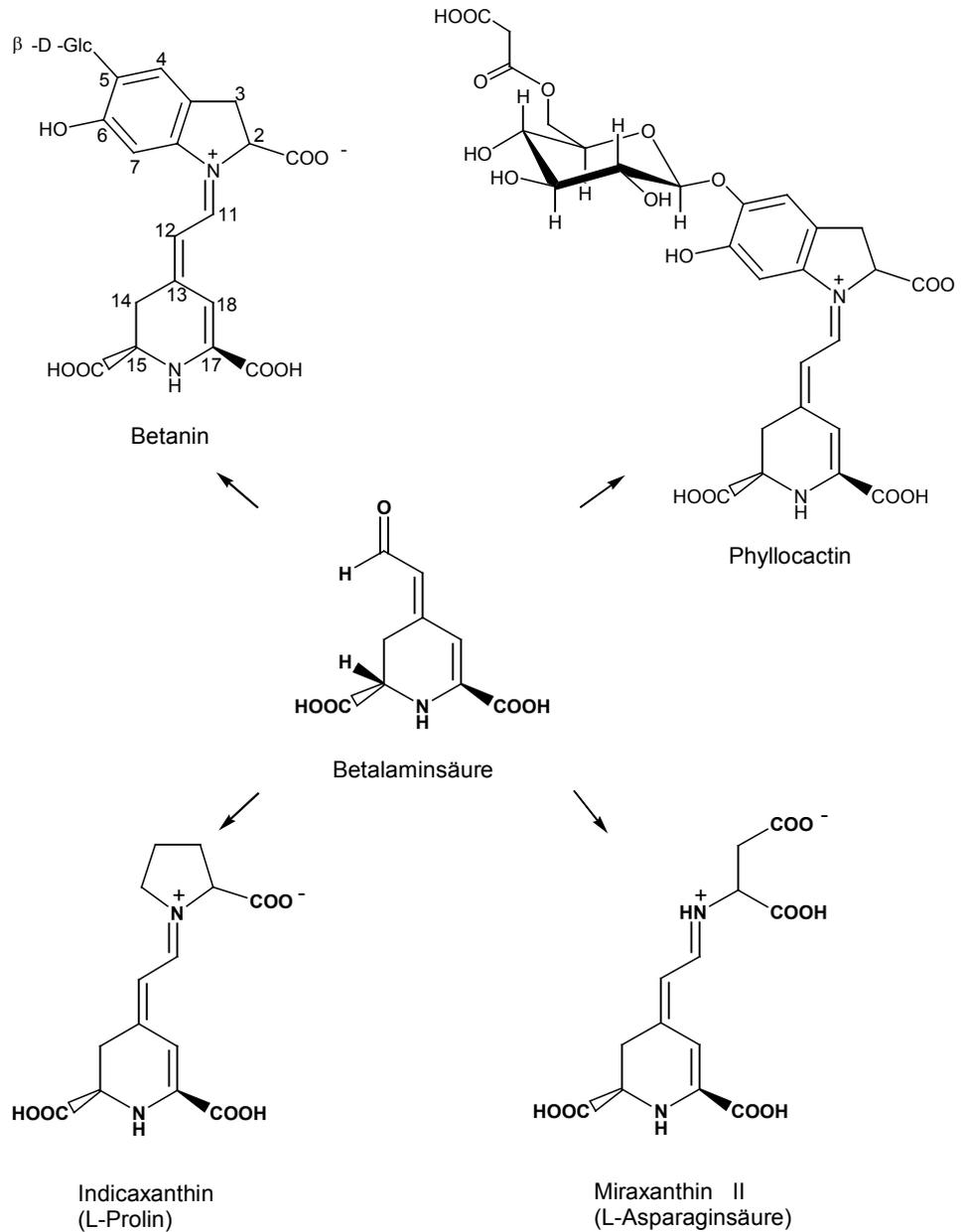


Abbildung B-17 Wichtige Betalaine: Betalaminsäure, Grundstruktur aller Betalaine (Mitte); Betacyane (rote Farbstoffe, obere Reihe): Betanin und Phyllocactin; Betaxanthine (gelbe Farbstoffe, untere Reihe Indicaxanthin und Miraxanthin II. Atom-Nummerierung am Beispiel von Betanin (nach Stintzing et al. 1999, Mabry 2001, Strack et al. 2003).

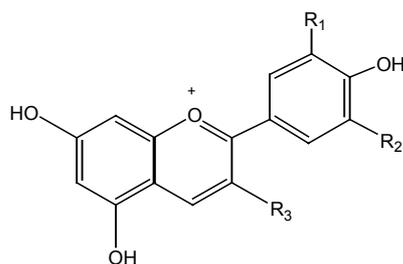


Abbildung B-18 Grundstruktur einiger Anthocyanidine (Römpp online 2006).

	R1	R2	R3
Pelargonidin	H	H	OH
Cyanidin	OH	H	OH
Delphinidin	OH	OH	OH
Malvidin	OCH3	OCH3	OH

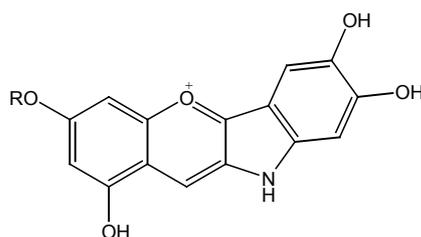


Abbildung B-19 Die postulierte Betalain Struktur von vor 1960, das sog. *nitrogenous anthocyanidine*; R steht als Platzhalter für verschiedene Zuckerreste (nach Mabry, 2001).

In den folgenden Jahrzehnten wurden die zugehörigen Enzymsysteme in Pflanzen der Familie Caryophyllales identifiziert, wie in Abbildung B-20 dargestellt. Nur für den letzten Schritt, die Aldiminbildung, durch die festgelegt wird, ob ein Betacyan (rot, z.B. Betanin) oder ein Betaxanthin (gelb, z.B. Indicaxanthin) gebildet wird, konnte bislang kein Enzym identifiziert werden (Schliemann et al. 1999, 2003). Dieser Schritt hängt möglicherweise nur von der Konzentration und der Gegenwart der beteiligten Substanzen ab.

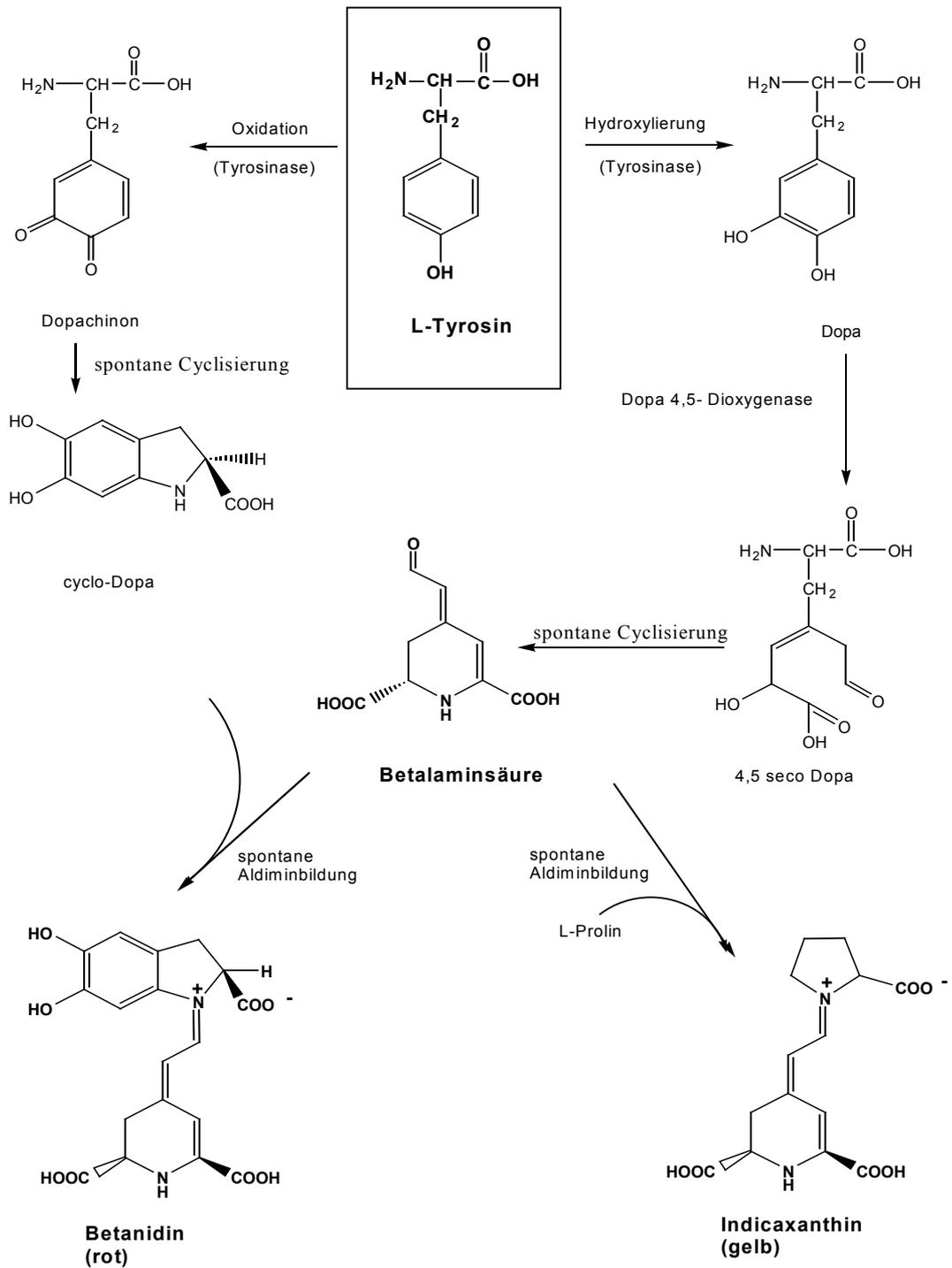


Abbildung B-20 Biosynthese von Betanidin und Indicaxanthin aus L-Tyrosin (nach Schliemann et al. 2003).

Trezzini et al. und anderen Gruppen ist es gelungen, ohne enzymatische Katalyse *in vitro* aus Betalaminsäure und Aminosäuren, wie L-Serin, γ -Amino-buttersäure und Taurin die entsprechenden Betaxanthine herzustellen (Trezzini und Zryd 1991, Hempel et al. 1997, Stintzing et al 1999).

Die Betalaine und Anthocyane werden in Pflanzen aus proteinogenen L-Aminosäuren gebildet. Während bei Betalainen L-Tyrosin die Ausgangsverbindung darstellt (vgl. Abbildung B-20), ist dies bei Anthocyanen L-Phenylalanin. Das ist besonders interessant, da sich das Vorkommen von Betalainen und Anthocyanen in Pflanzen gegenseitig ausschließt, obwohl die beiden Ursprungs-Aminosäuren in allen Pflanzen vorliegen und gerade L-Phenylalanin in betalainhaltigen Opuntien einen großen Anteil der freien L-Aminosäuren stellt (Stintzing et al. 1999, 2000b).

Innerhalb des Pflanzenreichs treten Betalaine nur in der Ordnung Caryophyllales und dort in den Familien Phytolaccaceae, Achatocarpaceae, Nyctaginaceae, Aizoaceae, Didiereaceae, Cactaceae (z.B. *Opuntia ficus indica*), Chenopodiaceae (z.B. *Beta vulgaris*), Amaranthaceae, Portulacaceae und Basellaceae auf (Mabry 2001). Eine Hypothese besagt, dass diese Familien im Lauf der Evolution bestimmte Enzymsysteme verloren oder hinzu gewannen, so dass statt der Anthocyane Betalaine als Pigmente gebildet wurden (Mabry 2001).

Die ebenfalls in die Ordnung Caryophyllales gehörenden Familien Molluginaceae und Caryophyllaceae enthalten jedoch Anthocyane. Untersuchungen der Chloroplasten-DNA und anderer Pflanzengene ergaben, dass diese beiden Familien untereinander weniger starke Verwandtschaftsbeziehungen haben, als jeweils mit den anderen, Betalaine enthaltenden Familien der Ordnung Caryophyllales. Dies deutet darauf hin, dass der Ursprung der Betalain-Bildung komplexer sein dürfte, als die von einem gemeinsamen mutierten Betalain-Vorläufer ausgehende Theorie (Mabry 2001).

4.1 Chemische Eigenschaften der Betalaine

Die gelben Betaxanthine haben ihr Absorptionsmaximum um 480 nm, die roten Betacyane um 535 nm. Orangegefärbte Pflanzen erreichen diese Farbe durch Mischungen gelber Betaxanthine und roter Betacyane.

Betalaine sind zwischen pH 3 und 7 farbstabil. Das Stabilitätsmaximum liegt für Betacyane bei pH 4,5 – 5 und für Betaxanthine bei pH 7. Bei pH > 10 werden Betalaine hydrolysiert und das den Betacyanen wie Betaxanthinen gemeinsame Chromophor, Betalaminsäure, freigesetzt.

Durch Erhitzen können Isomerisierung am C₁₅-Kohlenstoffatom ebenso wie Decarboxylierung eingeleitet werden (vgl. Abbildung B-17) (von Elbe et al. 1981). Die Reaktionsprodukte haben das gleiche Absorptionsspektrum und -maximum wie die Ursprungsverbindung, weshalb diese chemische Veränderung optisch nicht wahrnehmbar ist. Der Einfluss der Temperatur auf die Stabilität der Betalaine ist nicht unter allen Bedingungen gleich, sondern hängt vom Sauerstoffeintrag in das Betalaine enthaltende Medium ab. Von Elbe et al. (1974) und Huang mit von Elbe (1987) ermittelten, dass unter anaeroben Bedingungen Betalaine zwischen pH 4 und 5 am stabilsten sind und in einer Reaktion 0,5ter Ordnung abgebaut werden.

Unter aeroben Bedingungen sind die Betalaine am stabilsten bei pH 5 – 6, und der Abbau unterliegt einer Reaktion erster Ordnung. Der Mechanismus des nativen oxidativen Betalainabbaus ist noch unbekannt. Vermutlich verläuft er nicht nach einem radikalischen Mechanismus, da die Anwesenheit von α -Tocopherol oder L-Ascorbinsäure den Betalainabbau nicht beeinflussen konnte (Jackman und Smith 1996). Einen großen Einfluss auf die Betalainstabilität haben Metallionen wie Zinn und Aluminium, vor allem aber Eisen(III)- und Kupfer(II)-Ionen, die den oxidativen Betalainabbau fördern (Czabski 1990, Kuusi et al. 1977).

Die Betalaine sind lichtempfindlich. Ihre Stabilität gegen sichtbares Licht (400 nm bis 750 nm) ist im pH-Bereich pH 3 – 5 am größten. Der lichtinduzierte Zerfall gehorcht einer Reaktion erster Ordnung. Wirken Licht und Sauerstoff gleichzeitig auf Betalaine, so verstärkt sich der Betalainabbau (Von Elbe et al. 1973, 1981). Eine Bestrahl-

ung mit energiereicher Gammastrahlung von 1 kGy führt zum vollständigen Farbverlust (Aurstad und Dahle 1973).

Betalaine haben hohe molare Extinktionskoeffizienten. Das UV-Maximum von Betanin liegt bei 538 nm, und eine 1%ige wässrige Lösung besitzt einen Extinktionskoeffizienten von 1120 (Piattelli 1965, Henry 1996). Indicaxanthin ist mit einem Extinktionskoeffizienten für eine 1%ige wässrige Lösung von ca. 700 bei einem UV-Maximum von 475 nm weniger farbintensiv. Zum Vergleich: Der künstliche Farbstoff Tartrazin weist in der 1%igen wässrigen Lösung einen Extinktionskoeffizienten von 527 auf.

Bislang werden nur Betanin (rot) und rote Beete Pulver (E 162) als Lebensmittelfarbstoffe eingesetzt. Die gelben Betaxanthine werden bisher nicht zum Färben von Lebensmitteln verwendet, da in Europa und USA noch keine Zulassung der Betaxanthine als Lebensmittelfarbstoff besteht. Bei Einsatz der Betalaine in Lebensmitteln ist zu beachten, dass die Anwesenheit von Sulfid zum schnellen und irreversiblen Betalainabbau führt (Henry 1996). Auch die oben erwähnte Lichtempfindlichkeit schränkt den Einsatz von Betalainen als Lebensmittelfarbstoffe ein. Aufgrund der vielen Einschränkungen hinsichtlich der Stabilität wird Betanin am häufigsten zum Färben von Wurstwaren, Milchprodukten und Eiskrem verwendet (niedrige Temperatur, pH-Wert im optimalen Bereich) (Stintzing et al. 2000, Herbach et al. 2006).

4.2 Bioaktivität der Betalaine

Hinsichtlich ihrer biologischen Bedeutung gehören Betalaine zu den weniger gut untersuchten pflanzlichen Farbstoffen. Das trifft zum einen für die Pflanzenphysiologie selbst, zum anderen für die Bedeutung der Betalaine hinsichtlich der menschlichen Ernährung zu. So ist bekannt, dass Betalaine auch in nicht gefärbtem Gewebe gebildet werden, wenn die Pflanze verletzt wurde. Das liegt vermutlich daran, dass durch die Gewebeverletzung Kompartimente aufgebrochen wurden und so Enzyme und Substrate zusammenkommen und reagieren, oder dass Mechanismen ausgelöst werden, die die Betalainbildung initiieren. Ob diese dann als Boten- oder Abwehrstoffe dienen, ist noch ungeklärt (Delgado-Vargas et al. 2000).

Über die ernährungsphysiologische Bedeutung der Betalaine für den Menschen ist bislang wenig bekannt. Betalaine werden prinzipiell aus dem Verdauungstrakt resorbiert, aber mitunter sehr schnell wieder renal ausgeschieden (Mitchell 2001, Frank et al. 2005). So kann der Urin nach dem Verzehr von Roter Beete oder mit Betalainen gefärbten Lebensmitteln rötlich gefärbt sein. Ob dies an der Art der Zubereitung des Gemüses (z.B. roh, gekocht, verschiedene Garzeiten) oder an der individuellen metabolischen Disposition liegt, ist bislang unklar (Mitchell 2001). Kanner et al. (2001) zeigten, dass beim Verzehr von 120 mg Betanin (durch Trinken von 300 ml Rote Beete Saft) 0,6–1,08 mg Betanin (ca. 1% der zugeführten Menge) im 12 h-Urin der Probanden wiedergefunden wurde. Frank und Mitarbeiter fanden sogar weniger als 0,5% der aufgenommenen Betaninmenge im 24 h-Urin wieder (Frank et al. 2005). Sie stellten außerdem fest, dass Betanin schnell, d.h. mit einer Halbwertszeit von 7 h, ausgeschieden wurde.

Außerdem untersuchten Kanner und Mitarbeiter die Verbindungen Betanin und Betanidin auf ihre antioxidativen Eigenschaften. Die Studien ergaben, dass Betanin und Betanidin aus Roter Beete die durch Cytochrom C induzierte Oxidation von Linolensäure *in vitro* sehr effektiv, das heißt mit IC_{50} -Werten⁶² $< 1 \mu M$, hemmen können. Betanin und Betanidin erwiesen sich auch als potente Inhibitoren der Peroxidation mikrosomaler Lipide (Kanner et al. 2001). Bei diesem Test wurden mikrosomale Fraktionen aus Truthahn-Muskelgewebe mit den Testsubstanzen inkubiert und anschließend mit Metmyoglobin und H_2O_2 behandelt, um die Membranlipide zu oxidieren. Als Messgröße in diesem Versuch diente der Sauerstoffverbrauch. Die IC_{50} -Werte lagen auch hier unter $1 \mu M$. Das bekannte Antioxidans (+)-Catechin [2-(3,4-Dihydroxyphenyl)-chroman-3,5,7-triol] zeigte in beiden Tests weniger gute IC_{50} -Werte: $1,2 \mu M$ bei der Linolensäureoxidation und $2,5 \mu M$ bei der Membranlipidoxidation. Auch bei der Hemmung der Oxidation von LDL durch H_2O_2 -aktiviertes Metmyoglobin wies Betanin etwas bessere antioxidative Eigenschaften als (+)-Catechin auf (Kanner et al. 2001).

⁶² Wichtige Größe in Bioaktivitätsstudien: der Wert bei dem mind. 50 % der Versuchsobjekte den untersuchten Effekt zeigen.

Im Gegensatz zu Kanner und Mitarbeitern, welche die antioxidativen Eigenschaften von Betalainen bei der Oxidation von Lipiden untersuchten, studierten Butera et al. (2002) die antioxidativen Eigenschaften von Betanin, Indicaxanthin und wässrigen Kaktusfeigenextrakten aus roten, gelben und weißen Früchten in hydrophilen Testsystemen. Im verwendeten Trolox-Test wiesen Betanin, Indicaxanthin und die Kaktusfeigenextrakte ein größeres Potential zum Reduzieren des *in situ* generierten $\text{ABTS}^{\cdot+}$ -Radikals (2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzthiazolin)-6-sulfonsäure) auf als das wasserlösliche Vitamin E-Analogon Trolox (6-Hydroxy-2,5,7,8-Tetramethylchroman-2-carbonsäure), welches für diesen Test als Referenzsubstanz verwendet wurde. Außerdem ermittelten die Autoren eine mit steigender Konzentration zunehmende Inhibierung der LDL-Oxidation sowie eine konzentrationsabhängige Reduzierung der Oxidation der Membranlipide von Erythrozyten (Butera et al. 2002).

Interessant ist dabei, dass der weiße Kaktusfeigenextrakt, obwohl er die geringste Farbstoffkonzentration enthielt, in keinem der durchgeführten Tests geringere antioxidative Eigenschaften zeigte als die Extrakte der roten und gelben Früchte. Ausschließlich die reine Verbindung Betanin wies ein fünfmal höheres Trolox-Äquivalent auf als der weiße Extrakt. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass nicht ausschließlich Betalaine das wirksame Agens für die antioxidative Wirkung der Kaktusfeigen sind.

Wettasinghe et al. (2002) konnten zeigen, dass wässrige Extrakte aus verschieden stark pigmentierten Rote Beete (*Beta vulgaris*)-Varietäten *in situ* die Bildung des $\text{ABTS}^{\cdot+}$ -Radikalkations signifikant in Abhängigkeit zunehmender Färbung unterdrücken. Wenn hingegen das Radikalkation in Lösung vorgelegt und anschließend Rote Beete-Extrakt zugesetzt wurde, war die Abhängigkeit der $\text{ABTS}^{\cdot+}$ -Reduktion von der Farbintensität weniger stark, aber noch deutlich zu erkennen. Die gleiche Relation zeigte sich in der Eigenschaft, die durch das Peroxyl-Radikal AAPH [2,2'-Azobis-(2-amidinopropan)-dihydrochlorid] induzierte Bleichung von β -Carotin zu inhibieren.

Da für viele Antioxidantien wie z.B. tert. Butylhydroxyanisol (BHA; 2- bzw. 3-tert. Butyl-4-methoxyphenol) bekannt ist, dass sie Phase II-Enzyme induzieren können,

prüften Wettasinghe und Mitarbeiter antioxidativ wirksame Rote Beete-Extrakte im Hepa1c1c7 – NAD(P)H-Chinon:Oxidoreduktase-Test und fanden, dass die Extrakte aus normal gefärbten und stark pigmentierten Früchten eine mehr als doppelt so starke Induktion der NAD(P)H-Chinon-Oxidoreduktase zeigten als die weißen und orange-farbenen Extrakte. Gleichzeitig war die Zelldichte der mit Extrakten aus normal und stark gefärbten Kultivaren inkubierten Zellen geringer als bei Kontrollzellen oder den weißen oder orange-farbenen Extrakten. Maximal konnte eine Proliferationshemmung um 40% durch stark pigmentierte Rote Beete-Extrakte beobachtet werden. Die übrigen Extrakte verursachten Proliferationshemmungen von 5% (weiße Kultivare) bis 15% (normale Rote Beete) (Wettasinghe et al. 2002).

In Chemosensitivitätsversuchen (vgl. Kapitel B-1.3) fanden Reddy und Mitarbeiter, dass Betanin die Zellproliferation von vier verschiedenen humanen Krebs-Zell-Linien (permanente Linien) effektiv hemmte. Nach 48 h konnten bei einer Testkonzentration von 270 μM Betanin in den Zell-Linien MCF7 (Brusttumor), HCT118 (Kolontumor), AGS (Magentumor), CNS (Tumor des Zentralnervensystems) und NCI-H460 (Lungentumor) nur noch 50% lebende Zellen im Vergleich zum Kontrollansatz gezählt werden. Zusätzlich wurde eine Inhibierung der Cyclooxygenasen I und II in den mit Betanin inkubierten Zellen beobachtet (Reddy et al. 2005).

5 Die Kaktusfeige – *Opuntia ficus indica*

Kaktusfeigen sind die Früchte von Kakteen der Gattung *Opuntia*. Diese Pflanzengattung stellt in der Familie der *Cactaceae* eine von mehr als 200 Gattungen. Stammesgeschichtlich gehört die Familie *Cactaceae* und damit die Art *Opuntia* zu den nelkenähnlichen Gewächsen (Caryophyllales). Für alle Familien dieser Ordnung, mit Ausnahme der *Caryophyllaceae*, den *Nelkengewächsen*, und *Molluginaceae*, sind die Betalaine als Farbstoffe charakteristisch.

Die Gattung *Opuntia* ist in Amerika beheimatet und zählt zur Gruppe der CAM-Pflan-

zen⁶³. Dadurch haben die Opuntien, wie alle *Cactaceae*, in den ariden und semiariden Zonen der Erde einen Wachstumsvorteil gegenüber C3- und C4-Pflanzen (Nultsch 1996).

Die mehr als 300 bekannten Arten wachsen vom 53° nördlicher Breite bis zum 50° südlicher Breite (Kanada bis Süd-Chile) (Bravo 1978). Weiterhin existieren in dieser Gattung zahlreiche Hybride, da es keine biologische Barriere zwischen den oft gleichzeitig blühenden Arten gibt (Gibson and Nobel 1986, Barbera et al. 1995). Etwa ein Drittel der bekannten Opuntien-Arten sind in Mexiko beheimatet. Auch die Art *Opuntia ficus indica* stammt ursprünglich aus Mexiko. Sie wird dort „el nopal“ genannt und ist omnipräsent. Man findet die Früchte von *Opuntia ficus indica* auf allen Märkten, selbst im Staatswappen ist ein Feigenkaktus zu sehen. Für die Azteken war die Kaktusfeige, neben dem Mais und der Agave, eine der wichtigsten Ackerfrüchte (Mondragón-Jacobo und Pérez-González 2001). Aus archäologischen Funden von polyploiden *Opuntia ficus indica*-Pflanzen und dem Wissen um ihren heutigen diploiden Chromosomensatz ($2n = 88$) wird geschlossen, dass der Feigenkaktus eine sehr alte, vermutlich 3000 – 8000 Jahre alte Kulturpflanze ist (Mondragón-Jacobo und Pérez-González 2002). Heute werden in Mexiko Kaktusfeigen auf einer Fläche von ca. 1 Mio ha angebaut. Davon dienen ca. 900.000 ha der Gewinnung von Viehfutter, während auf ca. 100.000 ha Pflanzen zur Fruchtgewinnung angebaut werden (Mondragón-Jacobo und Pérez-González 2002).

Seit der Einfuhr der Kaktusfeigen nach Europa zu Beginn des 16. Jahrhunderts breitete sich diese Pflanze aufgrund des Fehlens natürlicher Schädlinge und ihrer Fähigkeit zur vegetativen Vermehrung im ganzen Mittelmeerraum aus und ist heute aus der mediterranen Landschaft nicht wegzudenken (Hoffmann 1995). Infolge der Kolonialisierung bzw. Globalisierung wachsen Opuntien inzwischen in allen ariden und semiariden Gebieten der Erde (Mondragón-Jacobo und Pérez-González 2002). Mexiko ist

⁶³ CAM (*crassulaceen acid metabolism*) – Säurestoffwechsel der Crassulaceen. Besondere Fähigkeit von meist an trockenen Standorten lebenden Pflanzen, bei Nacht CO₂ aufzunehmen und als organische Säuren (z.B. Äpfelsäure) zu speichern. Bei Tag werden die Säuren oxidativ decarboxyliert und das entstehende CO₂ der Photosynthese zugeführt. Der Säurerest wird in der Glyconeogenese umgesetzt. An ariden Standorten sind CAM-Pflanzen im Vorteil, da sie bei der nächtlichen CO₂-Aufnahme viel weniger Wasser verdunsten als es tagsüber der Fall wäre (Römpf online 2006).

heute noch der Hauptproduzent von Opuntienfrüchten. Hier werden jährlich etwa 70% der Welternte von ca. 420.000 t gewonnen. Danach folgen Italien (ca. 16%), Südafrika (ca. 3%), Chile, Argentinien, USA, Israel und die Türkei mit jeweils maximal 2% der Welternte. Hauptsächlich wird die Art *Opuntia ficus indica* angebaut, allerdings mit einer geringen Sortenvielfalt. Die dominierenden Sorten in Italien sind die gelbfleischige *Giulla*, die weiße *Bianca* und die rote *Rossa*. In Israel werden bevorzugt die orangefarbenen Früchte der Sort *Ofer* angebaut, während in Chile die ganzjährig Früchte tragende, grünlich-weiße Sorte *Blanca* bevorzugt wird. Einzig Südafrika und Mexiko bauen eine größere Sortenvielfalt (mehrere der o.a. Sorten) an (Barbera et al. 1992, 1994, Pimienta-Barrios und Munoz-Urias 1995, Mizrahi und Nerd 1997).

Zu der Art *Opuntia* gehören die widerstandsfähigsten und anpassungsfähigsten Kakteen. So dienen weniger dornige Arten in ariden Zonen als wasserspeicherndes Viehfutter, während andere als Unkraut vernichtet werden (Allkämper 1984). Die Opuntienpflanzen können 3-4 m hoch werden. Wie alle Kakteen bilden sie statt Blätter Blattdornen aus. Die Photosynthese ist bei den Cactaceen in der Sprossachse angelegt (Gibson und Nobel 1986). Diese hat bei den Opuntien eine flache Form und wird Kladodie genannt. Die Achselknospen (Areolen) tragen neben den längeren starken Dornen noch Büschel kurzer, borstenartiger Stacheln (Glochidien), die leicht in die menschliche Haut eindringen können und wegen kleiner Widerhaken schwer zu entfernen sind (Götz und Gröner 1996). Während der Fruchtbildung verwachsen Teile des Blütenbodens mit dem unterständigen Fruchtknoten.

Die Epidermis der Kaktusfeigenfruchtschale, morphologisch eine Kladodie, bildet ebenfalls Areolen mit Glochidien. Aus Gewebesträngen (Funiculi), die die Samenanlage mit der Plazenta verbinden, wird das Fruchtfleisch gebildet (Barbera et al. 1995). Dieses kann je nach Varietät eine grünlich-weiße, gelbe, orangefarbene bis tief-rote Farbe haben. In das Fruchtfleisch sind ca. 40 – 350 gelbbraune Samen eingebettet (Inglese et al. 1995, Barbera et al. 1994). Die Früchte des Feigenkaktus sind 4-11 cm lang, haben einen Durchmesser von bis zu 7 cm und wiegen 100-200 g. 60-70% der Fruchtmasse besteht aus Fruchtfleisch, 30-40% aus der Fruchtschale und 5-10% bringen die Samen ein (Barbera et al. 1995).

Der bekannteste, da am weitesten verbreitete Vertreter der Gattung *Opuntia* ist die Art *Opuntia ficus indica*, die niedrige Büsche, aber auch baumförmige Gewächse bilden kann. Die Pflanze wird auch als Feigenkaktus, Indische Feige oder Feigendistel bezeichnet. Das weißlich-gelbe, korallfarbene oder rote Fruchtfleisch mit seinen kleinen, dunklen essbaren Kernen ist schwach säuerlich und hat ein mildes, süßliches Aroma (Stintzing et al. 2000b). Die Früchte werden vor allem frisch, aber auch als Trockenfrucht verzehrt, sowie zur Honig- und Marmeladenherstellung verwendet. Der Saft wird zum Aromatisieren von Erfrischungsgetränken genutzt. Die Kladodien werden häufig als Salat zubereitet (*ensalada de nopalitos*) (Hoicke und Stintzing 1998).

In der traditionellen mexikanischen Medizin werden die Kaktusfeigenfrüchte bei Durchfallerkrankungen eingesetzt, während die jungen Pflanzensprosse bei vielen Erkrankungen, u.a. Gastritis, Glaukom und Leberschäden, verwendet werden (Tate 1969). Aus den Blüten werden Blasentees hergestellt. Wissenschaftlich ist jedoch nur die Wirkung des Opuntienpektins, das relativ viel Galacturonsäure und einen geringen Methylierungsgrad aufweist, bei diabetischen Ratten belegt (Fernandez et al. 1990, 1992; Mulas 1993, Trejo-Gonzalez et al. 1996).

Die Kaktusfeige ist eine nichtklimakterische Frucht, das heißt, dass sie bei der Lagerung, im Gegensatz zu Bananen und Äpfeln, die klimakterische Früchte darstellen, nicht nachreift (Barbera et al. 1995). Die stoffliche Zusammensetzung der Kaktusfeigen hängt von der jeweiligen Sorte, vom Anbauort, vom Anbaujahr (Jahrgang) und vom Reifegrad ab. Die Tabelle B-11 gibt die durchschnittlichen Gehalte wichtiger *Opuntia ficus indica* – Inhaltsstoffe wieder. Auffällig ist der geringe Säuregehalt der Kaktusfrüchte (0,02-0,08%) ebenso wie der Gehalt an freien Aminosäuren, der mit etwa 1% deutlich über dem anderer Früchte wie Äpfeln oder Birnen liegt. Die nicht-proteinogene Aminosäure L-Taurin dominiert bei den Aminosäuren. In keiner anderen der menschlichen Ernährung dienenden Frucht sind bislang vergleichbare Taurin-Mengen ermittelt worden (Stintzing et al. 1999, Guerri et al. 2000). Es ist bekannt, dass Katzen auf Taurinzufuhr durch die Nahrung angewiesen sind, um die Funktion ihrer Fotorezeptoren aufrecht zu halten (Hayes et al. 1975). Für den Menschen ist eine

externe Zufuhr nicht notwendig, da der Humanstoffwechsel zumindest teilweise zur Eigensynthese von Taurin befähigt ist (Laidlaw et al. 1990).

Tabelle B-11 Durchschnittliche Zusammensetzung an Inhaltsstoffen von *Opuntia ficus indica* im Vergleich zu den Durchschnittswerten von Äpfeln, Birnen, Pfirsichen und Wassermelonen (Stintzing et al. 1999, Souci-Fachmann-Kraut 2000).

	Kaktus- feige	Apfel	Birne	Pfirsich	Wasser- melone
Wasser [g/100g]	83,8	85,3	84,3	87,5	90,3
Reduzierende Zucker [g/100g]	14,1	11,4	12,4	8,9	8,3
D-Glucose [g/100g]	6,5	6,0	6,7	1,2	3,9
D-Fructose [g/100g]	1,0	2,2	1,7	1,0	2,0
Saccharose	1,0	2,5	4,0	6,5	3,0
Eiweiß [g/100g]	0,8	0,3	0,5	0,8	0,6
Rohfaser [g/100g]	0,2	2,0	3,3	1,9	0,2
Fett [g/100g]	0,09	0,6	0,3	0,1	0,2
Mineralstoffe [g/100g]	0,4	0,3	0,3	0,5	0,4
Ascorbinsäure [mg/100g]	20,3	2-25*	4,6	9,5	6,0
Gesamtsäure (als Citronensäure) [g/100g]	0,06	0,5	0,3	0,6	k.A.
freie Aminosäuren (gesamt) [g/100g]	1,0	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5
L-Taurin [g/100g]	0,2	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.
L-Prolin [g/100g]	0,5	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.
L-Glutamin [g/100g]	0,1	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.

* sortenabhängige Schwankung

k.A. – keine Angabe

Galati et al. (2003) ermittelten im Saft von Kaktusfeigen (hergestellt aus 95% gelben und 5% roten Früchten) einen Gesamtphenolgehalt⁵⁸ von 746 mg/l. Zum Vergleich: Rotwein hat je nach Sorte einen Gesamtphenolgehalt von 900 - 2500 mg/l (German

und Walzern 2000)⁶⁴, während Orangensaft bei rund 750 mg/l rangiert (Henn und Stehle 1998)⁵⁸.

Die Flavonoidverteilung des Kaktusfeigensafts wird von Rutin- und Isorhamnetinderivaten dominiert. Im DPPH (1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl)-Test verringerte der Kaktusfeigensaft in einer Konzentration von 6,75 µl pro Ansatz die gemessene Absorption um mehr als 50%. Dies deutet auf eine starke Aktivität des Kaktusfeigensaftes als Radikalfänger hin (Galati et al. 2003). In Ratten reduzierte ein Kaktusfeigensaft (hergestellt aus 95% gelben und 5% roten Früchten) durch Tetrachlorkohlenstoff (CCl₄) hervorgerufene Leberschäden (Galati et al. 2005). Die Autoren untersuchten jedoch nicht, auf welche Saftbestandteile diese Wirkung zurückzuführen war.

In einer *in vivo*-Studie fanden Tesoriere und Mitarbeiter, dass der Verzehr von Kaktusfeigenfrüchten (keine Sortenangabe) zu messbaren Plasmaspiegeln von Betanin und Indicaxanthin bei den Probanden führte. Das Maximum für beide Substanzen war nach 3 h erreicht, 12 h nach dem Verzehr waren keine Betalaine mehr im Blut nachweisbar. 76% der aufgenommenen Indicaxanthinmenge und 3,7% der Betaninmenge wurden in dieser Zeit im Urin wieder gefunden (Tesoriere et al. 2004b). Weiterhin fanden die Forscher, dass das LDL der Probanden nach der Kaktusfeigenverzehr *ex vivo* eine größere antioxidative Kapazität gegenüber der CuCl₂-induzierten LDL-Oxidation hatte, als vor der Mahlzeit (Tesoriere et al. 2004b).

In einer anderen Studie hat man gezeigt, dass nach Verzehr von Kaktusfeigen die Betalaine Betanin und Indicaxanthin in den Erythrozyten der Probanden nachweisbar waren. Das Konzentrationsmaximum wurde schon nach 3 h erreicht, und nach 5 h waren keine Betalaine mehr in den Erythrozyten detektierbar (Tesoriere et al. 2005). In *ex vivo*-Versuchen mit Erythrozyten wurde eine starke antioxidative Kapazität gegenüber der Cumen-Hydroperoxid-induzierten Hämolyse gemessen (Tesoriere et al. 2005). Diese bisher durchgeführten Studien weisen darauf hin, dass betalainhaltige Kaktusfeigenextrakte oder die darin enthaltenen Betalaine selbst vermutlich biologische Aktivität besitzen.

⁶⁴ bestimmt mit der Folin-Ciocalteau-Methode

C Ergebnisse und Diskussion

1 Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Bioaktivität von Betalain-Farbstoffen aus Kaktusfeigen mit *in vitro*-Modellen zu untersuchen. Im Fokus standen dabei mit Indicaxanthin und Betanin die beiden wichtigsten Vertreter der Betalaine. Ausgangspunkt war die Annahme, dass Betalaine ähnliche Funktionalitäten wie Anthocyane aufweisen könnten, die in jüngster Zeit im Zentrum funktioneller Lebensmittel-forschung stehen (Cooke et al. 2005, Nichenametla et al. 2006).

Im Rahmen dieser Arbeit mussten zunächst die Zellkulturtechniken in unserer Arbeitsgruppe etabliert werden. Dies geschah in Zusammenarbeit mit der Abteilung Gastroenterologie der Medizinischen Klinik der Uni-Klinik in Würzburg und dem Nestlé Research Center, Lausanne, Schweiz.

Zu Beginn der Erforschung der Bioaktivität der Betalaine sollten die cytotoxischen Effekte von Indicaxanthin und Betanin mit unterschiedlichen Nachweismethoden und in verschiedenen humanen Zell-Linien ermittelt werden. Dabei war zu klären, ob auftretende cytotoxische Effekte durch Nekrose oder Apoptose verursacht werden oder aus einem Zellzyklusstopp resultieren.

Analog sollte eine „*structure-activity-guided*“-Identifizierung von aktiven Inhaltsstoffen der Kaktusfrucht mit dem Ziel der Charakterisierung bioaktiver Komponenten durchgeführt werden.

In einem weiteren Ansatz war die Fähigkeit der Betalaine, *in vitro* die Expression und Aktivität chemopräventiv wirksamer Enzyme zu beeinflussen, zu untersuchen. Als Messgröße dienten der mRNA-Gehalt des jeweiligen Enzyms in Zellkulturen bzw. die mit entsprechenden Substraten messbare Enzymaktivität.

2 Gewinnung von Referenzsubstanzen

2.1 Einführung

Die für diese Arbeit vorgesehenen Referenzsubstanzen sind käuflich nicht zu erwerben und mussten daher in ausreichender Qualität und Menge aus Früchten extrahiert werden. Die Gewinnung von Betalainen aus Kaktusfeigen und anderen Früchten ist bereits von anderen Autoren beschrieben worden (Schwartz et al. 1980, Stintzing et al. 1999, Kanner et al. 2001, Castellar et al. 2003). In Anlehnung an die Methodik nach Stintzing und Mitarbeitern wurde Indicaxanthin aus gelben Kaktusfrüchten isoliert. Die Früchte wurden über den regionalen Markt bezogen, über Herkunftsland und Varietät waren keine Informationen verfügbar. Da das bekannteste Betalain, Betanin (vgl. Kapitel B-4 und B-5), in Kaktusfeigen nur ein Minorpigment darstellt, wurde ein flüssiges Rote Beete-Saftkonzentrat als Betaninquelle für die Extraktion eingesetzt.

Als Extraktionsmittel wurde Methanol verwendet. Zur Aufreinigung dienten chromatographische Methoden wie die Säulenchromatographie und die semi-präparative HPLC. Die Identifikation und die Reinheitsbestimmung wurden mittels HPLC-DAD, HPLC-MS und IR-Spektroskopie durchgeführt.

2.2 Indicaxanthin

In Anlehnung an die Methode nach Stintzing et al. (1999) wurden zur Extraktion 1000 g Kaktusfeigen geschält und das Fruchtfleisch mit einem Methanol/Wasser-Gemisch (80:20, v/v) extrahiert. Durch Säulenchromatographie an RP18-Material (LiChrospher®, Merck, Darmstadt) erfolgte die Auftrennung des Kaktusfeigenextrakts in eine rotorange und eine gelb gefärbte Fraktion. Aus der gelben Fraktion wurde Indicaxanthin isoliert, während die rote Fraktion aufgrund des bekannt niedrigen Betanin-Gehalts nicht weiter bearbeitet wurde. Zur Isolierung von Indicaxanthin wurde die semi-präparative HPLC eingesetzt. Man erhielt nach Gefriertrocknung 0,5 g Indicaxanthin, entsprechend 0,05% der eingesetzten Fruchtmasse. Ein Infrarot-Spektrum (IR) von Indicaxanthin zeigte Übereinstimmung der Wellenzahlen mit den funktionellen Gruppen der Substanz. Ein Referenzspektrum aus der Fachliteratur stand nicht zur Verfügung.

Im HPLC-UV-MS-Chromatogramm (Abbildung C-1) war mit einer Retentionszeit von 13,19 min bei (475 nm) und mit einem Masse/Ladungsverhältnis von $m/z = 309,5$ ($[M+H^+]$) im ESI-positiv Modus Indicaxanthin ($M=308,29$) zugeordnet. Andere Moleküle konnten nicht identifiziert werden.

Mittels HPLC-DAD-Analytik wurde die Reinheit des isolierten Indicaxanthins überprüft. Abbildung C-2 zeigt das HPLC-DAD-Chromatogramm des isolierten Indicaxanthins. Die aufgezeichneten Wellenlängen 220 nm, 260 nm, 325 nm, 475 nm und 538 nm decken alle UV-Maxima von Indicaxanthin ab. Vor allem die Wellenlängen aus dem ultravioletten Spektrum (hier bis 325 nm) sind geeignet, unspezifisch Verunreinigungen zu ermitteln, da alle Moleküle mit π -Elektronen in diesem Bereich UV-Licht absorbieren (Römpf online, 2006). Die detektierten Peaks bei 220 nm wurden als vernachlässigbare Verunreinigung hingegenommen.

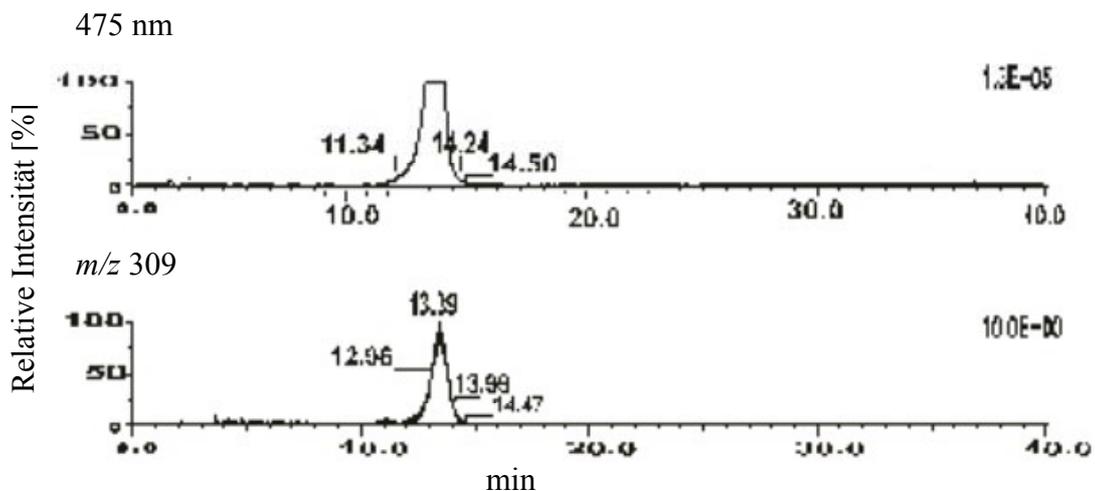


Abbildung C-1: HPLC-UV-MS-Chromatogramm von isoliertem Indicaxanthin (1 mg/ml) Das obere Chromatogramm zeigt die UV-Spur (475 nm), das untere die Massenspur $m/z = 309$.

Trennsäule Eurospher 100 C18 (150 x 2,1 mm, 5 μ m), Fließmittel Wasser + 0,05% TFA (v/v)/Acetonitril, Fluss 200 μ l/min, Gradient: 0–40 min: 1–30 % B, Scan Modus mit Scanbereich m/z 250–1000, ESI_{pos}-MS

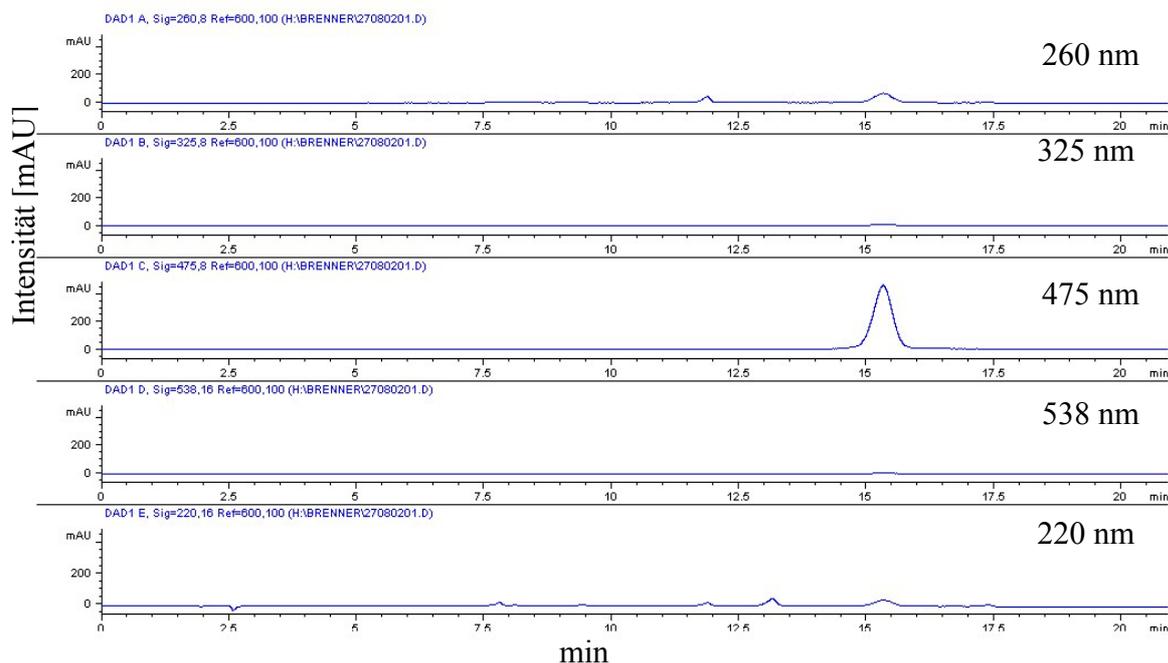


Abbildung C-2: HPLC-DAD-Chromatogramm von isoliertem Indicaxanthin (1 mg/ml) bei fünf verschiedenen Wellenlängen: 220 nm, 260 nm, 325 nm, 475 nm, 538 nm. Für alle Wellenlängen wurde die gleiche Skalierung gewählt. Trennsäule Phenomenex Synergi C18 Hydro (250 x 4,5 mm, 5 μ m), Fließmittel Wasser + 0,05% Ameisensäure (v/v)/Acetonitril, Fluss: 1ml/min, Gradient: 0–20 min: 1–15 % B

2.3 Betanin

Ein mit Wasser verdünntes Rote Beete-Saftkonzentrat wurde nach Filtration (0,45 μ m Spritzenvorsatzfilter) einer semi-präparativen HPLC unterworfen. Aus einem Ansatz erhielt man nach Gefriertrocknung 40 mg Betanin. Im IR-Spektrum zeigte die Substanz Übereinstimmung mit Literaturdaten (Bertram 1989).

Im HPLC-UV-MS-Chromatogramm (Abbildung C-3) trat bei einer Retentionszeit von 15,96 min (bei 538 nm) und mit einem Masse/Ladungsverhältnis $m/z = 551$ ($[M+H]^+$) Betanin ($M=550$) auf. Andere Moleküle konnten nicht detektiert werden.

Mittels HPLC-DAD-Analytik wurde die Reinheit des isolierten Betanins überprüft. Es wurden die gleichen Wellenlängen und Einstellungen wie bei der Reinheitsbestimmung von Indicaxanthin verwendet. Abbildung C-4 zeigt das HPLC-DAD-Chromatogramm für die Wellenlängen 220 nm, 260 nm, 325 nm, 475 nm, 538 nm, in denen

keine relevanten Verunreinigungen erkennbar waren. Die Peaks bei 3 min sind Einspritzpeaks, entstanden durch ungleichmäßiges Beladen der Probeschleife und zu langsame Injektion auf die Säule, wodurch Luftbläschen in das Eluat gebracht wurden.

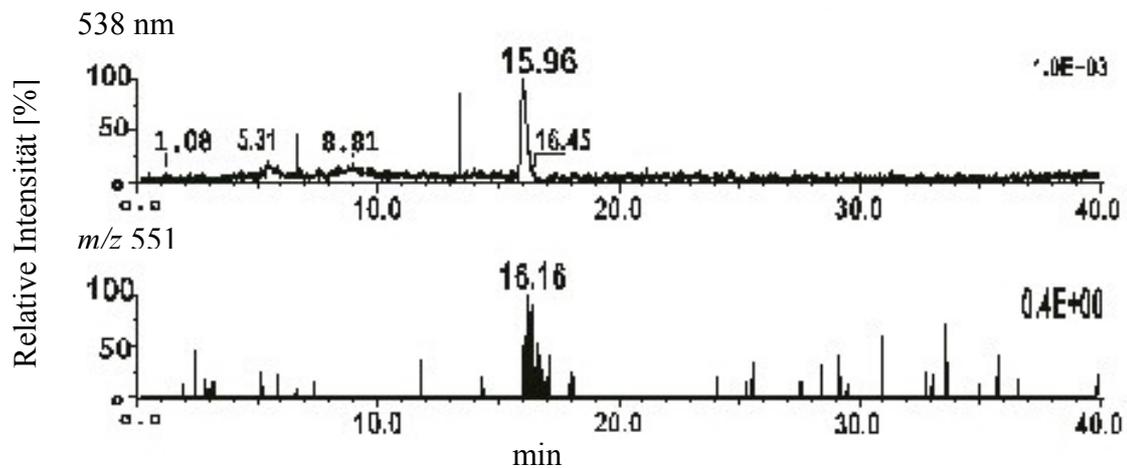


Abbildung C-3: HPLC-UV-MS-Chromatogramm von isoliertem Betanin (1 mg/ml)
Das obere Chromatogramm zeigt die UV-Spur 538 nm, das untere die Massenspur $m/z = 551$.

Trennsäule Eurospher 100 C18 (150 x 2,1 mm, 5 μm), Fließmittel Wasser + 0,05% TFA (v/v)/Acetonitril, Fluss 200 $\mu\text{l}/\text{min}$, Gradient: 0–40 min: 1–30 % B, Scan Modus mit Scanbereich m/z 250–1000, ESI_{pos}-MS

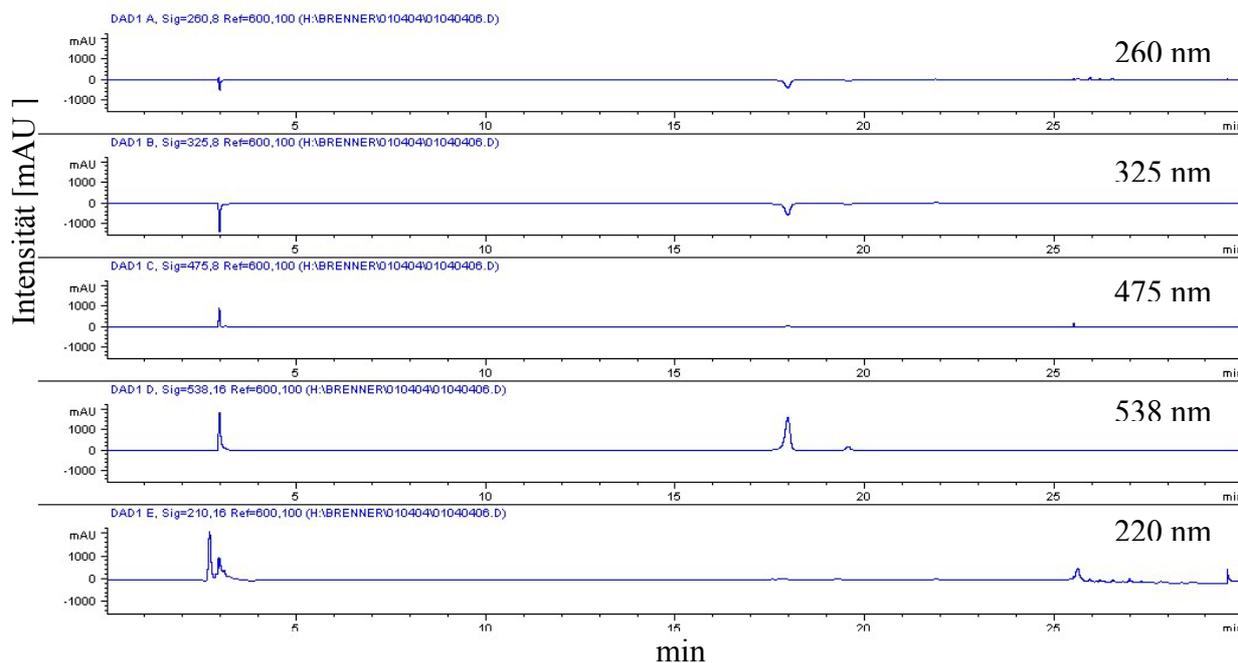


Abbildung C-4: HPLC-DAD-Chromatogramm von gereinigtem Betanin (1 mg/ml) bei fünf verschiedenen Wellenlängen: 220 nm, 260 nm, 325 nm, 475 nm, 538 nm.

Trennsäule Phenomenex Synergi C18 Hydro (250 x 4,5 mm, 5µm), Fließmittel: Wasser + 0,05% Ameisensäure (v/v)/Acetonitril, Fluss: 1ml/min, Gradient: 0–20 min: 1–15 % B

2.4 Gewinnung eines Kaktusfeigen-Extrakts

Zur Gewinnung eines Kaktusfeigen-Extrakts wurden Kaktusfeigen (gelb-orange-farbenes Fruchtfleisch, unbekannter Herkunft und Varietät) geschält und drei Mal mit einem Methanol/Wasser-Gemisch (80:20, v/v) extrahiert. Der gewonnene Extrakt wurde über ein Leinentuch filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Nach Lyophilisation wurden pro Versuchsansatz 50 g Extrakt erhalten.

Das HPLC-DAD-Chromatogramm des Kaktusfeigen-Extrakts zeigte neben Indicanthin und Betanin eine Vielzahl weiterer Substanzen (Abbildung C-5). Insbesondere bei 260 nm sind einige unbekannte Peaks detektiert worden. Bei 475 nm wurden z.B. andere gelbe Betaxanthine und bei 260 nm, wie z.B. phenolische Substanzen detektiert. Eine Identifizierung dieser Verbindungen wurde nicht durchgeführt, da nicht die strukturelle Aufklärung der Kaktusfeigen-Inhaltsstoffe, sondern die Bioaktivität der Früchte und der Betalaine im Fokus der Untersuchung stand.

Im Kaktusfeigen-Extrakt wurde mittels HPLC-DAD-Analyse ein Indicaxanthingehalt von 11 mg/g Extrakt und ein Betaningehalt von 0,9 mg/g ermittelt. Weitere Charakterisierungen erfolgten nicht.

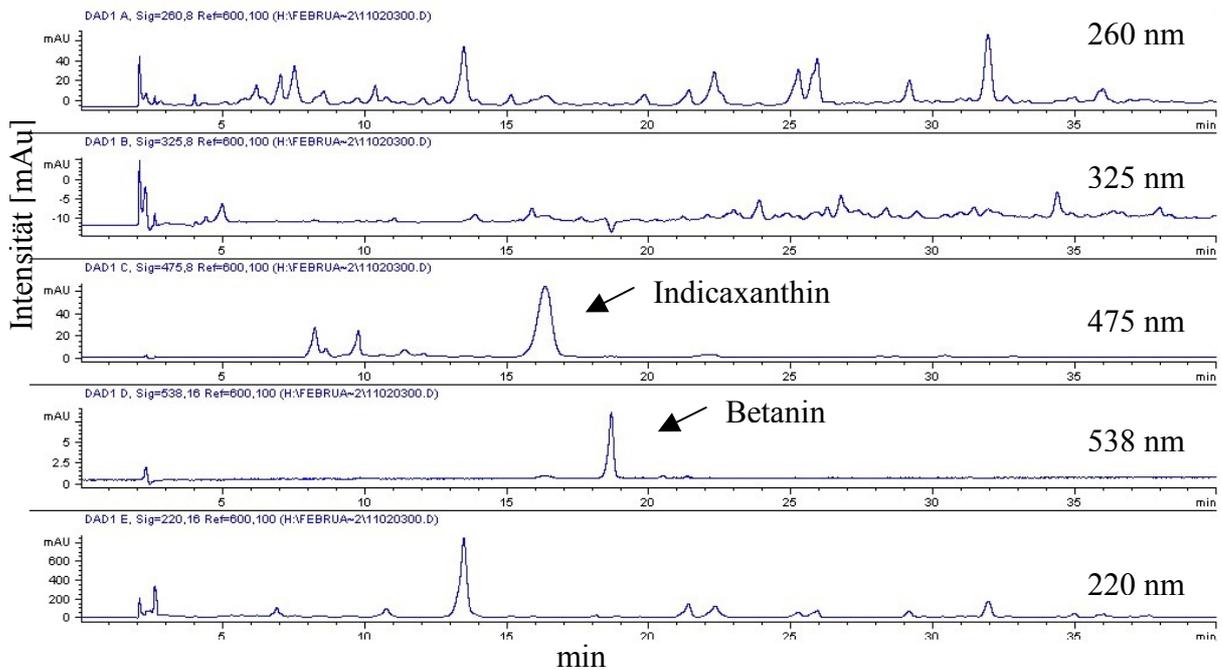


Abbildung C-5: HPLC-DAD-Chromatogramm des Kaktusfeigen-Extrakts bei fünf verschiedenen Wellenlängen: 220 nm, 260 nm, 325 nm, 475 nm, 538 nm. Um die Vielzahl an detektierbaren Substanzen zu zeigen, wurde auf die gleiche Skalierung der Chromatogramme verzichtet.

Trennsäule Phenomenex Synergi C18 Hydro (250 x 4,5 mm, 5 μ m), Fließmittel: Wasser + 0,05% Ameisensäure (v/v)/Acetonitril, Fluss: 1ml/min, Gradient: 0–40 min: 1–30 % B

2.5 Fraktionierung des Kaktusfeigen-Extrakts

Die Fraktionierung des Kaktusfeigen-Extrakts erfolgte mittels semi-präparativer HPLC (Fluss: 4 ml/min, 0-40 min 1-30 % Methanol). Dazu wurden 500 mg Kaktusfeigen-Extrakt in 4 ml Wasser gelöst, über 0,45 μ m Spritzenvorsatzfilter filtriert und in 200 μ l-Portionen aufgereinigt. Die Fraktionierung erfolgte in 10 min-Schritten, wobei jede Fraktion 30 ml umfasste. Nach Entfernung des Methanol-Anteils im

Vakuum und anschließender Gefriertrocknung der Fraktionen wurden aus 500 mg Kaktusfeigen-Extrakt die in Tabelle C-1 gezeigten Ausbeuten erhalten.

Tabelle C-1 Gewinnung von Fraktionen aus Kaktusfeigen-Extrakt (semi-präparative HPLC, Fluss: 4 ml/min, 0-40 min 1-30 % Methanol).

Fraktion	Sammelzeit	Farbe	Ausbeute	Anteil
I	0 – 10 min	hellgelb	425 mg	85 %
II	10,1 – 20 min	gelb	14 mg	2,8 %
III	20,1 – 30 min	beige	14 mg	2,8 %
IV	30,1 – 40 min	ocker	14 mg	2,8 %
V	40,1 – 50 min	beige	14 mg	2,8 %

Da die Inhaltsstoffe der Kaktusfeigen chemisch definierten und mit RP- HPLC gut untersuchten Gruppen (z.B. Aminosäuren, Monosaccharide, Betalaine und Phenole) angehören, kann aus den verwendeten HPLC-Bedingungen die ungefähre Zusammensetzung der Kaktusfeigen-Extrakt-Fraktionen abgeleitet werden. Fraktion I enthielt sehr polare und niedermolekulare Moleküle, wie Glucose, Fructose, freie Aminosäuren (220 nm und 260 nm), einfache Phenole (bei 260 nm) und einige Betaxanthine (bei 475 nm). In Fraktion II fanden sich weniger polare und meist höhermolekulare Verbindungen, niedermolekulare phenolische Verbindungen (260 nm) sowie Indicanthin (λ_{\max} 475 nm) und Betanin (λ_{\max} 538 nm). Die weiteren Fraktionen enthielten z.B. Proteine, höhermolekulare phenolische Verbindungen und Flavonoide. Alle diese Verbindungen sind durch ihre π -Elektronensysteme, aromatische Ringsysteme und Doppelbindungen, die eine UV-Absorption bei 260 nm und 320 nm zeigen, gekennzeichnet. Die UV-Spektren einiger Peaks deuteten, wie erwartet, auf Flavonoide und verwandte Verbindungen hin.

2.6 Indicaxanthinfreier Kaktusfeigen-Extrakt

Von einem Teil des in Abschnitt C-2.4 beschriebenen Kaktusfeigen-Extrakts wurde mittels semi-präparativer HPLC (Fluss: 4 ml/min, 0-40 min 1-30 % Methanol) Indicaxanthin abgetrennt und das übrige Eluat separat lyophilisiert. So erhielt man nach Gefriertrocknung 0,45 g indicaxanthinfreien Kaktusfeigen-Extrakt. Eine weitere Charakterisierung dieses Extrakts erfolgte nicht.

2.7 Diskussion

Für die Extraktion und die semi-präparative HPLC-Fraktionierung von Kaktusfeigenextrakt wurde Methanol als Extraktions- bzw. HPLC-Fließmittel verwendet, da aus der Literatur bekannt war, dass Acetonitril als Extraktionsmittel die biologische Aktivität von Extrakten verringern könnte (Wettasinghe et al. 2002).

Anhand der mittels HPLC-DAD detektierten Peaks (Chromatogramme nicht abgebildet) kann auf die Anwesenheit von Polyphenolen geschlossen werden, wie sie in Kaktusfrüchten allgemein zu erwarten sind (Jeong et al. 1999, Qui et al. 2002, Dok-Go 2003, Galati et al. 2003). In Tabelle C-2 sind die in Kaktusfrüchten nachgewiesenen Polyphenole/Flavonoide zusammengestellt. Nach Galati und Mitarbeitern (2003) stellen Isorhamnetinderivate die Hauptfraktion der in Kaktusfeigen vorliegenden Flavonoide, mit Isorhamnetin-3-O- β -rutosid als Hauptbestandteil.

Tabelle C-2 In Kaktusfrüchten nachgewiesene Flavonoide.

Flavonoide	Literatur
3,3'-Dimethylquercetin	Qiu et al. 2002
3-O-Methylquercetin 7-O- β -D-glucopyranosid	Qiu et al. 2002
Dihydrokaempferol	Jeong et al. 1999
(+)-Dihydroquercetin	Jeong et al. 1999, Dok-Go et al. 2003
Ferulasäure	Galati et al. 2003
Isorhamnetin-3-glucosid	Galati et al. 2003

Tabelle C-2, Fortsetzung

Flavonoide	Literatur
Isorhamnetin-3-O- β -rutinosid	Qiu et al. 2002 Galati et al. 2003
Kaempferol-3-rutinosid	Galati et al. 2003
Kaempferol-7-O- β -D-glucopyranosid	Qiu et al. 2002
Kaempferol-7-O- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucopyranosid	Qiu et al. 2002
Quercetin	Dok-Go et al. 2003
Quercetin-3-methylether	Dok-Go et al. 2003
Rutin (Quercetin-3-O-Rutinosid)	Qiu et al. 2002, Galati et al. 2003

Damit wurden in Kaktusfeigen bislang neben Hydroxyzimtsäuren wie Ferulasäure ausschließlich wasserlösliche Flavonolglykoside nachgewiesen.

Am Ende dieses Abschnitts der Untersuchungen standen uns Betanin, Indicaxanthin, Kaktusfeigen-Extrakt, indicaxanthinfreier Kaktusfeigen-Extrakt und fünf Kaktusfeigen-Extrakt-Fractionen als Testsubstanzen und -mischungen für die Zellkulturversuche zur Verfügung.

3 Hemmung der Proliferation humaner permanent Zell-Linien

Der Einfluss der Testsubstanzen und -mischungen wie Indicaxanthin und Betanin, Kaktusfeigen-Extrakt und indicaxanthinfreier Kaktusfeigen-Extrakt auf das Wachstum der humanen Zell-Linien HCEC, HepG2, HT29 und Caco2 (siehe Kapitel B-2.1 und D-3) wurde über einen Zeitraum von 72 h durch Messungen der Zellzahl nach 24 h, 48 h und 72 h untersucht.

Folgende Methoden zur Ermittlung der Zellzahl als Maß für die Proliferationshemmung wurden eingesetzt:

- Trypanblau-Färbung: Zählung unter Ausschluss toter Zellen (Kapitel B-2.2.1)
- MTS-Methode: Bestimmung lebender Zellen anhand chemischer Aktivität (Kapitel B-2.2.2)
- Neutralrot-Methode: Bestimmung lebender Zellen durch Farbeinlagerung (Kapitel B-2.2.3).

Im Allgemeinen wurde so verfahren, dass erste Versuche mit HT29- und/oder Caco2-Zellen unter Anwendung der Trypanblau-Färbung durchgeführt wurden, an die sich je nach Ergebnis weitere Cytotoxizitäts-Studien anschlossen. Ein Kriterium für weitere Versuche war z.B. das Erreichen von IC_{50} -Werten in einem Konzentrationsbereich von 10 μ M bis 100 μ M. Dieser Bereich wurde von Kroon und Mitarbeitern als maßgeblicher Bereich potenzieller Bioaktivität von Polyphenolen vorgeschlagen (Kroon et al. 2004). Durch die Anwendung von unterschiedlichen Methoden an verschiedenen Zell-Linien sollte die Signifikanz der beobachteten Effekte abgesichert werden. Bevorzugt wurde zu diesem Zweck die MTS-Methode herangezogen. Die Neutralrot-Methode diente der zusätzlichen Absicherung.

Die HCEC-Zellen sollten als Modell für Normal-Zellen (Kapitel B-2) dienen. Wir mussten jedoch feststellen, dass sie für Proliferationsstudien mit Betalainen nicht geeignet waren, da sie sich durch keine der an ihnen getesteten Substanzen beeinflussen ließen. Die Ursachen sind vermutlich in den besonderen Wachstumsbedingungen dieser Zell-Linie zu suchen: HCEC-Zellen benötigen im Gegensatz zu den anderen verwendeten Zell-Linien ein Zellkulturmedium, in dem anstelle von Rinderserum nur geringe Mengen ausgewählter Wachstumsfaktoren, wie z.B. Dexamethason und Hirnanhangsdrüsen-Extrakt enthalten sind. Das bedeutet für die Zellen, dass sie ein langsames, aber robustes Wachstum besitzen. Aufgrund dieser Robustheit ist diese Zell-Linie durch schwach proliferationshemmende Substanzen nicht zu beeinflussen. Die HCEC-Zell-Linie wurde aus diesem Grund nur für Vorversuche eingesetzt, deren Ergebnisse hier nicht diskutiert werden. In den nachfolgenden Tabellen wird die HCEC-Zell-Linie daher mit „nicht getestet“ aufgeführt.

Die Ergebnisse der Studien zur Proliferationshemmung (72 h) sind in den Abbildungen C-6 bis C-17 zeitabhängig dargestellt. In den Tabellen C-3 bis C-14 sind die bei Versuchsende (72 h Inkubation) erhaltenen Resultate zusammengefasst. Die Grafiken geben das Verhältnis „lebender Zellen im Testansatz“ zu den „lebenden Zellen in der Negativkontrolle“ als %-Wert wieder. Die Negativkontrolle wurde als 100% definiert und ist nicht abgebildet. Eine beobachtete Proliferationshemmung ist von weiterführendem Interesse, wenn sie signifikant (s.u.) oder $> 50\%$ ist, so dass ein IC_{50} -Wert angegeben werden kann.

Die Standardabweichung des Mittelwerts aus mindestens drei unabhängigen Versuchsansätzen ist ebenfalls abgebildet. Jeder Versuch in Mikrotiterplatten (96 Vertiefungen (*engl. wells*) wurde per se als Dreifachbestimmung (drei Vertiefungen pro Testsubstanz) durchgeführt, die jedoch nicht unabhängig sind, da alle Zellen der gleichen Passage entstammen. Die Standardabweichung des Mittelwerts solcher abhängiger Versuche (im Folgenden „Dreifachbestimmung aus einem Versuchsansatz“) wurde nicht angegeben.

Entscheidend für die Bewertung der beobachteten Effekte war die Signifikanz der Differenz zwischen Negativkontrolle und Testansatz. Zur Berechnung der Signifikanz wurde die Varianzhomogenität mit dem F-Test (MS-Excel-Funktion; homogene Varianzen haben einen F-Wert < 1) berechnet. Wenn diese gegeben war, wurde die Signifikanz mit dem Student'schen t-Test (MS-Excel-Funktion; mit $p < 0,05$) überprüft. Für die Durchführung des t-Tests werden wenigstens drei Messwerte benötigt. Da eine Signifikanz nur bei unabhängigen Dreifachbestimmungen gegeben sein kann, wurde die Signifikanzprüfung nicht bei Dreifachbestimmungen aus einem Versuchsansatz angewendet. Signifikant von der Negativkontrolle abweichende Werte wurden mit * gekennzeichnet.

3.1 Betanin

Die bei den Inkubationen von Betanin mit den verschiedenen Zell-Linien erhaltenen Ergebnisse sind in Tabelle C-3 zusammengefasst.

Tabelle C-3: Proliferationshemmung (PH) von Betanin ($1 \mu\text{M} \triangleq 0,55 \text{ mg/l}$) in HCEC-, HT29- und Caco2-Zellen nach 72 h. Auflistung der Testkonzentrationen und des mit der jeweiligen Untersuchungsmethode ermittelten Effekts: Nicht getestet* / keine PH/ PH/ signifikante PH/ IC50-Wert.

Zell-Linie	Eingesetzte Substanzkonzentration	Testmethode		
		Trypanblau	MTS	Neutralrot
HCEC	50 μM	keine PH	Nicht getestet*	Nicht getestet*
	100 μM	keine PH		
	150 μM	keine PH		
HT29	50 μM	keine PH	PH	PH
	100 μM	PH	PH	PH
	150 μM	sign. PH	PH	PH
Caco2	50 μM	Nicht getestet*	PH	PH
	100 μM		IC ₅₀ : 100 μM	PH
	150 μM		PH	PH

*Die Trypanblau-Versuche wurden am Nestlé Research Center in Lausanne durchgeführt, wo keine Caco2-Zellen zur Verfügung standen. Die Versuche an HCEC-Zellen wurden nach Vorversuchen nicht fortgeführt.

Experimente mit HT29-Zellen (unabhängige Dreifachbestimmung⁶⁵) führten in keiner der angewendeten Testkonzentrationen (50, 100, 150 μM) zu einer Proliferationshemmung $> 50\%$. Allerdings wurde nach 72 h eine signifikante Proliferationshemmung um ca. 30% durch Betanin bei einer Konzentration von 150 μM festgestellt (Abbildung C-6). Für 100 μM Betanin wurde bei Versuchsende eine (allerdings nicht signifikante) Proliferationshemmung von 16% ermittelt. Mit der niedrigsten Testkonzentration von 50 μM Betanin wurde keine Proliferationshemmung beobachtet. Diese Ergebnisse wurden mit der Trypanblau-Färbung ermittelt.

Mit der MTS-Methode (Dreifachbestimmung aus einem Versuchsansatz⁶⁶) wurde in HT29-Zellen nach 72 h eine Proliferationshemmung von ca. 20% für die drei Betaninkonzentrationen (50, 100, 150 μM) beobachtet (Abbildung C-6). Bei Anwendung der Neutralrot-Methode war in HT29-Zellen (Dreifachbestimmung aus einem Versuchs-

⁶⁵ Signifikanzberechnung möglich

⁶⁶ keine Signifikanzberechnung möglich

ansatz) nach 72 h eine Proliferationshemmung von ca. 30% für die höchste Testkonzentration von 150 μM Betanin zu beobachten (Abbildung C-6). Mit Betaninkonzentrationen von 50 μM und 100 μM konnte in diesem Versuch eine Proliferationshemmung von 20 % gemessen werden.

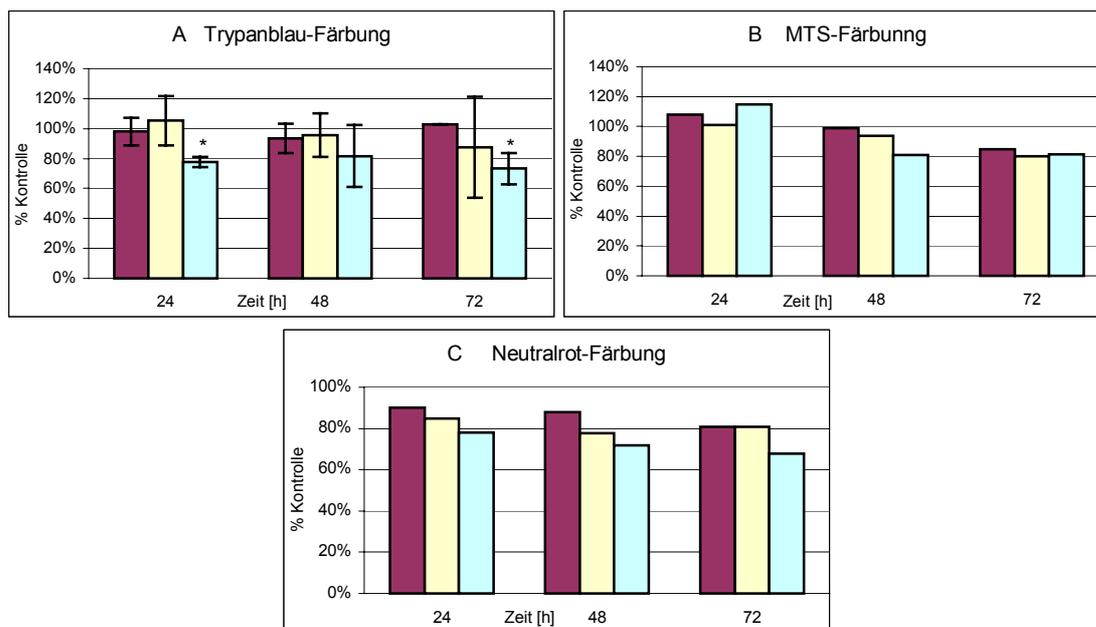


Abbildung C-6 Ergebnisse der Proliferationsstudien mit Betanin in HT29-Zellen. Dargestellt in der Reihenfolge 50 μM (rot), 100 μM (gelb) und 150 μM (türkis): **A** Trypanblau-Färbung; **B** MTS-Färbung; **C** Neutralrot-Färbung. Aufgetragen ist die Relation lebender Zellen im Testansatz im Vergleich zur Negativkontrolle in % (Negativkontrolle = 100%). Die Sternchen * zeigen signifikante Unterschiede zur Negativkontrolle ($p < 0,05$).

In Caco2-Zellen wurde bei der Anfärbung lebender Zellen mit der MTS-Methode (Dreifachbestimmung aus einem Versuchsansatz) ein IC_{50} -Wert von 100 μM nach 72 h Inkubation mit Betanin ermittelt. Für die Inkubation mit einer Betaninkonzentration von 150 μM war schon nach 24 h eine Proliferationshemmung um mehr als 70% zu beobachten, die nach 72 h auf 86% angewachsen war (Abbildung C-7). Die niedrigste Betanin-Konzentration von 50 μM zeigte nach 72 h eine Proliferationshemmung von 10%.

Bei der Detektion lebender Zellen mit der Neutralrot-Methode (Dreifachbestimmung aus einem Versuchsansatz) wurde jedoch im Gegensatz zur MTS-Methode keine Proliferationshemmung durch Betanin in Caco2-Zellen beobachtet (Abbildung C-7).

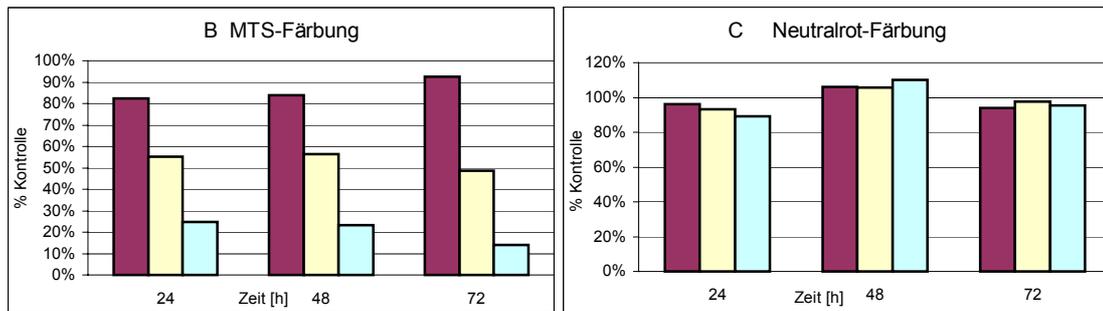


Abbildung C-7 Ergebnisse der Proliferationsstudien mit Betanin in Caco2-Zellen. Dargestellt in der Reihenfolge 50 µM (rot), 100 µM (gelb) und 150 µM (türkis): **B** MTS-Färbung; **C** Neutralrot-Färbung. Aufgetragen ist die Relation lebender Zellen im Testansatz im Vergleich zur Negativkontrolle in % (Negativkontrolle = 100%).

3.1.1 Diskussion

Bei den Versuchen mit Betanin führten die unterschiedlichen Detektionsmethoden bei HT29-Zellen zu einem einheitlichen Ergebnisbild bei Versuchsende, nämlich einer Proliferationshemmung von ca. 30% nach 72 h Inkubation (150 µM Betanin). Im Gegensatz dazu differierte bei den Versuchen mit Caco2-Zellen und der Testsubstanz Betanin die Intensität der Proliferationshemmung nach 72 h zwischen den eingesetzten Methoden stark (kein Effekt bei der Neutralrot-Färbung und ein IC_{50} -Wert von 100 µM Betanin bei der MTS-Färbung).

Die beobachteten Unterschiede wurden nicht durch einen Zellkulturschaden verursacht, da die Negativkontrolle über den Versuchszeitraum stetig gewachsen ist. Der Anstieg der Anzahl unbehandelter Zellen über die Versuchsdauer ist in Tabelle C-4 dargestellt. Die Werte zeigen, dass sowohl die HT29- als auch die Caco2-Zellen nach 72 h noch nicht degeneriert waren. Der niedrigere Wachstumsschub innerhalb der letzten 24 h der Versuche deutet jedoch darauf hin, dass eine längere Versuchsdauer

als 72 h ohne Mediumwechsel nicht durchführbar wäre (die Zellen der Vorratskultur wurden alle 48 h mit frischem Medium versorgt).

Ein anderer Grund für den stärkeren Effekt bei Anwendung der MTS-Färbung kann am Detektionsmechanismus liegen. Die Umsetzung von MTS erfolgt direkt in den Mitochondrien, von denen häufig „Todessignale“ ausgehen. Daher kann diese Detektionsmethode empfindlicher sein als die Trypanblau- und die Neutralrotfärbung, bei denen die Membrandurchlässigkeit in Folge des Zellsterbens ansteigt (Boehringer Mannheim 1998).

Reddy und Mitarbeiter ermittelten mit einer anderen permanenten Zell-Linie (HCT116-Kolon-Krebszellen) schon nach 48 h Inkubation mit der Testsubstanz Betanin einen IC_{50} -Wert von 142 μ M (Reddy et al. 2005). Zur Detektion verwendeten diese Autoren die MTT-Färbung, die auf dem gleichen Prinzip wie die MTS-Färbung beruht, aber einen anderen Farbstoff verwendet. Durch dieses Ergebnis wird die von uns beobachtete schwache Proliferationshemmung von Betanin (IC_{50} -Wert von 100 μ M nach 72 h) bestätigt.

Tabelle C-4 Wachstum der Negativkontrollen von 24 h zu 48 h und 48 h zu 72 h der Inkubationen von Betanin in HT29- und Caco2-Zellen.

	Trypanblau-Detektion	MTS-Detektion	Neutralrot-Detektion
HT29-Zellen			
24 h - 48 h	53%	78%	42%
24 h – 72 h	36%	41%	10%
Caco2-Zellen			
24 h - 48 h	—————	86%	6%
48 h - 72 h	—————	43%	3%

3.2 Indicaxanthin

Die bei Inkubationen von Indicaxanthin mit den verschiedenen Zell-Linien erhaltenen Ergebnisse sind in Tabelle C-5 zusammengefasst.

Tabelle C-5: Proliferationshemmung (PH) von Indicaxanthin ($1 \mu\text{M} \cong 0,31 \text{ mg/l}$) in HCEC-, HT29- und Caco2-Zellen nach 72 h. Auflistung der Testkonzentrationen und des mit der jeweiligen Untersuchungsmethode ermittelten Effekts: Nicht getestet* / keine PH/ PH/ signifikante PH/ IC50-Wert.

Zell-Linie	Eingesetzte Substanzkonzentration	Testmethode		
		Trypanblau	MTS	Neutralrot
HCEC	50 μM	keine PH	Nicht getestet*	Nicht getestet*
	100 μM	keine PH		
	150 μM	keine PH		
HT29	50 μM	PH	keine PH	Nicht getestet*
	100 μM	PH	keine PH	
	150 μM	PH	keine PH	
	300 μM	PH	-	
	450 μM	PH	-	
	600 μM	PH	-	
Caco2	50 μM	Nicht getestet*	keine PH	Nicht getestet*
	100 μM		keine PH	
	150 μM		keine PH	

*Die Trypanblau-Versuche wurden am Nestlé Research Center in Lausanne durchgeführt, wo keine Caco2-Zellen zur Verfügung standen.

Da keine eindeutige Proliferationshemmung nachweisbar war, wurden keine Versuche mit der Neutralrot-Färbung durchgeführt.

Die Versuche an HCEC-Zellen wurden nach Vorversuchen nicht fortgeführt.

Experimente mit HT29-Zellen (unabhängige Dreifachbestimmung) führten in keiner der verwendeten Testkonzentrationen zu einer Proliferationshemmung $> 50\%$. Die Resultate der Versuche mit Indicaxanthin in HT29-Zellen sind in Abbildung C-8 dargestellt.

Eine nicht signifikante Proliferationshemmung um 38% wurde mit der Trypanblau-Methode nach 72 h Inkubation mit 150 μM Indicaxanthin festgestellt. Bei Konzentrationen $> 300 \mu\text{M}$ verringerte sich die beobachtete Proliferationshemmung auf (nicht signifikante) 10%.

Bei der Detektion lebender Zellen mit der MTS-Methode (Dreifachbestimmung aus einem Versuchsansatz) hingegen wurde in HT29-Zellen keine Proliferationshemmung nach 72 h Inkubation mit Indicaxanthin beobachtet. Im Gegenteil, nach 72 h lagen für die Testkonzentrationen 50 μM , 100 μM und 150 μM ca. 50% mehr Zellen vor als in der Negativkontrolle (Abbildung C-8).

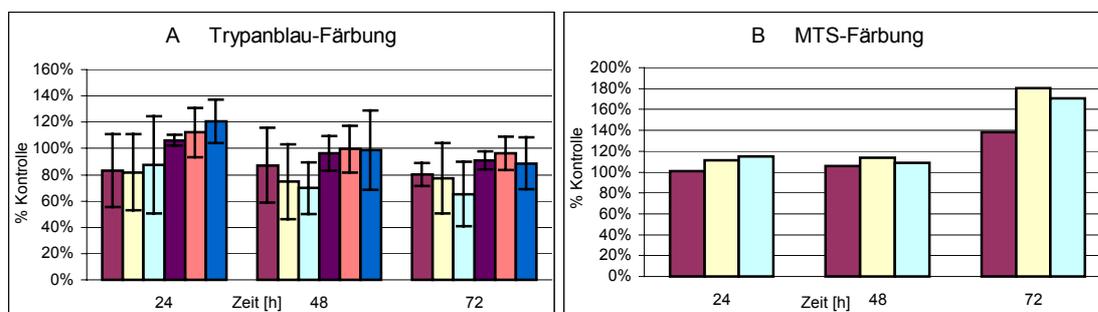


Abbildung C-8 Ergebnisse der Proliferationsstudien von Indicaxanthin in HT29-Zellen. Dargestellt in der Reihenfolge 50 μM (rot), 100 μM (gelb), 150 μM (türkis), 300 μM (violett), 450 μM (orange) und 600 μM (dunkelblau): **A** Trypanblau-Färbung; **B** MTS-Färbung. Aufgetragen ist die Relation lebender Zellen im Testansatz im Vergleich zur Negativkontrolle in % (Negativkontrolle = 100%).

Bei der Inkubation von Caco2-Zellen mit Indicaxanthin wurde mit der MTS-Methode (Dreifachbestimmung aus einem Versuchsansatz) nach 72 h keine Proliferationshemmung beobachtet, im Gegenteil, es zeigte sich eine Proliferationszunahme um 40% für 100 μM Indicaxanthin. Für die beiden anderen Testkonzentrationen war der Proliferationsanstieg geringer (10% für 50 μM Indicaxanthin und 2% für 150 μM) (Abbildung C-9).

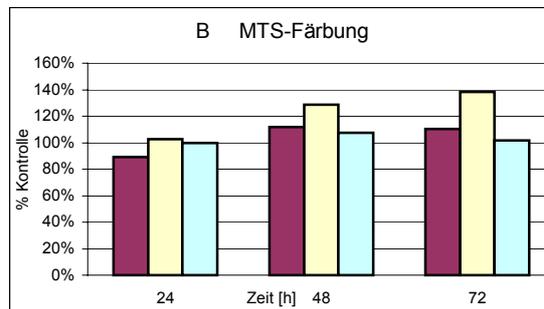


Abbildung C-9 Ergebnisse der Proliferationsstudien von Indicaxanthin in Caco2-Zellen. Dargestellt in der Reihenfolge 50 µM (rot), 100 µM (gelb), 150 µM (türkis): **B** MTS-Färbung. Aufgetragen ist die Relation lebender Zellen im Testansatz im Vergleich zur Negativkontrolle in % (Negativkontrolle = 100%).

3.2.1 Diskussion

Die Versuche mit Indicaxanthin führten bei HT29-Zellen zu keinem eindeutigen Ergebnis, da mit der Trypanblau-Methode bis 150 µM eine konzentrationsabhängige Tendenz zu einer Proliferationshemmung erkennbar war, während dies mit der MTS-Detektion nicht der Fall war. Im Gegenteil, nach 72 h war im gleichen Konzentrationsbereich ein Anstieg der Proliferation der HT29-Zellen um > 50% zu beobachten. Ein möglicher Grund für dieses Verhalten könnte eine mit der Inkubationsdauer zunehmende Einlagerung von Indicaxanthin in die Zellen sein, was zu einer Absorptionzunahme führen könnte (Indicaxanthin und MTS haben Absorptionsmaxima zwischen 450 nm und 500 nm). Mit einem schonenden Waschzyklus sollte das gut wasserlösliche Indicaxanthin entfernt und dieser Überlagerungseffekt der Testsubstanz und MTS verhindert werden (vgl. Kapitel D-3.2.4.3).

Da mit der MTS-Färbung weder in HT29- noch in Caco2-Zellen eine Proliferationshemmung beobachtet wurde, ist fraglich, ob die MTS-Färbung bei der Inkubation von Zellen mit Indicaxanthin die geeignete Methode ist, da womöglich mit zunehmender Inkubationszeit Indicaxanthin in Zellen eingelagert wurde und mit einem Waschschritt nicht entfernt werden konnte. Diese Hypothese wurde allerdings nicht weiter überprüft, da die mit der Trypanblau-Färbung ermittelte Proliferationshemmung keinen IC₅₀-Wert im Konzentrationsbereich 10 µM bis 100 µM erreichte. Daher

wurden auch keine weiteren Versuche mit anderen Zellen oder Detektionsmethoden durchgeführt.

Da die Versuche in HT29-Zellen mit Trypanblau-Detektion einen Hinweis auf eine konzentrationsabhängige Proliferationshemmung lieferten, wurden Studien mit höheren Indicaxanthin-Konzentrationen durchgeführt, um diesen Zusammenhang weiter aufzuklären. Dabei verringerte sich die negative Proliferation mit ansteigender Indicaxanthin-Konzentration von 40% auf 10%. Ein solches U-förmiges Wirkprofil könnte darauf hindeuten, dass Indicaxanthin eine „Janus-Verbindung“ ist, die konzentrationsabhängig gegensätzliche Effekte verursacht, was für einige Antioxidantien (z.B. die Vitamine C und E) und Flavonoide im Hinblick auf den Schutz vor Oxidationsschäden schon früher beschrieben wurde (Knasmüller et al. 2002). Für Indicaxanthin traf das in den getesteten Konzentrationen nur ansatzweise zu, da der gegensätzliche Effekt eine Proliferationszunahme gewesen wäre, aber in den Versuchen mit Trypanblau-Detektion ist nur eine Abschwächung der Proliferationshemmung beobachtet worden. Da der Schwerpunkt der Studien auf die Suche nach Wirksubstanzen im Konzentrationsbereich von 10 μM bis 100 μM ausgerichtet war, wurde dieser Effekt, der bei hohen Testkonzentrationen auftrat, nicht weiter untersucht.

Auch in der Versuchsreihe mit Indicaxanthin sind die Zellen bis zum Versuchsende gewachsen, so dass nicht von degenerierten Zellen auszugehen ist. In Tabelle C-6 sind die Proliferationsschritte der Negativkontrolle dargestellt.

Tabelle C-6 Wachstum der Negativkontrollen von 24 h zu 48 h und 48 h zu 72 h der Inkubationen von Indicaxanthin in HT29- und Caco2-Zellen.

	Trypanblau-Detektion	MTS-Detektion	Neutralrot-Detektion
HT29-Zellen			
24 h - 48 h	47%	78%	=====
24 h – 72 h	9%	41%	=====

Tabelle C-6, Fortsetzung

	Trypanblau-Detektion	MTS-Detektion	Neutralrot-Detektion
Caco2-Zellen			
24 h - 48 h	=====	86%	=====
48 h - 72 h	=====	43%	=====

3.3 Kaktusfeigen-Extrakt

Beim verwendeten Kaktusfeigen-Extrakt (siehe Kapitel C-2.4 und D-3.1.3) handelt es sich um ein unspezifiziertes Mehrkomponenten-Gemisch unbekannter Molekularmasse. Daher kann die Konzentrationsangabe nicht in $\mu\text{mol/l}$ (μM) erfolgen. Der Kaktusfeigen-Extrakt wurde in Konzentrationen von 3,3 mg/ml, 6,6 mg/ml und 10 mg/ml untersucht. Die Testkonzentration mit 10 mg/ml Kaktusfeigen-Extrakt enthielt 0,11 mg/ml (357 μM) Indicaxanthin. Zum Vergleich: Die in den bisherigen Versuchen eingesetzten Indicaxanthin-Konzentrationen deckten den Bereich von 0,015-0,18 mg/ml Indicaxanthin (50-600 μM) ab.

10 mg/ml Kaktusfeigen-Extrakt enthielten 0,009 mg/ml Betanin (16 μM), also ca. 1/3 der in den vorangegangenen Versuchen eingesetzten geringsten Betanin-Konzentration (50 μM entsprechend 0,0275 mg/ml).

Der Kaktusfeigen-Extrakt wurde nicht stärker konzentriert eingesetzt, um einen zu großen Nährstoffeintrag (z.B. Zucker, Proteine, Mineralstoffe) durch die übrigen Extraktbestandteile zu vermeiden. Dies hätte den Vergleich mit der Negativkontrolle stören können. Um dies für den auch in dieser Konzentration (10 mg/ml) hohen Nährstoffeintrag zu überprüfen, wurde bei den späteren Versuchen mit den Kaktusfeigen-Extrakt-Fractionen ein künstliches Extrakt-Imitat (Placebo) mit den gleichen Nährstoffgehalten, die durchschnittlich im Kaktusfeigen-Extrakt enthalten sind, als zusätzliche Kontrolle eingesetzt.

Die bei Inkubationen von Kaktusfeigen-Extrakt mit den verschiedenen Zell-Linien erhaltenen Ergebnisse sind in Tabelle C-7 zusammengefasst.

Tabelle C-7 Proliferationshemmung (PH) von Kaktus-Extrakt in HT29-, Caco2- und HepG2-Zellen nach 72 h. Auflistung der Testkonzentrationen und des mit der jeweiligen Untersuchungsmethode ermittelten Effekts: keine Angabe (k.A.)* / keine PH/ (PH)/ signifikante PH/ IC50-Wert.

Zell-Linie	eingesetzte Substanzkonzentration	Testmethode		
		Trypanblau	MTS	Neutralrot
HT29	3 mg/ml	PH	PH	k.A.*
	6 mg/ml	sign. PH	PH	
	10 mg/ml	IC ₅₀ : 9,0 mg/ml	IC ₅₀ : 8,5 mg/ml	
Caco2	3 mg/ml	sign. PH	k.A.*	k.A.*
	6 mg/ml	sign. PH		
	10 mg/ml	IC ₅₀ : 4,8 mg/ml		
HepG2	3 mg/ml	sign. PH	PH	PH
	6 mg/ml	sign. PH	PH	PH
	10 mg/ml	IC ₅₀ : 8,0 mg/ml	PH	PH

*Die MTS-Färbung führte in Caco2-Zellen nicht zu auswertbaren Ergebnissen. Die Neutralrot-Färbung führt in HT29- und Caco2-Zellen nicht zu verwertbaren Resultaten.

In HT29-Zellen (unabhängige Dreifachbestimmung) wurde bei der Inkubation mit Kaktusfeigen-Extrakt mit der Trypanblau-Methode ein IC₅₀-Wert von 9,0 mg/ml ermittelt. In Abbildung C-10 sind die Ergebnisse der Studien zur Wirkung von Kaktusfeigen-Extrakt in HT29-Zellen dargestellt. Mit der Trypanblau-Färbung wurde nach 48 h und 72 h Inkubationszeit eine signifikante, mit ansteigender Kaktusfeigen-Extrakt-Konzentration zunehmende Proliferationshemmung bestimmt.

Bei der Detektion lebender Zellen mit der MTS-Methode (unabhängige Dreifachbestimmung) wurde nach Inkubation mit Kakutsfeigen Extrakt in HT29-Zellen nach 72 h ein IC₅₀-Wert von 8,5 mg/ml ermittelt (Abbildung C-10).

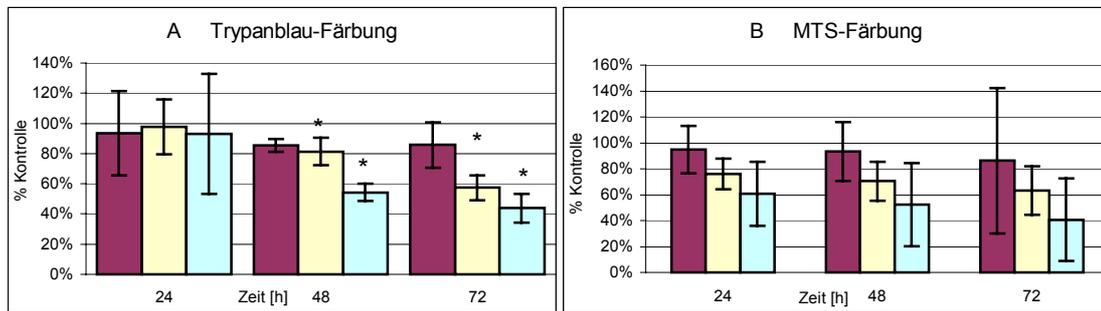


Abbildung C-10 Ergebnisse der Proliferationsstudien von Kaktusfeigen-Extrakt in HT29-Zellen. Dargestellt in der Reihenfolge 3 mg/ml (rot), 6 mg/ml (gelb) und 10 mg/ml (türkis): **A** HT29: Trypanblau-Färbung; **B**: MTS-Färbung; **C**: Neutralrot-Färbung. Aufgetragen ist die Relation lebender Zellen im Testansatz im Vergleich zur Negativkontrolle in % (Negativkontrolle = 100%). Die Sternchen * zeigen signifikante Unterschiede zur Negativkontrolle ($p < 0,05$).

In Versuchen mit Caco2-Zellen (unabhängige Dreifachbestimmung) wurde mit der Trypanblau-Färbung nach der Inkubation mit Kaktusfeigen-Extrakt nach 72 h ein IC_{50} -Wert von 4,8 mg/ml bestimmt. Für die Konzentrationen 3 mg/ml und 6 mg/ml Kaktusfeigen-Extrakt wurden nach 24 h und 72 h, für 10 mg/ml nur nach 72 h, eine signifikante Proliferationshemmung beobachtet (Abbildung C-11).

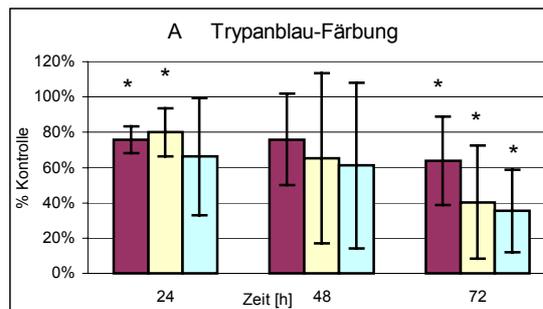


Abbildung C-11 Ergebnisse der Proliferationsstudien von Kaktusfeigen-Extrakt in Caco2-Zellen. Dargestellt in der Reihenfolge 3 mg/ml (rot), 6 mg/ml (gelb) und 10 mg/ml (türkis): **A** HT29: Trypanblau-Färbung; Aufgetragen ist die Relation lebender Zellen im Testansatz im Vergleich zur Negativkontrolle in % (Negativkontrolle = 100%). Die Sternchen * zeigen signifikante Unterschiede zur Negativkontrolle ($p < 0,05$).

In HepG2-Zellen (unabhängige Dreifachbestimmung) führte die Inkubation mit Kaktusfeigen-Extrakt nach 72 h zu einem IC_{50} -Wert von 8 mg/ml, der mit der Trypanblau-Methode bestimmt wurde. Mit der Trypanblau-Färbung wurde nach 48 h und 72 h Inkubationszeit eine signifikante, mit ansteigender Kaktusfeigen-Extrakt-Konzentration zunehmende Proliferationshemmung ermittelt (Abbildung C-12).

Mit der MTS-Färbung war in HepG2-Zellen (unabhängige Dreifachbestimmung) nach 72 h eine Proliferationshemmung von ca. 44% für die höchste untersuchte Kaktusfeigen-Extrakt Konzentration von 10 mg/ml zu beobachten.

Bei der Detektion lebender Zellen mit der Neutralrot-Färbung (unabhängige Dreifachbestimmung) wurde in HepG2-Zellen nach 72 h eine Proliferationshemmung von ca. 35% durch Kaktusfeigen-Extrakt beobachtet (Abbildung C-12).

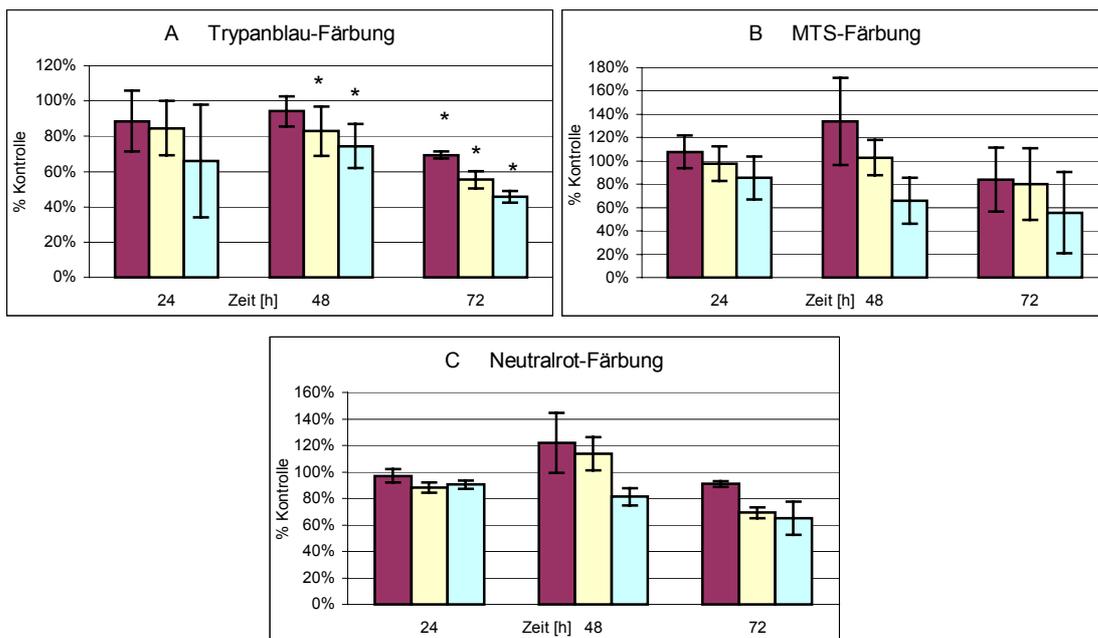


Abbildung C-12 Ergebnisse der Proliferationsstudien von Kaktusfeigen-Extrakt in HepG2-Zellen. Dargestellt in der Reihenfolge 3 mg/ml (rot), 6 mg/ml (gelb) und 10 mg/ml (türkis): **A** HT29: Trypanblau-Färbung; **B**: MTS-Färbung; **C**: Neutralrot-Färbung. Aufgetragen ist die Relation lebender Zellen im Testansatz im Vergleich zur Negativkontrolle in % (Negativkontrolle = 100%). Die Sternchen * zeigen signifikante Unterschiede zur Negativkontrolle ($p < 0,05$).

3.3.1 Diskussion

Der Kaktusfeigen-Extrakt verursachte in den untersuchten Zell-Linien HT29, Caco2 und HepG2 zum Versuchsende eine Proliferationshemmung von bis zu 60% in der größten eingesetzten Testkonzentration.

In Tabelle C-8 sind wiederum die Mittelwerte zur Proliferation der Negativkontrollen zusammengefasst, die zeigen, dass die jeweiligen unbehandelten Zellen stetig gewachsen sind und so eine Degeneration der untersuchten Zell-Linien ausgeschlossen werden kann. Auffällig ist, dass die Negativkontrolle der HT29-Zellen in den Versuchen mit MTS-Färbung binnen des zweiten Versuchstags durchschnittlich nicht gewachsen sind. Da die Proliferation der Versuchszellen im gleichen Zeitraum geringer war, wurde dieser Effekt nicht berücksichtigt, zumal die Kontrollzellen zum Versuchsende wieder proliferierten (Tabelle C-8).

Tabelle C-8 Wachstum der Negativkontrollen von 24 h zu 48 h und 48 h zu 72 h der Inkubationen von Kaktusfeigen-Extrakt in HT29-, Caco2- und HepG2-Zellen.

	Trypanblau-Detektion	MTS-Detektion	Neutralrot-Detektion
HT29-Zellen			
24 h - 48 h	190%	0%	=====
24 h – 72 h	74%	37%	=====
Caco2-Zellen			
24 h - 48 h	69%	=====	=====
48 h - 72 h	86%	=====	=====
HepG2-Zellen			
24 h – 48 h	42%	9%	35%
48 h – 72 h	93%	94%	25%

Die gemessenen IC₅₀-Werte und Proliferationshemmungen wurden mit Betanin- und Indicaxanthin-Konzentrationen erreicht, die in den Studien mit den isolierten Sub-

stanzen Betanin und Indicaxanthin keine Proliferationshemmung in dieser Stärke verursachten (vgl. Abschnitt C-3.1 und C-3.2). Die Betanin-Konzentration im wirksamen Kaktusfeigen-Extrakt betrug maximal 16 μM . Im Gegensatz dazu betrug bei den Tests mit der Reinsubstanz die kleinste Betanin-Konzentration 50 μM . Ein IC_{50} -Wert wurde für isoliertes Betanin in Caco2-Zellen bei 100 μM und für HT29-Zellen gar nicht gefunden. In Caco2-Zellen lag der IC_{50} -Wert für Kaktusfeigen-Extrakt bei 4,8 mg/ml (8 μM Betanin), in HT29-Zellen bei 9 mg/ml (15 μM).

Da die im Kaktusfeigen-Extrakt vorliegende Indicaxanthin-Konzentration den im Einzelversuch wenig wirksamen entspricht, lässt dies darauf schließen, dass nicht die Einzelsubstanzen Betanin und Indicaxanthin die Zellproliferation hemmen, sondern entweder andere Kaktusfeigen-Extraktbestandteile oder das komplexe Gemisch der im Extrakt enthaltenen Stoffe als Ganzes. Andere Bestandteile könnten Flavonoide wie Rutin und Isorhamnetin-Derivate sein (siehe Kapitel C-2.6 bzw. Qiu et al. 2002, Galati 2003). Um mögliche Wirksubstanzen einzugrenzen, wurden weitere Versuche mit indicaxanthinfreiem Kaktusfeigen-Extrakt und fraktioniertem Extrakt durchgeführt. Diese Ergebnisse sind in den folgenden Abschnitte zusammengestellt.

Die stark schwankenden Standardabweichungen zeigten deutlich, dass schon die Abweichungen zwischen Mehrfachbestimmungen aus dem gleichen Versuchsansatz groß sein können, weswegen signifikante Ergebnisse nur mit unabhängigen Versuchen, bei denen ohnehin schon größere Schwankungen auftreten können, zu erhalten sind. Die Ursache der Ergebnisschwankungen liegt in der Summierung verschiedener Unsicherheiten, wie z.B. der gleichmäßigen Aussaat der Zellen in die Kulturgefäße, Pipettier-toleranzen und unterschiedlichen Chargen des Kulturmediums (v.a. bei unabhängigen Versuchen).

3.4 Indicaxanthinfreier Kaktusfeigen-Extrakt

Analog zum normalen Kaktusfeigen-Extrakt wurde der indicaxanthinfreie Kaktusfeigen-Extrakt (siehe Kapitel C-2.6 und D-3.3) in den entsprechenden Konzentrationen

auf eine Proliferationshemmung hin untersucht. Die Ergebnisse dieser Studie sind in Tabelle C-9 zusammengefasst und in den Abbildungen C-13 und C-14 dargestellt.

Tabelle C-9: Proliferationshemmung (PH) von indicaxanthinfreiem Kaktusfeigen-Extrakt in HT29- und Caco2-Zellen nach 72 h. Auflistung der Testkonzentrationen und des mit der jeweiligen Untersuchungsmethode ermittelten Effekts: keine Angabe (k.A.)/ keine PH/ PH/ signifikante PH/ IC50-Wert.

Zell-Linie	Eingesetzte Substanz-Konzentration	Testmethode		
		Trypanblau	MTS	Neutralrot
HT29	3 mg/ml	keine PH	keine PH	k.A.*
	6 mg/ml	PH	PH	
	10 mg/ml	10,0 mg/ml	8,3 mg/ml	
Caco2	3 mg/ml	PH	k.A.*	k.A.*
	6 mg/ml	6,0 mg/ml		
	10 mg/ml			
HepG2		k.A.*	k.A.*	k.A.*

*Die Versuche in HepG2-Zellen, die Versuche mit Neutralrot-Färbung und der Versuch in Caco2-Zellen mit der MTS-Färbung führten nicht zu verwertbaren Resultaten.

In HT29-Zellen wurde nach der Inkubation mit indicaxanthinfreiem Kaktusfeigen-Extrakt mit der Trypanblau-Färbung nach 72 h ein IC₅₀-Wert von 10,0 mg/ml ermittelt (unabhängige Dreifachbestimmung). Diese Proliferationshemmung wurde schon nach 48 h erreicht. Die kleinste Testkonzentration von 3 mg/ml indicaxanthinfreiem Kaktusfeigen-Extrakt führte hingegen zu einer Verdopplung der Proliferation nach 24 h , wovon nach 48 h und 72 h noch ein Anstieg um 10% verblieb. (Abbildung C-13).

Bei der Detektion lebender Zellen mit der MTS-Methode (Dreifachbestimmung aus einem Versuchsansatz) wurde in HT29-Zellen nach 72 h ein IC₅₀-Wert von 8,3 mg/ml durch Inkubation mit indicaxanthinfreiem Kaktusfeigen-Extrakt beobachtet. Schon nach 48 h Stunden lag die Proliferationshemmung für die höchste Testkonzentration von 10 mg/ml deutlich über 50% (Abbildung C-13).

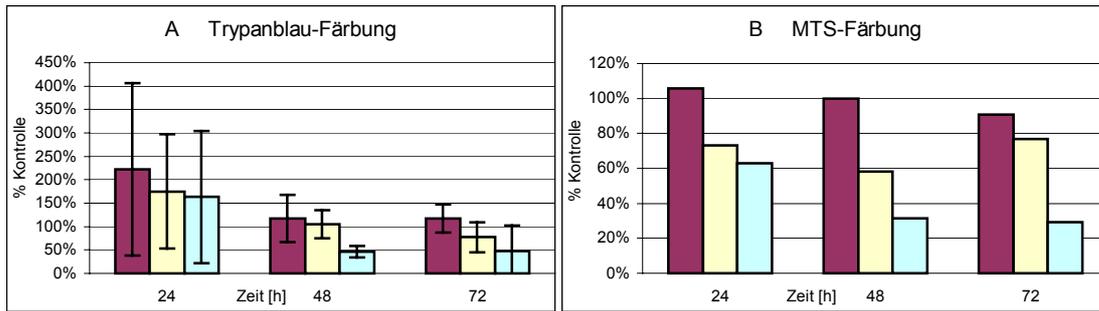


Abbildung C-13 Ergebnisse der Proliferationsstudien von indicaxanthinfreiem Kaktusfeigen-Extrakt in HT29-Zellen. Dargestellt in der Reihenfolge 3 mg/ml (rot), 6 mg/ml (gelb) und 10 mg/ml (türkis): **A** Trypanblau-Methode; **B** MTS-Methode. Aufgetragen ist die Relation lebender Zellen im Testansatz im Vergleich zur Negativkontrolle in % (Negativkontrolle = 100%).

In Versuchen mit Caco2-Zellen wurde mit der Trypanblau-Methode nach der Inkubation mit indicaxanthinfreiem Kaktusfeigen-Extrakt nach 72 h ein IC_{50} -Wert von 6,0 mg/ml gemessen (unabhängige Dreifachbestimmung). Mit 6 mg/ml und 10 mg/ml indicaxanthinfreiem Kaktusfeigen-Extrakt wurde in Caco2-Zellen eine Proliferationshemmung > 50% bereits nach 24 h erreicht. Jedoch verringerte sich nach 48 h für die Konzentration 6 mg/ml die Proliferationshemmung auf 24%, um nach 72 h wieder auf 50% anzusteigen. Die kleinste Testkonzentration von 3 mg/ml indicaxanthinfreiem Kaktusfeigen-Extrakt führte, wie bei den Versuchen mit HT29-Zellen, zu einer Verdopplung der Proliferation nach 24 h (Abbildung C-14).

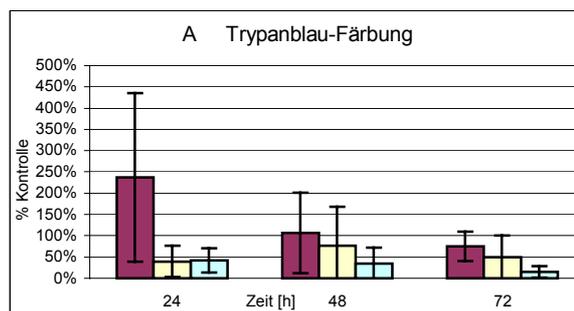


Abbildung C-14 Proliferationsstudien von indicaxanthinfreiem Kaktusfeigen-Extrakt in Caco2-Zellen. Dargestellt in der Reihenfolge 3 mg/ml (rot), 6 mg/ml (gelb) und 10 mg/ml (türkis): **A** Trypanblau-Methode. Aufgetragen ist die Relation lebender Zellen im Testansatz im Vergleich zur Negativkontrolle in % (Negativkontrolle = 100%).

3.4.1 Diskussion

Die deutliche (nicht signifikante) Proliferationshemmung von HT29- und Caco2-Zellen durch indicaxanthinfreien Kaktusfeigen-Extrakt bestätigt die mit Kaktusfeigen-Extrakt erstellten Ergebnisse. In beiden Versuchsreihen traten nach 72 h IC₅₀-Werte in der gleichen Größenordnung auf (10 mg/ml bei HT29- und 6 mg/ml bei Caco2-Zellen). Damit wurde deutlich, dass Indicaxanthin als Extraktbestandteil keinen negativen Einfluss auf die Zellproliferation der untersuchten HT29- und Caco2-Zellen hatte.

Für die Darstellung der mit Trypanblau gefärbten Versuche musste die Ordinate bis 450% skaliert werden, da in den Ansätzen mit der niedrigsten Testkonzentration nach 24 h einmal eine enorme Proliferationszunahme und im nächsten Ansatz mit der gleichen Konzentration eine starke Proliferationshemmung gemessen wurde. Dies führte zu der großen Standardabweichung des Mittelwerts bei den 24 h – Werten und erschwerte die Bewertung der Ergebnisse. Wodurch dieses Verhalten verursacht wurde, konnte nicht geklärt werden. Von einem allgemeinen Zellschaden ist nicht auszugehen, da alle Negativkontrollen stetig gewachsen sind (Tabelle C-10).

Tabelle C-10 Wachstum der Negativkontrolle von 24 h zu 48 h und 48 h zu 72 h der Inkubationen von indicaxanthinfreiem Kaktusfeigen-Extrakt in HT29- und Caco2-Zellen.

	Trypanblau-Detektion	MTS-Detektion	Neutralrot-Detektion
HT29-Zellen			
24 h - 48 h	142%	78%	=====
24 h – 72 h	240%	41%	=====
Caco2-Zellen			
24 h - 48 h	146%	=====	=====
48 h - 72 h	68%	=====	=====

3.5 Fraktionierter Kaktusfeigen-Extrakt

Die Inkubation mit den fünf Fraktionen des Kaktusfeigen-Extrakts (siehe Kapitel C-2.5) wurde nur mit der Neutralrot-Methode durchgeführt. Die Fraktionen wurden in Konzentrationen eingesetzt, die ihrem jeweiligen Anteil am Kaktusfeigen-Extrakt entsprechen (Tabelle C-11). Bei dieser Studie sollte überprüft werden, ob die durch den Kaktusfeigen-Extrakt verursachte Proliferationshemmung auf einzelne Extrakt-Bestandteile zurück geführt werden kann.

Zugleich wurde der Kaktusfeigen-Extrakt in einer Konzentration von 8 mg/ml eingesetzt, was in etwa den in HepG2- und HT29-Zellen beobachteten IC₅₀-Werten entspricht. Zusätzlich wurde noch eine Kontroll-Lösung (Placebo, Tabelle C-12) getestet, mit der die osmotischen Effekte der Mineralstoffe, der Glucose und anderer Inhaltsstoffe des Kaktusfeigen-Extrakts berücksichtigt wurden. Die Gehalte der mengenmäßig stärksten Kaktusfeigen-Inhaltsstoffe sind den Arbeiten von Stintzing et al. (1999 und 2000b) entnommen.

Tabelle C-11 in den Proliferationsstudien eingesetzte Testkonzentration der Kaktusfeigen-Extrakt-Fraktionen und ihr Anteil am Gesamtextrakt [%]

	Testkonzentration	
Fraktion I	7,2 mg/ml	88,8%
Fraktion II	0,2 mg/ml	2,5%
Fraktion III	0,3 mg/ml	3,7%
Fraktion IV	0,2 mg/ml	2,5%
Fraktion V	0,2 mg/ml	2,5%
Gesamt	8,1 mg/ml	100%

Tabelle C-12 Zusammensetzung der Placebo-Lösung (nach Stintzing 1999 und 2000b)

	Testkonzentration
D-Glucose	5,23 mg/ml
K ₂ CO ₃	0,58 mg/ml
KH ₂ PO ₄	0,26 mg/ml
Citronensäure	0,26 mg/ml
Taurin	0,05 mg/ml
MgSO ₄	0,04 mg/ml
CaCl ₂	0,04 mg/ml
Gesamt	7,0 mg/ml

Die bei Proliferationsstudien mit den Kaktusfeigen-Extrakt-Fraktionen erhaltenen Ergebnisse sind in Tabelle C-13 zusammengefasst und in den Abbildungen C-15 bis C-17 dargestellt.

Tabelle C-13 Proliferationshemmung (PH) der Kaktusfeigen-Extrakt-Fractionen in den Zell-Linien HT29, Caco2 und HepG2 nach 72 h. Auflistung der Testkonzentrationen und des mit der jeweiligen Untersuchungsmethode ermittelten Effekts: keine Angabe (k.A.)/ keine PH/ PH/ signifikante PH/ IC50-Wert.

Zell-Linie	Eingesetzte Substanzkonzentration	Testmethode		
		Trypanblau	MTS	Neutralrot
HT29	Kontroll-Lösung			keine PH
	Kaktusfeigen-Extrakt			PH
	Fraktion I	k.A.*	k.A.*	keine PH
	Fraktion II			keine PH
	Fraktion III			keine PH
	Fraktion IV			keine PH
Fraktion V	keine PH			
Caco2	Kontroll-Lösung			keine PH
	Kaktusfeigen-Extrakt			PH
	Fraktion I	k.A.*	k.A.*	keine PH
	Fraktion II			keine PH
	Fraktion III			keine PH
	Fraktion IV			keine PH
Fraktion V	keine PH			
HepG2	Kontroll-Lösung			keine PH
	Kaktusfeigen-Extrakt			PH
	Fraktion I	k.A.*	k.A.*	keine PH
	Fraktion II			keine PH
	Fraktion III			keine PH
	Fraktion IV			keine PH
Fraktion V	keine PH			

*Die Versuche mit Trypanblau-Färbung und der MTS-Färbung führten nicht zu auswertbaren Ergebnissen.

In HT29-Zellen wurde mit Hilfe der Neutralrot-Färbemethode bei keiner der eingesetzten Kaktusfeigen-Extrakt-Fractionen eine Proliferationshemmung beobachtet (Dreifachbestimmung aus einem Versuchsansatz) (siehe Abbildung C-15). Auch bei der Kontroll-Lösung war keine Proliferationshemmung zu beobachten. Im Gegenteil, wie bei den Kaktusfeigen-Extrakt-Fractionen nahm die Proliferation um etwa 10% zu. Der Kaktusfeigen-Extrakt (8 mg/ml) zeigte nach eine Inkubation von 72 h eine Proliferationshemmung von 20% (Abbildung C-15).

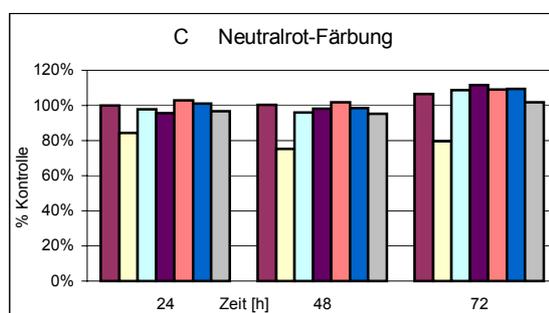


Abbildung C-15 Ergebnisse der Proliferationsstudien mit Kaktusfeigen-Extrakt-Fractionen in HT29-Zellen nach Neutralrot-Vitalitätsfärbung. Dargestellt in der Reihenfolge Kontroll-Lösung (rot), Kaktusfeigen-Extrakt (gelb), Fraktion I (türkis), Fraktion II (violett), Fraktion III (orange), Fraktion IV (dunkelblau), Fraktion V (grau). Aufgetragen ist die Relation lebender Zellen im Testansatz im Vergleich zur Negativkontrolle in % (Negativkontrolle = 100%).

In Caco2-Zellen wurde mit Hilfe der Neutralrot-Methode bei der Kaktusfeigen-Extrakt-Fraktion V eine Proliferationshemmung beobachtet (Dreifachbestimmung aus einem Versuchsansatz). Nach 72 h Inkubation bewirkte diese Konzentration eine Proliferationshemmung um 15%. Die Kontroll-Lösung hingegen bewirkte einen Anstieg der Proliferation von Caco2-Zellen um etwa 70% nach 72 h. Die Positivkontrolle Kaktusfeigen-Extrakt (8 mg/ml) zeigte am Versuchsende nach 72 h eine Proliferationshemmung von 37% (Abbildung C-16).

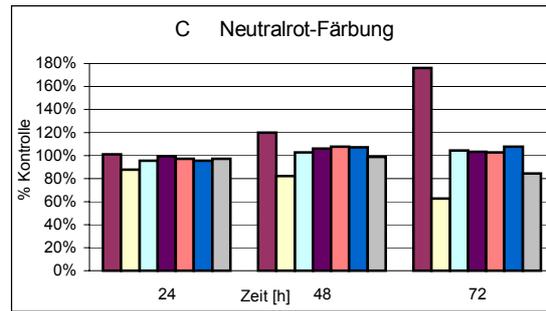


Abbildung C-16 Ergebnisse der Proliferationsstudien mit Kaktusfeigen-Extrakt-Fractionen in Caco2-Zellen nach Neutralrot-Vitalitätsfärbung. Dargestellt in der Reihenfolge Kontroll-Lösung (rot), Kaktusfeigen-Extrakt (gelb), Fraktion I (türkis), Fraktion II (violett), Fraktion III (orange), Fraktion IV (dunkelblau), Fraktion V (grau). Aufgetragen ist die Relation lebender Zellen im Testansatz im Vergleich zur Negativkontrolle in % (Negativkontrolle = 100%).

In HepG2-Zellen wurde mit der Neutralrot-Methode bei keiner der eingesetzten Kaktusfeigen-Extrakt-Fractionen eine Proliferationshemmung beobachtet (Dreifachbestimmung aus einem Versuchsansatz). Auch bei der Kontroll-Lösung war keine Proliferationshemmung zu beobachten. Im Gegenteil, wie bei den Kaktusfeigen-Extrakt-Fractionen nahm die Proliferation um etwa 10% zu.

Die Positivkontrolle Kaktusfeigen-Extrakt (8 mg/ml) zeigte nach 72 h eine Proliferationshemmung von 29% (Abbildung C-17).

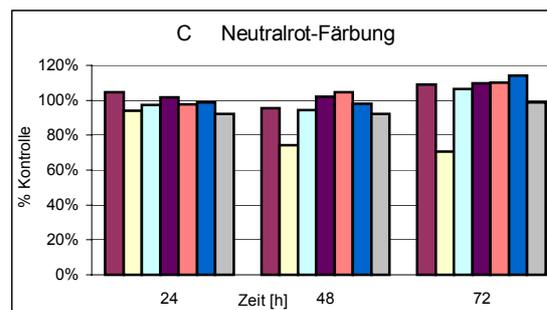


Abbildung C-17 Ergebnisse der Proliferationsstudien mit Kaktusfeigen-Extrakt-Fractionen in HepG2-Zellen nach Neutralrot-Vitalitätsfärbung. Dargestellt in der Reihenfolge Kontroll-Lösung (rot), Kaktusfeigen-Extrakt (gelb), Fraktion I (türkis), Fraktion II (violett), Fraktion III (orange), Fraktion IV (dunkelblau), Fraktion V (grau). Aufgetragen ist die Relation lebender Zellen im Testansatz im Vergleich zur Negativkontrolle in % (Negativkontrolle = 100%).

3.5.1 Diskussion

Bei den Versuchen mit Kaktusfeigen-Extrakt-Fractionen wurde keine Proliferationshemmung durch diese Testmischungen beobachtet. Einzige Ausnahme war die Fraktion V, die in Caco2-Zellen eine schwache Proliferationshemmung um 18% verursachte. Mit diesem Ansatz gelang es demnach nicht, die mit dem Kaktusfeigen-Extrakt beobachtete Proliferationshemmung bestimmten Extrakt-Fractionen oder Einzelsubstanzen zu zuordnen.

Da auch ein aus den fünf Fractionen wieder rekonstituierter Kaktusfeigen-Extrakt keine Proliferationshemmung zeigte (Daten nicht abgebildet), stellte sich die Frage, ob durch die HPLC-Fractionierung biologische Aktivität verloren gegangen sein konnte. So bleibt zu prüfen, ob das HPLC-Lösungsmittel oder das Säulenmaterial Einfluss auf die Bioaktivität haben. Es wurde z.B. berichtet, dass mit Acetonitril gewonnene Extrakte im Gegensatz zu Wasser/Ethanol-Extrakten keine Bioaktivität mehr aufwiesen (Wettasinghe et al. 2002)⁶⁷. Dies könnte daran liegen, dass für die Bioaktivität wichtige Inhaltsstoffe durch Acetonitril nicht von der Säule eluiert wurden, oder dass flüchtige Inhaltsstoffe während der Lyophilisation verloren gingen. Letzteres ist aber unwahrscheinlich, da auch der Kaktusfeigen-Extrakt lyophilisiert wurde und etwaige flüchtige Verbindungsstoffe dann auch abgetrennt wurden, ohne jedoch die Bioaktivität zu hemmen. Ob ein solcher Effekt auch für das hier verwendete Extraktionsmittel Methanol vorgelegen haben kann, müsste durch weitere Studien überprüft werden. Als weitere Möglichkeit bleibt noch eine Denaturierung der für die Wirkung des Kaktusfeigen-Extrakts wichtigen Strukturen durch das HPLC-Lösungsmittel Methanol. Eiskaltes Acetonitril und Methanol werden in der Medizin erfolgreich zum Denaturieren von Blutplasma eingesetzt (Lottspeich und Zorbas 1998). Eiskaltes Lösungsmittel wird bei der semi-präparativen HPLC des Kaktusfeigen-Extrakts jedoch nicht eingesetzt, daher kann nicht eindeutig beurteilt werden, ob eine Denaturierung in diesem Fall möglich war.

⁶⁷ Bioaktivität hinsichtlich Enzyminduktion in Hepa1c1c7-Zellen

In dieser Versuchsreihe wurde auch die Placebo-Lösung untersucht, die in keiner der drei Zell-Linien (HT29, Caco2, HepG2) eine Proliferationshemmung verursachte. Damit kann ausgeschlossen werden, dass die mit Kaktusfeigen-Extrakt gemessenen Effekte durch stark erhöhte Nährstoffkonzentrationen verursacht wurden.

Wie in Tabelle C-14 dargestellt, sind die Zellen auch in dieser Versuchsreihe während der Inkubationszeit stetig gewachsen, wodurch das Funktionieren der Zellkultur belegt werden konnte.

Tabelle C-14 Wachstum der Negativkontrolle von 24 h zu 48 h und 48 h zu 72 h für HT29- und Caco2-Zellen.

	Trypanblau-Detektion	MTS-Detektion	Neutralrot-Detektion
HT29-Zellen			
24 h - 48 h	=====	=====	76%
24 h - 72 h	=====	=====	9%
Caco2-Zellen			
24 h - 48 h	=====	=====	14%
48 h - 72 h	=====	=====	61%
HepG2-Zellen			
24 h - 48 h	=====	=====	96%
48 h - 72 h	=====	=====	32%

3.6 Diskussion der Studien zur Proliferationshemmung

Wie ausgeführt, zeigten die isolierten Betalaine (Betanin und Indicaxanthin) sowie Kaktusfeigen-Extrakte nach 72 h eine schwache, signifikante proliferationshemmende Wirkung in immortalisierten humanen Krebszell-Linien (HT29, Caco2).

Diese ist im Vergleich zu anderen literaturbekannten SPS als gering einzustufen, da keine IC₅₀-Werte im Konzentrationsbereich von 0,1-10 µM erreicht wurden. Derartige IC₅₀-Werte hat man als maßgeblichen Bereich potenzieller Bioaktivität von Polyphenolen vorgeschlagen, weil bei *in vivo*-Studien nach polyphenolreicher Kost Kon-

zentrationen von 0,1-10 μM im Blut gefunden worden sind (Kroon et al. 2004). Da man für Betanin und Indicaxanthin ähnliche Plasmakonzentrationen beobachtet hat (Betanin 0,2 μM , Indicaxanthin 7 μM) (Tesoriere et al. 2004), wurde für die vorliegende Arbeit dieser Zielbereich (0,1-10 μM) für IC_{50} -Werte übernommen.

Mit anderen SPS wie z.B. mit Xanthohumol, einem prenylierten Flavonoid aus Hopfen, wurden in MCF-7-Zellen nach 48 h IC_{50} -Werte von 13 μM , in A-2780-Zellen von 5 μM ermittelt (Miranda et al. 1999). Nach 48 h fanden Manthey und Guthrie in HT29-Zellen für das Flavonoid Nobiletin einen IC_{50} -Wert von 3,5 μM (Manthey und Guthrie 2002).

Schwache Proliferationshemmung wie bei Betanin beobachtete man jedoch auch bei einigen bekannten SPS, wie z.B. den Flavonoiden Quercetin, Myricetin, Hesperidin, Baicalein, Tangeretin und Genistein, deren IC_{50} -Werte nach 72 h in HT29- und Caco2-Zellen zwischen 50 μM und 100 μM lagen (Kuo 1996, Kuntz et al. 1999).

Für Betanin wurde in der Literatur schon nach 48 h Inkubation ein IC_{50} -Wert von 142 μM in HCT116-Colon-Krebszellen beschrieben (Reddy et al. 2005). In Krebszellen aus anderen Geweben (Brust, Lunge, Magen, Zentrales Nervensystem) fanden die o.a. Autoren IC_{50} -Werte in der gleichen Größenordnung. Diese parallel zu unseren Studien erarbeiteten Daten bestätigen die hier zu Betanin vorgestellten Ergebnisse und machen anbei deutlich, welche Bedeutung unterschiedliche Zell-Linien für die Wirksamkeit von Testsubstanzen haben. So sind z.B. HT29-Zellen für ihre Robustheit bekannt, wodurch im Vergleich zu anderen Zell-Linien höhere oder auch gar keine IC_{50} -Werte nachweisbar sind (Miranda et al. 1999, Manthey und Guthrie 2002).

Die in den Zell-Linien HT29, Caco2 und HepG2 beobachtete Proliferationshemmung durch Kaktusfeigen-Extrakt war statistisch signifikant. Anhand der Untersuchung eines Placebos, mit dem die Proliferation der Zellen nicht negativ beeinflusst werden konnte, ist sichergestellt worden, dass die beobachtete Proliferationshemmung nicht durch einen Nährstoffüberschuss künstlich verursacht wurde. Die aufgetretenen Ergebnisschwankungen lassen sich durch die Summierung verschiedener Unsicher-

heiten, wie. z.B. der ungleichmäßigen Aussaat der Zellen⁶⁸ und unterschiedlichen Serum-Chargen in neuen Kulturmedien erklären.

Auch andere betaninhaltige Pflanzenextrakte, wie z.B. wässrige und ethanolsche Rote Beete-Extrakte verursachten in Zellkulturen eine Proliferationshemmung. So fanden Wettasinghe und Mitarbeiter nach 24 h in der Maus-Zell-Linie Hepalcl7 eine Proliferationshemmung von fast 50% bei einer Rote Beete Extrakt-Konzentration von 4 mg/ml (Wettasinghe et al. 2002). Allerdings ist auszuschließen, dass die in den Versuchen mit Kaktusfeigen-Extrakt beobachtete Proliferationshemmung maßgeblich durch die Betalaine Betanin und Indicaxanthin verursacht wurde. Der Grund für diese Beurteilung liegt in den niedrigen Betanin- und Indicaxanthin-Konzentrationen des eingesetzten Kaktusfeigen-Extrakts. Der IC₅₀-Werte bewirkende Kaktusfeigen-Extrakt enthielt Betanin- und Indicaxanthinkonzentrationen, die in den Studien mit den isolierten Substanzen keine Proliferationshemmung in dieser Stärke verursachten. Im Falle von Betanin betrug die Konzentration im Kaktusfeigen-Extrakt 1/12 der im Versuch mit der Reinsubstanz zu einem IC₅₀-Wert führenden Konzentration, während mit isoliertem Indicaxanthin kein IC₅₀-Wert ermittelt werden konnte. Dies weist darauf hin, dass nicht die Einzelsubstanzen Betanin und Indicaxanthin für die Proliferationshemmung des Kaktusfeigen-Extrakts verantwortlich sind, sondern andere Extraktbestandteile oder das komplexe Gemisch der im Extrakt enthaltenen Stoffe.

Andere wirksame Bestandteile könnten Flavonoide wie Isorhamnetin-3-O- β -rutinosid, Rutin und 3,3'-Dimethylquercetin sein (siehe Kapitel C-2.7 bzw. Qiu et al. 2002, Galati et al. 2003). Für Quercetin, die Stammverbindung dieser Flavonoide, ist in Caco2- und HT29-Zellen eine konzentrationsabhängige Proliferationshemmung von Kuo und Mitarbeitern beobachtet worden. Sie ermittelten in Caco2- und HT29-Zellen einen IC₅₀-Wert von 50 μ M bzw. 55 μ M Quercetin (Kuo et al. 1996). Manthey und Guthrie fanden in HT29-Zellen für Quercetin einen IC₅₀-Wert von 40 μ M, während Rutin auch bei 200 μ M keine Proliferationshemmung um 50% oder mehr zeigte

⁶⁸ die gleiche Menge in jedem Kulturgefäß; gleichmäßige Verteilung in jedem Kulturgefäß

(Manthey und Guthrie 2002). Für Isorhamnetin, Dimethylquercetin, Dihydroquercetin und Dihydrokaempferol wurden bislang keine Daten zur Cytotoxizität veröffentlicht.

Da nach Inkubation von HT29-, Caco2- und HepG2-Zellen mit den Kaktusfeigen-Extrakt-Fractionen im Gegensatz zu den Versuchen mit dem Gesamtextrakt keine Proliferationshemmung beobachtet wurde, drängt sich der Gedanke einer synergistischen Wirkung der Extraktbestandteile auf. Nicht durch Einzelfractionen und deren Inhaltsstoffe, sondern nur durch den Kaktusfeigen-Extrakt als Ganzes wurde die ermittelte Proliferationshemmung hervorgerufen. Ähnliches haben Butera et al. (2002) für die antioxidativen Eigenschaften von methanolischen Extrakten aus gelben, roten und weißen Kaktusfrüchten sowie die isolierten Verbindungen Betanin und Indicaxanthin beschrieben. Alle Testsubstanzen zeigten antioxidative Eigenschaften im Trolox-Test, ebenso wie bei der Lipid-Oxidation in Erythrozyten und LDL. Dabei lagen die Ergebnisse der Extrakte aus den unterschiedlich gefärbten Früchten maximal 25% auseinander, während ihr Betalaingehalt (Summe Indicaxanthin und Betanin) um 50% differierte (Butera et al. 2002). Dies deutet darauf hin, dass Betanin und Indicaxanthin zwar einen Beitrag zur antioxidativen Wirkung von methanolischen Kaktusfeigen-Extrakten leisten, die maßgebliche Wirkung aber durch andere Inhaltsstoffe oder synergistische Wirkungen erreicht wurde, da die Betalainkonzentration der Kaktusfeigen-Extrakte 1/20 der isoliert getesteten Betalaine betrug (Butera et al. 2002).

Ein anderes Beispiel für eine synergistische oder additive Wirkung beschrieben Briviba und Mitarbeiter mit den Rotweinpolyphenolen Malvidin-3-glucosid, (+)-Catechin, (-)-Epicatechin und Resveratrol, die als Mischung eine schwächere antiproliferative Wirkung als ein Rotwein-Polyphenolextrakt zeigten (Briviba et al. 2002).

Das bei den Inkubationen mit Indicaxanthin aufgetretene U-förmige Wirkprofil könnte darauf hindeuten, dass Indicaxanthin eine „Janus-Verbindung“ ist, die konzentrationsabhängig gegensätzliche Effekte verursacht, was für einige Antioxidantien und Flavonoide im Hinblick auf den Schutz vor Oxidationsschäden schon früher beschrieben worden ist (Knasmüller et al. 2002). Diese Eigenschaft einiger Verbin-

dungen (wie z.B. auch der Vitamine C und E) erschwert die Festlegung von Verzehrsempfehlungen und Tagesdosen.

Die beobachtete Proliferationshemmung beruhte nicht auf akut toxischen Effekten, da sich die durch Betalaine und Kaktusfeigen-Extrakte verursachte Proliferationshemmung erst langsam manifestierte und meist erst nach 72 h determinierbare IC_{50} -Werte erreichte. Eine weitere Beobachtung, die gegen eine akute Toxizität der Betalaine spricht, ist der Anteil toter (nekrotischer) Zellen, der mit der Trypanblau-Methode ermittelt werden kann, und der nur in wenigen Testansätzen $> 10\%$ der lebenden Zellen betrug (in diesen Fällen lag er zwischen 10% und 20%). Eine solche Cytostase wurde auch für andere SPS wie z.B. Flavone, Flavonole, Flavanone und Isoflavone in HT29- und Caco2-Zellen (Kuntz et al. 1999, Pool-Zobel et al. 1999) sowie für Indole in p53-wild-type-40-16-HCT116-Zellen (Pappa et al. 2006) beschrieben. Diese „nicht-toxische“ Proliferationshemmung kann mehrere Ursachen haben (Kuntz et al. 1999, Pool-Zobel et al. 1999, Lindl 2002, Pappa et al. 2006):

- Induktion von Apoptose durch die Testsubstanzen: Die Zellen zerstören sich selbst, die DNA wird gespalten; die Zellen sind unter dem Mikroskop nicht mehr als runde, geschlossene Einheiten erkennbar.
- Durch die Testsubstanzen verursachter Zellzyklusstopp: Der Zellzyklus der Zellen wird unterbrochen; die Zellen bleiben in einer der Phasen hängen, sterben jedoch nicht.
- Auslösen von Differenzierungsprozessen durch die Testsubstanzen: Die Zellen verlassen den Zellzyklus, um zu differenzieren. Sie verlieren die Proliferationsfähigkeit und entwickeln neue/andere Eigenschaften.
- Verlangsamung des Zellzyklus: Der Zellzyklus wird verlangsamt, die Generationszahl⁶⁹ wird kleiner, die Generationszeit⁷⁰ länger.

Die möglichen Ursachen wie Apoptose und Zellzyklusstopp wurden in weiterführenden Studien überprüft, jedoch nicht mit allen Testsubstanzen und Zell-Linien.

⁶⁹ Anzahl Generationen/Zellteilungen während der Inkubationszeit

⁷⁰ Für eine Teilung der Zelle benötigte Zeit

Die vorliegenden Ergebnisse verdeutlichen die Notwendigkeit der Betrachtung handelsüblicher Lebensmittel in Chemopräventionsstudien, da der mit dem Kaktusfeigen-Extrakt nachgewiesene antiproliferative Effekt nicht in Extrakt-Fractionen auftrat, ebensowenig wie mit rekonstituiertem Extrakt (siehe Kapitel C-3.5.1).

Für die Chemoprävention könnte das beobachtete *in vitro*-Verhalten der Betalaine und Kaktusfeigen-Extrakte interessant sein, da möglicherweise *in vivo* bevorzugt entartete Zellen angegriffen und in der Proliferation gehemmt werden, ohne dass aufgrund der schwachen Wirkung gesunde Zellen in Mitleidenschaft gezogen werden. Diese Hypothese ist gegenwärtig allerdings weder für Betalaine noch für andere SPS belegbar, da aussagekräftige Testsysteme wie Normalzellen noch nicht etabliert sind.

Die in den Versuchen wirksame Menge des Kaktusfeigen-Extrakts entspricht 20% der Trockenmasse des Fruchtfleischs einer Kaktusfeige. Die wirksame Menge ist demnach durch den Verzehr von Kaktusfeigen leicht aufzunehmen. Da aber unklar ist, ob eine wirksame Menge der Extraktbestandteile ins Blut gelangt, sind weitere Arbeiten nötig, um die wirksame Zusammensetzung des Extrakts, die Bioverfügbarkeit der benötigten Inhaltsstoffe und eine mögliche *in vivo*-Bedeutung des Kaktusfeigen-Extrakts aufzuklären. Mit den vorliegenden *in vitro*-Ergebnissen sind noch keine Aussagen zu den Wirkungen des Kaktusfeigen-Extrakts *in vivo* möglich.

4 Induktion von Apoptose und Beeinflussung des Zellzyklus durch Kaktusfeigen-Extrakt

4.1 Induktion von Apoptose durch Kaktusfeigen-Extrakt

Apoptose, auch genetisch programmierter Zelltod genannt, ist die gezielte kontrollierte Vernichtung von einzelnen Zellen oder Zellgruppen (siehe Kapitel 2.3). Durch Apoptose kann die Zellproliferation verringert werden, ohne dass dabei mehr nekrotische Zellen gebildet werden. Zur Detektion der im folgenden beschriebenen Versuche wurde der Annexin V-Test zum Nachweis von apoptotischen Zellen eingesetzt. Dieser beruht auf der Fähigkeit des Proteins Annexin V, Phosphatidylserin zu binden,

das nur in apoptotischen Zellen auf der Außenseite der Zellmembran präsentiert wird (siehe Kapitel B-2.4). Das eingesetzte Annexin V ist selbst mit Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) markiert, wodurch die Detektion apoptotischer Zellen im Durchflusszytometer möglich wird. Durch Gegenfärbung mit einem unspezifischen DNA-Intercalator, wie 7-Aminoactinomycin D (7-AAD), der intakte Zellmembranen nicht passieren kann, lassen sich im Idealfall mit dieser Methode im Durchflusszytometer vier verschiedene Zellpopulationen differenzieren:

1. lebende Zellen, die weder Annexin-V-FITC noch 7-AAD binden (Abb. C-18, unten links),
2. früh-apoptotische Zellen (siehe Kapitel 2.3), die Annexin-V-FITC binden, jedoch kein 7-AAD,
3. spät-apoptotische Zellen, die Annexin-V-FITC und 7-AAD binden,
4. nekrotische Zellen, die 7-AAD binden, jedoch kein Annexin-V-FITC.

Der Annexin V-Test zum Nachweis von Apoptose in den Zielzellen wurde mit Kaktusfeigen-Extrakt an HT29-Zellen durchgeführt. Für den Versuch wurden vergleichbare Bedingungen wie für die Proliferationsstudien mit der Trypanblau-Färbung angewendet. Der Versuch wurde allerdings nur als unabhängige Doppelbestimmung durchgeführt. Nach der Inkubation von HT29-Zellen mit Kaktusfeigen-Extrakt zeigte sich eine konzentrationsabhängige Vergrößerung des Anteils apoptotischer Zellen (Summe der früh- und spät-apoptotischen Zellen) von 6,3% in der Negativkontrolle auf 13,2% mit der höchsten Testkonzentration (10 mg/ml Kaktusfeigen-Extrakt) (Tabelle C-15, Abbildung C-18). Der Anteil nekrotischer Zellen blieb in etwa konstant.

Die Proliferationshemmung, ausgedrückt als Verminderung vitaler (nicht gefärbter) Zellen, belief sich auf 14,3 % bei einer Testkonzentration von 10 mg/ml Kaktusfeigen-Extrakt und war geringer als in den Proliferationsversuchen.

Tabelle C-15 Ermittlung des prozentualen Anteils früh-/spät-apoptotischer, vitaler und nekrotischer Zellen nach 72 h Inkubation von HT29-Zellen mit Kaktusfeigen-Extrakt.

Konzentration [mg/ml]	vitale Zellen	Früh-apoptotische Zellen	Spät-apoptotische Zellen	nekrotische Zellen
0	92,4 %	2,6 %	3,7 %	1,4 %
3,3	92,2 %	3,0 %	4,0 %	0,9 %
6,6	89,3 %	4,6 %	5,3 %	0,9 %
10	85,7 %	5,9 %	7,3 %	1,2 %

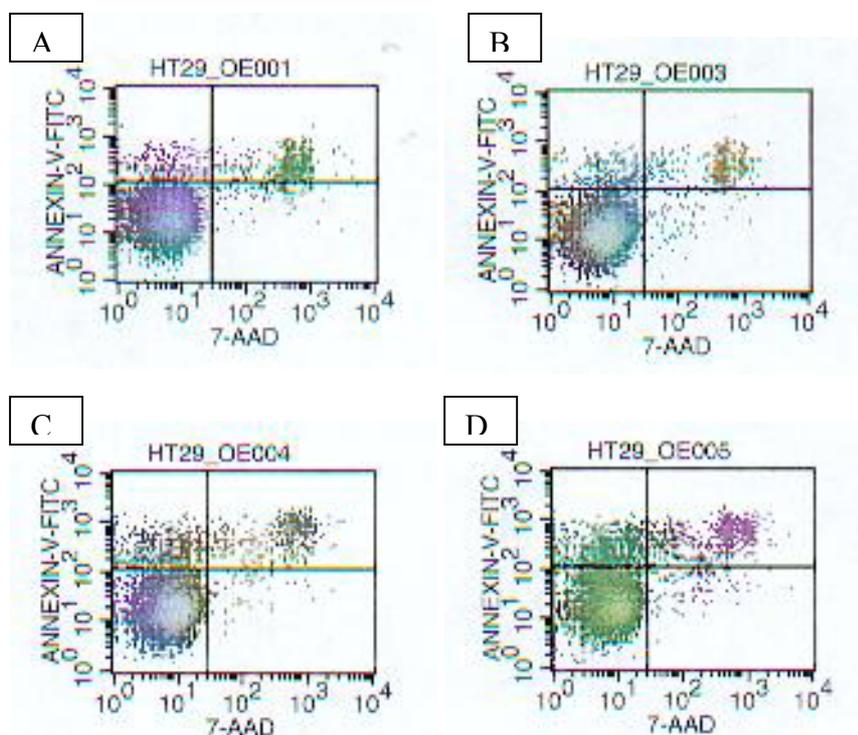


Abbildung C-18 Ermittlung des Anteils früh-/spät-apoptotischer, vitaler und nekrotischer Zellen nach 72 h Inkubation von HT29-Zellen mit Kaktusfeigen-Extrakt
 Quadrant unten links: vitale Zellen; unten rechts: nekrotische Zellen; oben links: früh-apoptotische Zellen; oben rechts: spät-apoptotische Zellen; A – Negativkontrolle, B – 3,3 mg/ml Kaktusfeigen-Extrakt, C – 6,6 mg/ml Kaktusfeigen-Extrakt, D – 10,0 mg/ml Kaktusfeigen-Extrakt. Für die prozentuale Auswertung siehe Tabelle C-15 .

4.1.1 Diskussion

Bei Inkubation mit Kaktusfeigen-Extrakt war bei den kultivierten HT29-Zellen kein signifikanter Anstieg der apoptotischen Zellpopulation nachweisbar. Der bei HT29-Zellen beobachtete Anstieg apoptotischer Zellen um 7% wurde aufgrund der in den Trypanblau-Versuchen beobachteten, großen Standardabweichungen nicht als signifikant betrachtet.

Es konnte keine Induktion von Apoptose in HT29-Zellen durch Inkubation mit Kaktusfeigen-Extrakt nachgewiesen werden. In Versuchen mit den isolierten Betalainen Betanin und Indicaxanthin war ebenfalls keine Apoptose nachzuweisen (nicht abgebildet).

Zusätzlich bestätigte sich die Beobachtung aus den Proliferationsversuchen mit Trypanblau-Detektion (Kapitel C-3), bei denen kein Anstieg der nekrotischen Zellen beobachtet wurde. Auch bei der Detektion mit 7-AAD wurde bei der Inkubation von HT29-Zellen mit Kaktusfeigen-Extrakt ein konstanter Anteil von ca. 1,1% nekrotischer Zellen ermittelt.

Der getestete Kaktusfeigen-Extrakt und die Betalaine (Betanin und Indicaxanthin) wiesen kein akut toxisches Potential auf, da weder massives Zellsterben noch durch Apoptose verursachte Proliferationshemmung zu beobachten war. Der gemessene proliferationshemmende Effekt von Kaktusfeigen-Extrakt musste andere Ursachen haben. Diese könnte im Zellzyklusstopp zu suchen sein, durch den die proliferierenden Zellen in einer Zyklusphase angehalten werden, aber kein Todessignal erhalten. Solche ruhenden Zellen leben in Kultur weiter, bis die Nährstoffe aufgebraucht sind oder sie aus benachbarten proliferierenden Zellen ein Todessignal erhalten (Boehringer Mannheim 1998, Lindl 2002). Diese Möglichkeit wurde untersucht und ist in Kapitel C-5 beschrieben.

Andere SPS, wie z.B. die Flavonoide Baicalein, Myricetin und 2-Phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (Flavone), die ebenfalls eine Proliferationshemmung in HT29- oder Caco2-Zellen verursachen, lösen gleichzeitig Apoptose in diesen Zellen aus (Kuntz et al. 1999, Wenzel et al. 2000).

4.2 Beeinflussung des Zellzyklus durch Kaktusfeigen-Extrakt

Der Zellzyklus steuert die Proliferation der einzelnen Zelle (siehe Kapitel 2.4). Wird er unterbrochen oder blockiert, kann die Zellproliferation verringert werden, ohne dass der Anteil nekrotischer Zellen dabei zunimmt, da eine solche Zelle in diesem Status lebensfähig bleibt.

Wie in Kapitel 2.4 näher beschrieben, beruht die grobe Unterteilung des Zellzyklus in drei Phasen auf der Veränderung des DNA-Gehalts während eines Zyklusdurchgangs. In der G_0/G_1 -Phase liegt der normale Chromosomensatz vor ($DNA = 1n$). In der S-Phase beginnt die DNA-Synthese ($DNA = 1n + x$), die in der G_2/M -Phase abgeschlossen ist ($DNA = 2n$). Zur Bestimmung des DNA-Gehalts und damit der Zellzyklusphase wird die Zellkern-DNA mit einem Fluoreszenzfarbstoff, z.B. Propidiumiodid angefärbt und im Durchflusszytometer vermessen. Dabei werden die Zellen einzeln gezählt und können am Computer nach Fluoreszenz und Zellgröße (Maß für den DNA-Gehalt) kategorisiert werden ($DNA = 1n, 1n+x$ oder $2n$). Die Anteile der jeweiligen Kategorie werden als %-Werte ausgegeben.

Die Bestimmung des Zellzyklus wurde an HT29- und Caco2-Zellen durchgeführt, die mit Kaktusfeigen-Extrakt und Indicaxanthin inkubiert worden waren. Die Ergebnisse sind in Tabelle C-16 zusammengefasst. Für die Versuche (keine Mehrfachbestimmung) wurden die gleichen Bedingungen wie für die Proliferationsversuche mit der Trypanblau-Färbung angewendet (siehe Kapitel C-3 und D-3.1.4.1). Bei Inkubation der HT29-Zellen mit Kaktusfeigen-Extrakt konnte keine Veränderung des Zellzyklus nachgewiesen werden.

In Caco2-Zellen, die ebenfalls mit Kaktusfeigen-Extrakt inkubiert wurden, verringerte sich der Anteil der Zellen in der G_1 -Phase mit ansteigender Konzentration des Kaktusfeigen-Extrakts um 8%, während der Zellanteil in der S-Phase um 1% und der Zellanteil in der G_2/M -Phase um 7% anstiegen.

Bei Inkubation mit Indicaxanthin verringerte sich in HT29-Zellen der Zellanteil in der G₁-Phase um 9% mit steigender Indicaxanthinkonzentration, während derjenige in der S-Phase um 8% und der Zellanteil in der G₂-Phase um 1% anstiegen (Tabelle C-16).

Tabelle C-16 Ergebnisse der Versuche zum Einfluss von Kaktusfeigen-Extrakt und Indicaxanthin auf den Zellzyklus von HT29- und Caco2-Zellen. Getrennt nach Testsubstanz und Testkonzentration ist der prozentuale Anteil der Zellen in der jeweiligen Zyklusphase aufgelistet.

	Test-Konzentration	G ₁ -Phase		S-Phase		G ₂ -Phase	
		HT29	Caco2	HT29	Caco2	HT29	Caco2
Opuntienextrakt	0	73%	39%	22%	43%	5%	18%
	3 mg/ml	72%	36%	21%	43%	7%	21%
	6 mg/ml	70%	31%	24%	47%	6%	22%
	10 mg/ml	73%	31%	21%	44%	6%	25%
Indicaxanthin	0	59%		28%		13%	
	50 µM	55%		32%		13%	
	150 µM	52%		33%		15%	
	300 µM	50%		36%		14%	

Die beobachteten Veränderungen im Zellzyklus bei der Inkubation mit Kaktusfeigen-Extrakt und Indicaxanthin können wegen der geringen Ausprägung und der Einfachbestimmung nicht als signifikant betrachtet werden. Es wurde angesichts der zwar signifikanten, aber schwachen Proliferationshemmung und des fehlenden Einflusses der Testsubstanzen auf die Apoptose nicht davon ausgegangen, dass weitere Zellzyklusversuche einen signifikanten und deutlichen Effekt zeigen würden. Wäre eine Veränderung im Zellzyklus der Grund für die in Kapitel C-3 beobachtete Proliferationshemmung, die durch IC₅₀-Werte in den Zell-Linien HT29, Caco2 und HepG2 beschrieben wurde, müsste die Zellzyklusänderung wohl in der Größenordnung 40%iger Verschiebung von G₁ in die andere Phase liegen.

4.2.1 Diskussion

Das Fehlen einer deutlichen Zellzyklusverschiebung trotz eines eindeutigen antiproliferativen Effekts deutete darauf hin, dass die Zellzyklussteuerung nicht Ursache der beobachteten Proliferationshemmung sein kann. Dies ist ungewöhnlich, da bei proliferationshemmenden Effekten in Zellkulturen entweder toxische Effekte (führen zu großem Anteil nekrotischer Zellen), Apoptose oder ein Zellzyklusstopp (führt zu ruhenden Zellen) vorliegen (Kirlin et al. 1999, Kuntz et al. 1999, Wenzel et al. 2000).

Eine Erklärung für dieses Paradoxon einer Proliferationshemmung ohne Zellzyklusbeeinflussung könnte eine Verlangsamung einzelner Zellzyklusschritte sein. Dabei könnte die Zyklusgeschwindigkeit soweit verringert werden, dass im Vergleich zur Kontrolle weniger behandelte Zellen vorliegen. Den Nachweis einer solchen Verlangsamung der Generationszeit⁷¹ kann man durch Studien zum Einbau markierter Nukleinsäuren (z.B. 5-Bromouracil-2'-deoxyribose, BrdU) führen (Lindl 2002). Die Aufklärung des proliferationshemmenden Effekts des Kaktusfeigen-Extrakts wurde zurückgestellt, da zuerst die Bioaktivität des Kaktusfeigen-Extrakts weiter untersucht werden sollte. Dazu wurden die in den folgenden Kapiteln beschriebenen Versuche zur Beeinflussung von Enzymen des Fremdstoffmetabolismus durchgeführt.

4.3 Zusammenfassung der Apoptose- und Zellzyklusergebnisse

Da weder in HT29-, noch in Caco2-Zellen in nennenswertem Maß Apoptose oder ein Zellzyklusblock nachweisbar waren, musste davon ausgegangen werden, dass die Testsubstanzen keine toxische Wirkung auf die eingesetzten Zell-Linien hatten. Die beobachtete Proliferationshemmung ist durch eine Verlängerung der Generationszeit der behandelten Zellen erklärbar, wodurch diese langsamer wachsen als unbehandelte Zellen (Lindl 2002). Eine andere Erklärung ist eine durch die Testsubstanzen ausgelöste Differenzierung der Zellen, wodurch diese ihre Teilungsfähigkeit verlieren und spezielle Eigenschaften erlangen (Lindl 2002). Für HT29- und Caco2- Zellen ist eine Differenzierung möglich und kann z.B. durch Inkubation mit Butyrat induziert werden.

⁷¹ Zeitspanne zwischen zwei Zellteilungen

Differenzierte Zellen gehen zwar nach einer gewissen Zeit (für jeden Zelltyp anders) in die Apoptose über, aber möglicherweise geschah das so spät, dass es in diesen Versuchen nicht erfasst wurde. Im Zellzyklus war eine Zelldifferenzierung nicht erkennbar, da differenzierte Zellen den gleichen DNA-Gehalt wie G₁-Phase-Zellen haben, und deren Anteil in den Versuchen nicht zugenommen hatte. Um differenzierte Zellen sicher nachzuweisen, werden Differenzierungsmarker wie das Enzym alkalische Phosphatase oder das Carcinoembryonale Antigen (CEA) bestimmt. Beide Thesen wurden jedoch nicht weiter überprüft, da weitere Bioaktivitätsstudien auf Enzymebene Vorrang hatten.

5 Einfluss von Kaktusfeigen-Extrakt, Betanin und Indicaxanthin auf ausgewählte Phase I- und II-Enzyme

Neben der Beeinflussung der Zellproliferation ist die Beeinflussung des Fremdstoffmetabolismus ein Zielort chemopräventiv wirksamer Verbindungen. Wünschenswert ist eine Aktivitätssteigerung vor allem von Phase II-Enzymen, die bei Entgiftungsmechanismen eine große Rolle spielen (siehe Kapitel B-3). Die Aktivität von Phase I-Enzymen wie der Cytochrom P450-Isoenzymfamilie soll durch die chemopräventiven Substanzen nicht beeinflusst werden, da diese Enzyme die Bildung schädlicher Verbindungen ermöglichen können. Da auch entzündliche Vorgänge von großer Bedeutung für die Gewebeintegrität sind, sind auch die Cyclooxygenasen (COX), die an der Synthese von Entzündungsmediatoren wie den Prostaglandinen beteiligt sind, ein Angriffspunkt chemopräventiv wirksamer Verbindungen oder Stoffgemische.

Zur Bestimmung der Enzymaktivität gibt es unterschiedliche Ansätze:

1. Die Quantifizierung der das jeweilige Enzym codierenden mRNA aus geeigneten Modellsystemen, da mit steigender mRNA-Menge mehr Enzymmoleküle translatiert werden und mehr Enzym mehr Substrat umsetzen kann.
2. Die direkte Bestimmung der Enzymaktivität durch den Umsatz von Substraten und einer photometrischen Messung in geeigneten Modellsystemen.

Beide Methoden wurden in dieser Arbeit eingesetzt. Der Vorteil der mRNA-Methode liegt in der größeren Spezifität, da gezielt einzelne Isoenzyme nachgewiesen werden können. Allerdings kann nicht vorhergesagt werden, wieviel mRNA erfolgreich in aktives Protein translatiert wird. Die direkte Messung ermöglicht Aussagen über tatsächliche Umsatzraten, ohne die verschiedenen Isoenzyme zu differenzieren.

5.1 Quantifizierung der mRNA chemopräventiv bedeutender Enzyme

Als Maß für die Enzym-Aktivität wurde die in den Zellen exprimierte mRNA-Menge für das jeweilige Enzym bestimmt. Die gebildete mRNA-Menge determiniert, wieviele Enzymmoleküle translatiert werden, was direkt die spezifische Aktivität des Enzyms beeinflussen kann⁷².

Zur Bestimmung der zellulären mRNA-Menge des jeweiligen Enzyms wurde die gesamte RNA aus den Zellen extrahiert und photometrisch bei 260 nm quantifiziert. Die jeweiligen gesuchten mRNA-Abschnitte wurden mittels PCR-Techniken⁷³ in DNA translatiert und vervielfältigt. Diese DNA wurde via Agarose-Gelchromatographie nach der Größe (Basenpaare, bp) aufgetrennt; die DNA-Banden wurden mit Ethidiumbromid detektiert. Die gesuchten Banden wurden durch Vergleich mit einem Größenmarker identifiziert (siehe Kapitel D-3.3). Da von jeder Probe die gleiche RNA-Menge zur PCR eingesetzt wurde, konnte durch visuellen Intensitätsvergleich der Banden eine Zu- oder Abnahme der gesuchten RNA bestimmt und Aussagen zur Enzymaktivitätsänderung gemacht werden.

Die Versuche wurden analog zu den Versuchen zur Proliferationshemmung mit Trypanblau-Detektion durchgeführt (vgl. Kapitel C-2 und Kapitel D-3.1). Als Testsubstanz wurde Indicaxanthin eingesetzt und in HT29-Zellen inkubiert. Die Qualität der extrahierten RNA und der Erfolg der rtPCR wurde für jede Probe mit einer rtPCR auf die in jeder Zelle vorliegende RNA von β -Actin überprüft.

⁷² Bei ausreichender Eduktmenge gilt: je mehr Enzym, desto mehr Produkt

⁷³ PCR – Polymerase Kettenreaktion: Reaktionsfolge zur Vervielfältigung definierter DNA-Sequenzen; Techniken: z.B. reverse transcriptase PCR (rt PCR): Translation von RNA- in DNA-Sequenzen

5.1.1 Beeinflussung der COX-II-Expression in HT29-Zellen

Die beiden Isoenzyme der Cyclooxygenase, COX-I und COX-II, sind im Endoplasmatischen Retikulum (ER) lokalisiert. COX-I ist ein konstitutives, d.h. nicht induzierbares, auf festem Niveau vorliegendes Enzym, während COX-II induzierbar ist. Die Transkription und Translation von COX-II wird z.B. durch Verletzungen oder Infektionen der Zellen induziert. In den meisten Tumorzellen, z.B. Haut, Leber, Lunge, Brust und Darm, wird das Enzym jedoch kontinuierlich gebildet. Dabei wird die Zellteilung beschleunigt, die Apoptose gehemmt, die Immunabwehr unterdrückt und die Bildung neuer Blutgefäße angeregt. Dementsprechend ist die Verringerung der COX-II-Aktivität durch Nahrungsmittelinhaltsstoffe ein chemopräventiver Effekt.

Die HT29-Zellen wurden mit Indicaxanthin in Konzentrationen von 50 μM , 100 μM und 150 μM für 48 h inkubiert. In Abbildung C-19 ist ein Gelchromatogramm der COX-II-DNA zu sehen. Die COX-II-Sequenz der mit Indicaxanthin inkubierten HT29-Zellen ist durch die Buchstaben A-D gekennzeichnet. In diesem Versuch zeigte sich, dass im Vergleich zur Negativkontrolle keine Beeinflussung der COX-II-mRNA-Expression durch Indicaxanthin auftrat. Aus jeder Zelle wurde gleichzeitig eine ständig exprimierte mRNA untersucht (hier beta-Actin), um sicherzustellen, dass die RNA-Extraktion erfolgreich war. Da dies bei diesem Versuch gegeben war (siehe Kapitel D-3.3), bedeutet das Versuchsergebnis, dass Indicaxanthin in HT29-Zellen die COX-II-Transkription nicht beeinflusst.

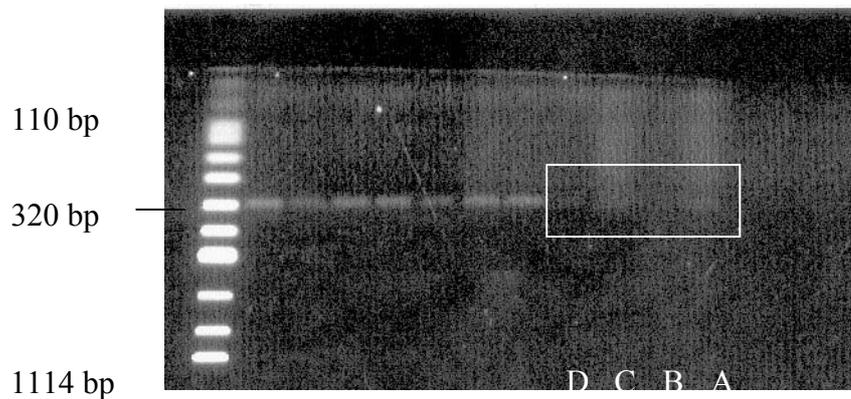


Abbildung C-19 Agarose-Gel mit Ethidium-Bromid-Färbung. Durch Vergleich mit dem Größenmarker wurde die 305 Basenpaare (bp) große Cox II –Sequenz aus den inkubierten HT29-Zellen lokalisiert. A Negativkontrolle, B 50 μM Indicaxanthin, C 100 μM Indicaxanthin, D 150 μM Indicaxanthin.

5.1.2 Beeinflussung der Cytochrom P450-Expression in HT29-Zellen

Die Cytochrom P450-Monooxygenasen (Cyp P450) bilden eine große Isoenzymfamilie (siehe Kapitel B-3.1), deren Expression mit den Isoenzymen 2c, 3A4 und 3A5 in diesem Experiment untersucht wurde. Die Cyp P450-Studie wurde mit HT29-Zellen und der Testsubstanz Indicaxanthin (50 μM , 100 μM und 150 μM) durchgeführt. Die Versuche wurden analog zu den Experimenten zur Proliferationshemmung mit Trypanblau-Detektion durchgeführt (vgl. Kapitel C-2).

Im Vergleich zur Negativkontrolle war keine Beeinflussung der Cyp P450-mRNA-Expression für die Isoenzyme 2c und 3A5 durch Indicaxanthin festzustellen (Abb. C-20 und C-22). Die zum Cyp P450-Isoenzym 3A4 gehörende Bande konnte in HT29-Zellen nicht detektiert werden (Abb. C-21), was daran liegen kann, dass dieses spezielle Cyp P450-Isoenzym von der Zell-Linie HT29 nicht exprimiert wird.

Allerdings wurden bei allen untersuchten Cytochrom P450-Isoenzymen viele zusätzliche Banden im Gel detektiert, die ebenfalls nicht durch Indicaxanthin beeinflusst wurden. Der Hauptgrund für diese Banden war die unspezifische Oligo d(T)₁₆-Translation, durch die auch nicht gesuchte mRNA in cDNA übersetzt wird. Die Banden stehen daher

in keiner Verbindung mit den untersuchten Cyp P450-Isoenzymen, sondern sind systembedingt⁷⁴.

Bei der Überprüfung der isolierten RNA durch eine Untersuchung der beta-Actin mRNA ergab sich kein Hinweis auf eine schlechte RNA-Extraktion.

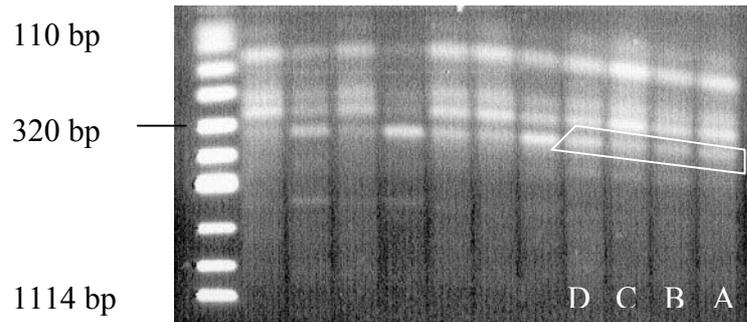


Abbildung C-20 Agarose-Gel mit Ethidium-Bromid-Färbung. Durch Vergleich mit dem Größenmarker wurde die 344 Basenpaare große **Cyp P450 2c**-Sequenz aus den mit Indicaxanthin inkubierten HT29-Zellen lokalisiert. A Negativkontrolle, B 50 μ M Indicaxanthin, C 100 μ M Indicaxanthin, D 150 μ M Indicaxanthin.

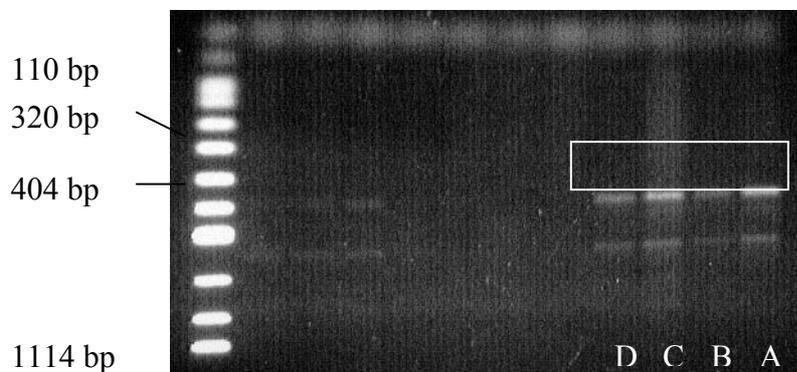


Abbildung C-21 Agarose-Gel mit Ethidium-Bromid-Färbung. Durch Vergleich mit dem Größenmarker wurde die 385 Basenpaare große **Cyp P450 3A4**-Sequenz aus den mit Indicaxanthin inkubierten HT29-Zellen lokalisiert. A Negativkontrolle, B 50 μ M Indicaxanthin, C 100 μ M Indicaxanthin, D 150 μ M Indicaxanthin.

⁷⁴ Oligo d(T)16-Primer translaterien relativ unspezifisch bestimmte mRNA-Bereiche, in denen sich auch die gesuchte Sequenz befindet. Da aber auch nicht benötigte Sequenzen erfasst werden, ist das Rauschen (hier der Anteil unspezifischer Banden) erhöht.

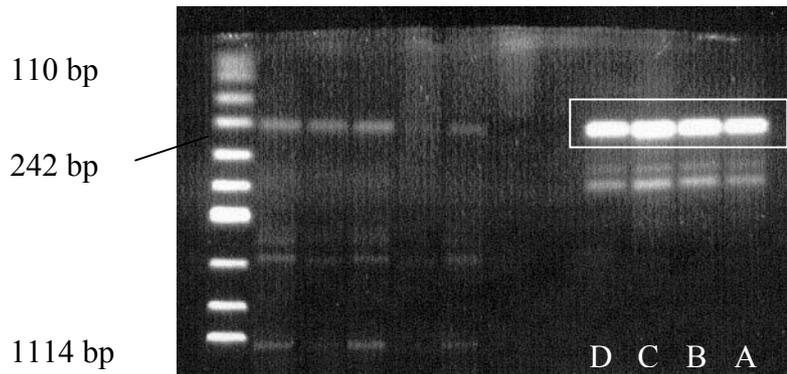


Abbildung C-22 Agarose-Gel mit Ethidium-Bromid-Färbung. Durch Vergleich mit dem Größenmarker wurde die 239 Basenpaare große **Cyp P450 3A5**-Sequenz aus den mit Indicaxanthin inkubierten HT29-Zellen lokalisiert. A Negativkontrolle, B 50 μM Indicaxanthin, C 100 μM Indicaxanthin, D 150 μM Indicaxanthin.

5.1.3 Beeinflussung der Glutathion-S-Transferase Expression in HT29-Zellen

Die Glutathion-S-Transferasen (GST) bilden eine große Isoenzymfamilie (siehe Kapitel B-3.2), deren Isoenzym $\mu 3$ in diesem Experiment untersucht wurde. GST $\mu 3$ katalysiert bevorzugt die Konjugation α, β -ungesättigter Carbonylverbindungen und Epoxide (Hayes und McMahon 2000).

Die Untersuchung der GST $\mu 3$ -Expression in HT29-Zellen wurde mit Indicaxanthin (50 μM , 100 μM und 150 μM) analog zu den Experimenten zur Proliferationshemmung mit Trypanblau-Detektion durchgeführt (vgl. Kapitel C 2).

Im Vergleich zur Negativkontrolle war keine Beeinflussung der GST $\mu 3$ -mRNA-Expression durch Indicaxanthin festzustellen (Abbildung C-23). Allerdings wurde in HT29-Zellen neben der Bande bei 204 Basenpaaren eine weitere bei 690 Basenpaaren detektiert, deren Herkunft ungeklärt ist. Diese Bande wurde ebenfalls nicht durch Indicaxanthin beeinflusst. Möglicherweise gehört diese Bande zu einem anderen Protein, dessen mRNA-Sequenz teilweise mit der gesuchten mRNA-Sequenz von GST $\mu 3$ übereinstimmt. Dies läßt sich anhand der vorliegenden Daten (eingesetzte Primer und Größenangabe (bp) des DNA-Strangs) nicht genauer bestimmen. Da jedoch ausgeschlossen

werden kann, dass die unbekannte Bande etwas mit der gesuchten GST μ 3 zu tun hat, wurde sie nicht weiter untersucht.

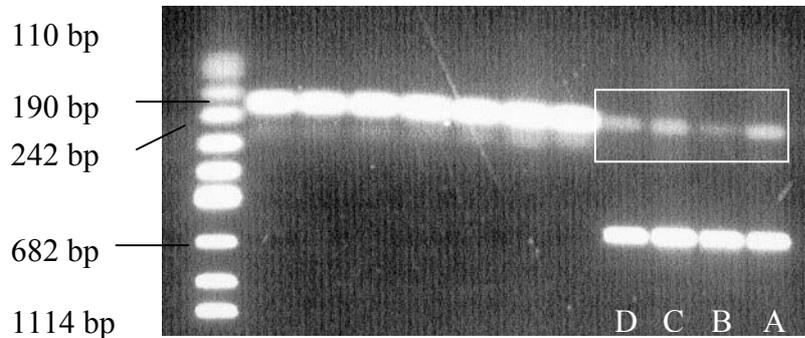


Abbildung C-23 Agarose-Gel mit Ethidium-Bromid-Färbung. Durch Vergleich mit dem Größenmarker wurde die 204 Basenpaare große GST μ 3-Sequenz aus den mit Indicaxanthin inkubierten HT29-Zellen lokalisiert. A Negativkontrolle, B 50 μ M Indicaxanthin, C 100 μ M Indicaxanthin, D 150 μ M Indicaxanthin.

5.1.4 Diskussion

Durch die reverse transcriptase Polymerase Kettenreaktion konnte in HT29-Zellen die mRNA-Expression für die Enzyme Cyclooxygenase II, Cytochrom P450 2C/3A5 und Glutathion-S-Transferase μ 3 nachgewiesen werden. Es wurde jedoch keine dem Cytochrom P450-Isoenzym 3A4 entsprechende mRNA in HT29-Zellen gefunden.

In diesen Versuchen wurde kein Einfluss von Indicaxanthin auf die Enzymexpression von Cyclooxygenase II, Cytochrom P450 2C/3A5 sowie auf Glutathion-S-Transferase μ 3 beobachtet. Weitere Versuche zur Genexpression von Enzymen des Fremdstoffmetabolismus wurden nicht durchgeführt, da für jedes Isoenzym eigene Primer benötigt wurden und unklar war, in welchem Maß die jeweiligen Enzyme in den zur Verfügung stehenden Zellen vorlagen. Stattdessen wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit die messbare Enzymaktivität in HepG2-, HT29- und Caco2-Zellen untersucht. Dabei konnten zwar keine einzelnen Isoenzyme unterschieden werden, aber es war eine allgemeine Aussage über die Beeinflussung der jeweiligen Enzymklasse möglich.

5.2 Beeinflussung der *in vitro* Aktivität ausgewählter Phase II-Enzyme

Die Beeinflussung der *in vitro*-Aktivität von Phase II-Enzymen wurde durch Messung der jeweiligen Enzymaktivität in Zellhomogenaten bestimmt. Dazu wurden die HepG2-, HT29- und Caco2-Zellen wie bei den Proliferationsversuchen mit den entsprechenden Testsubstanzen inkubiert. Nach 72 h wurden die Zellen geerntet, aufgeschlossen und homogenisiert. Mit diesen Homogenaten wurde untersucht, ob die Testsubstanzen die Enzymaktivität beeinflussten (siehe Kapitel D-3.2). Das Homogenat wurde jeweils in einer Menge eingesetzt, die 400.000 Zellen entsprach.

Als Positiv-Kontrolle wurde tert. Butylhydrochinon (TBHQ) eingesetzt. Diese Substanz ist von Münzel et al. (1999) als potenter Induktor von Phase II-Enzymen in humanen Zellkulturen (HepG2-Zellen) beschrieben worden. TBHQ wurde in Konzentrationen von 40 μM und 80 μM unter den gleichen Bedingungen wie die Testsubstanzen und –mischungen (Konzentrationen siehe bei der jeweiligen Messung) und die Negativkontrolle inkubiert. Die Abbildungen C-24 bis C-30 zeigen die Mittelwerte und Standardabweichungen dreier unabhängiger Bestimmungen der jeweiligen Enzymaktivität.

5.2.1 Glutathion-S-Transferase-Aktivität

Die Glutathion-S-Transferase (GST)-Aktivität wurde nach der Methode von Habig und Jakoby (1974) bestimmt. Als Substrat diente blass-gelbes 2-Chlor-1,4-dinitrobenzol (CDNB), das durch die Konjugation mit Glutathion (GSH) entfärbt wird. CDNB ist ein bekanntes Substrat für die GST-Isoenzyme GST-A4, GST- μ 3, MGST-I und MGST-II. Das Vorkommen dieser Isoenzyme ist in Darmepithelzellen beschrieben worden (Hayes und McMahon 2001). In der Kolonkrebs-Zell-Linie HT29 wurden die GST-Isoenzyme GST-A1, GST-A2, GST μ 2, GST-P1 und GST-T1 nachgewiesen (Ebert et al. 2003). In der Caco2-Zell-Linie hat man eine Beeinflussung der allgemeinen GST-Aktivität durch Inkubation mit Lebensmitteln (hier Brotkruste) beschrieben; so wurde ein Anstieg des GST-P1-Isoenzyms beobachtet (Faist et al. 2002).

Die Abnahme der CDNB-Absorption durch die Konjugation mit Glutathion (GSH) wurde bei 370 nm⁷⁵ im Multiwell-Plattenleser vermessen. Je größer die Differenz zwischen Negativkontrolle und Messwert, desto größer die umgesetzte CDNB-Menge und damit die GST-Enzymaktivität in den inkubierten Zellen. Es wurden von uns keine Absolutwerte der GST-Aktivität ermittelt, sondern das Verhältnis von Probe zu Negativkontrolle [%] wurde wiedergegeben, so dass direkt ersichtlich ist, ob eine Aktivitätszunahme vorlag. Für die Negativkontrolle ist (= 100%) kein Balken abgebildet (Abbildung C-24 und C-25).

Als Testsubstanz wurde in diesen Versuchen vordringlich der Kaktusfeigen-Extrakt eingesetzt, da dieser in den bisherigen Versuchen die stärkste Wirkung zeigte.

Wie in Abbildung C-24 dargestellt, wurde in Caco2-Zellen nach 72 h Inkubation mit Kaktusfeigen-Extrakt ein signifikanter konzentrationsabhängiger Anstieg der GST-Aktivität um 16% (3,3 mg/ml), 99% (6,6 mg/ml) respektive 195 % (10,0 mg/ml) beobachtet. Auch die mit TBHQ als Positivkontrolle behandelten Proben wiesen eine höhere Enzymaktivität als die Negativkontrolle auf (ohne Standardabweichung).

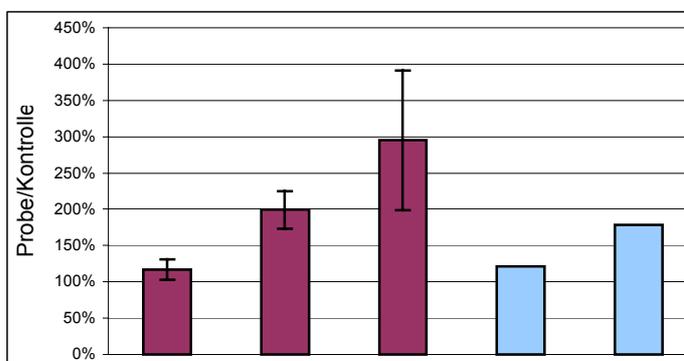


Abbildung C-24 Beeinflussung der Glutathion-S-Transferase (GST)-Aktivität in Caco2-Zellen durch unterschiedliche Kaktusfeigen-Extrakt-Konzentrationen (3, 6, 10 mg/ml, rote Balken) und der Positivkontrolle tert. Butylhydrochinon (TBHQ) (40 und 80 µM, blaue Balken). Aufgetragen ist die relative Änderung der Enzymaktivität (Negativkontrolle = 100%).

⁷⁵ Das Extinktionsmaximum von CDNB liegt eigentlich bei 340 nm. Da für den Multiwell-Plattenleser jedoch kein solcher Filter zur Verfügung stand, wurde in der Absorptionsflanke bei 370 nm gemessen. Die Absorption betrug hier ca. 65% des Maximums bei 340 nm.

In HT29-Zellen wurde nach 72 h Inkubation mit Kaktusfeigen-Extrakt ein Aktivitätsanstieg bei einer Konzentration von 6 mg/ml um 23%, sowie bei der höheren TBHQ-Konzentration (80 μ M, Positivkontrolle) um 35% beobachtet (Abbildung C-25). Allerdings indizieren die Standardabweichungen der Mittelwerte Schwankungen um 100%, so dass nicht von einer Beeinflussung der CDNB konjugierenden GST in HT29-Zellen ausgegangen werden kann.

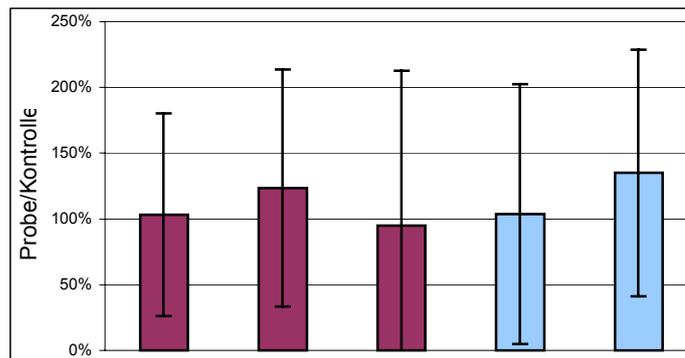


Abbildung C-25 Beeinflussung der Glutathion-S-Transferase (GST)-Aktivität in HT29-Zellen durch unterschiedliche Kaktusfeigen-Extrakt-Konzentrationen (3, 6, 10 mg/ml, rote Balken) und der Positivkontrolle tert. Butylhydrochinon (TBHQ) (40 und 80 μ M, blaue Balken). Aufgetragen ist die relative Änderung der Enzymaktivität (Negativkontrolle = 100%).

5.2.1.2 Diskussion

Nach der Inkubation von Caco2-Zellen mit Kaktusfeigen-Extrakt war ein deutlicher, konzentrationsabhängiger Anstieg der GST-Aktivität um nahezu 200% erkennbar. Die Positivkontrolle TBHQ bewirkte in Caco2-Zellen einen konzentrationsabhängigen GST-Aktivitätsanstieg um 78%. In HT29-Zellen war der Einfluss von TBHQ auf die GST-Aktivität geringer (35%), eine Beeinflussung der GST-Aktivität durch Kaktusfeigen-Extrakt war jedoch nicht erkennbar. Die Werte für Kaktusfeigen-Extrakt in HT29-Zellen waren mit Standardabweichungen von 70-120% behaftet, was Fragen an der Versuchs- und Zellqualität aufwirft. Gegen die Unbrauchbarkeit von HT29-Zellen spricht jedoch das nach Inkubation mit der Positivkontrolle TBHQ erhaltene Ergebnis, welches die gleiche Tendenz aufweist, wie die Inkubation von TBHQ in Caco2-Zellen. Daher sind weitere Arbeiten zum Optimieren der Versuchsdurchführung nötig.

5.2.2 UDP-Glucuronosyltransferase (UGT)-Aktivität

Die UDP-Glucuronosyltransferase (UGT)-Aktivität wurde nach der Methode von Castren und Oikari (1974) bestimmt. Als Substrat diente gelbes p-Nitrophenol (pNP), das nach der Konjugation mit UDP-Glucuronsäure zum farblosen pNP-Glucuronid reagiert. pNP ist ein bekanntes Substrat für die UGT-Isoenzyme. Diese sind in humanen Darmepithelzellen identifiziert (Tukey und Strassburg 2000) und auch in den Zell-Linien HT29 und Caco2 nachgewiesen worden (Münzel et al. 1999, Galijatovic et al. 2000 und 2001, Basten et al. 2002, Cummings et al. 2003).

Zur Detektion des umgesetzten pNP wurden die Proben bei 405 nm im Multiwell-Plattenleser vermessen. Je größer die Differenz zwischen Negativkontrolle und Messwert, desto größer die umgesetzte pNP-Menge und damit die Enzymaktivität. Es wurden keine Absolutwerte der UGT-Aktivität ermittelt, sondern es wurde das Verhältnis von Probe zu Negativkontrolle [%] wiedergegeben, so dass direkt ersichtlich ist, ob eine Aktivitätsänderung vorlag. Für die Negativkontrolle ist (= 100%) kein Balken abgebildet (Abb. C-26 und C-27). Als Testsubstanz wurde in diesen Versuchen primär der Kaktusfeigen-Extrakt eingesetzt, da dieser in den bisherigen Versuchen die stärkste Wirkung zeigte. Mit HT29-Zellen wurden zusätzlich auch die isolierten Substanzen Betanin und Indicaxanthin untersucht.

Wie in Abbildung C-26 gezeigt, war bei Inkubation von Caco2-Zellen mit Kaktusfeigen-Extrakt nach 72 h ein signifikanter, konzentrationsabhängiger Anstieg der UGT-Aktivität um 84% (3,3 mg/ml), 161% (6,6 mg/ml) respektive 558% (10,0 mg/ml) festzustellen. Auch die mit TBHQ behandelten Proben wiesen eine höhere Enzymaktivität als die Kontrolle auf (ohne Standardabweichung).

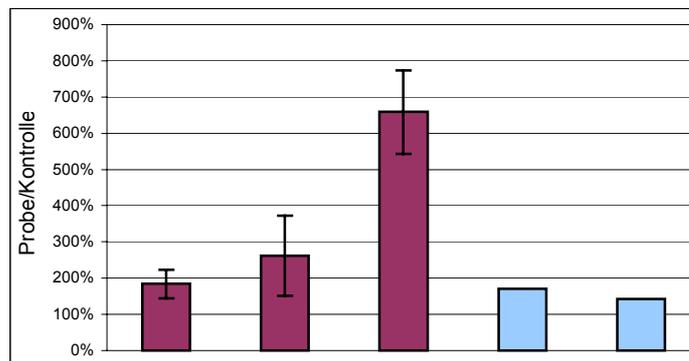


Abbildung C-26 Beeinflussung der UDP-Glucuronosyltransferase (UGT)-Aktivität in Caco2-Zellen durch unterschiedliche Kaktusfeigen-Extrakt-Konzentrationen (3, 6, 10 mg/ml, rote Balken) und der Positivkontrolle tert. Butylhydrochinon (TBHQ) (40 und 80 µM, blaue Balken). Aufgetragen ist die relative Änderung der Enzymaktivität (Negativkontrolle = 100%).

In HT29-Zellen wurde nach Inkubation mit Kaktusfeigen-Extrakt für die niedrigste Testkonzentration von 3 mg/ml nach 72 h ein Abfall der UGT-Aktivität auf 57% beobachtet, während für die beiden höheren Konzentration (6 mg/ml und 10 mg/ml) ein konzentrationsabhängiger Aktivitätsanstieg um 82% bzw. um 168% festzustellen war (Abbildung C-27). Die Standardabweichungen sind auch in diesen Versuchen mit HT29-Zellen hoch, doch ist eine Tendenz zu einem konzentrationsabhängigen Aktivitätsanstieg bei Inkubation mit Kaktusfeigen-Extrakt deutlich gegeben. Die Positivkontrolle mit TBHQ induzierte in HT29-Zellen keinen Anstieg der UGT-Aktivität (Abbildung C-27).

In HT29-Zellen wurde nach UGT-Aktivitätssteigerung durch Kaktusfeigen-Extrakt in Caco2- sowie HT29-Zellen auch der Einfluss von Betanin und Indicaxanthin untersucht. Betanin führte in HT29-Zellen zu einem Anstieg der UGT-Aktivität um 28% bei der niedrigsten Testkonzentration (25 µM), während die beiden höheren Testkonzentrationen einen konzentrationsabhängigen Abfall der UGT-Aktivität auf 43% (50 µM) bzw. 12% (100 µM) bewirkten (Abbildung C-27).

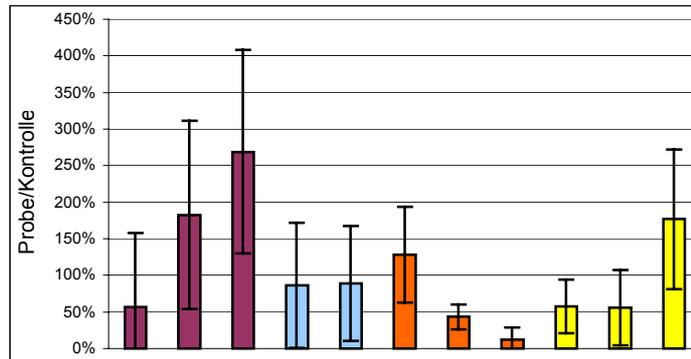


Abbildung C-27 Beeinflussung der UDP-Glucuronosyltransferase (UGT)-Aktivität in HT29-Zellen durch unterschiedliche Kactusfeigen-Extrakt-Konzentrationen (3, 6, 10 mg/ml, rote Balken), der Positivkontrolle tert. Butylhydrochinon (TBHQ) (40 und 80 μM , blaue Balken) sowie Betanin (25 μM , 50 μM , 100 μM , orange Balken) und Indicaxanthin (36 μM , 160 μM , 360 μM), gelbe Balken). Aufgetragen ist die relative Änderung der Enzymaktivität (Negativkontrolle = 100%).

Indicaxanthin hingegen führte bei den beiden niedrigen Testkonzentrationen (36 μM und 160 μM) zu einer Abnahme der UGT-Aktivität um 45% während die höchste Indicaxanthin-Konzentration (360 μM) einen Anstieg der UGT-Aktivität um 76% aufwies (Abbildung C-27). Hier wurden von den Proliferationsversuchen abweichende Betanin- und Indicaxanthin-Konzentrationen eingesetzt, um den Gehalten dieser Stoffe im Kactusfeigen-Extrakt näher zu kommen (vgl. Kapitel C-3.3). Wie bei allen Enzym-Versuchen mit HT29-Zellen waren auch hier die Standardabweichungen groß, so dass nicht von einem signifikanten Einfluss der Testsubstanzen ausgegangen werden kann.

5.2.2.1 Diskussion

Nach der Inkubation von Caco2-Zellen mit Kactusfeigen-Extrakt war ein deutlicher, konzentrationsabhängiger Anstieg der UGT-Aktivität um 550% erkennbar. Die Positivkontrolle TBHQ bewirkte in Caco2-Zellen einen UGT-Aktivitätsanstieg. Für die niedrige TBHQ-Konzentration (40 μM) wurde ein UGT-Aktivitätsanstieg um 70%, für die höhere TBHQ-Konzentration (80 μM TBHQ) eine Aktivitätszunahme um 41% ermittelt. Münzel et al. haben nach Inkubation von Caco2-Zellen mit 80 μM TBHQ einen UGT-Aktivitätsanstieg um 100% gemessen, mit 40 μM TBHQ eine UGT-Aktivitätszunahme um 98% (Münzel et al. 1999). Die Tendenz der vorliegenden Ergebnisse

und das Funktionieren des Tests wurde durch diese Literaturdaten bestätigt. Die Abweichung der gemessenen Absolutwerte ließe sich durch eine größere Versuchsanzahl und Optimierung der Versuchsdurchführung verringern.

In HT29-Zellen war der Einfluss von TBHQ auf die UGT-Aktivität geringer (35%), eine Beeinflussung der UGT-Aktivität durch Kaktusfeigen-Extrakt war jedoch nicht erkennbar. Die Werte für Kaktusfeigen-Extrakt in HT29-Zellen waren mit Standardabweichungen in der Größenordnung der Messwerte behaftet. Gegen die prinzipielle Unbrauchbarkeit von HT29-Zellen spricht jedoch das nach Inkubation mit der Positivkontrolle TBHQ erhaltene Ergebnis, nach dem TBHQ in HT29-Zellen in etwa die gleiche UGT-Aktivitätssteigerung (allerdings in umgekehrter Konzentrationsreihenfolge) bewirkte wie TBHQ in Caco2-Zellen. Allerdings standen keine Vergleichsdaten zur Inkubation von HT29-Zellen mit TBHQ zur Verfügung. Daher sind weitere Arbeiten zum Optimieren der Versuche nötig.

In HT29-Zellen wurden zusätzlich noch Betanin (25, 50, 100 μM) und Indicaxanthin (36 μM , 160 μM , 360 μM) untersucht. Die in diesen Versuchen erhaltenen Ergebnisse (Betanin verringerte die UGT-Aktivität mit steigender Konzentration; Indicaxanthin steigerte die UGT-Aktivität mit zunehmender Konzentration) lassen sich nur bedingt mit den bei Kaktusfeigen-Extrakt erhaltenen Ergebnissen in Zusammenhang bringen. Da der Betanin-Gehalt im eingesetzten Kaktusfeigen-Extrakt nur zwei Drittel der in diesem Test wirksamen Betanin-Konzentration betrug, ist es möglich, dass die Wirkung von Betanin auf die UGT-Aktivität von anderen bioaktiven Substanzen überdeckt wurde. Solche Substanzen könnten Indicaxanthin, das eine UGT-steigernde Wirkung zeigte, aber auch Flavonoide, von denen z.B. für Chrysin eine UGT-Induktion belegt ist (Galijatovic et al. 2000 und 2001), sein.

5.2.3 Sulfotransferase (SULT)-Aktivität

Die Messung der Sulfotransferase (SULT)-Aktivität wurde nach der von Mulder und Scholtens (1977) erstmals beschriebenen und von Frame et al. (1997) modifizierten Methode durchgeführt. Im Versuch wird die Sulfatgruppe von PAPS durch die Phenolsulfotransferase auf 2-Naphthol transferiert. Anschließend überträgt das Enzym eine

Sulfatgruppe von p-Nitrophenolsulfat (pNPS) auf das entstandene PAP, so dass ständig genug PAPS vorliegt. Durch die Desulfatierung von pNPS entsteht gelbes p-Nitrophenol, welches bei 405 nm vermessen wird. Je größer die Differenz zwischen Negativkontrolle und Probe, desto höher ist die Enzymaktivität. 2-Naphthol ist Substrat für die phenolkonjugierenden SULT1-Isoenzyme, von denen die Isoenzyme A1 und B1 in Darmepithelzellen beschrieben wurden (Coughtrie und Johnston 1998). In der Caco2-Zell-Linie, jedoch nicht in der Zell-Linie HT29 wurde bereits SULT-Aktivität beobachtet (Galijatovic et al. 1999, Hofmann 2004).

Als Testsubstanz wurde in diesen Versuchen der Kaktusfeigen-Extrakt eingesetzt, da dieser in den bisherigen Versuchen die stärkste Wirkung zeigte.

In HT29-Zellen wurde nach 72 h Inkubation ein Aktivitätsanstieg bei einer Konzentration von 3 mg/ml um 16% sowie bei den höheren Konzentrationen und TBHQ (Positivkontrolle) um < 10% beobachtet (Abbildung C-28). Allerdings indizieren die Standardabweichungen der Mittelwerte Schwankungen um 90%, so dass eine Beeinflussung der 2-Naphthol konjugierenden SULT in HT29-Zellen nicht angenommen werden kann. Mit Caco2-Zellen gelang es nicht, eine Mehrfachbestimmung durchzuführen. Das Ergebnis einer Einfachbestimmung erbrachte das gleiche Bild wie die Versuche mit HT29-Zellen und Kaktusfeigen-Extrakt.

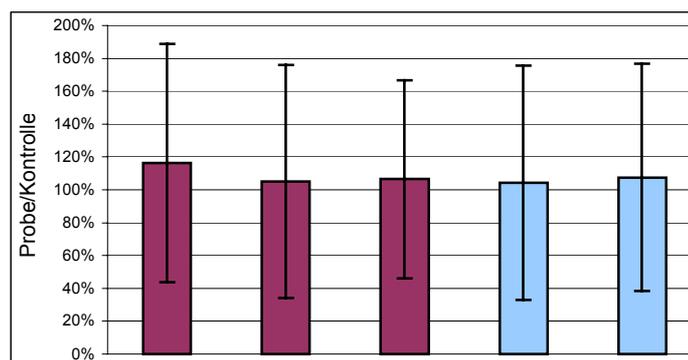


Abbildung C-28 Beeinflussung der Sulfotransferase (SULT)-Aktivität in HT29-Zellen durch unterschiedliche Kaktusfeigen-Extrakt-Konzentrationen (3, 6, 10 mg/ml, rote Balken), der Positivkontrolle tert. Butylhydrochinon (TBHQ) (40 und 80 µM, blaue Balken). Aufgetragen ist die relative Änderung der Enzymaktivität (Negativkontrolle = 100%).

5.2.3.1 Diskussion

Auffällig bei den Versuchen zur Bestimmung der Sulfotransferaseaktivität waren wiederum die großen Standardabweichungen der Mittelwerte, was auf schwankende Zellqualität hindeutet. Ein Einfluss des Kaktusfeigen-Extrakts oder der Positivkontrolle TBHQ auf die SULT-Aktivität konnte nicht festgestellt werden. Eine Aussage zum Vorliegen von SULT-Aktivität in HT29-Zellen lässt sich mit den vorliegenden Daten nicht machen. In diesem Zusammenhang ist es problematisch, dass es nicht gelang, in Caco2-Zellen oder HepG2-Zellen die SULT-Aktivität zu untersuchen, obwohl in beiden Zell-Linien bereits SULT-Aktivität nachgewiesen worden ist (Galijatovic et al. 1999, Hofmann 2004).

5.2.4 NAD(P)H:Chinon-Oxidoreduktase (NQO)-Aktivität

Zur Bestimmung der NAD(P)H:Chinon-Oxidoreduktase (NQO)-Aktivität wurde nach der von Prochaska und Santamaria (1988, 1992) beschriebenen Methode vorgegangen. Das Substrat für die NQO war Menadion (Vitamin K), das unter NADPH+ H⁺-Verbrauch zu Menadiol reduziert wird. Menadion ist auch *in vivo* ein Substrat für das Isoenzym NQO-I, welches in humanen Darmepithelzellen, aber auch in der Zell-Linie HT29 beschrieben wurde (Winski et al. 2002, Han et al. 2004). In Caco2-Zellen wurde bislang keine NQO-Aktivität beschrieben, diese ist aber wegen der Bedeutung des Enzyms zur schonenden Reduktion von Chinonen (siehe Kapitel B-3.5) zu erwarten. Menadiol wiederum reduziert das Detektionsmittel MTT auf chemischem Weg zu seinem Formazanderivat. In einem parallel ablaufenden System wird durch Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase NADPH+H⁺ regeneriert, indem Glucose-6-Phosphat zu 6-Phosphogluconat oxidiert wird. Die Umsetzung von Menadion wird am Ende der Inkubation durch Dicumarol (Vitamin K-Antagonist) gestoppt. Dicumarol hemmt die Aktivität der NQO, indem es Menadiol vollständig aus dem aktiven Zentrum des Enzyms verdrängt. Zur Detektion des umgesetzten MTT wurden die Proben wurden bei 610 nm im Multiwell-Plattenleser vermessen. Je größer die Absorptiondifferenz zwischen Negativkontrolle und Probe, desto höher die Enzymaktivität. Als Testsubstanz wurde in diesen Versu-

chen hauptsächlich der Kaktusfeigen-Extrakt eingesetzt, da dieser in den bisherigen Experimenten die stärkste Wirkung zeigte.

In Caco2-Zellen wurde nach 72 h Inkubation mit Betanin (25, 100 μM) keine Änderung der NQO-1-Aktivität beobachtet (Abbildung C-29). Die mit Indicaxanthin behandelten Proben wiesen zwar eine Aktivitätsänderung auf, jedoch war diese nicht einheitlich. Die NQO-1-Aktivität des mit der 36 μM Indicaxanthin inkubierten Ansatzes sank auf 37%, die des mit der mittleren Indicaxanthin-Konzentration (160 μM) inkubierten Ansatzes blieb bei 90% der Negativkontrolle, während der Versuchsansatz mit der höchsten Indicaxanthinkonzentration (360 μM) noch 57% der in Kontrollzellen beobachteten NQO-1-Aktivität aufwies (Abbildung C-29). Die Standardabweichungen der Mittelwerte waren wiederum hoch, so dass nicht von einer tatsächlichen Beeinflussung der NQO-1-Aktivität durch Indicaxanthin in Caco2-Zellen ausgegangen werden kann. Es gelang nicht, Versuche mit Kaktusfeigen-Extrakt an Caco2-Zellen durchzuführen.

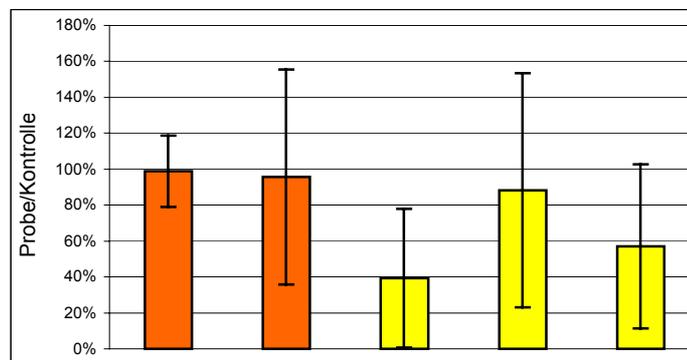


Abbildung C-29 Beeinflussung der NAD(P)H:Chinon-Oxidoreduktase (NQO)-Aktivität in Caco2-Zellen durch Betanin (25 μM , 100 μM , orange Balken) und Indicaxanthin (36 μM , 160 μM , 360 μM), gelbe Balken). Aufgetragen ist die relative Änderung der Enzymaktivität (Negativkontrolle = 100%).

In HT29-Zellen wurde nach 72 h Inkubation mit Kaktusfeigen-Extrakt für die niedrigste Testkonzentration (3 mg/ml) ein Abfall der NQO-1-Aktivität auf 70% festgestellt, während für die beiden höheren Konzentration ein konzentrationsabhängiger Aktivitätsanstieg um 21% (6 mg/ml Kaktusfeigen-Extrakt) und um 35% (10 mg/ml) beobachtet

wurde (Abbildung C-30). Die Standardabweichungen sind auch in diesem Versuch mit HT29-Zellen groß, doch ist eine Tendenz zu einem konzentrationsabhängigen Aktivitätsanstieg erkennbar. Die Positivkontrolle TBHQ induzierte in HT29-Zellen ebenfalls einen Anstieg der NQO-1-Aktivität um 98% (80 μM) bzw. 11% (40 μM) (Abbildung C-30). Indicaxanthin bewirkte praktisch keine NQO-1-Aktivitätsänderung. Die Wert lagen zwischen 92% der Negativkontrolle für die kleinste Testkonzentration (36 μM) und 117% für die größte Indicaxanthin-Konzentration (360 μM) (Abbildung C-30).

Nach einer Inkubation der HT29-Zellen mit 25 μM Betanin ist nach 72 h eine Zunahme der NQO-1-Aktivität um 51% beobachtet worden. Bei höheren Betaninkonzentrationen (50 μM , 100 μM) wurden hingegen kleinere NQO-1-Aktivitätssteigerungen von 40% (50 μM) und 7% (100 μM) ermittelt. Relativierend muss allerdings angemerkt werden, dass aufgrund der hohen Standardabweichungen der Mittelwerte statistisch sichere Aussagen unmöglich waren.

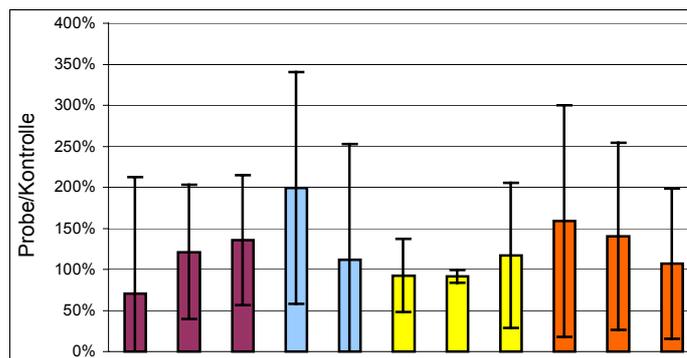


Abbildung C-30 Beeinflussung der NAD(P)H:Chinon-Oxidoreduktase (NQO)-Aktivität in HT29-Zellen durch unterschiedliche Kaktusfeigen-Extrakt-Konzentrationen (3, 6, 10 mg/ml, rote Balken), der Positivkontrolle tert. Butylhydrochinon (TBHQ) (40 und 80 μM , blaue Balken) sowie Betanin (25 μM , 50 μM , 100 μM , orange Balken) und Indicaxanthin (36 μM , 160 μM , 360 μM , gelbe Balken). Aufgetragen ist die relative Änderung der Enzymaktivität (Negativkontrolle = 100%).

5.2.4.1 Diskussion

Die Versuche zur Messung der NQO I-Aktivität in Caco2-Zellen führten zu unbefriedigenden Ergebnissen. Es ist möglich, dass Caco2-Zellen für Versuche zur NQO I-Aktivitätsmessung nicht optimal geeignet sind. In den meisten veröffentlichten Studien wird

zur Beeinflussung der NQO-1 ein Testsystem basierend auf Hepa1c1c7-Zellen⁷⁶ eingesetzt, von dem die Versuche in Caco2- und HT29-Zellen abgeleitet wurden. Die grundsätzliche Eignung der Caco2-Zellen für NQO-1-Aktivitätsmessungen sollte in weiteren Versuchen sicher gestellt werden.

In HT29-Zellen war der Einfluss der Positivkontrolle TBHQ auf die NQO-1-Aktivität deutlich (Aktivitätszunahme um 99%), allerdings scheint die niedrigere TBHQ-Konzentration (40 µM) wirksamer zu sein, als die höhere (80 µM). Wie mit Caco2-Zellen sollten auch die NQO-1-Aktivitätsbestimmungen in HT29-Zellen weiter optimiert werden, um die hohen Standardabweichungen zu verringern, damit verlässlichere Aussagen möglich werden. Die Werte für Kaktusfeigen-Extrakt in HT29-Zellen waren mit Standardabweichungen in der Größenordnung der Messwerte behaftet, was die Tendenz zur NQO-1-Aktivitätszunahme mit steigender Konzentration in Frage stellt.

In HT29-Zellen wurden zusätzlich noch Betanin (25, 50, 100 µM) und Indicaxanthin (36, 100, 360 µM) untersucht. Die in diesen Versuchen erhaltenen Ergebnisse (Betanin verringerte die NQO-1-Aktivität mit steigender Konzentration, ohne jedoch die 100% zu unterschreiten; Indicaxanthin hatte keinen Einfluss auf die NQO-1-Aktivität) lassen sich nur schlecht mit den Kaktusfeigen-Extrakt-Ergebnissen in Zusammenhang bringen. Da der Betanin-Gehalt im eingesetzten Kaktusfeigen-Extrakt nur zwei Drittel der in diesem Test wirksamen Betanin-Konzentration betrug, ist es möglich, dass die Wirkung von Betanin auf die NQO-1-Aktivität von anderen bioaktiven Substanzen überdeckt wurde. Allerdings waren aufgrund der hohen Standardabweichungen der Mittelwerte keine verlässlichen Aussagen über die tatsächliche Beeinflussung der NQO-1-Aktivität durch die Testsubstanzen möglich.

5.3 Diskussion der Enzymstudien

Zusammenfassend ließ sich sagen, dass keine der untersuchten Einzelsubstanzen eindeutig konzentrationsabhängige Änderungen der Aktivität der untersuchten Phase II-Enzyme verursachte. Der Kaktusfeigen-Extrakt hingegen zeigte einen konzentrationsab-

⁷⁶ eine Mäuseleber-Zell-Linie

hängigen Einfluss. Dies deutet auf andere bioaktive Bestandteile und/oder möglicherweise synergistische Wirkungen von Betanin und anderen Kaktusfeigen-Extrakt-Inhaltsstoffen hin. Diese könnten z.B. Polyphenole sein, von denen einige wie Chrysin - allerdings bislang nicht in Kaktusfrüchten nachgewiesen - in Caco2-Zellen eine UGT-induzierende Wirkung aufwiesen (Galijatovic et al. 2000 und 2001). Von den in Kaktusfrüchten vorkommenden Polyphenolen wurden bislang nur für Dimethylquercetin Daten zur Induktion der NQO-1 in Hepa 1c1c7-Zellen veröffentlicht (Jang et al. 2004). Als Beispiel für synergistische Wirkung bei der Induktion von Phase II-Enzymen dient die Arbeit von Wettasinghe et al. (2002), in der eine Induktion von Phase II-Enzymen am Beispiel von NQO 1 in Hepa1c1c7-Mäusezellen durch ethanolische Extrakte unterschiedlich stark pigmentierter Roter Beete aufgezeigt worden ist. Diese Autoren stellten fest, dass Extrakte aus stark pigmentierter (hoher Betaningehalt) und normal pigmentierter Roter Beete die stärkste NQO 1-Induktion bewirkten. Weitere Studien zu den wirksamen Bestandteilen erfolgten jedoch nicht. Auch der Betanin-Gehalt der Rote Beete-Extrakte wurde in der zitierten Publikation nicht angegeben.

Eine Verbindung der Ergebnisse von Wettasinghe mit den in dieser Arbeit beschriebenen Studien ließ keinen eindeutigen Schluss zu, dass die Wirkung der Rote Beete Extrakte durch Betanin allein verursacht wurde. Vermutlich waren, wie bei den Versuchen zur Proliferationshemmung (vgl. Kapitel C-3.6), andere Extraktbestandteile bzw. die Zusammensetzung der Extrakte ausschlaggebend. Um diese These zu bestätigen, müssten allerdings noch weitere Studien mit isolierten Betalainen und Kaktusfeigen- bzw. Rote Beete-Extrakt durchgeführt werden.

Für die menschliche Ernährung sind diese Ergebnisse interessant, da eine Kaktusfeigen-Extrakt-Konzentration von 10 mg/ml in etwa einem Fünftel der Trockenmasse einer Kaktusfeige entspricht. Damit sind die eingesetzten Konzentration im Rahmen der normalen Ernährung leicht erreichbar, so dass die Möglichkeit einer Phase II-Enzymaktivitätssteigerung *in vivo* durch den Verzehr von Kaktusfeigen gegeben sein kann. Die Bioverfügbarkeit von Betanin oder anderer für die Bioaktivität verantwortlicher Verbindungen ist jedoch noch unbekannt. Daher sind weitere Arbeiten zur Aufklärung der wirksamen Verbindungen und ihrer Bioverfügbarkeit notwendig.

D Material und Methoden

1 Material

1.1 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden in p.a.-Qualität von den Firmen Sigma-Aldrich (Taufkirchen), Roth (Karlsruhe) und Merck (Darmstadt) bezogen. Lösungsmittel wurden vor der Verwendung über Füllkörperkolonnen rektifiziert. Reinstwasser wurde über Millipore-Kartuschen gefiltert (Millipore, Eschborn). Die Reagenzien für die rt-PCR stammten von Perkin-Elmer (Rodgau), die benötigten Primer wurden von Catherine Máce, Nestlé Research Center- Vers Chez Les Blanc, Schweiz, zur Verfügung gestellt. Das RNeasy-RNA-Extraktionskit lieferte Quiagen (Hilden).

1.2 Untersuchungsmaterial

Gelb-orange farbene Kaktusfrüchte (*Opuntia ficus indica*) wurden über den Obst- und Gemüse-Großhandel und im Supermarkt bezogen. Über das Herkunftsland oder die Varietät der Früchte waren keine weiteren Angaben zu erhalten.

1.3 Verbrauchsmaterial

Alle Verbrauchsmaterialien wurden bei den Firmen Roth (Karlsruhe), Fisher-Scientific (Ulm) und Hartenstein (Würzburg) erworben.

1.4 Säulenchromatographie

Als stationäre Phase wurde LiChroPrep® RP18 (Merck, Darmstadt) verwendet. Die Korngröße betrug 40 – 63 µm. Als Lösungsmittel wurden Acetonitril und Reinstwasser eingesetzt.

1.5 Zell-Linien

Die Zell-Linie HCEC wurde von Dr. Stephanie Blum-Sperisen (Ernährungsimmunologie-Labor, Nestlé Research Center, Vers Chez Les Blanc, Schweiz) zur Verfügung gestellt.

Die ebenfalls für diese Arbeit verwendeten Zell-Linien Caco2, HepG2 und HT29 wurden über die Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig) bezogen.

Caco2: ACC169 LOT 8

HepG2: ACC180 LOT 11

HT29: ACC 299 LOT 5

1.6 Zellkulturmaterial

Verbrauchsmaterial

Die Zellkultur-Plastikware (z.B. sterile Pipetten, Zellkulturflaschen, Falcon-Röhrchen) wurde von den Firmen Roth (Karlsruhe), Fisher-Scientific (Ulm) und Hartenstein (Würzburg) bezogen. Das Zellkultur-Material wurde entweder bereits sterilisiert angeliefert oder mittels eines Autoklaven vor Gebrauch sterilisiert.

Chemikalien, Medien und Seren

Die eingesetzten Zellkulturmedien, Seren, Antibiotika und Proliferationskits wurden von Invitrogen Corporation (Paisley, Schottland), Biofluids Inc. (Rockville, USA) und Promega (Mannheim) bezogen. Die Chemikalien wurden bereits sterilisiert angeliefert oder mittels Filtration über 0,2 µm Einmalfilter vor Gebrauch sterilisiert.

Arbeitslösungen

Dulbeccos Minimum Essential Medium (DMEM, 1x):

Kat.Nr. 21969, Gibco-Invitrogen Corporation, Eggenstein, wurde bei Raumtemperatur gelagert.

Ethanol/Eisessig-Mischung:

50 ml Ethanol mit 1 ml Eisessig mischen und mit Reinstwasser auf 100 ml auffüllen.

Fötales Rinderserum (FBS):

Kat.Nr. 10270-106, Gibco-Invitrogen Corporation, Eggenstein, wurde in sterile 50 ml Falcon-Röhrchen aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

HEPES-Puffer (1 M):

Kat.Nr. 15630-049, Gibco-Invitrogen Corporation, Eggenstein, wurde in sterile 15 ml Falcon-Röhrchen aliquotiert und bei Raumtemperatur gelagert.

L-Glutamin (200 mM; 100x):

Kat.Nr. 25030-024, Gibco-Invitrogen Corporation, Eggenstein, wurde in sterile 15 ml Falcon-Röhrchen aliquotiert und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

Minimum Essential Medium mit Earles-Salzen (MEM, 1x):

Kat.Nr. 21090-022, Gibco-Invitrogen Corporation, Eggenstein, wurde bei Raumtemperatur gelagert.

MTS/PMS-Lösung (CellTiter Aqueous [®]-Assay, Promega, Mannheim):

MTS- und PMS-Lösung auftauen und 20 Teile MTS und 1 Teil PMS unmittelbar vor Gebrauch mischen.

Nicht essentielle Aminosäuren (NEAA, 100x):

Kat.Nr. 11140-035, Gibco-Invitrogen Corporation, Eggenstein, wurden in sterile 15 ml Falcon-Röhrchen aliquotiert und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

Penicillin/ Streptomycin (Pen/Strep, 5000 U):

Kat.Nr. 15070-063, Gibco-Invitrogen Corporation, Eggenstein, wurde in 15 ml Falcon-Röhrchen aliquotiert und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

Phosphatgepufferte Kochsalzlösung pH 7,4 (PBS):

Kat.Nr. 10010-015, Gibco-Invitrogen Corporation, Eggenstein

Trypanblau-Lösung:

Kat.Nr. 15250-061, Invitrogen Corporation, Eggenstein

Trypsin-EDTA (TE):

Kat.Nr. 25300-054, Gibco-Invitrogen Corporation, Eggenstein, wurde in sterile 15 ml Falcon-Röhrchen aliquotiert und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

1.7 Puffer- und Salzlösungen

Annexin V-FITC/7-AAD-Färbelösung:

10 µl Annexin V-FITC-Lösung (Sigma-Aldrich) wurden mit 10 µl 7-AAD-Lösung (Sigma-Aldrich) und 500 µl Zellkultur-Medium A (Kapitel D-3.2.1) gemischt.

1-Chloro-2,4-dinitrobenzol (CDNB)-Lösung (M=202,6 g/Mol):

7 mg CDNB/ml in Dimethylsulfoxid (DMSO, Sigma-Aldrich)

FAD-Lösung (M=785,8 g/Mol):

4,5mg FAD/100µl Reinstwasser. (einige Wochen bei -20 °C stabil)

Glucose-6-Phosphat-Lösung (G6P) (M=260,1 g/Mol):

100mg G6P /ml in Reinstwasser. (mehrere Monate bei -20 °C stabil)

Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6PDH):

1mg G6PDH/ml Reinstwasser. (zwei Wochen bei -20 °C stabil)

Glutathion (GSH)-Lösung (M=307,33 g/Mol):

7,8 mg GSH/ml in 0,1 M K₃PO₄-Puffer (pH 6,5)

Hypotonischer Puffer:

4,28 g Saccharose in 40 ml Reinstwasser lösen, 0,5 ml 1 M Tris-HCl-Puffer (pH 7,4) zugeben, mit Reinstwasser auf 50 ml auffüllen.

Homogenisierungspuffer:

0,5 ml Antipain-Lösung (1 mg/ml Reinstwasser), 0,05 ml Aprotinin-Lösung (1 mg/ml Reinstwasser), 3 mg Benzamidin, 0,0125 ml Leupeptin-Lösung (1 mg/ml Reinstwasser), 0,025 ml Pepstatin A-Lösung (1 mg/ml Reinstwasser), 3 mg PMSF mit Hypotonischem Puffer auf 25 ml auffüllen.

5 N NaOH:

20 g NaOH in 70 ml Reinstwasser lösen, anschließend auf 100 ml auffüllen.

0,1 N NaOH:

2 ml 5 N NaOH mit Reinstwasser auf 100 ml auffüllen.

Neutralrot-Lösung:

5 mg Neutralrot in 100 ml Medium A lösen. Die Lösung 10 min vor Verwendung bei 37 °C inkubieren (max. 3 Tage verwenden!)

0,1 M K_3PO_4 (pH 6,5):

106,14 g K_3PO_4 in 400 ml Reinstwasser lösen, pH-Wert mit 9 M H_3PO_4 einstellen und auf 500 ml auffüllen.

MgCl₂-Lösung (M=95,22 g/Mol):

24 mg/ml in 0,12 M Tris-HCl (pH 7,4)

NADP-Lösung M=743,4 g/Mol):

12 mg NADP/ml in Reinstwasser. (einige Wochen bei -20 °C stabil)

2-Naphthol-Lösung (M=144,2 g/Mol):

18 mg 2-Naphthol/ml in Ethanol

0,5 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 6,2):

3,55 g Na_2HPO_4 und 3,5 g NaH_2PO_4 in 200 ml Reinstwasser lösen, pH-Wert mit 9 M H_3PO_4 auf 6,2 einstellen und mit Reinstwasser auf 250 ml auffüllen.

p-Nitrophenol-Lösung (M=139,1 g/Mol):

4,4 mg/ml in 0,12M Tris-HCl (pH 7,4)

NQO-Reaktionslösung:

10 mg *Bovine Serum Albumine* (BSA), 13,7 mg 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), 10 µl-FAD-Lösung, 138 µl Glucose-6-Phosphat-Lösung, 300 µl Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Lösung, 100 µl NADP-Lösung, 100 µl 1,5% Tween 20-Lösung

NQO-Startreagenz:

25 mM Menadion-Lösung (M=172,2 g/Mol): 4,3 mg/ml in Acetonitril

NQO-Stoppreagenz:

0,3 mM Dicumarol-Lösung (M=336,3 g/Mol): 1mg Dicumarol/10ml Reinstwasser. mit 0,5% Dimethylsulfoxid (DMSO)

p-Nitrophenolsulfat (pNPS)-Lösung (M=257,3 g/Mol):

32 mg pNPS/ml in 0,5 mM Natriumphosphat-Puffer

3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat (PAPS)-Lösung (M=507,3 g/Mol):

2 mg PAPS/ml in 0,5 mM Natriumphosphat-Puffer

Propidiumiodid-Lösung (PI):

1 mg PI/ml in Reinstwasser.

RNAse α :

0,22 $\mu\text{g/ml}$ in sterilem PBS

TAE-Puffer (Agarose-Gelelektrophorese):

107,8 g Tris-Base, 55,02 g H_3BO_4 , 7,44 g Na_2EDTA in 750 ml Reinstwasser.
lösen und mit Reinstwasser. auf 1000 ml auffüllen

3 % Trichloressigsäure:

3 g Trichloressigsäure in 70 ml Reinstwasser lösen, mit Reinstwasser auf 100 ml
auffüllen

1 M Tris (pH 7,4):

62,8 g Tris-HCl in 400 ml Reinstwasser lösen, den pH-Wert mit 12 M HCl auf
7,4 einstellen und mit Reinstwasser auf 500 ml auffüllen.

0,5 M Tris (pH 7,4):

50 ml 1 M Tris-HCl-Puffer mit 40 ml Reinstwasser mischen, pH-Wert mit 0,1 M
HCl auf pH 7,4 einstellen und mit Reinstwasser auf 100 ml auffüllen.

0,12 M Tris-HCl (pH 7,4):

120 ml 1 M Tris-HCl-Puffer in 800 ml Reinstwasser lösen, den pH-Wert mit 1
M HCl auf pH 7,4 einstellen und mit Reinstwasser auf 1 l auffüllen.

1,5 % Tween 20– Lösung:

0,15 ml Tween 20 mit Reinstwasser. auf 10 ml auffüllen.

UDP-Glucuronsäurelösung (M=646,2 g/Mol):

1 mg/10 μl in MgCl_2 -Lösung

2 Geräte

2.1 Analytische Hochleistungsflüssigchromatographie-Diodenarray-Detektion (HPLC-DAD)

System:	Agilent 1100 Series (Agilent, Waldbronn)
Entgaser:	Agilent 1100 Series Degasser
Pumpe:	Agilent 1100 Series binäre Gradienten-Pumpe
Detektor:	Agilent 1100 Series Dioden Array Detektor
Injektor:	Rheodyne 7125, Probenschleife 100 µl
Autosampler:	Waters WISP 750B (Waters, Eschborn)
Säule:	Synergi C18hydro (250 x 4,5 mm, 5 µm) (Phenomenex, Aschaffenburg)
Eluent:	A: 0,05 % Ameisensäure in Reinstwasser B: Acetonitril
Fluss:	1 ml/min.
Gradient:	0 – 20 min: 1 – 15 % B
Software:	Agilent ChemStation für LC Rev.A.06.01 [403]

2.2 Semi-präparative Hochleistungsflüssigchromatographie (S-Prep-HPLC)

System:	Knauer Chromline (Knauer, Berlin)
Pumpe:	Knauer K 1001 quarternäre Gradienten-Pumpe (Knauer, Berlin)
Säule:	Eurospher 100 C18 (250 x 8 mm, 5 µm) (Knauer, Berlin)
Detektor:	UV/VIS-Detektor Nr. A 29815, variable Wellenlänge, Knauer
Injektor:	Rheodyne 7125, Probenschleife 1 ml
Eluent:	A: 0,05 % Ameisensäure in Reinstwasser B: Acetonitril (Isolierung von Indicaxanthin und Betanin) bzw. Methanol (indicaxanthinfreier Kaktusfeigen-Extrakt und Kaktusfeigen-Extrakt-Fractionen)
Fluss:	4 ml/min.
Gradient:	0-20 min 1-15% B (zur Isolierung von Betanin und Indicaxanthin)
Gradient:	0-40 min 1-30% B (zur Fraktionierung des Kaktusfeigen-Extrakts)

2.3 Hochleistungsflüssigchromatographie-Elektrospray-Tandem-Massenspektrometrie (HPLC-ESI-MS/MS)

Gerät:	Finnigan TSQ 7000 Triple Stage Quadrupol-Massenspektrometer mit Finnigan Elektrospray Ionisation-Interface (ESI) (Finnigan MAT, Bremen)
Pumpe:	Applied Biosystems 140B Spritzenpumpe für binäre Hochdruckgradienten (Applied Biosystems, Bensheim)
Injektor:	Rheodyne 8125 Probenventil, Probenschleife, 5 µl
ESI-Kapillare:	Desaktivierte Fused Silica Kapillare (50 µm i.d.) (J&W, Folsom)
Sheath-Gas:	Stickstoff 5.0, 50-70 psi (1 psi ≈ 7kPa)
Hilfsgas:	Stickstoff 5.0, 10 l/min
Kollisionsgas:	Argon 5.0, Kollisionsdruck 1,8 – 2,2 mTorr (0,239 - 0,293 Pa)
Kollisionsenergie:	25 bis 50 eV
Ionenquelle:	760 Torr (1013,24 hPa), Raumtemperatur
Eingangskapillare:	200 °C
Kapillarspannung:	3,5 bis 4,0 kV
Eluent:	A: 0,05 % TFA in Reinstwasser B: Acetonitril
Fluss:	0,2 ml/min.
Gradient:	0–20 min 1–15 % B
Datenaufnahme u. -auswertung:	DEC 500/33 Workstation (Digital Equipment, Unterföhring), ICIS 8.1 Software (Finnigan MAT, Bremen)

2.4 Sonstige Geräte

pH-Meter:	Labor pH-Meter (Knick, Berlin)
Waagen:	Mettler H 10 W (Mettler-Toledo, Gießen) Sartorius BP 210 S (Sartorius)
Schüttler:	Bellydancer (Storvall); Titer Plate Shaker (Lab-Line Instruments)
Rotavapor:	Büchi B-173, Vakuum-Controller B-720 (Büchi, Konstanz)

Kühlzentrifuge:	Hettich, Universal 16R, Rotor 1614/1616 (Hettich, Tuttlingen)
Lyophilisator:	Christ Alpha 1-4; 0,1 mbar (Christ, Osterode)
CO ₂ - Brutschrank:	Binder CB 150 (Binder, Ulm)
Sterilbank:	UVF 6.12, (BDK, Sonnenbühl-Genkingen)
Mikroskop:	Wilovert Standard PH40 (Hundt, Wetzlar)
Zählkammer:	Neubauer (improved) – Zählkammer (Brand, Wertheim)
Homogenisator:	„Dounce-Glas-Homogenisator“
Apparaturen Agarose-	
Gelelektrophorese:	Pharmacia, Freiburg
Spannungsgeräte:	Pharmacia, Freiburg
ELISA-Plattenleser:	BMG-Fluostar-Galaxy (BMG Labtechnologies, Offenburg)

3 Methoden

3.1 Extraktion der Testsubstanzen

3.1.1 Extraktion von Indicaxanthin

In Anlehnung an die Methode nach Stintzing et al. (1999) wurden zur Extraktion von Indicaxanthin 1000 g Kaktusfeigen geschält und das Fruchtfleisch unzerkleinert drei Mal sechs Stunden mit 2 l eines frisch angesetzten Methanol/Wasser-Gemisches (80:20, v/v) auf einem Schüttler extrahiert. Nach Filtration über ein Leinentuch wurde aus den vereinigten Extrakten das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Durch portionsweise (jeweils 20 ml) Säulenchromatographie an RP18-Material (LiChrospher®, Merck, Darmstadt; Säulendimension 2,5 x 30 cm,) mit Wasser (+ 0,05% Ameisensäure) als Eluent (Fluss ca. 1,5 ml/min) erfolgte die Auftrennung des Kaktusfeigen-Extrakts in eine gelbe Fraktion Nr.1 (9 ml) und in eine rotorange gefärbte Fraktion Nr.2 (2 ml), die auf der Säule aufgrund ihrer Farbigkeit leicht unterscheidbar waren. Daher wurde kein Fraktionensammler eingesetzt. Aus der gelben Fraktion (ca. 1 l) wurde Indicaxanthin isoliert, die rote Fraktion wurde verworfen.

Zur Isolierung von Indicaxanthin wurde die gelbe Fraktion mittels semi-präparativer HPLC (Säule: Eurospher C18 250 x 8 mm, 5 µm (Knauer, Berlin); Fluss: 4 ml/min;

Gradient: 0-20 min 1-15% Acetonitril; Einspritzvolumen: 1 ml) weiter aufgereinigt. Dazu wurde der von 14,5 bis 15,5 min bei der Wellenlänge 475 nm detektierte Indicaxanthin-Peak vom restlichen Eluat getrennt (pro Lauf ca. 4 ml Eluat). Nach Entfernen des Acetonitrils im Vakuum wurden ca. 4 l des indicaxanthinhaltigen Eluats gefriergetrocknet und so 0,5 g lyophilisiertes Indicaxanthin gewonnen, entsprechend 0,05% der eingesetzten Kaktusfeigen-Extrakt Menge.

3.1.2 Extraktion von Betanin

5 ml Rote Beete-Saftkonzentrat (Sensient Food Colors Germany GmbH & Co. KG, Geesthacht) wurden mit Wasser 1:10 verdünnt und über 0,45 µm PTFE-Spritzenvor-satzfilter gereinigt. Anschließend wurde das Betanin an der semi-präparativen HPLC (Säule: Eurospher C18 250 x 8 mm, 5 µm (Knauer, Berlin); Fluss: 4 ml/min; Gradient: 0-20 min 1-15% Acetonitril; Einspritzvolumen: 200 µl) isoliert. Dazu wurde der von 17,5 bis 18,5 min bei der Wellenlänge 538 nm detektierte Betanin-Peak vom restlichen Eluat getrennt (pro Lauf ca. 4 ml Eluat). Es wurden ca. 1 l Eluat erhalten und nach Entfernen des Acetonitrils im Vakuum lyophilisiert. Identifizierung und Reinheitsbestimmung erfolgten mittels HPLC-DAD, HPLC-MS und IR-Spektroskopie. Auf diese Weise wurden 40 mg Betanin erhalten.

3.1.3 Herstellung des Kaktusfeigen-Extrakt

Zur Gewinnung eines Kaktusfeigen-Extrakts wurden 1133 g Kaktusfeigen (gelb-orangefarbenes Fruchtfleisch) geschält und unzerkleinert drei Mal sechs Stunden mit 2 l eines jeweils frisch angesetzten Methanol/Wasser-Gemisches (80:20, v/v) auf einem Schüttler extrahiert. Der gewonnene Extrakt wurde über ein Leinentuch filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Nach Lyophilisation der vereinigten wässrigen Extrakte wurden 50 g Kaktusfeigenextrakt erhalten.

Zur Bestimmung des Indicaxanthin- und Betaningehalts wurde der Kaktusfeigen-Extrakt einer HPLC-DAD-Analyse (Säule: Synergi C18hydro 250 x 4,5 mm, 5 µm (Phenomenex, Aschaffenburg); Fluss: 1 ml/min; Gradient 0-40 min, 1-30% Acetonitril) unterworfen.

3.1.4 Herstellung von Kaktusfeigen-Extrakt-Fractionen

Die Fraktionierung des Kaktusfeigen-Extrakts wurde an der semi-präparativen HPLC (Säule: Eurospher C18 250 x 8 mm, 5 µm (Knauer, Berlin); Fluss 4 ml/min; Gradient: 0-40 min, 1-30% Methanol) durchgeführt.

Dazu wurden 500 mg Kaktusfeigen-Extrakt in 4 ml Wasser gelöst, über 0,45 µm Spritzenvorsatzfilter filtriert und in 200 µl Portionen an der semi-präparativen HPLC getrennt. Zur Fraktionierung wurde das Eluat in 10 min Schritten in verschiedenen Gefäßen aufgefangen. Jede Fraktion umfasste 30 ml. Nach Entfernung des Methanol-Anteils im Vakuum und anschließender Gefriertrocknung der Fraktionen wurden aus 500 mg Kaktusfeigen-Extrakt die in Tabelle D-1 gezeigten Ausbeuten erhalten.

Tabelle D-1 Gewinnung der Kaktusfeigen-Extrakt-Fractionen (semi-präparative HPLC: Säule: Eurospher C18 250 x 8 mm, 5 µm (Knauer, Berlin); Fluss 4 ml/min; 0-40 min 1-30 % B).

Fraktion	Sammelzeit	Farbe	Ausbeute	Anteil
I	0 – 10 min	hellgelb	425 mg	85 %
II	10,1 – 20 min	gelb	14 mg	2,8 %
III	20,1 – 30 min	beige	14 mg	2,8 %
IV	30,1 – 40 min	ocker	14 mg	2,8 %
V	40,1 – 50 min	beige	14 mg	2,8 %

3.1.5 Herstellung von indicaxanthinfreiem Kaktusfeigen-Extrakt

Zur Herstellung des indicaxanthinfreien Kaktusfeigen-Extrakts wurden 500 mg Kaktusfeigen-Extrakt-Lyophilisat in 4 ml Wasser gelöst, über 0,45 µm Spritzenvorsatzfilter gereinigt und in 200 µl Portionen an der semi-präparativen HPLC (Säule: Eurospher C18 250 x 8 mm, 5 µm (Knauer, Berlin); Fluss 4 ml/min; Gradient: 0-20 min, 1-15% Methanol) aufgereinigt. Der nach 14,5 bis 15,5 min bei 475 nm detektierte Indicaxanthin-Peak (pro Lauf ca. 4 ml) wurde in einem anderen Gefäß aufgefangen und vom übrigen Eluat getrennt. Pro Lauf wurden so ca. 80 ml Eluat erhalten. Nach Entfernung des Methanols im Vakuum und anschließender Gefriertrocknung wurden 450 mg indicaxanthinfreier Kaktusfeigen-Extrakt erhalten.

3.2 Zellkultur

Alle Arbeiten mit Zellkulturen oder Zellkulturlösungen wurden zur Vorbeugung von Kontaminationen in einer Sterilwerkbank durchgeführt.

3.2.1 Medien-Herstellung und -Lagerung

Die Zellkulturmedien HT29-, Caco2- und HepG2-Zellen wurden aus Minimum Essential Medium (MEM, siehe Abschnitt D-1.6) bzw. Dulbeccos Minimal Essential Medium (DMEM, siehe Abschnitt D-1.6) und den jeweiligen Supplementen (Abschnitt D-1.6) gemäß Tabelle D-2 hergestellt. Das Medium für HCEC-Zellen unterliegt einer Vertraulichkeitserklärung und wurde hier nicht aufgeschlüsselt. Nach der Filtration in einem Stericup-System (Millipore, Eschborn) wurde das sterile Medium luftdicht verschlossen in Flaschen bei 2–4 °C gelagert.

Tabelle D-2: Zusammensetzung der Zellkulturmedien A (für HT29- und Caco2-Zellen) und B (für HepG2-Zellen) sowie des Einfriermediums.

	Medium A	Medium B	Einfriermedium	
MEM (1x)	428 ml	0 ml	Medium A oder Medium B (je nach Zellart)	18 ml
DMEM (1x)	0 ml	435 ml		
Fötales Rinderserum (FBS)	50 ml	50 ml	FBS	5 ml
L-Glutamin (200 mM; 100x)	5 ml	5 ml	DMSO	2 ml
Penicillin/Streptomycin (5000 U)	10 ml	10 ml		
nicht essentielle Aminosäuren (100x)	5 ml	0 ml		
HEPES-Puffer (1 M)	2 ml	0 ml		
Gesamtvolumen	500 ml	500 ml		25 ml

Informationen zu den Lösungen siehe Kapitel 1.6 .

3.2.2 Auftauen und Einfrieren (Kryokonservierung) der Zell-Linien

Auftauen:

Alle verwendeten Zell-Linien wurden dem Stickstofftank (Flüssigstickstoff, -195 °C) entnommen, das Kryoröhrchen von außen mit 70%-igem Ethanol desinfiziert, und im Wasserbad bei 37 °C zügig aufgetaut. Sobald sich die letzten Eiskristalle aufgelöst hatten, wurde die Zellsuspension in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt, mit 5 ml des entsprechenden, auf 37 °C temperierten Zellkulturmediums versetzt und kurz trituriert⁷⁷. Anschließend wurden die Zellen für 5 min bei 170x g pelletiert und der Überstand vorsichtig abgesaugt und verworfen. Das Zellpellet wurde mit 2 ml des entsprechenden Kulturmediums resuspendiert und in eine mit 2 ml Kulturmedium befüllte T25-Kulturflasche (25 ml) überführt. Die Flasche wurde anschließend vorsichtig in ‚Achtertoren‘ bewegt, um eine gleichmäßige Zellverteilung zu erreichen. Zur Zell-Kultivierung wurde die Kulturflasche in den Brutschrank (37 °C, 5% CO₂) verbracht. Nach 10–12 h wurde der Adhäsionsgrad der Zellen unter dem Mikroskop kontrolliert und ein Mediumwechsel durchgeführt. Danach erfolgten die Medienwechsel im Zwei-Tages-Rhythmus.

Einfrieren

Zum Anlegen eines Zellvorrats wurden die kultivierten adhärenen Zellen trypsiniert und „geerntet“ (siehe Abschnitt D-3.2.3). Nach der Abnahme eines Aliquots zur Zellzahlbestimmung wurden die Zellen für 5 min bei 170x g zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt und verworfen, und das Pellet in gekühltem Einfriermedium (Tabelle D-2) resuspendiert, so dass eine Zellzahl von ca. 4 Mio Zellen pro ml erreicht wurde. Von dieser Zellsuspension wurden 1,2–1,5 ml in vorgekühlte Kryoröhrchen pipettiert. Diese wurden fest verschlossen, 1 h bei – 20 °C gelagert und anschließend bei – 80 °C eingefroren. Nach etwa 1 Woche wurden die Zellen zur Langzeitlagerung in flüssigen Stickstoff (- 195 °C) überführt.

⁷⁷ mehrfaches Ansaugen und Ausstoßen in die Pipette, so werden die Zellen vereinzelt

3.2.3 Kultivierung und Passagierung

Die eingesetzten Zell-Linien HT29, Caco2, HepG2 und HCEC sind adhärente, auf dem Boden der Kulturflaschen in Einzel-Zellschichten (*Monolayer*) wachsende Kulturen. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in T75-Kulturflaschen (75 cm² Bodenfläche). Zur Passagierung⁷⁸ wurde von einer zu etwa 70-90 % konfluenten Zellkultur in einer T75-Kulturflasche das Medium vorsichtig abgesaugt, die adhärennten Zellen mit 2 ml PBS gewaschen, 1 ml Trypsin-Lösung⁷⁹ aufgetragen und die T25-Kulturflasche dann im Brutschrank inkubiert. Nach 5-8 min. Inkubationszeit wurden die Zellen durch kräftige seitliche Stöße vom Kulturflaschenboden abgelöst. Das Trypsin wurde durch Zugabe von 1 ml auf 37 °C temperiertem FBS-haltigem Kulturmedium inaktiviert und die Zellsuspension in sterile 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Die Kulturflasche wurde mit 3 ml PBS nachgespült und diese Lösung mit der Zellsuspension vereinigt. Anschließend wurden die Zellen für 5 min bei 170x g pelletiert und der Überstand vorsichtig abgesaugt und verworfen. Das Zellpellet wurde in 5 ml PBS resuspendiert und die Zellen durch Triturieren vereinzelt.

Diese Zellsuspension wurde zur Weiterführung der jeweiligen Kultur verwendet. Dazu wurden ca. 0,1 ml dieser Zellsuspension in T75-Zellkulturflaschen mit 20 ml des jeweiligen Kulturmediums pipettiert. Die Zellen hefteten sich nach 5-6 Stunden an den Boden der Zellkulturflasche an und begannen zu proliferieren.

3.2.3.1 Caco2-Zellen

Die Caco2-Zellen wuchsen als Monolayer-Kultur in T75-Zellkulturflaschen mit 20 ml Kulturmedium A bei 37 °C, 5% CO₂ und 100% Luftfeuchte. Die Kulturen wurden 1x pro Woche passagiert. Bei 70-90% Konfluenz lagen ca. 80.000 Zellen/cm² (ca. 6 mio Zellen/Kulturflasche) vor. Caco2-Zellen wurden mit ca. 5.000 Zellen/cm² in neue T75-Kulturflaschen ausgebracht. Die Zellen wurden täglich unter dem Mikroskop auf morphologische Veränderungen überprüft.

⁷⁸ eine Kultur muss vor Erreichen einer kritischen Größe (als Maß dient die Konfluenz, das „Zusammenwachsen“) geteilt (=passagiert) werden, da sonst die Zellen sterben.

⁷⁹ Zum „Durchschneiden“ der Proteoglykane mit denen die Zellen am Kulturflaschenboden adhären

3.2.3.2 HepG2-Zellen

Die HepG2-Zellen wurden als Monolayer in T75-Zellkulturflaschen mit 20 ml Kulturmedium B bei 37 °C, 5% CO₂ und 100% Luftfeuchte kultiviert. Die Kulturen wurden alle 5 Tage passagiert. Bei 70-90% Konfluenz lagen ca. 150.000 Zellen/cm² (ca. 11,5 mio Zellen/Kulturflasche) vor. HepG2-Zellen wurden mit ca. 8.000 Zellen/cm² in neue T75-Kulturflaschen ausgebracht. Die Zellen wurden täglich unter dem Mikroskop auf morphologische Veränderungen überprüft.

3.2.3.3 HT29-Zellen

Die HT29-Zellen wuchsen als Monolayer-Kultur in T75-Zellkulturflaschen mit 20 ml Kulturmedium A bei 37 °C, 5% CO₂ und 100% Luftfeuchte. Die Kulturen wurden 1x pro Woche passagiert. Bei 70-90% Konfluenz lagen ca. 330.000 Zellen/cm² (ca. 24,5 mio Zellen/Kulturflasche) vor. HT29-Zellen wurden mit ca. 5.000 Zellen/cm² in neue T75-Kulturflaschen ausgebracht. Die Zellen wurden täglich unter dem Mikroskop auf morphologische Veränderungen überprüft.

3.2.3.4 HCEC-Zellen

Da die HCEC-Zellen keine eigenen Proteoglycane zum Anheften am Boden der Zellkulturflasche sezernieren, wurde die Monolayer-Kultur dieser Zellen in Matrigel-beschichteten T75-Zellkulturflaschen mit 20 ml Kulturmedium C bei 37 °C, 5% CO₂ und 100% Luftfeuchte durchgeführt. Die Kulturen wurden 1x pro Woche passagiert. Bei 70-90% Konfluenz lagen ca. 400.000 Zellen/cm² (ca. 30 mio Zellen pro Kulturflasche) vor. HCEC-Zellen wurden mit ca. 25.000 Zellen/cm² in neue Matrigel-beschichtete T75-Kulturflaschen ausgebracht. Die Zellen wurden täglich unter dem Mikroskop auf morphologische Veränderungen überprüft.

3.2.4 Bestimmung der Zellzahl/Cytotoxizität

Zur Bestimmung der Cytotoxizität einer Substanz wurde die Zellzahl der Kultur insgesamt oder nur die Anzahl lebender Zellen ermittelt. Als Maß für die Cytotoxizität wurde der EC₅₀-Wert angegeben. EC₅₀ steht für „effective concentration at 50%“. Gemeint ist

die Konzentration, bei der 50% des untersuchten biologischen Endpunkts (hier Inhibition des Zellwachstums, also IC_{50} -Wert) erreicht sind. Der bekannteste EC_{50} -Wert ist der LD_{50} aus der Toxikologie, der die Dosis beschreibt, bei der 50% der Versuchstiere gestorben sind (**letale Dosis**). Bei dieser Art der Angabe kann die zu erreichende Intensität beliebig definiert wurden. Es kann genauso die für 25% Effekt nötige Dosis angegeben werden (EC_{25}). Mit dieser Ergebnisdarstellung lässt sich die Wirksamkeit verschiedener Testsubstanzen direkt miteinander vergleichen.

3.2.4.1 Trypanblau-Methode

Diese Methode ist ein Verfahren zur Bestimmung der Anzahl lebender und toter Zellen in Zellkulturen. Das Farbstoffmolekül Trypanblau kann durch geschädigte Zellmembranen, wie sie bei toten Zellen auftreten, in die Zellen eindringen und sich in deren DNA einlagern. Dadurch werden tote Zellen blau angefärbt. Lebende Zellen mit intakten Membranen nehmen diesen Farbstoff aufgrund der Molekülgröße nicht auf und können so unter dem Lichtmikroskop deutlich von den toten Zellen unterschieden werden (siehe Abschnitt B-2.2.1).

Ausplattieren der Zellen

Für Proliferationsversuche wurden die jeweiligen Zellen wie unter 3.2.3 beschrieben in T25-Kulturflaschen ausgesät. Für einen Standard-Versuch über 72 h mit drei Konzentration (Test 1–3) wurden 13 Zellkulturflaschen (KF) benötigt (Tabelle D-3).

Exposition der Zellen

72 h nach der Aussaat wurde das Kulturmedium durch frisches, die Testsubstanz enthaltendes Medium ersetzt. Der Null-Wert (KF 13) wurde beim Versuchsstart nach der Trypanblau-Methode ausgezählt.

Messung

Im Abstand von 24 h wurde ein Testblock wie in Kapitel 3.1.3 geerntet und ausgezählt.

Tabelle D-3 Versuchsdesign Proliferationshemmung-Trypanblau-Methode. Für einen Standard-Versuch mit 3 Testkonzentrationen über 72 h werden 13 Zellkulturflaschen (KF) benötigt.

	0 h – Versuchsstart	24 h	48 h	72 h
Kontrolle	KF 13	KF 1	KF 5	KF 9
Test 1		KF 2	KF 6	KF 10
Test 2		KF 3	KF 7	KF 11
Test 3		KF 4	KF 8	KF 12

Auswertung

Zur Bestimmung der Zellzahl nach der Trypan-Blau-Methode wurden 50 µl der gut durchmischten Zellsuspension in ein Eppendorf-Cup überführt, mit 50 µl Trypan-Blau-Lösung versetzt, und gründlich trituriert. 10 µl der gefärbten Suspension wurden unter eine Deckglashälfte der Neubauer-Kammer pipettiert und unter dem Mikroskop ausgezählt. Es wurden lebende (weiße) und tote Zellen (blaue) getrennt gezählt und berechnet.

Die Berechnung der Zellzahl erfolgt nach:

Zellzahl pro ml = durchschnittliche Zellzahl pro Kleinquadrat x 2 x 10.000

(Die Neubauer-Zählkammer enthält 8 Kleinquadrate, mit jeweils 16 Kleinstquadraten, jedes Kleinquadrat entspricht 0,1 µl Zellsuspension)

Aus den Zellzahlen wurde das Verhältnis Probe/Negativkontrolle gebildet und grafisch aufgetragen. Daraus wurde der IC₅₀-Wert (*inhibitory concentration* – Inhibition der Zellproliferation um 50%, analog EC₅₀-Konzept) abgelesen.

3.2.4.2 Neutralrot-Methode

Die Neutralrot-Methode ist eine Methode zur Vitalfärbung von Zellen. Sie dient der Ermittlung der vitalen Zelldichte adhärenter Zellkulturen (siehe Abschnitt B-2.2.2). Eine gleichzeitige Erfassung toter Zellen ist mit der Neutralrot-Methode nicht möglich.

Die Versuche wurden in Mikrotiter-Platten mit 96 Vertiefungen (96well-Platten) durchgeführt, die direkt in einem ELISA-Reader vermessen wurden.

Ausplattieren der Zellen

Die jeweiligen Zellen wurden, wie in Abschnitt D-3.2.3 beschrieben trypsiniert und ausgezählt. Die Zellsuspension wurde mit dem jeweiligen Zellkulturmedium verdünnt:

Caco2:	20.000 lebende Zellen/ml
HepG2:	8.000 lebende Zellen/ml
HT29:	9.000 lebende Zellen/ml

Von diesen Zellsuspensionen wurden je 100 µl in die Vertiefungen einer schwarzen 96well-Platte mit durchsichtigem Boden pipettiert. Die Zellzahlen waren so abgestimmt, dass auch nach 72 h Versuchsdauer alle Messwerte im linearen Bereich lagen. Zur Bestimmung des Messbereichs wurde eine Kalibration mit definierten Zellzahlen durchgeführt, die direkt nach dem Anheften (6 h nach der Aussaat) vermessen wurden. Daraus ergaben sich die folgenden linearen Bereiche:

Caco2:	2.000-500.000 lebende Zellen/well
HepG2:	2.000-300.000 lebende Zellen/well
HT29:	2.000-400.000 lebende Zellen/well

Exposition der Zellen

Für jede Testkonzentration und die Negativ-Kontrolle wurden mind. drei Vertiefungen vorgesehen. 24 h nach Aussaat wurde das Kulturmedium durch frisches, die Testsubstanz enthaltendes Medium ersetzt. Für einen Standard-Versuch über 72 h mit drei Konzentration (T 1–3) wurden drei 96well-Platten benötigt. Zum Versuchsstart wurde kein Null-Wert gemessen.

Messung

Im Abstand von 24 h wurde eine Platte aus dem Inkubationsschrank genommen und vermessen. Zur Bestimmung der Neutralrotaufnahme wurde das Inkubationsmedium vorsichtig abgesaugt und die Zellen in den Vertiefungen vorsichtig mit PBS gewaschen. Anschließend wurden 100 µl Neutralrotlösung (Abschnitt D-1.6) in jede Vertiefung pipettiert und die Platte anschließend für 3 h bei 37 °C, 5% CO₂ und 100% Luftfeuchte

inkubiert. Anschließend wurde die Neutralrotlösung vorsichtig abgesaugt und die Neutralrotreste vorsichtig mit PBS aus den Vertiefungen gewaschen. Danach wurden in jede Vertiefung 100 µl der Ethanol/Eisessig-Mischung (Abschnitt D-1.6) pipettiert und die Platte 15 min bei Raumtemperatur langsam geschüttelt. Die Messung im ELISA-Plattenleser erfolgt bei 570 nm.

Auswertung

Aus den Absorptionseinheiten wurde das Verhältnis Probe/Negativkontrolle gebildet, grafisch aufgetragen und der IC₅₀-Wert ermittelt.

3.2.4.3 MTS-Methode

Diese Methode ist ebenfalls ein Verfahren zur Bestimmung der Anzahl lebender Zellen in der Zellkultur. Das innere Tetrazoliumsalz 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxy-methoxy-phenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium) (MTS) wird von, vor allem in den Mitochondrien lebender Zellen, aber auch in Peroxysomen und im Cytosol lokalisierten Oxidoreduktasen, zu einem farbigen Formazanderivat reduziert (Barltrop 1991). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde der CellTiter 96® AQueous-Assay von Promega, Mannheim, als MTS-Methode eingesetzt.

Ausplattieren der Zellen

Die jeweiligen Zellen wurden, wie oben beschrieben trypsinisiert und ausgezählt. Die Zellsuspension wurde mit dem jeweiligen Zellkulturmedium verdünnt:

Caco2:	20.000-200.000 lebende Zellen/ml
HepG2:	8.000-200.000 lebende Zellen/ml
HT29:	9.000-200.000 lebende Zellen/ml

Von diesen Zellsuspensionen wurden je 100 µl in die Vertiefungen einer schwarzen 96well-Platte mit durchsichtigem Boden pipettiert. Die Zellzahlen waren so abgestimmt, dass auch nach 72 h Versuchsdauer alle Messwerte im linearen Bereich lagen. Zur Bestimmung des Messbereichs wurde eine Kalibration mit definierten Zellzahlen durchgeführt, die direkt nach dem Anheften vermessen wurden.

Daraus ergaben sich diese linearen Bereiche:

Caco2:	2.000-60.000 lebende Zellen/well
HepG2:	2.000-40.000 lebende Zellen/well
HT29:	2.000-50.000 lebende Zellen/well

Exposition der Zellen

Für jede Testkonzentration und die Negativ-Kontrolle wurden mind. drei Vertiefungen vorgesehen. 24 h nach der Aussaat wurde das Kulturmedium durch frisches, die Testsubstanz enthaltendes Medium ersetzt. Für einen Standard-Versuch über 72 h mit drei Konzentration (T 1–3) wurden drei Mikrotiter-Platten benötigt.

Messung

Im Abstand von 24 h wurde eine 96well-Platte aus dem Inkubationsschrank genommen und vermessen. Zur Messung der mitochondrialen Aktivität wurde das Inkubationsmedium vorsichtig abgesaugt und die Zellen in den Vertiefungen vorsichtig mit PBS gewaschen. Anschließend wurden 100 µl frisches Zellkulturmedium in jede Vertiefung pipettiert und pro Vertiefung 20 µl der frisch hergestellten MTS/PMS Lösung (Abschnitt D-1.6) zugegeben. Drei Vertiefungen ohne Zellen wurden mit 100 µl Zellkulturmedium und 20 µl MTS/PMS-Lösung befüllt und zur Messung der Reagenzienabsorption verwendet. Nach vorsichtigem Schütteln wurde die Platte 2 h bei 37 °C, 5% CO₂ und 100% Luftfeuchte inkubiert. Nach der Inkubation wurde die 96well-Platte 5 min bei Raumtemperatur abgekühlt und bei 490 nm im ELISA-Reader vermessen.

Auswertung

Aus den um die Reagenzienabsorption korrigierten Absorptionseinheiten wurde das Verhältnis Probe/Negativkontrolle gebildet, grafisch aufgetragen und der IC₅₀-Wert ermittelt.

3.2.5 Bestimmung des Zellzyklus

Zellzyklusuntersuchung mittels Propidiumiodid (PI)-Färbung:

Die Versuchsdurchführung und das Aussäen der jeweiligen Zellen erfolgte wie in Kapitel 3.2.4.1 beschrieben. Am Messzeitpunkt wurden die Zellen wie in Kapitel 3.1.4.1 erläutert geerntet. Alle Proben und Lösungen wurden auf Eis gelagert und verarbeitet. Nach der Entnahme eines Aliquots zur Zellzahlbestimmung wurde die restliche Zellsuspension bei 250x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet im Eisbad in 4 ml eiskaltem Ethanol resuspendiert. Die so konservierten Zellen wurden für mindestens 18 h bei -25° C gelagert. Vor der Messung am Durchflusszytometer (FACS) wurden die Zellen bei 250x g pelletiert und der Überstand vorsichtig abgesaugt. Das sehr labile Pellet wurde in PBS resuspendiert und 30 min mit 100 μ l RNase α -Lösung inkubiert. Danach wurden 100 μ l Propidiumiodid-Lösung (PI, Kapitel D-1.6) zugegeben. Nach 6 min wurde die Probe am FACS vermessen. Der Fluoreszenzfarbstoff PI intercaliert in die Zell-DNA und wurde vom Laser (480 nm) des FACS angeregt. Die Zellpopulation wurde in einem Forward Scatter (FSC) – Sideward Scatter (SSC) – Dot Plot bestimmt. Die PI-markierten Zellen wurden über die Fluoreszenz des Farbstoffs auf Kanal FL-1 gezählt. Für die Auswertung wurden extrem niedrige Werte (verursacht durch Zellfragmente), ebenso wie extrem hohe Werte (durch Verklumpung von Zellen) durch das Setzen von Gates ausgeklammert. Die Grenzen für eine spezifische Anfärbung mit PI wurden durch Vergleich mit der Fluoreszenz der Leerwerte ermittelt. Die Ergebnisse wurden als prozentualer Anteil der jeweiligen markierten Zellen an der Gesamtpopulation angegeben.

3.2.6 Bestimmung des Anteils apoptotischer Zellen

Annexin V-FITC/7-Amino-actinomycin (7-AAD)–Protokoll

Die Versuchsdurchführung und das Ausplattieren der jeweiligen Zellen erfolgt wie in Kapitel 3.2.4.1 beschrieben. Am Messzeitpunkt wurden die Zellen wie in Kapitel 3.2.4.1 erläutert geerntet. Alle Proben und Lösungen wurden auf Eis gelagert und verarbeitet. Nach der Entnahme eines Aliquots zur Zellzahlbestimmung wurde die restliche Zellsuspension bei 250x g zentrifugiert, der Überstand dekantiert und die Zellsuspension

sion mit PBS auf einen Gehalt von 0,5 Mio Zellen/ml eingestellt. In ein FACS-Röhrchen wurden 50 µl der Annexin V-FITC/7-AAD-Färbelösung (Kapitel D-1.6) und mit 100 µl Zellsuspension gründlich vermischt. Die Reaktionsmischung wurde lichtgeschützt 15 min auf Eis inkubiert und anschließend am FACS vermessen.

Die Messung wurde auf einem FACScan (Beckton Dickinson, Mannheim) mit Anregung durch einen 488 nm Laser durchgeführt. Die Zellpopulation wurde in einem Forward Scatter (FSC) – Sideward Scatter (SSC) – Dot Plot bestimmt. Die Annexin V-FITC markierten apoptotischen Zellen wurden über die Fluoreszenz des gekoppelten FITC auf Kanal FL-1 (530 ± 30 nm) gezählt, die mit 7-AAD markierten nekrotischen Zellen über Kanal FL-3 (675 ± 22 nm). FL-1 wurde logarithmisch auf der Ordinate, FL-3 logarithmisch auf der Abszisse abgebildet (vgl. Abb. C-23). Für die Auswertung wurden extrem niedrige Werte (verursacht durch Zellfragmente), ebenso wie extrem hohe Werte (durch Verklumpung von Zellen) durch das Setzen von Gates ausgeklammert. Die Ergebnisse wurden als prozentualer Anteil der jeweiligen markierten Zellen an der Gesamtpopulation angegeben.

3.3 Enzymaktivitäts-Bestimmungen

3.3.1 Herstellung der Zellhomogenate

Für die Bestimmung der Enzymaktivität wurden die jeweiligen Zellen wie in Kapitel 3.2.3 beschrieben ausgesät. 72 h später wurde der Versuch gestartet und das Kulturmedium durch frisches, die Testsubstanz enthaltendes Medium ersetzt. Das schlecht wasserlösliche TBHQ wurde mit 1% DMSO als Lösungsvermittler im Zellkulturmedium gelöst. Nach 72 h wurden die Zellen wie in Kapitel 3.2.3 beschrieben geerntet und die Zellzahl nach der Trypanblau-Methode (siehe Kapitel 3.2.4.1) ermittelt. Die Zellhomogenate für die im Folgenden beschriebenen Enzymtests zur Bestimmung der Chinonreduktase-, der UDP-Glucuronosyltransferase-, der Sulfotransferase und der Glutathion-S-Transferase Aktivität wurden mit Hilfe eines Dounce-Homogenisators hergestellt.

Nach Abnehmen von 50 µl Zellsuspension zur Zellzahlbestimmung wurden die Zellen bei 1000x g und 4 °C für 5 min pelletiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen

und das Zellpellet mit 2x 250 µl PBS in sterile Eppendorfcups überführt. Nach erneuter Zentrifugation bei 1000x g und 4° C für 5 min und Verwerfen des Überstandes wurde das erhaltene Pellet mit 250 µl Homogenisierungspuffer (siehe Kapitel D-1.7) in den Dounce-Homogenisator überführt. Die Zellen wurden auf Eis durch 20 – 25 Stöße mit dem Stempel aufgeschlossen. Für jede Zell-Linie wurde der Zellaufschluss bei erstmaliger Durchführung unter dem Mikroskop durch Trypanblau-Färbung kontrolliert. Aufgeschlossene Zellen hatten keinen weiß leuchtenden Rand und waren oftmals blau angefärbt.

Um die Enzymaktivität der gesuchten Enzyme zu erhalten, wurden dem Homogenisierungspuffer mehrere Proteinase-Inhibitoren zugesetzt:

- Antipain: mikrobiell gewonnener Proteinase-Inhibitor; hemmt Serin-Proteasen wie Plasmin, Trypsin und Chymotrypsin
- Aprotinin: ein Proteinase-hemmendes Polypeptid; wirksam gegen Serin-Proteasen wie Plasmin, Trypsin und Chymotrypsin
- Benzamidin: synthetischer Proteinase-Inhibitor; hemmt Serin-Proteasen wie Plasmin, Trypsin und Chymotrypsin
- Leupeptin: mikrobieller Proteinase-Hemmer; inhibiert Serin- und Cystein-Proteasen wie Plasmin, Trypsin, Papain und Kathepsine
- Pepstatin A: mikrobiell gewonnenes Pentapeptid; hemmt Aspartat-Proteasen wie Pepsin und Renin
- PMSF: synthetischer Proteinase-Inhibitor; wirksam gegen Serin- und Thiol-Proteasen wie Plasmin, Trypsin, Papain und Kathepsine

3.3.2 UDP-Glucuronosyltransferase-Enzymtest (UGT)

Das nach Kapitel 3.3.1 erhaltene Zellhomogenisat wurde direkt für die Bestimmung der UDP-Glucuronosyltransferase (UGT)-Aktivität eingesetzt. Es wurde soviel Homogenisat verwendet wie 400.000 Zellen entsprach. Als Substrat wurde p-Nitrophenol eingesetzt, das durch die UGT glucuronidiert und entfärbt wurde.

Das Zellhomogenisat wurde in sterile Eppendorfcups pipettiert und mit Tris-HCl-Puffer (0,12 M, pH 7,4) auf 484 μ l aufgefüllt. Anschließend wurde die Probe mit 10 μ l UDP-Glucuronsäure (UGA)-Lösung (Kapitel D-1.7) versetzt. Nach gründlichem Mischen wurde diese Lösung 5 min bei 37 °C inkubiert. Zum Versuchsstart wurden 6 μ l p-Nitrophenol-Lösung (Kapitel D-1.7) zugesetzt, gemischt und 45 min bei 37 °C inkubiert. Nach 45 min wurde die Reaktion durch Zugabe 150 μ l eiskalter 3 % Trichloressigsäure (TCA, Kapitel D-1.7) gestoppt. Nach zweimaliger Zentrifugation bei 4 °C und 10.000x g wurden 50 μ l des Überstands zur Messung in eine schwarze Mikrotiter-Platte mit durchsichtigem Boden überführt und mit 200 μ l NaOH (0,1 N) versetzt. Die Lösungen wurden bei 405 nm im ELISA-Plattenleser vermessen.

Zur Auswertung wurden die Probenwerte vom Blindwert subtrahiert und das Verhältnis von Probe zu Negativkontrolle in Prozent berechnet. In diesem Wert war eine Änderung der Enzymaktivität der mit Testsubstanz inkubierten Probe im Vergleich zur Negativkontrolle direkt ablesbar. Das Verhältnis Probe/Negativkontrolle [%] wurde zusammen mit den Standardabweichungen des Mittelwerts grafisch aufgetragen und im Text angegeben (Bock und White 1974, Lilienblum et al. 1982).

3.3.3 NAD(P)H:Chinon-Oxidoreduktase Enzymtest (NQO)

Das nach Kapitel 3.3.1 erhaltene Zellhomogenisat wurde direkt für die Bestimmung der NQO-Aktivität eingesetzt. Es wurde soviel Homogenisat verwendet wie 40.000 Zellen entsprach. Bei größeren Homogenisat-Mengen lag die Farbreaktion außerhalb des linearen Messbereichs des ELISA-Plattenlesers. Das Zellhomogenisat wurde in die Vertiefungen einer schwarzen Mikrotiter-Platte mit durchsichtigem Boden pipettiert. Als nächstes wurden 200 μ l Reaktionslösung (siehe D-1.7) zupipettiert und schnell 1 μ l Startreagenz (siehe D-1.7) zugesetzt. Zur Reaktion wurde die Platte 5 min bei 37 °C inkubiert. Durch Zugabe von 50 μ l Stopp-Reagenz (siehe D-1.7) wurde die Reaktion abgebrochen. Die Platte wurde bei 690 nm im ELISA-Plattenleser vermessen.

Die Enzymaktivität ergab sich aus der Differenz zwischen Probe und Blindwert. Zur weiteren Auswertung wurde das Verhältnis von Probe zu Negativkontrolle in Prozent berechnet. In diesem Wert war eine Änderung der Enzymaktivität der mit Testsubstanz

inkubierten Probe im Vergleich zur Negativkontrolle direkt ablesbar. Das Verhältnis Probe/Negativkontrolle [%] wurde zusammen mit den Standardabweichungen des Mittelwerts grafisch aufgetragen und im Text angegeben (Prochaska und Santamaria 1988, Spencer et al. 1990, Prochaska et al. 1992).

3.3.4 Sulfotransferase-Test (SULT)

Das nach Kapitel 3.3.1 erhaltene Zellhomogenisat wurde direkt für die Bestimmung Sulfotransferase (SULT)-Aktivität eingesetzt. Es wurde soviel Homogenisat verwendet wie 400.000 Zellen entsprach. Als Substrat wurde p-Nitrophenol eingesetzt, dessen Sulfonierung und Entfärbung durch SULT katalysiert wurde. Zur Aktivitätsmessung wurde das Zellhomogenisat in sterile Eppendorf-Cups pipettiert und mit 20 µl MgCl₂-Lösung (Kapitel D-1.7) versetzt. Mit Natriumphosphat-Puffer (pH 6,2) wurde auf 467,5 µl aufgefüllt und 20 µl pNPS-Lösung (Kapitel D-1.7) und 2,5 µl PAPS-Lösung (Kapitel D-1.7) zugesetzt. Nach der Zugabe von 10 µl 2-Naphthol-Lösung (Startreagenz, Kapitel D-1.7) wurde die Platte bei 37 °C für 75 min inkubiert. Am Ende der Inkubation wurde die Reaktion durch Zugabe von 150 µl 5 N NaOH abgebrochen. Vor der Messung wurden die Eppendorf-Cups 10 min bei 10.000x g und 4 °C zentrifugiert. 100 µl des Überstands wurden in eine schwarze Mikrotiter-Platte mit durchsichtigem Boden überführt und bei 405 nm im ELISA-Plattenleser vermessen.

Zur Auswertung wurden die Probenwerte vom Blindwert subtrahiert und das Verhältnis von Probe zu Negativkontrolle in Prozent berechnet. In diesem Wert war eine Änderung der Enzymaktivität der mit Testsubstanz inkubierten Probe im Vergleich zur Negativkontrolle direkt ablesbar. Das Verhältnis Probe/Negativkontrolle [%] wurde zusammen mit den Standardabweichungen des Mittelwerts grafisch aufgetragen und im Text angegeben (Mulder und Scholtens 1977, Frame et al. 1997).

3.3.5 Glutathion-S-Transferase (GST)-Test

Beim Glutathion-S-Transferase (GST)-Test wurde das Substrat 1-Chloro-2,4-dinitrobenzol (CDNB) mit Glutathion (GSH) konjugiert. Das entstandene Produkt wurde bei 370 nm vermessen. Das Zellhomogenisat (entsprechend 400.000 Zellen) wurde in ste-

rile Eppendorfcups pipettiert und mit Kaliumphosphat-Puffer (pH 6,5) auf 600 µl aufgefüllt. Zu dieser Mischung wurden 14 µl CDNB-Lösung (Kapitel D-1.7) gegeben und gründlich gemischt. Nach Zugabe von 20 µl GSH-Lösung (Kapitel D-1.7) wurden die Cups 5 min bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Cups 10 min bei 4 °C und 10.000x g zentrifugiert. Vom Überstand wurden 250 µl in eine schwarze Mikrotiter-Platte mit durchsichtigem Boden transferiert und bei 370 nm im ELISA-Plattenleser vermessen.

Aus der Differenz von Probe zum Blindwert wurde die Enzymaktivität ermittelt und das Verhältnis von Probe zu Negativkontrolle in Prozent berechnet. In diesem Wert war eine Änderung der Enzymaktivität der mit Testsubstanz inkubierten Probe im Vergleich zur Negativkontrolle direkt ablesbar. Das Verhältnis Probe/Negativkontrolle [%] wurde zusammen mit den Standardabweichungen des Mittelwerts grafisch aufgetragen und im Text angegeben (Habig et al. 1974).

3.4 RNA-Extraktion zur Bestimmung der mRNA von Enzymen des Fremdstoffmetabolismus und COX II

Die Zellkulturversuche wurden analog der Proliferationsversuche mit Trypanblau (D-3.2.4.1) durchgeführt. Für die anschließende RNA-Extraktion wurden die Zellen schon nach 48 h Inkubation verwendet, da die mRNA zu diesem Zeitpunkt bereits vorlag, während die zugehörigen Proteine später translatiert werden.

Nach Chomczynski und Sacchi (1987) isolierte Gesamt-RNA enthält neben mRNA noch tRNA (transfer-RNA) und rRNA (ribosomale RNA).

Die nach D-3.2.3 erhaltene Zellsuspension wurde in ein RNase-freies Eppendorf-Gefäß überführt und kurz zentrifugiert (10000 rpm, 1 min). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 500 µl Denaturierungslösung (enthielt 4 M Guanidin-Isothiocyanat, 0,02 M Natriumcitrat, 0,5% Sarkosyl, 0,72% β-Mercapto-Ethanol; Sigma-Aldrich) versetzt und gründlich gemischt. Dann wurden nacheinander 50 µl 2 M Natriumacetat (Sigma-Aldrich), 500 µl Phenol (mit Bernsteinsäure auf pH 5,3-5,7 eingestellt, Sigma-

Aldrich) und 100 µl Chloroform/Isoamylalkohol (50:1, Sigma-Aldrich) zugegeben und homogenisiert. Anschließend wurde 5 min bei 14.000 rpm (4 °C) zentrifugiert und die obere, wässrige Phase in ein mit 500 µl Isopropanol gefülltes Eppendorf-Gefäß überführt. Nach 30 min Zentrifugation der Isopropanolfraktion bei 14.000 rpm (4 °C) wurde der Überstand verworfen und das kaum sichtbare Pellet 2x mit eiskaltem 75% Ethanol gewaschen. Zwischen und nach den Waschsritten jeweils 5 min bei 14.000 rpm (4 °C) zentrifugieren. Der Überstand wurde jeweils verworfen. Das Pellet 5 min an der Luft trocknen lassen, anschließend in 250 µl Reinstwasser resuspendieren.

Die Menge der extrahierten Gesamt-RNA wurde photometrisch bei 260 nm ermittelt. Zur Berechnung des RNA-Gehalts diente die Formel $RNA [\mu g/ml] = A_{260} \times 40^{80} \times Vf^{81}$. Durch eine zusätzliche Messung bei 280 nm wurde der Grad der Verunreinigung durch Proteine bestimmt. War der Quotient $Abs.260/280$ der beiden Messungen $< 1,5$, so war die Probe verunreinigt und wurde nicht weiter verwendet (Chomczynski und Sacchi 1987, Raha et al. 1998).

3.5 reverse transcriptase PCR (rt PCR)

Die Reagenzien wurden nicht einzeln zur Probe pipettiert, sondern unmittelbar vor der Reaktion zusammengegeben (Mastermix). Ein Aliquot dieses Mastermix wurde im Reaktionsgefäß mit der vorgelegten Probe gemischt. Jede Probe wurde auf einen RNA-Gehalt von 0,5 µg/µl eingestellt und von dieser Lösung 1 µl (bei 3'-primern) bzw. 2 µl (bei oligo d(T)16-primern) zur rt PCR eingesetzt.

Die Reaktion lief in zwei Stufen ab:

zuerst die reverse Transkription der mRNA in cDNA (in Tabelle D-4 Nr. 1-2), anschließend die Amplifikation der transkribierten cDNA. (in Tabelle D-5 Nr. 3-4).

Die Auswertung der rtPCR erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese (2 % Agarose für DNA-Sequenzen von 100-1200 bp): Agarose wurde durch mehrmaliges Aufkochen in Wasser (1,2 g Agarose + 1,2 ml TAE-Puffer (50x) + 60 ml Wasser) vollständig gelöst. Die auf 60 °C abgekühlte Gellösung wurde in die abgedichtete Gelkammer mit

⁸⁰ eine Absorptionseinheit von 1 entsprach 40 µg/ml RNA

⁸¹ Verdünnungsfaktor

eingesetztem Taschenformer gegossen. Nach Erstarren wurde das Gel in die mit Puffer gefüllte Elektrophoresekammer gelegt und mit Puffer überschichtet. In die Taschen wurden je 5 µl cDNA-Amplifikat pipettiert. Pro Gel wurde eine Tasche mit einem Größenmarker (110 bp-1114 bp) beladen. Durch Anlegen einer Spannung von ca. 100 V wurde die amplifizierte DNA in 60 min. elektrophoretisch aufgetrennt.

Die benötigten Reagenzien waren im rt PCR-Kit von Perkin Elmer, Rodgau enthalten. Nur Reinstwasser wurde hinzu gefügt.

Die Eignungsprüfung der extrahierten RNA wurde mit der rtPCR auf das Protein β -Actin⁸² (460 bp) durchgeführt, das in allen humanen Zellen vorliegt und aktiv ist. β -Actin-negative Proben wurden verworfen.

Tabelle D-4 Stufen der reverse transcriptase PCR (rtPCR). Die Stufen 1-2 umfassen die Transkription von mRNA in cDNA, die Stufen 3-4 die Amplifikation der cDNA.

1. Master-Mix für Reverse Transcriptase Amplification		
	3'-primer	Oligo d(T)16
MgCl ₂	2 µl	4 µl
10x PCR Buffer II	1 µl	2 µl
Reinstwasser	0,5 µl	1 µl
d(NTP)s	4 µl	8 µl
RNAse - Inhibitor	0,5 µl	1 µl
Reverse Transcriptase	0,5 µl	1 µl
3'-primer	0,5 µl	-
Oligo d(T)	-	1 µl
Master-Mix pro Probengefäß	9 µl	18 µl
Sample – RNA (0,5 µg/µl)	1 µl	2 µl

Fortsetzung Tabelle D-4

⁸² in vielen Zellen das mengenmäßig häufigste Protein. β -Actin ist an der Stabilisierung zellulärer Strukturen und an Bewegungsvorgängen beteiligt.

2. Thermocycler	
Schritt 1	42°C/30 min
Schritt 2	99°C/5 min
Schritt 3	4°C bis zur Weiterverarbeitung; die vorliegende mRNA wurde in cDNA transkribiert

Tabelle D-5 Stufen der reverse transcriptase PCR (rt PCR). Die Stufen 3-4 umfassen die Amplifikation der cDNA.

3. PCR – Master-Mix		
MgCl ₂	2 µl	3 µl
10x PCR Buffer II	4 µl	5 µl
Reinstwasser	32,75 µl	30,7 µl
3'-primer	0,5 µl	1 µl
5'-primer	0,5 µl	1 µl
d(NTP)s	-	6 µl
Amplitaq Polymerase	0,25 µl	0,3 µl
Master-Mix pro Probengefäß	40 µl ins rt-Gefäß hinzufügen	47 µl in neues Gefäß
Proben - cDNA (rt)	Endvolumen 50 µl	3 µl cDNA (rt)
4. Thermocycler		
Schritt 1	95°C/1 min	
Schritt 2	60°C/1 min	
Schritt 3	72°C/1 min 1–3: 29x wiederholen	
Schritt 4	95°C/1 min	
Schritt 5	60°C/1 min	
Schritt 6	72°C/1 min	
Schritt 7	4°C bis zur Weiterverarbeitung; die vorliegende DNA wurde amplifiziert	

Die Primer zur für die PCR-Transkription der COX II-, Cyp P450 2c, 3A4, 3A5-Isoenzyme und für GST μ 3-mRNA in die entsprechende cDNA sowie für deren Vervielfältigung wurden von Catherine Macé (Nestlé Research Center (NRC), Vers Chez Les Blanc, Schweiz) zur Verfügung gestellt (Tabelle D-6).

Tabelle D-6 Basensequenz der 3'- und 5'-Primer, die zur rt-PCR eingesetzt wurden (Catherine Macé, NRC, Vers Chez Les Blanc, Schweiz).

	3'-Primer	5'-Primer
Cox II	AGATCATCTCTGCCTGAGTATC TT	TTCAAATGAGATTGTGGGAAAA TTGCT
Cyp 2c	CCTGCTGAGAAAGGCATGAA	CCAGAGGTCACAGCTAAAGT
Cyp 3A4	CTATTCACAAAGTAATTTGAGG	TGACCCAAAGTACTGGACAG
Cyp 3A5	TGAAGAAGTCCTTGCGTGTC	TGACCCAAAGTACTGGACAG

3.6 Statistische Analyse

Statistische Analysen wurden mittels Microsoft Excel 2000 (Microsoft Inc., Redmond, OR, USA) durchgeführt.

Der Student t-Test wurden eingesetzt, um die statistische Signifikanz zwischen den Testsubstanz-Inkubationen und der Negativkontrolle zu berechnen. Als Signifikanzniveau wurde $p < 0,05$ angenommen. Die dargestellten Graphen zeigen den Mittelwert \pm Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Vor Anwendung des t-Tests wurde mit Hilfe des F-Tests die Homogenität der Varianzen der Mittelwerte bestimmt. Bei Varianzenhomogenitäten < 1 konnte anschließend der t-Test angewendet werden.

E Literatur

- Aden, D.P.; Fogel, A.; Plotkin, S.; Damjanov, I.; Knowles, B.B. Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line. *Nature*, **1979**, 282, 615-616
- Albin, D.M.; Tappenden, K.A. Advances in methods to evaluate gastrointestinal transport functions. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, **2001**, 4 (5), 351-354
- Allkämper, J. Gießener Beiträge zur Entwicklungsforschung, Reihe I, 11, 9, **1984**
- Aubry, J.P.; Blaecke, A.; Lecoanet-Henchoz, S.; Jeannin, P.; Herbault, N.; Caron, G.; Moine, V.; Bonnefoy, J.Y. Annexin V used for measuring apoptosis in the early events of cellular cytotoxicity *Cytometry* **1999**, 37(3),197-204.
- Aurstad, K.; Dahle, H.K. The effects of heat treatment, UV and gamma radiation on some beetroot pigments. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und –Forschung*, **1972**, 151, 171-174
- Aviram, M.; Dornfeld, L.; Kaplan, M.; Coleman, R.; Gaitini, D.; Nitecki, S.; Hofman, A.; Rosenblat, M.; Volkova, N.; Presser, D.; Attias, J.; Hayek, T.; Fuhrman, B. Pomegranate Juice Flavonoids inhibit Low-Density Lipoprotein Oxidation and Cardiovascular Diseases: Studies in Atherosclerotic Mice and Humans *Drugs Exptl. Clin. Res.* **2002**,28(2/3), 49-62
- Barbera, G. et al. „Agro-ecology, cultivation and uses of cactus pear”, *FAO plant production and protection paper* 132, Rom, **1995**, Herausgeber: Barbera, G. G. Barbera, P. Inglese and E. Pimienta-Barrios (Eds.)
- Barbera, G.; Carimi, F.; Inglese, P. Past and Present Role of the Indian-Fig Prickly-Pear (*Opuntia ficus-indica*. L. Miller, Cactaceae) in the Agriculture of Sicily. *Economic Botany*, **1992**, 46, 10-20
- Barbera, G.; Inglese, P.; La Mantia, T. Seed content and fruit characteristics in cactus pear (*Opuntia ficus-indica* Mill.) *Scientia Hort.*, **1994**, 58 (1-2), 161-165
- Bartrop, J.A.; Owen, T.C.; Cory, A.H.; Cory, J.G. 5-(3-carboxamethoxyphenyl)-2-(4,5-dimethylthiazoly)-3-(4-sulfophenyl)tetrazolium, inner salt (MTS) and related analogs of 3-(4,5-dimethylthiazoly)-2,5-diphenyltetrazolium bromide

- (MTT) reducing to purple water-soluble formazans as cell-viability indicators. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **1991**, 1, 611
- Bartsch, H.; Frank, N.; Gehrhäuser, C., Owen, R.W.; Berger, M.R. Meeting Report: International Meeting on Cancer Chemoprevention: Molecular Basis, Mechanisms and Trials. *European Journal of Cancer Prevention*, **1997**, 6, 80-92
- Basten, G.P.; Bao, Y.; Williamson, G. Sulforaphane and its glutathione conjugate but not sulforaphane nitrile induce UDP-Glucuronosyltransferase (UGT1A1) and Glutathionetransferase (GSTA1) in cultured cells. *Carcinogenesis*, **2002**, 23 (8), 1399-1404
- Becker-Brüser, W.; Gieck, H.R.; Halbekath, J.; Juche, A.; Kern B.; Kochen, M.M.; von Maxen, A.; Mühlhauser, I.; Schenk, S.; Schönhöfer, P.S.; Wille, H.; Wirth, B. „Absturz“ von Cerivastatin (Lipobay, Zenas) keine Indikation für obscure Lipidsenker. *Arznei-Telegramm*, **2001**, 32 (9), 94
- Bertram, B. Farbstoffe in Lebensmitteln und Arzneimitteln - Eine Farbstoffübersicht mit toxikologischer Bewertung, WWGmbH Stuttgart, **1989**
- Blaut, M.; Schoefer, L.; Braune, A. Transformation of flavonoids by intestinal microorganisms. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.*, **2003**, 73(2), 79-87
- Block, G.; Patterson, B.; Subar, A. Fruit, vegetables and cancer prevention: a review of the epidemiological evidence. *Nutr. Cancer*, **1992**, 18, 1-29
- Bock, K.W.; White, I.N. UDP-glucuronyltransferase in perfused rat liver and in microsomes: influence of phenobarbital and 3-methylcholanthrene. *Eur. J. Biochem.*, **1974**, 46(3), 451-459
- Boeing, H.; Kroke, A. Krebsprävention durch Ernährung (Zusammenfassung World Cancer Research Fund – Expert Report: Food, Nutrition and the Prevention of Cancer: a global perspective) *Deutsches Forschungsinstitut für Ernährung* **1999**
- Booth, C.; Potten, C.S. Gut instincts: thoughts on intestinal epithelial stem cells. *The Journal of Clinical Investigation*, **2000**, 105(11), 1493-1499
- Bravo, H. Las Cactáceas de México, Vol. 1, Univ. Nac. Aut. México, 2. Auflage, México D.F., **1978**

- Briviba, K.; Pan, L.; Rechkemmer, G. Red Wine polyphenols inhibit the growth of colon carcinoma cells and modulate the activation pattern of Mitogen-Activated-Protein-Kinases. *Journal of Nutrition*, **2002**, 132, 2814-2818
- Broekmans, W.M.R.; Klöpping-Ketelaars, I.A.A.; Schuurman, C.R.W.C.; Verhagen, H.; Berg van den, H.; Kok, F.J.; Poppel van, G. Fruits and vegetables increase Plasma carotenoids and vitamins and decrease homocysteine in humans *J. Nutr.* **2000**, 130, 1578-1583
- Brooks, J.D.; Goldberg, M.F.; Nelson, L.A.; Wu, D.; Nelson, W.G. Identification of potential prostate cancer preventive agents through induction of quinone reductase *in vitro*. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, **2002**, 11, 868-875
- Buckberry, Teesdale *Essentials of biological Chemistry*, S. 172ff., Wiley-VCH, New York – Weinheim, **2001**
- Buesen, R.; Mock, M.; Nau, H.; Seidel, A.; Jacob, J.; Lampen, A. Human intestinal Caco2-cells display active transport of benzo[a]pyren metabolites. *Cem. Biol. Interact.*, **2003**, 142 (3), 201-221
- Butera, D.; Tesoriere, L.; di Gaudio, F.; Bongiorno, A.; Allegra, M.; Pintaudi, A.M.; Kohen, R.; Livrea, M.A. Antioxidant activities of sicilian prickly pear (*Opuntia ficus indica*) fruit extracts and reducing properties of its betalains: betanin and Indicaxanthin. *J. Agric. Food Chem.*, **2002**, 50, 6895-6901
- Castellar, R.; Obón, J.M.; Alacid, M.; Fernández-López, J. Color Properties and Stability of Betacyanins from *Opuntia* Fruits *J. Agric. Food Chem.*, **2003**, 51, 2772-2776
- Chen, G.; Chen, X. Arginine residues in the active site of human Phenolsulfotransferase (SULT1A1). *Journal of Biological Chemistry*, **2003**, 278 (38), 36358-36364
- Chomczynski, P.; Sacchi, N. Single step method of RNA extraction by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform-extraction. *Analytical Biochemistry*, **1987**, 162, 156-159
- Colgan, H.A.; Floyd, S.; Noone, E.J.; Gibney, M.J.; Roche, H.M. Increased intake of fruit and vegetables and a low-fat diet, with and without low-fat plant sterol-

- enriched spread consumption: effects on plasma lipoprotein and carotenoid metabolism. *Journal of Human Nutrition and Dietetics* **2004**; 17 (6): 561-9.
- Cooke, D.; Stewart, W.P.; Gercher, A.J.; Marczylo, T. Anthocyanins from fruits and vegetables – does bright colour signal cancer chemopreventive activity? *European Journal of Cancer*, **2005**, 41, 1931-1940
- Coughtrie, M.W.H.; Johnston, L.E. Interactions between dietary chemicals and human sulfotransferases-molecular mechanisms and clinical significance. *Drug Metabolism and Disposition*, **2001**, 29 (4(2)), 522-528
- Cummings, J.; Ethell, T.; Jardine, L.; Boyd, G.; Macpherson, J.S.; Burchell, B.; Smyth, J.F.; Jodrell, D.I. Glucuronidation as a mechanism of intrinsic drug resistance in human colon cancer: reversal of resistance by food additives. *Cancer Research*, **2003**, 63 (23), 8443-8450
- Czabanski, J. Heat stability of betacyanins in red beet juice and in betanin solutions. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und –Forschung*, **1990**, 191, 275-278
- DeFlora, S.; Ferguson, L.R. Overview of mechanisms of cancer chemopreventive agents. *Mutation Research*, **2005**, 591(1-2), 8-15
- Delgado-Vargas, F.; Jiménez, A.R.; Paredes-López, O. Natural Pigments: Carotenoids, Anthocyanidins and Betalains – Characteristics, Biosynthesis, Processing and Stability *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **2000**, 40(3), 173-289
- Dok-Go, H.; Lee, K.H.; Kim, H.J.; Lee, E.H.; Lee, J.; Song, Y.S.; Lee, Y.H.; Jin, C.; Lee, Y.S.; Cho, J. Neuroprotective effects of antioxidative flavonoids, quercetin, (+)-dihydroquercetin, and quercetin 3-methyl ether, isolated from *Opuntia ficus-indica* var. *soboten*. *Brain Research*, **2003**, 965, 130-136
- Dubbels, W. Peking-Ente statt Lipobay? *Pharmazeutische Zeitung* **2002**, 3
- Duffy, S.J.; Keany, J.F., jr.; Holbrook, M.; Gokce, N.; Swerdloff, P.L.; Frei, B.; Vita, J.A.; Short- and long-term black tea consumption reverses endothelial dysfunction in patients with coronary artery disease. *Circulation* **2001**, 104, 151-156
- Ebert, M.N.; Klinder, A.; Peters, H.M.W.; Schäferhenrich, A.; Sendt, W.; Scheele, J.; Pool-Zobel, B.L. Expression of glutathione S-transferases (GSTs) in human

- colon cells and inducibility of GSTM2 by butyrate. *Carcinogenesis*, **2003**, 24(10), 1637-1644
- Eisenbrand, G.; Metzler, M.; Hennecke, F.J. Toxikologie für Naturwissenschaftler und Mediziner: Stoffe, Mechanismen, Prüfverfahren. Wiley-VCH, Weinheim, **2005**, 3., überarb. und aktualisierte Auflage
- Eisenbrand, G.; Pool-Zobel, B.; Baker, V.; Balls, M.; Blaauboer, B.J.; Boobis, A.; Carere, A.; Kevekordes, S.; Lhuguenot, J.C.; Pieters, R.; Kleiner, J. Methods of in vitro toxicology. *Food Chemical Toxicology*, **2002**, 40, 193-236
- Enari, M.; Sakahira, H.; Yokohama, H. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis and its inhibitor ICAD *Nature* **1996**, 391, 43-50
- Ezzati, M.; Danaei, G.; Vander Hoorn, S.; Lopez, A.D.; Murray, C.L. Causes of cancer in the world: comparative risk assessment of nine behavioural and environmental risk factors. *Lancet*, **2005**, 366, 1784-1793
- Fadok, V.A.; Völker, D.R.; Campbell, P.A.; Cohen, J.J.; Bratton, D.L.; Henson, P.M. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J. Immunol.*, **1992**, 148, 2207-2216
- Faist, V.; Lindenmeier, M.; Geisler, C.; Erbersdobler H.F., Hofmann, T. Influence from molecular weight fractions isolated from roasted malt on the enzyme activities of NADPH:Cytochrome c-reductase and and Glutathione-S-Transferase in Caco2-cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2002**, 50, 602-606
- Falbe, J.; Regitz, M. (Herausgeber) Römpp Chemie Lexikon online, **2006**, Georg Thieme Verlag, Stuttgart
- Fernandez, M.L.; Lin, E.C.; Trejo, A.; McNamara, D.J. Prickly pear (*Opuntia* sp.) pectin reverses low density lipoprotein receptor suppression induced by a hypercholesterolemic diet in guinea pigs. *J.Nutr.*, **1992**, 122, 2330
- Fernandez, M.L.; Trejo, A.; McNamara, D.J. Pectin isolated from prickly pear (*Opuntia* sp.) modifies low density lipoprotein metabolism in cholesterol-fed guinea pigs. *J.Nutr.*, **1990**, 120, 1283

- Fiander, H.; Schneider, H. Dietary ortho phenols that induce glutathione-S-transferase and increase the resistance of cells to hydrogen peroxide are potential cancer chemopreventives that act by two mechanisms: the alleviation of oxidative stress and the detoxification of mutagenic xenobiotics. *Cancer Letters*, **2000**, 156, 117-124
- Fogh, J.; Trempe, P. in: *Human Tumor Cells in vitro.*, **1975**, Plenum Press, New York, 115-159, Herausgeber Fogh, J.
- Fogh, J.; Wright, W.C.; Loveless, J.D. Absence of HeLa cell contamination in 169 cell lines derived from human tumors. *J. Natl. Cancer Inst.*, **1977**, 58, 209-214
- Frame, T.L.; Gatlin, L.T.; Kadlubar, F.F.; Lang, P.N. Metabolic differences and their impact on human disease Sulfotransferases and colorectal cancer. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, **1997**, 4, 277-281
- Frank, T.; Stintzing, F.C.; Carle, R.; Bitsch, I.; Quaas, D.; Strass, G.; Bitsch, R.; Netzel, M. Urinary pharmacokinetics of betalains following consumption of red beet juice in healthy humans. *Pharmacol. Res.*, **2005**, 52(4), 290-297
- Galati, E.M.; Mondello, M.R.; Giuffrida, D.; Dugo, G.; Miceli, N.; Pergolizzi, S.; Taviano, M.S. Chemical characterization and biological effects of Sicilian *Opuntia ficus indica* (L.) mill. Fruit juice: antioxidant and antiulcerogenic activity. *J. Agric. Food Chem.*, **2003**, 51(17), 4903-4908
- Galati, E.M.; Mondello, M.R.; Lauriano, E.R.; Taviano, M.F.; Galluzzo, M.; Miceli, N. *Opuntia ficus indica* (L.) Mill. Fruit juice protects liver from carbon tetrachloride induced injury. *Phytotherapy Research*, **2005**, 19, 796-800
- Galijatovic, A.; Otake, Y.; Walle, U. K.; Walle, T. Extensive metabolism of the flavonoid chrysin by human Caco-2 and HepG2 cells. *Xenobiotica*, **1999**, 29 (12), 1241-1256
- Galijatovic, A.; Otake, Y.; Walle, U.K.; Walle, T. Induction of UDP-Glucuronosyl-transferase UGT1A1 by the Flavonoid Chrysin in Caco-2 Cells—Potential Role in Carcinogen Bioinactivation. *Pharmaceutical Research*, **2001**, 18(3), 374-379

- Garrett, D.A.; Failla, M.L.; Sarama, R.J. Development of an in vitro digestion method to assess carotenoid bioavailability from meals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **1999**, 47(10), 4301-4309
- Gaßmann, B.; Fankhänel, S. Non-nutritive bioactive food constituents of plants: Importance for nutrition and health. *Ernährungsumschau-Forschung und Praxis*, **2001**, 48 (12), 508
- German, J.B.; Walzern, R.L. The health benefits of wine. *Annual Reviews of Nutrition* **2000**, 20, 561-593
- Gibson, A.C.; Nobel, P.S. *The Cactus Primer*. Harvard University Press, Cambridge, **1986**
- Götz, E.; Gröner, G. Kakteen: Kultur, Vermehrung und Pflege. *Lexikon der Gattungen und Arten*, S.Ulmer Verlag, 6. Auflage, Stuttgart, **1996**
- Griffiths, L.A.; Smith, G.E. Metabolism of apigenin and related compounds in the rat. Metabolite formation in vivo and by the intestinal microflora in vitro. *Biochem. J.*, **1972**, 128, 901-911.
- Guerri, S.; Miceli, L.; Lanza, C.M.; Tomaselli, F.; Bonomo, R.P.; Rizzarelli, E. Chemical Characterization of Sicilian Prickly Pear (*Opuntia ficusindica*) and Perspectives for the Storage of Its Juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2000**, 48, 5424-5431
- Gupta, M.; Gupta, S.; Hoffman, B.; Liebermann, D.A. GADD45A and GADD45B protect hematopoietic cells from UV induced apoptosis via distinct signaling pathways including p38 activation and JNK inhibition. *Journal of Biological Chemistry*, **2006**, 281(26), 17552-17558
- Habig, W.H.; Pabst, M.J.; Jacoby, W.B. Glutathione-S-Transferases: The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *The Journal of Biological Chemistry*, **1974**, 249 (22), 7130-7139
- Hadley, C.W.; Clinton, S.K.; Schwartz, S.J. The consumption of processed tomato products enhances plasma lycopene concentrations in association with a reduced lipoprotein sensitivity to oxidative damage. *Journal of Nutrition*, **2003**, 133, 727-732

- Halliwell, B.; Zhao, K.; Whiteman, M. The gastrointestinal tract: A major site of antioxidant action? *Free Radical Research*, **2000**, 33, 819-830
- Han, Y.; Chen, H.; Carr, B.I.; Wipf, P.; Lazo, J.S.; Pan, S.S. NAD(P)H:Quinone-Oxidoreductase-1-dependent and -independent cytotoxicity of potent quinone Cdc25 phosphatase inhibitors *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **2004**, 209, 64-70
- Harborne, J.B.; Williams, C.A. Advances in Flavonoid Research since 1992. *Phytochemistry*, **2000**, 55 (6), 481-504
- Hayes, J.D.; McMahon, M. Molecular basis for the contribution of the antioxidant responsive element to cancer chemoprevention. *Cancer Letters*, **2001**, 174, 103-113
- Hayes, J.D.; Pulford, D.J. The Glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, **1995**, 30(6), 445-600
- Hayes, K.D.; Carey, R.E.; Schmidt, S.Y. Retinal degeneration associated with taurine deficiency in the cat. *Science*, **1975**, 188, 949-951
- Hayes, R.J.; Strange, D.C. Glutathione-S-Transferases and their biological consequences. *Pharmacology*, **2000**, 61, 154-166
- Henn, T.; Stehle, P. Gesamtphenolgehalt und antioxidative Kapazität handelsüblicher Getränke. *Ernährungsumschau* **1998**, 45, 308-313.
- Henry, B.S. Natural Food Colours. In Hendry, G.F.; Houghton, J.D. (Herausgeber), *Natural Food Colorants*. Blackie Academic&Professional London, 2nd edition, Chapter 2, 40-79, **1996**
- Herbach, K.M.; Stintzing, F.C.; Elss, S.; Preston, C.; Schreier, P.; Carle, R. Isotope ratio mass spectrometrical analysis of betanin and isobetanin isolates for authenticity evaluation of purple pitaya-based products. *Food Chemistry*, **2006**,
- Hodgson, J.M.; Puddey, I.B.; Croft, K.D.; Burke, V.; Mori, T.A.; Caccetta, R.A.; Beilin, L.J. Acute effects of ingestion of black and green tea on lipoprotein oxidation. *American Journal of Clinical Nutrition* **2000**, 71, 1103-1107

- Hoffmann, W. in Agro-ecology, cultivation and uses of cactus pear. **1995**, *FAO Plant Production and Protection Paper*, 132, Herausgeber: Barbera, G. G. Barbera, P. Inglese and E. Pimienta-Barrios (eds)
- Hofmann, A.F. Detoxification of Lithocholic Acid, a toxic bile acid relevance to drug hepatotoxicity *Drug Metabolism Reviews*, **2004**, 36(3-4), 703-722
- Hoicke, C., Stintzing, F. Gesunde Ernährung zwischen Natur- und Kulturwissenschaft – Die Arbeit der Dr. Rainer Wild-Stiftung. Rhema-Verlag, Münster, **1998**, 239-244
- Hoogwerf, B.J.; Young, J.B. The HOPE study. Ramipril lowered cardiovascular risk, but vitamin E did not. *Cleveland Clinical Journal of Medicine*, **2000**, 61, 287-293
- Huang, A.S.; von Elbe, J.H. Kinetics of the degradation and regeneration of betanine. *Journal of Food Science*, **1987**, 52, 1689-1693
- Huber, W.W.; Prustomerski, S.; Delbanco, E.; Uhl, M.; Scharf, G.; Tureski, R.J.; Their, R.; Schulte-Hermann, R. Enhancement of the chemoprotective enzymes glucuronosyltransferase and glutathione transferase in specific organs of the rat by the coffee components kahweol and cafestol. *Arch. Toxicol.*, **2002**, 76, 209-217
- Jackman, R.L.; Smith, J.L. Anthocyanins and Betalains. In: Hendry, G.F.; Houghton, J.D. (Hrsg.) *Natural food colorants*. **1996**, Blackie Academic & Professional London, zweite Ausgabe, Kapitel 8, 244-309
- Jang, D.S.; Cuendet, M.; Pawlus, A.D.; Kardono, L.B.; Kawanishi, K.; Farnsworth, N.R.; Fong, H.H.; Pezzuto, J.M.; Kinghorn, A.D. Potential cancer chemopreventive constituents of the leaves of *Macaranga triloba*. *Phytochemistry*, **2004**, 65(3), 345-350
- Janson, W.; Brandner, G.; Siegel, J. Butyrate modulates DNA-damage-induced p53 response by induction of p53-independent differentiation and apoptosis. *Oncogene*, **1997**, 15, 1695-1406
- Jeong, S.J.; Jun, K.Y.; Kang, T.H.; Ko, E.B.; Kim, Y.C. Flavonoids from the fruits of *Opuntia ficus indica*, var *soboten*. *Kor. J. Pharmacogn.*, **1999**, 30, 84-97

- Kampman, E.; Arts, I.C.; Hollman, P.C. Plant foods versus compounds in carcinogenesis; observational versus experimental human studies. *Int J Vitam Nutr Res.*, **2003**, 73(2), 70-78
- Kanner, J.; Harel, S.; Granit, R. Betalains – a new class of dietary cationized antioxidants. *J. Agric. Food Chem.*, **2001**, 49, 5178-5185
- Katan, M.B.; Grundy, S.M.; Jones, P.; Law, M.; Miettinen, T.; Paoletti, R. Efficacy and Safety of Plant Stanols and Sterols in the Management of Blood Cholesterol Levels. *Mayo Clinic Proceedings*, **2003**, 78: 965-978
- Kataoka, S.; Liu, W.; Albright, K.; Storkson, J.; Pariza, M. Inhibition of benzo[a]pyrene-induced mouse forestomach neoplasia and reduction of H₂O₂ concentration in human polymorphonuclear leucocytes by flavour components of Japanese-style fermented soy-sauce. *Food and Chemical Toxicology* **1997**, 35(5), 449-457
- Kavvadias, D.; Monschein, V.; Sand, P.; Riederer, P.; Schreier, P. Constituents of sage (*Salvia officinalis*) with in vitro affinity to human brain benzodiazepine receptor. *Planta Med.*, **2003**, 69(2), 113-117
- Kavvadias, D.; Sand, P.; Youdim, K.A.; Qaiser, M.Z.; Rice-Evans, C.; Baur, R.; Sigel, E.; Rausch, W.D.; Riederer, P.; Schreier, P. The flavone hispidulin, a benzodiazepine receptor ligand with positive allosteric properties, traverses the blood-brain barrier and exhibits anticonvulsive effects. *Br. J. Pharmacol.*, **2004**, 142(5), 809-10.
- Kirlin, W.D.; Cai, J.; DeLong, M.J.; Patten, E.J.; Jones, D.P. Dietary compounds that induce cancer preventive Phase 2 Enzymes activate apoptosis at comparable doses in HT29 colon carcinoma cells. *Journal of Nutrition*, **1999**, 129, 1827-1835
- Knasmüller, S.; Mersch-Sundermann, V.; Kevekordes, S.; Darroudi, F.; Huber, W.W.; Hoelzl, C.; Bichler, J.; Majer, B.J. Use of human-derived liver cell lines for the detection of environmental and dietary genotoxicants; current state of knowledge. *Toxicology*, **2004**, 198, 315-328

- Knasmüller, S.; Parzefall, W.; Sanyal, R.; Ecker, S.; Schwab, C.; Uhl, M.; Mersch-Sundermann, V.; Williamson, G.; Hietsch, G.; Langer, T.; Darroudi, F.; Natarajan, A.T. Use of metabolically competent human hepatoma cells for the detection of mutagens and antimutagens. *Mutation Research*, **1998**, 402, 185-202
- Knasmüller, S.; Steinkellner, H.; Majer, B.J.; Nobis, E.C.; Scharf, G.; Kassie, F. Search for dietary antimutagens and anticarcinogens: methodological aspects and extrapolation problems. *Food and Chemical Toxicology*, **2002**, 40, 1051-1062
- Krammer, P.H. Apoptose. *Deutsches Ärzteblatt*, **2000**, 97(25), C1315-1322
- Kris-Etherton, P.M.; Hecker, K.D.; Bonanome, A.; Coval, S.M.; Binkoski, A.E.; Hilpert, K.F.; Griel, A.E.; Etherton, T.D. Bioactive compounds in foods: Their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. *Am. J. Med.*, **2002**, 113(9B), 71S-88S
- Kroemer, G.; Reed, J.C. Mitochondrial control of cell death. *Nature Medicine*, **2000**, 6(5), 513-519
- Kroon, P.A.; Clifford, M.N.; Croizer, A.; Day, A.J.; Donovan, J.L.; Manach, C.; Williamson, G. How should we assess the effects of exposure to dietary polyphenols in vitro? *American Journal of Clinical Nutrition*, **2004**, 80, 15-21
- Krzystyniak, K.L. Current strategies for anticancer chemoprevention and chemoprotection. *Acta Pol. Pharm.*, **2002**, 59 (6), 473-478
- Kuntz, S; Wenzel, U.; Daniel, H. Comparative analysis of the effects of flavonoids on proliferation, cytotoxicity and apoptosis in human colon cancer cell lines. *European Journal of Nutrition*, **1999**, 38(3), 133-142
- Kuo, S.M. Antiproliferative potency of structurally distinct dietary flavonoids on human colon cancer cells. *Cancer Letters*, **1996**, 110, 41-48
- Kuusi, T.; Pyysalo, H.; Pippuri, A. The effect of iron, tin aluminium and chromium on fading, discoloration and precipitation in berry and red beet juices. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und –Forschung*, **1977**, 163, 196,-202
- Kuypers, F.A.; Lewis, R.A.; Hua, M.; Schott, M.A.; Discher, D.; Ernst, J.D.; Lubin, B.H. Detection of altered membrane phospholipid asymmetry in subpopulations

- of human red blood cells using fluorescently labeled annexin V *Blood* **1996**, 87, 1179
- Labib, S.; Erb, A.; Kraus, M.; Wickert, T.; Richling, E. The pig caecum model: a suitable tool to study the intestinal metabolism of flavonoids. *Mol Nutr. Food Res.* **2004**, 48(4), 326-32.
- Laidlaw, S.A.; Grosvenor, M.; Kopple, J.D. The taurine content of common foodstuffs *J. Parenteral Enteral Nutr.*, **1990**, 14, 183-188
- Levine, A. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell*, **1997**, 88, 323-331
- Lilienblum, W.; Walli, A.K.; Bock, K.W. Differential induction of rat liver microsomal UDP-glucuronosyltransferase activities by various inducing agents. *Biochem. Pharmacol.*, **1982**, 31(6), 907-913
- Lindl, T. Zell- und Gewebekultur. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg – Berlin, 5. Auflage, **2002**
- Lock, K.; Pomerleau, J.; Causer, L.; McKee, M. in:“Comparative quantification of health risks: global and regional burden of disease attributable to selected major risk factors.” Herausgeber: Ezzati, M.; Lopez, A.D.; Rodgers, A.; Murray, C.J.L.; *World Health Organization*, Genf, **2004**, 597-728
- Löffler, G.; Petrides, P.E. Physiologische Chemie - Lehrbuch der medizinischen Biochemie und Pathobiochemie für Studierende und Ärzte. Springer Verlag, Berlin, 4.Auflage 1988, 1. korrigierter Nachdruck **1990**
- Lottspeich, F.; Zorbas, H. Bioanalytik Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 1. Auflage, **1998**
- Mabry, T.J. Selected Topics from Forty Years of Natural Products Research: Betalains to Flonoids, Antiviral Proteins and Neurotoxic Nonprotein Amino Acids *J. Nat. Prod.* **2001**, 64, 1596-1604
- Maiti, S.; Chen, G. Tamoxifen induction of aryl sulfotransferase and hydroxysteroid sulfotransferase in male and female rat liver and intestine. *Drug Metabolism and Disposition*, **2003**, 31, 637-644
- Majno, G., Noris, I. Apoptosis, oncosis and necrosis. An overview of the cell death. *Am. J. Pathol.*, **1995**, 146, 3-15

- Manach, C.; Williamson, G.; Morand, C.; Scalbert, A.; Rémésy C. Bioavailability and bioefficiency of polyphenols in humans. *American Journal of Clinical Nutrition*, **2005**, 81(suppl.), 230S-242S
- Manthey, J.A.; Guthrie, N. Antiproliferative activities of citrus flavonoids against six human cancer cell lines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2002**, 50, 5837-5843
- Mariadson, J.M.; Velcich, A.; Wilson, A.J.; Augenlicht, L.H.; Gibson, P.R. Resistance to butyrate-induced cell differentiation and apoptosis during spontaneous Caco2-cell differentiation. *Gastroenterology*, **2001**, 120, 889-899
- Marian, B. In vitro models for the identification and characterization of tumor-promoting and protective factors for colon carcinogenesis. *Food and Chemical Toxicology*, **2002**, 40, 1099-1104
- Marko, D.; Habermeyer, M.; Kemény, M.; Weynand, U.; Niederberger, E.; Frank, O.; Hofmann, T. Maillard reaction products modulating the growth of human tumor cells in vitro. *Chem. Res. Toxicol.*, **2003**, 16, 48-55
- Marko, D.; Puppel, N.; Tjaden, Z.; Jakobs, S.; Pahlke, G. The substitution pattern of anthocyanidins affects different cellular signaling cascades regulating cell proliferation. *Mol. Nutr. Food Res.*, **2004**, 48(4), 318-325.
- Matsumoto, H.; Inaba H.; Kishi, M.; Tominaga, S.; Hirayama, M. ; Tsuda, T. Orally administered Delphinidin 3-Rutinoside and Cyanidin 3-Rutinoside are directly absorbed in Rats and Humans and appear in the blood as the intact Forms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2001**, 49(3), 1546-1551
- Mennen, L.I.; Walker, R.; Bennetau-Pelissero, C.; Scalbert, A. Risks and safety of polyphenol consumption. *American Journal of Clinical Nutrition*, **2005**, 81 (suppl.), 326S-329S
- Mersch-Sundermann, V.; Knasmüller, S.; Wu, X.J.; Darroudi, F.; Kassie, F. Use of a human-derived liver cell line for the detection of cytoprotective, antigenotoxic and cogenotoxic agents. *Toxicology*, **2004**, 198, 329-340

- Miranda, C.L.; Aponso, G.L.M.; Stevens, J.F.; Deinzer, M.L.; Buhler, D.R. Prenylated chalcones and flavanones as inducers of quinone reductase in mouse Hepa 1c1c7 cells. *Cancer Letters*, **2000**, 149, 21-29
- Miranda, C.L.; Stevens, J.F.; Helmrich, A.; Henderson, M.C.; Rodriguez, R.J.; Yang, Y.H.; Deinzer, M.L.; Barnes, D.W.; Buhler, D.R. Antiproliferative and cytotoxic effects of prenylated Flavonoids from Hops (*Humulus lupulus*) in human cancer cell lines. *Food and Chemical Toxicology*, **1999**, 37, 271-285
- Mitchell, S.C. Food Idiosyncrasies: Beetroot and Asparagus. *Drug Metab. Dispos.*, **2001**, 29(4), 539-543
- Miura, Y.; Chiba, T.; Miura, S.; Tomita, I.; Umegaki, K.; Ikeda, M.; Tomita, T. Green Tea polyphenols (flavan 3-ols) prevent oxidative modification of low density lipoproteins: An ex vivo study in humans. *J. Nutr. Biochem.*, **2000**, 11, 216-222
- Mizrahi, Y.; Nerd, A. Cacti as Crops. *Hortic. Rev.*, **1997**, 18, 291
- Mondragón-Jacobo, C.; Pérez-González, S. (Hrsg.) Cactus (*Opuntia* spp.) as forage. *FAO plant production and protection paper* 169, Rom, **2002**
- Mulas, M. Medicinal Properties and yield possibilities of the prickly pear (*Opuntia* spp.) in the mediterranean environment. *Acta Horticulturae*, **1993**, 331, 79-84
- Mulder, G.J.; Scholtens, E. Phenol sulphotransferase and uridine diphosphate glucuronyltransferase from rat liver in vivo and in vitro. 2,6-Dichloro-4-nitrophenol as selective inhibitor of sulphation. *Biochem. J.*, **1977**, 165(3), 553-559
- Münzel, P.A.; Schmohl, S.; Heel, H.; Kälberer, K.; Bock-Hennig, B.S.; Bock, K.W. Induction of Human UDP Glucuronosyltransferases (UGT1A6, UGT1A9, and UGT2B7) by t-Butylhydroquinone and 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-Dioxin in Caco-2 cells. *Drug Metab. Dispos.*, **1999**, 27(5), 569-573
- Narayanan, B.A.; Geoffroy, O.; Willingham, M.C.; Re, G.G.; Nixon, D.W. p53/p21 (WAF1/CIP1) expression and its possible role in G1 arrest and apoptosis in ellagic acid treated cancer cells. *Cancer Letters*, **1999**, 136(2), 215-221
- Nichenametla, S.N.; Taruscio, T.G.; Barney, D.L.; Exon, J. H. A review of the effects and mechanisms of polyphenolics in cancer. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **2006**, 46, 161-183

- Nuhn, P. Naturstoffchemie: mikrobielle, pflanzliche und tierische Naturstoffe Hirzel Verlag, Stuttgart, 3. Auflage **1997**
- Nultsch, W. Allgemeine Botanik. (10., neu bearbeitete und erweiterte Auflage), **1996**, Thieme Verlag, Stuttgart
- O'Brien, N.M.; Woods, J.A.; Aherne, S.A.; O'Callaghan Cytotoxicity, genotoxicity and oxidative reactions in cell-culture models: modulatory effects of phytochemicals. *Biochemical Society Transactions*, **2000**, 28(2), 22-28
- Pappa, G.; Lichtenberg, M.; Iori, R.; Barillari, J.; Bartsch, H.; Gerhäuser, C. Comparison of growth inhibition profiles and mechanisms of apoptosis induction in human colon cancer cell lines by isothiocyanates and indoles from Brassicaceae. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, **2006**, 599(1-2), 76-87
- Park, Y.; Hunter, D.J. Spiegelmann, D.; Bergkvist, L.; Berrino, F.; van den Brandt, P.A.; Buring, J.E.; Colditz, G.A.; Freudenheim, J.L.; Fuchs, C.S.; Giovannucci, E.; Goldbohm, R.A.; Graham, S.; Harnack, L.; Hartmann, A.M.; Jacobs, D.R.; Kato, I.; Krogh, V.; Leitzmann, M.F.; McCullough, M.L.; Miller, A.B.; Pietinen, P.; Rohan, T.E.; Schatzkin, A.; Willet, W.C.; Wolk, A.; Zeleniuch-Jacquotte, A.; Zhang, S.M.; Smith-Warner, S.A. Dietary fiber intake and risk of colorectal cancer – A pooled analysis of prospective cohort studies. *Journal of the American Medicinal Association*, **2005**, 294(22), 2849-2857
- Piattelli, M.; Minale, L.; Prota, G. Pigments of Centrospermae. III. Betaxanthins from *Beta vulgaris* L. *Phytochemistry*, **1965**, 4, 121-125
- Pimienta-Barrios, E.; Muñoz-Urías, A. Domestication of opuntias and cultivated varieties. **1995**, p.58-63, in: G. Barbera, P. Inglese and E. Pimienta-Barrios (eds) Agro-ecology, cultivation and uses of cactus pear. FAO Plant Production and Protection Paper, 132.
- Pinto, M.; Robine-Leon, S.; Appay, M.-D.; Kedinger, M.; Triadou, N.; Dussaulx, E.; Lacroix, B.; Simon-Assmann, P.; Haffen, K.; Fogh, J.; Zweibaum, A. Enterocyte-like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture. *Biol. Cell*, **1983**, 47, 323-330

- Pischetsrieder, M. Funktionelle Lebensmittel. *Unterricht Chemie*, **2001**, 69 (13), 111-115
- Pool-Zobel, B.L.; Bub, A.; Schröder, N.; Rechkemmer, G. Anthocyanins are potent antioxidants in model systems but do not reduce endogenous oxidative DNA damage in human colon cells. *European Journal of Nutrition*, **1999**, 38, 227-234
- Prochaska, H.J.; Santamaria, A.B. Direct measurement of NAD(P)H:quinone reductase from cells cultured in microtiter wells: a screening assay for anticarcinogenic enzyme inducers. *Anal. Biochem.*, **1988**, 169(2), 328-336
- Prochaska, H.J.; Santamaria, A.B.; Talalay, P. Rapid detection of inducers of enzymes that protect against carcinogens. *Proc. Natl. Acad. Sci*, **1992**, 89, 2394-2398
- Pschyrembel, Klinisches Wörterbuch 259. Auflage, de Gruyter-Verlag, Berlin, **2002**
- Qiu, Y.; Chen, Y.; Pei, Y.; Matsuda, H.; Yoshikawa, M. Constituents with Radical Scavenging Effect from *Opuntia dillenii*: Structures of New α -Pyrone and Flavonol Glycoside. *Chem. Pharm. Bull.*, **2002**, 50(11), 1507-1510
- Quaroni, A.; Hochman, J. Development of intestinal cell culture models for drug transport and metabolism studies. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **1996**, 22, 3-52
- Quattrochi, L.C.; Guzelian, P.S. CYP3A Regulation: From Pharmacology to Nuclear Receptors. *Drug Metab. Dispos.*, **2001**, 29(5), 615-622
- Raha, S.; Ling, M.; Merante, F. Extraction of Total RNA from Tissues and Cultured Cells *Molecular Biomechanics Handbook*, **1998**, Humana Press Inc., Totowa (NJ), Herausgeber: Rapley, R.; Walker, J.M.
- Reddy, M.K.; Alexander-Lindo, R.L.; Nair, M. Relative inhibition of lipid peroxidation, cyclooxygenase enzymes, and human tumor cell proliferation by natural food colors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2005**, 53, 9268-9273
- Reed, J. Double identity for proteins of the Bcl-2 family. *Nature*, **1997**, 387, 773-776
- Rietveld, A.; Wiseman, S. Antioxidant effects of tea: evidence from human clinical trials. *Journal of Nutrition*, **2003**, 133, 3285S-3292S

- Riso, P.; Brusamolino, A.; Ciappellano, S.; Porrini, M. Comparison of lutein bioavailability from vegetables and supplement. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.*, **2003**, 73(3), 201-205
- Rochette-Egly, C.; Kedinger, M.; Haffen, K. Modulation of HT-29 human colonic cancer cell differentiation with calmidazolium and 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Cancer Research*, **1988**, 48(21), 6173-6182
- Scalbert, A.; Manach, C.; Morand, C.; Remesy, C.; Jimenez, L. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Critical Review of Food Science and Nutrition*, **2005**, 45(4), 287-306
- Scalbert, A.; Williamson, G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *Journal of Nutrition*, **2000**, 138(8S), 2073S-2085S
- Schliemann, W.; Kobayashi, N.; Strack, D. The decisive step in betaxanthin biosynthesis is a spontaneous reaction. *Plant Physiology*, **1999**, 119(4), 1217-1232
- Schwab, W. Metabolome diversity: too few genes, too many metabolites. *Phytochemistry*, **2003**, 62, 837-849
- Schwartz, S.J.; von Elbe, J.H. Quantitative Determination of individual Betalains by high performance liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.*, **1980** 28, 540-543
- Sherr, C. Cancer cell cycles. *Science* **1996**, 274, 1672-1677
- Sing, B.; Bhat, T.K.; Singh, B. Potential therapeutic applications of some antinutritional plant secondary metabolites. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2003**, 51, 5579-5597
- Sonoda, J.; Rosenfeld, J.M.; Xu, L.; Evans, R.M.; Xie, W. A nuclear receptor-mediated xenobiotic response and its implication in drug metabolism and host protection. *Current Drug Metabolism*, **2003**, 4, 59-72
- Souci, Fachmann, Kraut; Nährwerttabellen, 6. Auflage, wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart mbh, **2000**
- Spencer, S.R.; Wilczak, C.A.; Talalay, P. Induction of glutathione transferases and NAD(P)H:quinone reductase by fumaric acid derivatives in rodent cells and tissues. *Cancer Research*, **1990**, 50(24), 7871-7875

- Stintzing, F.C.; Schieber, A.; Carle, R. Cactus pear – a promising component to functional food. *Obst- Gemüse- und Kartoffelverarbeitung*, **2000**, 85(1), 40-47
- Stintzing, F.C.; Schieber, A.; Carle, R. Identification of betalains from Yellow Beet (*Beta vulgaris L.*) and cactus pear (*Opuntia ficus indica (L.) Mill.*) by High-Performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.*, **2002**, 50, 2302-2307
- Stintzing, F.C.; Schieber, A.; Carle, R. Phytochemical and nutritional significance of cactus pear. *Eur. Food Res. Technol.*, **2001**, 212(4), 396-407
- Stintzing, F.C.; Schieber, A.; Carle, R. Amino Acid composition and betaxanthin formation in fruits from *Opuntia ficus indica*. *Planta Medica*, **1999**, 65, 632-635
- Stintzing, F.C.; Schieber, A.; Carle, R. Rote Beete als färbendes Lebensmittel – eine Bestandsaufnahme. *Gemüse- und Kartoffelverarbeitung*, **2001**
- Stopper, H.; Schmitt, E.; Kobras, K. Genotoxicity of phytoestrogens. *Mutation Research*, **2005**, 574, 139-155
- Strack, D.; Vogt, T.; Schliemann, W. Recent advances in betalain research. *Phytochemistry*, **2003**, 62, 247-269
- Tate, J.L. California Cacti and other Succulents and their Uses *Cactus and succulent Journal*, **1969**, 41, 245
- Tesoriere, L.; Allegra, Butera, D.; M. Livrea, M.A. Absorption, excretion, and distribution of dietary antioxidant betalains and LDLs: potential health effects of betalains in humans. *Am. J. of Clin. Nutr.*, **2004b**, 80(4), 941-945
- Tesoriere, L.; Butera, D.; Pintaudi, A.M.; Allegra, M. Livrea, M.A. Supplementation with cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) fruit decreases oxidative stress in healthy humans: a comparative study with vitamin C¹⁻³. *Am. J. of Clin. Nutr.*, **2004a**, 80(2), 391-395
- Tesoriere, L.; Fazzari, M.; Allegra, M.; Livrea, M.A. Biothiols, Taurine, and lipid-soluble antioxidants in the edible pulp of sicilian cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) fruits and changes of bioactive juice components upon industrial processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2005**, 53, 7851-7855
- Thornberry, N.; Lazebnik, Y. Caspases: Enemies within. *Science*, **1998**, 281, 1312-1316

- Tomei, D.L.; Cope, F.O. Apoptosis: The molecular basis of cell death. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York **1991**
- Trejo-Gonzalez, A. et al. A purified extract from prickly pear cactus (*Opuntia fuliginosa*) controls experimentally induced diabetes in rats *J.Ethnopharmacol.*, **1996**, 55, 27
- Trezzini, G.F.; Zryd, J.P. Characterization of some natural and semi-synthetic betalains. *Phytochemistry*, **1991**, 30(6), 1901-1903
- Trump, B.F.; Berezski, I.K. The reactions of cells to lethal injure: Oncosis and necrosis - the role of calcium in: Lockshin, R.A.; Zakeri, Z.; Tilly, J.L. (Hrsg.): When cells die. , **1998**, Wiley-Liss, NewYork, Chichester, Weinheim
- Valerio, L.G.jr.; Kupa, J.K.; Pickwell, G.V.; Quattrochi L.C. Induction of the human NAD(P)H:Quinone Oxidoreductase gene expression by the flavonol quercetin. *Toxicology Letters*, **2001**, 119 (1), 49-57
- Verhoven, B.; Schlegel, R.A.; Williamson, P. Mechanisms of phosphatidylexposure, a phagocyte recognition signal, on apoptotic T-Lymphocytes *J.Exp.Med.*, **1995**, 182, 1597-1601
- Voet, D.; Voet, J.G. Biochemie. VCH-Verlag, Weinheim, 1. Auflage 1992, 1. korrigierter Nachdruck **1994**, (Herausgeber: Maelicke, A.; Müller-Esterl, W.)
- Von Elbe, J.H.; Attoe, E.L. Photochemical degradation of betanin and selected anthocyanins. *Journal of Food Science*, **1981**, 46, 1934-1937
- Von Elbe, J.H.; Maing, I.Y. Betalains as possible food colorants of meat substitutes. *Cereal Science Today*, **1973**, 18, 263-264, 316-317
- Von Elbe, J.H.; Maing, I.Y.; Amundson, C.H. Color stability of betanin. *J. Food Sci.*, **1974**, 39, 334-337
- Von Elbe, J.H.; Schwartz, S.J.; Hildenbrand, B.E. Loss and regeneration of betacyanin pigments during processing of red beets. *J. Food Sci.*, **1981**, 46, 1713-1715
- Walgren, R.A.; Lin, J.T.; Kinne, R.K.H.; Walle, T. Cellular uptake of dietary flavonoid quercetin 4'-beta.-glucoside by sodium-dependent glucose transporter SGLT1. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **2000**, 294(3), 837-843

- Walle, T.; Walle, U.K.; Halushka, P.V. Carbon Dioxide is the major metabolite of Quercetin in humans. *Journal of Nutrition*, **2001**, 131(10), 2648-2652
- Wenzel, U.; Kuntz, S.; Storcksdiek, S.; DeSousa, U.J.; Daniel, H. Food derived flavonoids that affect proliferation, differentiation and apoptosis in human colon carcinoma cells and their mode of action. *Carcinog. Anticarcinog. Factors Food, Symp.*, 3rd, **2000**, 513-518
- Wettasinghe, M.; Bolling, B.; Plhak, L.; Xiao, H.; Parkin, K.; Phase II Enzyme-inducing and antioxidant activities of Beetroot (*Beta vulgaris*) Extracts from Phenotypes of different pigmentation. *J. Agric. Food Chem.*, **2002**, 50, 6704-6709
- Winski, S.L.; Koutalos, Y.; Bentley, D.L.; Ross, D. Subcellular localization of NAD(P):quinone oxidoreductase 1 in human cancer cells. *Cancer Research*, **2002**, 62, 1420-1424
- Wyllie, A.H. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* **1980**, 284, 555-556
- Yeum, K.J.; Russell, R.M. Carotenoid bioavailability and bioconversion. *Annual Reviews of Nutrition*, **2002**, 22, 483-504
- Yusuf, S.; Dagenais, G.; Pogue, J.; Bosch, J.; Sleight, P. Vitamin E supplementation and cardiovascular events in high-risk patients. The Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med.*, **2000**, 342(3), 154-160

Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die Dissertation „Charakterisierung der Bioaktivität der Betalaine Betanin und Indicaxanthin sowie von Extrakten aus der Kaktusfeige (*Opuntia ficus indica*)“ selbständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Ich erkläre außerdem, dass diese Dissertation weder in gleicher oder anderer Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Ich habe früher außer den mit dem Zulassungsgesuch urkundlich vorgelegten Graden keine weiteren akademische Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Mainz, den

Thomas Wickert

Publikationsliste

Veröffentlichungen

Labib, S.; Erb, A.; Kraus, M.; Wickert, T.; Richling, E. The pig caecum model: a suitable tool to study the intestinal metabolism of flavonoids. *Molecular Nutrition and Food Research*, **2004**, 48(4), 326-32.

Posterbeiträge

Heil, M.; Blumenschein, K.; Luan, F.; Wickert, T.; Mosandl, A.

Zur Bestimmung mehrfunktioneller organischer Säuren – Möglichkeiten und Grenzen bekannter Veresterungsmethoden.

Deutscher Lebensmittelchemikertag 2000, 12.09.-13.09.2000, Stuttgart-Hohenheim

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde von Januar 2001 bis März 2004 am Lehrstuhl für Lebensmittelchemie der Universität Würzburg durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. P. Schreier danke ich herzlich für die Überlassung des Themas, die wissenschaftliche Unterstützung und die gewährten Freiräume. Besonderer Dank gilt der von ihm ermöglichten Einrichtung eines Zellkulturlabors an seinem Lehrstuhl.

Herrn Prof. Dr. H.-U. Humpf, gilt mein Dank für die Abwicklung aller mit der baulichen Struktur des neuen Zellkulturlabors zusammenhängenden Dinge sowie für seine Hilfsbereitschaft und tatkräftige Unterstützung im Allgemeinen.

Herrn Prof. Dr. Scheppach danke ich für die Möglichkeit in seinem Labor erste Zellkulturversuche durchzuführen.

Herrn Dr. H. Lührs, Herrn Dr. Fock und Frau Dr. Rdest gilt mein Dank für ihre große Hilfsbereitschaft bei Fragen um und zur Zellkultur. In diesem Zusammenhang danke ich auch Frau Keller, Frau Korte, Herrn Friedl, Herrn Dr. Kudlich, Herrn Dr. Schauber und Herrn Dr. Scheller für ihre Hilfe in der Zellkultur und am Durchflusszytometer.

Bei allen Mitarbeitern des Arbeitskreises Schreier bedanke ich mich für die gute Zusammenarbeit, die gute Arbeitsatmosphäre und die stete Hilfsbereitschaft. Besonders beim „Frauenkeller“ mit Dominique Kavvadias, Diana Kemmer, Samira Labib und Anke Meisner möchte ich mich für die gute Aufnahme in diesen Gefilden, das freundschaftliche Verhältnis und das angenehme Arbeitsklima bedanken. Besonderer Dank gilt auch Frank Heckel für seine tatkräftige Unterstützung bei allen normalen und besonderen Aufgaben, sowie Sandra Elss und Michael Kempf für Literaturbestellungen. Für ihren Einsatz im Rahmen des Fortgeschrittenen-Praktikums danke ich Orcun Kurthan und Martin Röder. Frau Prof. Dr. A.M.A. Pfeiffer danke ich für die Möglichkeit am Nestlé Research Center in Vers chez le Blanc (Schweiz) arbeiten zu können. Frau Dr. S. Blum-Sperisen gilt mein Dank für die Betreuung der Arbeiten in Vers chez le Blanc.

Schließlich danke ich der International Fruit Foundation in Heidelberg, die meine Arbeit fachlich und finanziell unterstützt hat.

Lebenslauf

Name: Thomas Wickert

Anschrift: Am Rosengarten 3, 55131 Mainz

Geboren: 04.07.1974 in Heppenheim/Bergstraße

Religion: römisch-katholisch

Familienstand: ledig

Eltern: Alfred Wickert, Bäckermeister
Rosel Wickert, geb. Kuhn, Bürokauffrau

Schulbildung: August 1981 bis Juli 1985
Peter Schöffler-Grundschule in Gernsheim/Rhein

August 1985 bis Juli 1987
Johannes Gutenberg-Haupt- und Realschule in Gernsheim/Rhein

August 1987 bis Juni 1994
Gymnasium Gernsheim/Rhein

Zivildienst: Juli 1994 bis Oktober 1995
Deutsches Rotes Kreuz, Kreisverband Groß-Gerau

Studium: Oktober 1995 bis Oktober 1999
Studium der Lebensmittelchemie an der Johann Wolfgang
Goethe-Universität Frankfurt/Main
Hauptprüfung Teil A für Lebensmittelchemiker am 08.10.1999

November 1999 bis April 2000
Praktikum bei Nutrinova Nutrition Specialties & Food Ingredients
GmbH, Frankfurt/Main

Mai 2000 bis November 2000

Praktikum am Staatlichen Medizinal-, Veterinär- und Lebensmitteluntersuchungsamt Nordhessen in Kassel

Hauptprüfung Teil B am 22.11.2000, Abschluss: Staatlich geprüfter Lebensmittelchemiker

Promotion:

Januar 2001 bis März 2004

Anfertigung der Promotionsarbeit am Lehrstuhl für Lebensmittelchemie der Universität Würzburg.

Betreuer: Prof. Dr. P. Schreier

Januar 2001 bis Dezember 2001 Stipendiat der International Fruit Foundation, Heidelberg.

September 2001 bis Dezember 2001 Forschungsaufenthalt am Nestlé Research Center, Vers chez le Blanc

Beruflicher Weg:

September 2004 bis August 2005

Produktionsleiter bei der Scheffler Plantafood GmbH, Leiningen/Hunsrück

Seit Mai 2006

Gruppenleiter bei der Roche Diagnostics GmbH, Mannheim