

„DIE ENDLOSIGKEIT DES WISSENSCHAFTLICHEN RINGENS SORGT UNABLÄSSIG DAFÜR,  
DASS DEM FORSCHENDEN MENSCHENGEIST SEINE BEIDEN EDELSTEN ANTRIEBE  
ERHALTEN BLEIBEN UND IMMER WIEDER VON NEUEM ANGEFACHT WERDEN:

DIE BEGEISTERUNG UND DIE EHRFURCHT.“

*MAX PLANCK (1858-1947)*

**Vom Antioxidanz zum Genregulator:  
Transkriptionelle Regulation von  
Phase I- und Phase II-Enzymen durch Vitamin E und  
antioxidative sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe**

**DISSERTATION**

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doktor der Naturwissenschaften  
- doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.) -  
in der Wissenschaftsdisziplin „Biochemie der Ernährung“

eingereicht an der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Universität Potsdam



von

**DIRK KLUTH**

Potsdam, im April 2006

**Gutachter/innen:**

*Prof. Dr. Regina Brigelius-Flohé*

Deutsches Institut für Ernährungsforschung Potsdam-Rehbrücke  
Abteilung Biochemie der Mikronährstoffe

*Prof. Dr. Doris Marko*

Universität Karlsruhe (TH)  
Institut für Angewandte Biowissenschaften, Abteilungen für Lebensmittelchemie und  
Lebensmitteltoxikologie

*Prof. Dr. Thomas Kietzmann*

Technische Universität Kaiserslautern  
Fachbereich Chemie, Institut für Biochemie

**Disputation:** 10. Oktober 2006

***MEINEN ELTERN UND  
MEINEM BRUDER VOLKER GEWIDMET.***

„WEGE ENTSTEHEN DADURCH,  
DASS MAN SIE GEHT.“

*FRANZ KAFKA (1883-1924)*

## Inhaltsverzeichnis

<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>IV</b>
<b>TABELLENVERZEICHNIS</b> .....	<b>VI</b>
<b>ABKÜRZUNGEN</b> .....	<b>VII</b>
<b>1 EINLEITUNG</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 Oxidativer Stress und Antioxidanzien</b> .....	<b>1</b>
1.1.1 Ursachen und Wirkungen des oxidativen Stresses.....	1
1.1.2 Antioxidative Schutzmechanismen.....	2
<b>1.2 Antioxidative Nahrungsinhaltsstoffe</b> .....	<b>3</b>
1.2.1 Vitamin E.....	3
1.2.1.1 Aufnahme, Verteilung und Metabolismus von Vitamin E.....	5
1.2.1.2 Antioxidative und nicht-antioxidative Wirkungen von Vitamin E.....	7
1.2.2 Sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe.....	9
<b>1.3 Biotransformation</b> .....	<b>11</b>
1.3.1 Regulation von Phase I-Enzymen.....	12
1.3.2 Regulation von Phase II-Enzymen.....	14
<b>1.4 Antioxidanzien - Kritische Betrachtung</b> .....	<b>15</b>
<b>1.5 Ziele der Arbeit</b> .....	<b>17</b>
<b>2 MATERIALIEN</b> .....	<b>18</b>
<b>2.1 Chemikalien und Enzyme</b> .....	<b>18</b>
<b>2.2 Zellkulturmaterialien, Antibiotika und Antikörper</b> .....	<b>18</b>
<b>2.3 Puffer und Lösungen</b> .....	<b>18</b>
<b>2.4 Plasmide</b> .....	<b>18</b>
2.4.1 Reporter- und Expressionsplasmide.....	19
2.4.2 Allgemeine Plasmide.....	20
<b>2.5 Oligonukleotide</b> .....	<b>20</b>
<b>2.6 Pflanzenextrakte und Substanzen</b> .....	<b>21</b>
<b>3 METHODEN</b> .....	<b>22</b>
<b>3.1 Die Zellkultur als <i>in vitro</i> Testsystem</b> .....	<b>22</b>
3.1.1 Kultivierung der Zellen.....	22
3.1.2 Subkultivierung der Zellen.....	23
3.1.3 Bestimmung der Zellzahl.....	23
3.1.4 Auftauen der Zellen.....	23
<b>3.2 Das Tierexperiment als <i>in vivo</i> Testsystem</b> .....	<b>23</b>
3.2.1 Tiermodell und Haltungsbedingungen.....	23
3.2.2 Versuchsaufbau und -ablauf .....	24

<b>3.3</b>	<b>Vitamin E-Analytik</b> .....	<b>25</b>
3.3.1	Probengewinnung .....	25
3.3.2	Messung des Vitamin E-Gehalts in Zellen .....	25
3.3.3	Messung der Vitamin E-Metabolite im Medium.....	26
3.3.4	Bestimmung von Response-Faktoren .....	27
<b>3.4</b>	<b>Molekularbiologische und biochemische Methoden</b> .....	<b>28</b>
3.4.1	MTT-Test.....	28
3.4.2	Proteinbestimmung .....	29
3.4.3	RNA-Isolierung .....	29
3.4.3.1	RNA-Extraktion aus Zellen .....	29
3.4.3.2	RNA-Extraktion aus Mäuse-Gewebe.....	29
3.4.3.3	Bestimmung von Konzentration und Reinheit der RNA.....	30
3.4.4	DNA-Gewinnung .....	30
3.4.4.1	Reverse-Transkriptase-Reaktion.....	30
3.4.4.2	Bestimmung von Konzentration und Reinheit der cDNA.....	31
3.4.5	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) .....	31
3.4.5.1	Quantifizierung der Genexpression mittels semiquantitativer PCR.....	32
3.4.5.2	Quantifizierung der Genexpression mittels real-time PCR .....	32
3.4.6	In vitro Transkription und Translation von humanen PXR und RXR .....	33
3.4.7	EMSA .....	33
3.4.7.1	Mutagenese PCR .....	34
3.4.8	Herstellung von Reportergenkonstrukten.....	35
3.4.8.1	Klonierung .....	35
3.4.8.2	DNA-Fällung .....	36
3.4.8.3	Fragmentelution aus Agarosegelen.....	37
3.4.8.4	Ligation von DNA-Fragmenten .....	37
3.4.8.5	Transformation von <i>E. coli</i> .....	37
3.4.8.6	Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien und Sequenzierung.....	38
3.4.9	Transiente Transfektion von Luciferase-Reportergenvektoren .....	38
3.4.9.1	Lyse transfizierter Zellen .....	39
3.4.10	Bestimmung der Reportergenaktivität.....	39
3.4.10.1	Luciferasemessung .....	39
3.4.10.2	$\beta$ -Galaktosidasemessung .....	40
3.4.11	SDS-Gelelektrophorese und Western-Blot.....	40
3.4.11.1	Gewinnung von Kernlysaten.....	40
3.4.11.2	SDS-PAGE .....	41
3.4.11.3	Western Blot .....	42
<b>3.5</b>	<b>Statistik</b> .....	<b>42</b>
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>43</b>
<b>4.1</b>	<b>Zelluläre Akkumulation, Metabolismus und Toxizität von Vitamin E</b> .....	<b>43</b>
4.1.1	Vitamin E-Gehalt in Zellen ist abhängig von der angebotenen Vitamin E-Form ....	43
4.1.2	Die Metabolisierungsrate der Vitamin E-Formen ist unterschiedlich.....	44
4.1.3	Zelluläre Akkumulation von Vitamin E ist nicht vom $\alpha$ -TTP abhängig.....	46
4.1.4	Unterschiedliche Toxizität der verschiedenen Vitamin E-Formen.....	48

<b>4.2</b>	<b>Regulation von Phase I-Enzymen durch Vitamin E und antioxidative sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe</b>	<b>51</b>
4.2.1	Vitamin E induziert die Genexpression von Phase I-Enzymen <i>in vitro</i>	51
4.2.1.1	Vitamin E-Formen aktivieren den Promotor des CYP3A4	51
4.2.1.2	$\gamma$ -Tocotrienol induziert die Expression der endogenen mRNA von CYP3A4 und CYP3A5	53
4.2.1.3	$\gamma$ -Tocotrienol beeinflusst nicht die Bindung des PXR an die DNA	54
4.2.2	Vitamin E induziert die Genexpression von Phase I-Enzymen <i>in vivo</i>	55
4.2.2.1	$\alpha$ -Tocopherol induziert die mRNA von Cyp3a11 in der Leber	55
4.2.2.2	$\gamma$ -Tocotrienol hat keinen Einfluss auf die Cyp3a11 Expression in der Leber	58
4.2.2.3	$\gamma$ -Tocotrienol erhöht die $\alpha$ -TTP mRNA-Expression in der Leber	60
4.2.3	Antioxidative sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe und die Genexpression von Phase I-Enzymen	61
4.2.3.1	Einfluss von sekundären Pflanzeninhaltsstoffen auf die PXR-Aktivierung	61
4.2.3.2	Aktivierung des CYP3A4-Promotors	62
<b>4.3</b>	<b>Regulation von Phase II-Enzymen durch Vitamin E und antioxidative sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe</b>	<b>64</b>
4.3.1	Vitamin E wirkt nicht auf das Nrf2/Keap1-System	64
4.3.2	Einfluss von sekundären Pflanzeninhaltsstoffen auf das Nrf2/Keap1-System	65
4.3.2.1	Aktivierung des „Antioxidant Response Elements“ (ARE)	65
4.3.2.2	Aktivierung des GI-GPx-Promotors	66
4.3.2.3	Translokation von Nrf2 in den Kern	68
<b>5</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>70</b>
<b>5.1</b>	<b>Zelluläre Akkumulation und Metabolismus von Vitamin E</b>	<b>70</b>
5.1.1	Die zelluläre Akkumulation ist abhängig von der Vitamin E-Form	70
5.1.2	Verschiedene Vitamin E-Formen werden unterschiedlich stark metabolisiert	74
<b>5.2</b>	<b>Regulation von Phase I- und Phase II-Enzymen durch antioxidative Nahrungsinhaltsstoffe</b>	<b>76</b>
5.2.1	Regulation durch Vitamin E	76
5.2.2	Regulation durch sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe	80
5.2.2.1	Einfluss auf PXR und CYP3A4	80
5.2.2.2	Einfluss auf das Nrf2/Keap1-System und den GI-GPx-Promotor	83
<b>5.3</b>	<b>Genregulation durch Nahrungsinhaltsstoffe - „Nutrigenomics“</b>	<b>86</b>
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>89</b>
<b>7</b>	<b>LITERATUR</b>	<b>92</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: ROS-Bildung und enzymatischer ROS-Abbau.....	2
Abb. 2: Vitamin E-Formen .....	4
Abb. 3: Metabolismus des Vitamin E .....	7
Abb. 4: Lipid-Peroxidation durch freie Radikale.....	8
Abb. 5: Polyphenole.....	10
Abb. 6: Wichtige regulatorische Elemente des CYP3A4-Promotors .....	13
Abb. 7: Vereinfachte Übersicht der Regulation von Phase I- und Phase II-Enzymen am Beispiel des PXR- und Nrf2-Weges .....	15
Abb. 8: schematische Darstellung des Tierversuches.....	24
Abb. 9: Klonierungsstrategie.....	36
Abb. 10: Vitamin E-Gehalt in HepG2-Zellen nach Inkubation mit Vitamin E .....	44
Abb. 11: CEHC-Freisetzung nach Inkubation mit Vitamin E.....	45
Abb. 12: CMBHC-Freisetzung nach Inkubation mit Vitamin E.....	45
Abb. 13: Vitamin E-Gehalt in HepG2-Zellen und HepG2 <sup>αTTP</sup> -Zellen nach Inkubation mit Vitamin E .....	47
Abb. 14: Zytotoxizität der Vitamin E-Formen in HepG2-Zellen.....	49
Abb. 15: Zytotoxizität der Vitamin E-Formen in Caco-2-Zellen.....	50
Abb. 16: Potentielle PXR/RXR-Bindungsstellen im CYP3A4-Promotor .....	51
Abb. 17: Aktivierung des CYP3A4-Promotors durch Tocopherole .....	52
Abb. 18: Aktivierung des CYP3A4-Promotors durch Tocotrienole .....	53
Abb. 19: Endogene Expression der mRNA von CYP3A4 und CYP3A5 .....	54
Abb. 20: Einfluss von $\gamma$ -Tocotrienol auf die Bindung des PXR an die DNA.....	55
Abb. 21: $\Delta C_T$ -Wert-Vergleich.....	56
Abb. 22: Expression der Cyp3a11 mRNA in Abhängigkeit von $\alpha$ -Tocopherol.....	57
Abb. 23: Expression der Cyp3a11 mRNA in Abhängigkeit von $\gamma$ -Tocotrienol.....	59
Abb. 24: Einfluss der Schlündefelung auf die Expression der Cyp3a11 mRNA.....	59
Abb. 25: Einfluss von $\alpha$ -Tocopherol und $\gamma$ -Tocotrienol auf die Expression der $\alpha$ -TTP mRNA in der Leber .....	60
Abb. 26: Aktivierung des responsiven Elements des PXR (DR3).....	61
Abb. 27: Aktivierung des CYP3A4-Promotors durch antioxidative Substanzen .....	62
Abb. 28: Aktivierung des CYP3A4-Promotors durch verschiedene Pflanzenextrakte .....	63
Abb. 29: Einfluss von Vitamin E auf die GI-GPx-Promotoraktivität.....	64
Abb. 30: Aktivierung des HO- und GI-ARE in HepG2-Zellen.....	65
Abb. 31: Aktivierung des HO- und GI-ARE in Caco-2-Zellen .....	66

---

Abb. 32: Einfluss auf die GI-GPx-Promotoraktivität.....	67
Abb. 33: Einfluss auf die GI-GPx-Promotoraktivität.....	67
Abb. 34: Rolle der ARE-Sequenz bei der Aktivierung des GI-GPx-Promotors durch Thymianextrakt und Quercetin.....	68
Abb. 35: Translokation von Nrf2 in den Kern.....	69
Abb. 36: Rolle von antioxidativen Nahrungsinhaltsstoffen bei der Aktivierung der zelleigenen Abwehr .....	88

---

## Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Verwendete Reporter- und Expressionsplasmide .....	19
Tab. 2: Plasmide zur Klonierung von Oligonukleotiden .....	20
Tab. 3: Oligonukleotide .....	20
Tab. 4: Verwendete Pflanzenextrakte .....	21
Tab. 5: Verwendete nicht kommerziell erworbene Substanzen .....	21
Tab. 6: Verwendete Zellkulturgefäße .....	22
Tab. 7: Standard-PCR-Protokolle .....	31
Tab. 8: Zusammensetzung von Sammel- und Trenngel .....	41
Tab. 9: $\alpha$ -Tocopherol-Gehalt in Leber und Plasma .....	56
Tab. 10: Einfluss von $\gamma$ -Tocotrienol auf den $\alpha$ -Tocopherol-Gehalt in der Leber .....	58
Tab. 11: Übersicht der <i>in vitro</i> -Ergebnisse zur transkriptionellen Regulation von Phase I- und Phase II-Enzymen .....	90

## Abkürzungen

AhR	<i>aryl hydrocarbon receptor</i>
AMP	Adenosinmonophosphat
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ARE	<i>antioxidant response element</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA</i>
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
CAR	<i>constitutive androstane receptor</i>
CEHC	Carboxyethylhydroxychroman [2-(2'-Carboxyethyl)-6-Hydroxychroman]
CMBHC	Carboxymethylbutylhydroxychroman [2-(4'-Carboxy-4'-methylbutyl)-hydroxychroman]
COX	Cyclooxygenase
CYP	Cytochrom P450 abhängige Monooxygenase
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dI-dC	Deoxyinosidphosphat-Deoxycytidinphosphat
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
DTT	1,4-Dithiothreitol
ECD	Elektrochemischer Detektor
EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure
engl.	englisch
FCS	fetales Kälberserum
FXR	<i>farnesoid X receptor</i>
$\gamma$ -GCS	<i><math>\gamma</math>-glutamyl-cysteine synthase</i>
GI-GPx	gastrointestinale Glutathionperoxidase
GR	<i>glucocorticoid receptor</i>
HDL	<i>high density lipoproteins</i>
HO	Hämoxygenase-1
HPRT	Hypoxanthin-Guanin Phosphoribosyltransferase
kDa	Kilodalton
Keap1	Kelch-like ECH-associated protein-1
k.o.	<i>knockout</i>

---

lat.	lateinisch
LDL	<i>low density lipoproteins</i>
LXR	<i>liver X receptor</i>
MOPS	4-Morpholinpropansulfonsäure
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazolyl-2)-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid
NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (reduzierte Form)
NF-κB	Nukleärer Faktor κB
Nrf2	<i>NF-E2 related factor-2</i>
OD	optische Dichte
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PPAR	<i>peroxisome proliferator-activated receptor</i>
PXR	<i>pregnane X receptor</i>
RPMI	<i>Rosewell Park Memorial Institute Medium</i>
RNS	reaktive Stickstoffspezies ( <i>reactive nitrogen species</i> )
ROS	reaktive Sauerstoffspezies ( <i>reactive oxygen species</i> )
RT	Raumtemperatur
RXR	<i>retinoid X receptor</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SR-B1	<i>scavenger receptor class B type 1</i>
T3	Tocotrienol
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Toc	Tocopherol
Toc-ac	Tocopherylacetat
TTBS	Tween-TBS
α-TTP	α-Tocopherol-Transfer-Protein
vgl.	vergleiche
VLDL	<i>very low density lipoproteins</i>

Ergebnisse der vorliegenden Dissertation wurden bereits teilweise veröffentlicht in:

Landes, N., Pfluger, P., Kluth, D., Birringer, M., Rühl, R., Böhl, G. F., Glatt, H. and Brigelius-Flohé, R. (2003). Vitamin E activates gene expression via the pregnane X receptor, *Biochem Pharmacol* 65, 269-273

Kluth, D., Landes, N., Pfluger, P., Müller-Schmehl, K., Weiss, K., Bumke-Vogt, C., Ristow, M. and Brigelius-Flohé, R. (2005). Modulation of Cyp3a11 mRNA expression by alpha-tocopherol but not gamma-tocotrienol in mice, *Free Radic Biol Med* 38, 507-514

# 1 Einleitung

## 1.1 Oxidativer Stress und Antioxidanzen

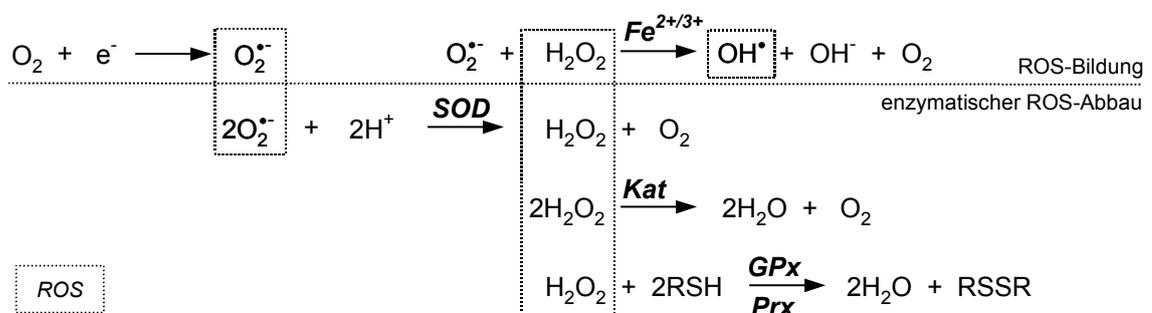
### 1.1.1 Ursachen und Wirkungen des oxidativen Stresses

In vielen eukaryontischen Zelltypen entstehen bei physiologischen Prozessen, wie enzymatischen Oxidationen oder Zellatmung, ständig reaktive Sauerstoffradikale und -verbindungen, die u.a. als Botenstoffe und zur Abwehr bakterieller Infektionen dienen. Bedingt durch ihre Elektronenkonfiguration besitzen Sauerstoffradikale eine hohe chemische Reaktivität und können aufgrund dieser Eigenschaft biologische Strukturen dauerhaft schädigen. Zu den Sauerstoffradikalen zählen u.a. das Superoxidanion- ( $O_2^{\bullet-}$ ), das Perhydroxyl- ( $HOO^{\bullet}$ ), das Hydroxyl- ( $HO^{\bullet}$ ), das Alkoxyl- ( $RO^{\bullet}$ ) und das Peroxylradikal ( $ROO^{\bullet}$ ). Neben Sauerstoff ist Stickstoff das zweite wichtige Molekül, das Ausgangssubstanz für die Bildung freier Radikale ist. Aus Sauerstoff- und Stickstoffradikalen können *in vivo* nicht-radikale Folgeprodukte entstehen, die teilweise eine noch größere Toxizität besitzen. So reagiert z.B. das Superoxidanionradikal mit Stickstoffmonoxid zum Peroxynitrit ( $ONOO^-$ ) oder wird zu Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) umgewandelt. Zusammengefasst werden Radikale und deren oxidierte Folgeprodukte auch als reaktive Sauerstoff- (ROS, engl. *reactive oxygen species*) bzw. Stickstoffspezies (RNS, engl. *reactive nitrogen species*) bezeichnet. Diese können Prozesse auslösen, die zum sog. oxidativen Stress in der Zelle führen. Als oxidativer Stress wird das Ungleichgewicht zwischen Bildung und Abbau von ROS oder RNS bezeichnet, wenn dies zugunsten der Bildung ausfällt. Oxidativer Stress kann neben endogenen Ursachen auch durch exogene Faktoren wie Ozon, UV-Strahlung und Toxine (z.B. Nikotin oder Alkohol) begünstigt werden. ROS oder RNS sind aus mehreren Gründen zellpathogen. Sie können DNA-Strangbrüche induzieren, Onkogene aktivieren, Tumorsuppressorgene hemmen sowie Enzyme oder Proteine inaktivieren. Eine der am häufigsten untersuchten Reaktionen ist die Lipid-Peroxidation an Zellmembranen und Lipiden. Oxidativer Stress und insbesondere die Lipid-Peroxidation werden mit Krankheiten wie arteriosklerotische Herz-Kreislauf-Erkrankungen, Krebs aber auch mit Diabetes mellitus und neurologischen Erkrankungen, wie Alzheimer und Parkinson, in Verbindung gebracht (Übersicht in [1, 2]).

Entgegen früherer Denkansätze lassen sich heute oxidative Prozesse nicht mehr ausschließlich mit zellpathologischen Veränderungen in Zusammenhang bringen. Geringe Verschiebungen des zellulären Redoxgleichgewichts können durchaus als physiologisch angesehen werden. Ein moderater oxidativer Stress kann auch günstige Auswirkungen haben, da die Zelle so auf akute größere oxidative Stressphasen vorbereitet ist.

### 1.1.2 Antioxidative Schutzmechanismen

Im Organismus sind mehrere antioxidative Schutzmechanismen vorhanden. Dazu gehören enzymatische Abfangreaktionen und niedermolekulare Antioxidanzien. Unter engem Zusammenwirken bilden Superoxiddismutase, Katalase, Glutathionperoxidasen und Peroxiredoxine das enzymatische Schutzsystem (Abb. 1). Die Superoxiddismutase katalysiert die Umsetzung des Superoxidanionradikals zu Wasserstoffperoxid und Sauerstoff. Die Umsetzung des entstandenen Wasserstoffperoxids zu Wasser und Sauerstoff wird durch die Katalase, die Glutathionperoxidasen oder Peroxiredoxine katalysiert. Die Selen-abhängigen Glutathionperoxidasen und die Peroxiredoxine können neben Wasserstoffperoxid auch andere organische Hydroperoxide zu Wasser und den entsprechenden Alkoholen umsetzen, wobei reduziertem Glutathion oder Thioredoxin reversibel zum Disulfid oxidiert wird. Das Disulfid wird durch die Glutathion- bzw. Thioredoxinreduktase wieder in die reduzierte Form umgewandelt. Neben den intrazellulären antioxidativen Enzymsystemen gibt es auch die nicht-enzymatischen Antioxidanzien. Zu dieser Gruppe zählen Vitamin E und Vitamin C sowie Polyphenole, wie z.B. Flavonoide. Weiterhin zählen auch Harnsäure, Ubichinon, Glutathion und verschiedene Eisen-bindende Proteine (durch Hemmung der Fenton- bzw. Haber-Weiß-Reaktion) zu den nicht-enzymatischen Antioxidanzien (Übersicht in [2-4]).



**Abb. 1: ROS-Bildung und enzymatischer ROS-Abbau**

ROS-Bildung durch Übertragung eines Elektrons auf molekularen Sauerstoff und die durch Eisen(oder Kupfer)-katalysierte Fenton- bzw. Haber-Weiß-Reaktion; enzymatischer ROS-Abbau durch Superoxiddismutase (SOD), Katalase (Kat), Glutathionperoxidasen (GPx) und Peroxiredoxine (Prx); RSH – reduziertem Thiol-Protein (bei GPx: hauptsächlich Glutathion, bei Prx: Thioredoxin, Glutaredoxin), RSSR – Disulfid

Wie effektiv sowohl die enzymatischen als auch die nicht-enzymatischen antioxidativen Schutzmechanismen letztendlich funktionieren, wird u.a. durch die Ernährung beeinflusst. Die Ernährung stellt z.B. mit den Vitaminen, die eine direkte Schutzwirkung entfalten können, und den essentiellen Spurenelementen wie Kupfer, Zink, Mangan, Eisen oder Selen, die die Wirkung antioxidativer Enzyme ermöglichen, die Bausteine bereit, die das

antioxidative Schutzsystem benötigt. Um dieses System des Körpers zu unterstützen, müssen die erforderlichen Mikronährstoffe und andere Nahrungsinhaltsstoffe täglich in ausreichenden Mengen zugeführt werden. Dabei sollte aber immer die individuelle Wirkungsweise der einzelnen Substanzen sowie deren mögliche toxische Eigenwirkung beachtet und bekannt sein.

## 1.2 Antioxidative Nahrungsinhaltsstoffe

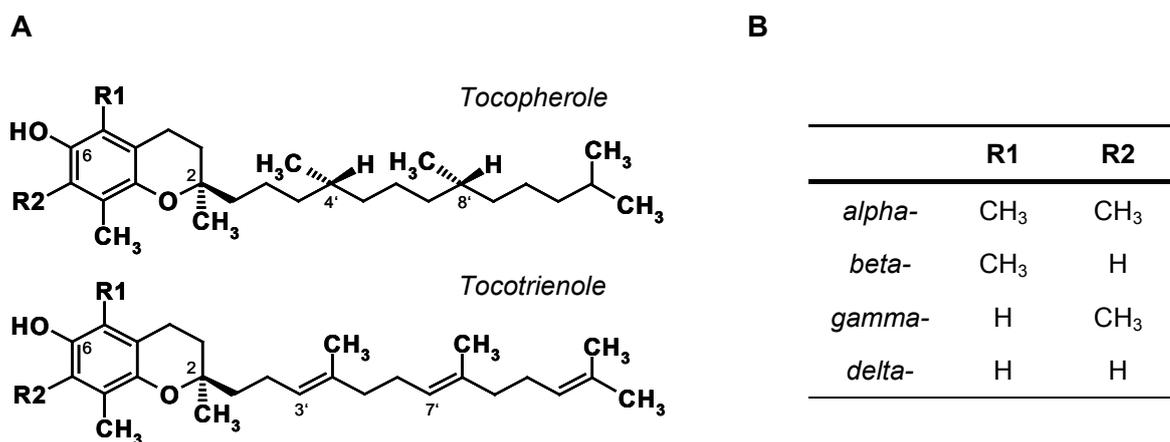
Nahrungsinhaltsstoffe sind an vielen Steuerungsprozessen und Stoffwechselreaktionen beteiligt. Insbesondere den mit der Nahrung aufgenommenen Mikronährstoffen und sekundären Pflanzeninhaltsstoffen kommt eine besondere Bedeutung für die Aufrechterhaltung eines gesunden Organismus zu. Zu den Nahrungsinhaltsstoffen, denen antioxidative Eigenschaften zugeschrieben werden, zählen hauptsächlich die Mikronährstoffe Vitamin C und E sowie verschiedene sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe (z.B. Flavonoide und andere Polyphenole). Neben den nachgesagten antioxidativen Eigenschaften besitzen diese Nahrungsinhaltsstoffe aber auch nicht-antioxidative Eigenschaften bzw. Funktionen. Diesen Funktionen des Vitamin E und verschiedener sekundärer Pflanzeninhaltsstoffe soll sich in dieser Arbeit besonders gewidmet werden.

### 1.2.1 Vitamin E

Vitamin E wird noch heute häufig als wichtigstes lipophiles Antioxidanz bezeichnet. Entdeckt wurde es jedoch als „Fruchtbarkeits-Vitamin“. Herbert M. Evans und Katherine S. Bishop wiesen 1922 als erste auf einen bis dahin unbekanntem fettlöslichen Faktor hin, der für die Reproduktion von Ratten essentiell war [5]. Zunächst wurde der fehlende Faktor als Bestandteil von Salat oder Weizenkeimöl beschrieben. In den Folgejahren wurde er auch aus Milch, Hafer und Mais isoliert, als Vitamin erkannt und aufgrund der bereits bekannten Vitamine A, B, C und D nun Vitamin E genannt [6]. Abgeleitet von den altgriechischen Wörtern  $\tau\omicron\kappa\omicron\varsigma$  (tocos = Geburt) und  $\phi\acute{\epsilon}\rho\epsilon\iota\nu$  (pherein = voranbringen) und ergänzt um die Kennzeichnung als Alkohol (-ol) wurde das Vitamin E im Jahre 1936 zum ersten Mal „Tocopherol“ genannt [7]. Zwei Jahre später erfolgte die vollständige Strukturklärung und Synthese der Tocopherole [8, 9]. Vertreter der ebenfalls zu den Vitamin E-Formen zählenden Tocotrienole wurden erst später beschrieben und synthetisiert [10-13].

Vitamin E ist heute der Sammelbegriff für alle in der Natur vorkommenden Tocopherole und Tocotrienole. Alle Vitamin E-Formen werden ausschließlich in photosynthetisch aktiven Organismen wie Pflanzen und Cyanobakterien synthetisiert (für Tocopherole illustriert in [14, 15]). Die Grundstruktur aller Vitamin E-Formen bildet ein an Position 6 hydro-

xylierter Chromanring, der an Position 2 bei Tocopherolen mit einer gesättigten Seitenkette und bei Tocotrienolen mit einer ungesättigten Seitenkette verknüpft ist (Abb. 2 A). Aufgrund ihrer chemischen Struktur besitzen die Tocopherole drei chirale Zentren an den C-Atomen 2, 4' und 8'. Bei den in der Natur vorkommenden Tocopherolen liegt stets die *RRR*-Konfiguration vor (*RRR*-Tocopherole), während synthetisch hergestellte Tocopherole (*all-rac*-Tocopherole) in Abhängigkeit vom Syntheseweg entweder aus einem Gemisch aller acht möglichen Stereoisomere (*RRR*, *RRS*, *RSR*, *RSS*, *SSS*, *SSR*, *SRS*, *SRR*) oder den Epimeren an Position 2 (*RRR*, *SRR*) bestehen. Die Tocotrienole besitzen nur ein chirales Zentrum am C-Atom 2, so dass im Gegensatz zu den Tocopherolen nur zwei Stereoisomere (*R* oder *S*) auftreten können. Durch die Doppelbindungen an den Positionen 3' und 7' können die Tocotrienole jedoch als *cis/trans*-Isomere auftreten [16]. Sowohl die Tocopherole als auch die Tocotrienole werden in Abhängigkeit der Methylierung ihres Chromanrings in eine  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - oder  $\delta$ -Form unterteilt (Abb. 2 B). Abhängig von der Anzahl und der Verteilung der Methylgruppen und den Stereoisomeren variiert die biologische Aktivität der Vitamin E-Formen. Sie wird in „Internationalen Einheiten“ (IE oder IU, engl. *international units*) angegeben, wobei für 1 mg *all-rac*- $\alpha$ -Tocopherylacetat eine Aktivität von 1 IE definiert wurde [17]. Alle anderen Vitamin E-Formen und -Derivate werden auf diesen Wert bezogen. Basierend auf Fetusresorptionstests an Ratten besitzt das *RRR*- $\alpha$ -Tocopherol mit 1,49 IE die höchste biologische Aktivität, gefolgt vom *RRR*- $\alpha$ -Tocopherylacteat mit 1,36 IE und dem *all-rac*- $\alpha$ -Tocopherol mit 1,10 IE [18].



**Abb. 2: Vitamin E-Formen**

(A) Chemische Grundstruktur der Tocopherole und Tocotrienole (B) Anzahl und Position der Methylgruppen der verschiedenen Vitamin E-Formen.

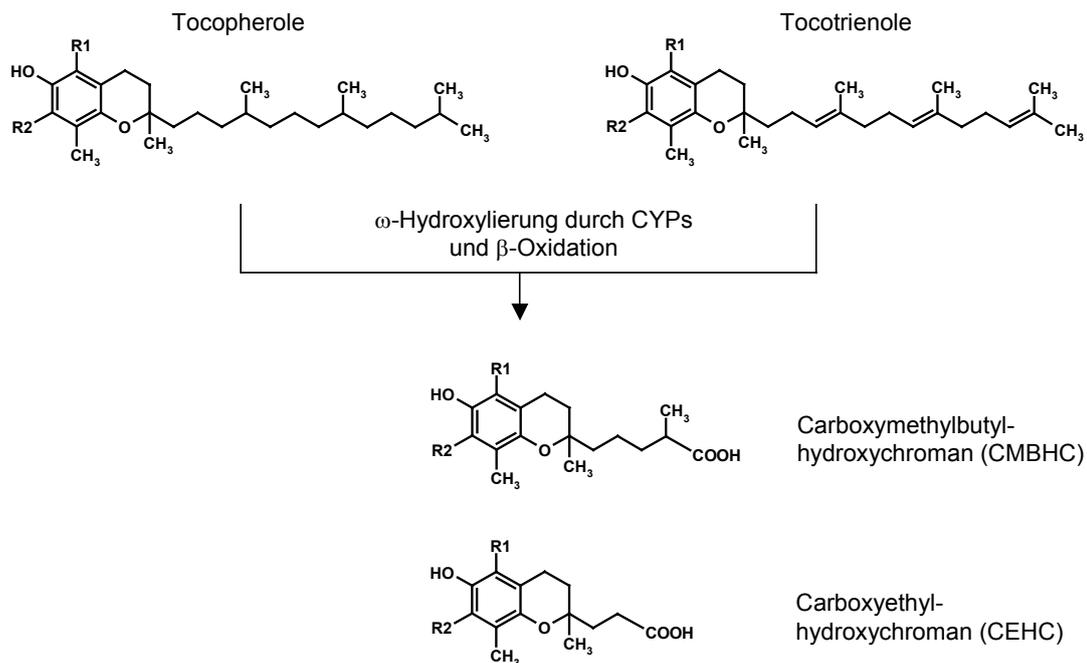
### 1.2.1.1 Aufnahme, Verteilung und Metabolismus von Vitamin E

Vitamin E kommt in fast allen Nahrungsmitteln vor. Dabei sind pflanzliche Keimöle, Samen, Nüsse und Getreidekörner die wichtigsten Quellen für Vitamin E, weil es sich im Fettanteil der Pflanzen, d.h. vorwiegend im Pflanzenkeim, befindet. Die Mechanismen der Absorption und Verteilung von Vitamin E sind in mehreren Übersichtsartikeln zusammengefasst worden (z.B. [19-27]). Danach ist die Absorption des Vitamin E im Darm an einen intakten Fettstoffwechsel sowie die Anwesenheit von genügend Gallenflüssigkeit gebunden und erfolgt mit den Nahrungslipiden. Enzyme des Pankreas und Gallensäuren ermöglichen die Triglyceridhydrolyse und die Bildung von Micellen, in deren lipophilen Kernen Vitamin E eingeschlossen wird. Über diesen Einschluss erfolgt die Aufnahme in die intestinalen Mukosazellen. Veresterte Vitamin E-Formen (Tocopherylester) werden vor ihrer Absorption durch eine pankreatische Esterase oder zu einem geringen Teil auch in den Mukosazellen durch eine intrazelluläre Esterase gespalten [28]. In den Intestinalzellen erfolgt die Bildung von Lipoproteinpartikeln, den Chylomikronen, mit denen das Vitamin E und die anderen Nahrungslipide über das Lymphsystem in den Blutkreislauf und zur Leber gelangen. Während der Lipolyse der Chylomikronen durch eine Lipoproteinlipase gelangt ein geringer Teil der Tocopherole und Tocotrienole bereits ins Gewebe. Der weitaus größere Teil gelangt mit den Chylomikronen-Remnants in die Leber. Die Absorptionsrate der Vitamin E-Formen wird auf bis zu 70 % geschätzt, sie sinkt jedoch mit steigender Dosis. Bis zur Aufnahme in die Leber gibt es keine Unterscheidung zwischen den verschiedenen Vitamin E-Formen und Stereoisomeren. Erst in der Leber kommt es zu einer Sortierung zwischen den Vitamin E-Formen. Das hepatische  $\alpha$ -Tocopherol-Transfer-Protein ( $\alpha$ -TTP) sortiert aus allen Vitamin E-Formen bevorzugt das *RRR*- $\alpha$ -Tocopherol aus und vermittelt dessen Sekretion in die Blutzirkulation (illustriert in [29]). Es gibt aber auch Hinweise darauf, dass die  $\alpha$ -Tocopherol-Sekretion über den ABC-Transporter A1 erfolgt und somit mit dem zellulären Cholesteroltransport verbunden ist [30-32]. Der Einbau des  $\alpha$ -Tocopherols in die VLDL erfolgt vermutlich erst im sinusoidalen Spalt der Leber. Mit der Umwandlung der VLDL zu LDL gelangt das  $\alpha$ -Tocopherol in die LDL. Von den VLDL und LDL kann das  $\alpha$ -Tocopherol mit Hilfe des Phospholipid-Transfer-Proteins und einer Lipoprotein-Lipase auf die HDL übertragen werden. Das vorrangig in LDL und HDL gebundene  $\alpha$ -Tocopherol [33] wird von den Geweben bei LDL-assoziiertem  $\alpha$ -Tocopherol über den LDL-Rezeptor und bei HDL-assoziiertem  $\alpha$ -Tocopherol über den SR-B1-Rezeptor (engl. *scavenger receptor class B type 1*) aufgenommen (illustriert in [26, 34]). Alle anderen Formen werden nach bisherigem Kenntnisstand über Fäzes und Galle oder metabolisiert über den Urin ausgeschieden.

Das  $\alpha$ -TTP wurde erstmals in den 70er Jahren als ein cytosolisches Leberprotein in der Ratte beschrieben, welches  $\alpha$ -Tocopherol bindet [35, 36]. In den Folgejahren konnte

gezeigt werden, dass das  $\alpha$ -TTP beim Menschen in der Leber [37], in der Placenta [38, 39] und im Gehirn [40] exprimiert ist. Das  $\alpha$ -TTP ist ein 32 kDa großes Protein, das aufgrund seiner im Vergleich zu allen anderen Vitamin E-Formen sehr großen Affinität zum  $\alpha$ -Tocopherol [41] entscheidend zur Anreicherung von  $\alpha$ -Tocopherol im Blutplasma beiträgt. Wie das geschieht, ist jedoch noch relativ unklar. Eine erst kürzlich erschienene Arbeit postuliert eine intrazelluläre Transportfunktion des  $\alpha$ -TTP; den Transport von  $\alpha$ -Tocopherol zur Zellmembran [42]. Ein  $\alpha$ -TTP-Mangel führt zu einem extrem niedrigen  $\alpha$ -Tocopherol-Spiegel im Blutplasma und damit zu entsprechenden Symptomen eines Vitamin E-Mangels, wie z.B. Ataxie. Charakteristische Symptome eines  $\alpha$ -TTP-Gendefekts sind Retinitis pigmentosa und AVED (Ataxie mit isolierter Vitamin E-Defizienz), gekennzeichnet durch Muskelschwäche, neurologische Ausfälle, Sprachstörungen und geistige Retardierung [43-47]. Neben dem  $\alpha$ -TTP wurden weitere intrazelluläre Tocopherol-bindende Proteine in verschiedenen Geweben gefunden und charakterisiert. Dazu gehören das Tocopherol-bindende Protein [48], das Phospholipid-Transfer-Protein [49] und das Tocopherol-assoziierte Protein [50]. Ihre Aufgaben sind bislang weitgehend unbekannt, aber vermutlich im extra- als auch im intrazellulären Transport zu suchen.

Der Metabolismus des Vitamin E war lange Zeit unklar. In den 50er Jahren des letzten Jahrhunderts wurden zwei Metabolite des  $\alpha$ -Tocopherols im Urin entdeckt. Dabei handelte es sich um die  $\alpha$ -Tocopheronsäure und ihr Lacton, die durch einen geöffneten Chromanring und eine verkürzte Seitenkette gekennzeichnet sind (sog. „Simon-Metabolite“, [51]). Der geöffnete Chromanring wurde als Hinweis dafür gewertet, dass Vitamin E *in vivo* als Antioxidanz gewirkt haben muss. Die Entdeckung neuer Metabolite im Urin, der Carboxyethylhydroxychromane (CEHC) des  $\alpha$ -,  $\gamma$ - und  $\delta$ -Tocopherols [52-54] sowie des  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Tocotrienols [55, 56] zeigte allerdings, dass der Metabolismus über einen oxidativen Seitenkettenabbau ohne vorherige oxidative Öffnung des Chromanrings abläuft. Heute ist der Metabolismus der Vitamin E-Formen weitestgehend aufgeklärt. Der Abbauweg ist für alle Formen gleich [57]. Er erfolgt über eine initiale  $\omega$ -Hydroxylierung der Seitenkette unter Beteiligung von Cytochrom-P450-Enzymen (CYP). Aus Hemmungs- und Induktionsversuchen wurden das CYP3A4 [58-60] und das CYP4F2 [61] als mögliche Enzyme postuliert. Nach der  $\omega$ -Hydroxylierung erfolgt ein schrittweiser Abbau der Seitenkette durch mehrere  $\beta$ -Oxidationen. Das Endprodukt ist das entsprechend methylierte CEHC, dessen Vorläufer das CMBHC ist (vgl. Abb. 3). Beide Metabolite werden als Glucuronid- oder Sulfat-Konjugat über den Urin ausgeschieden [54, 62-64].



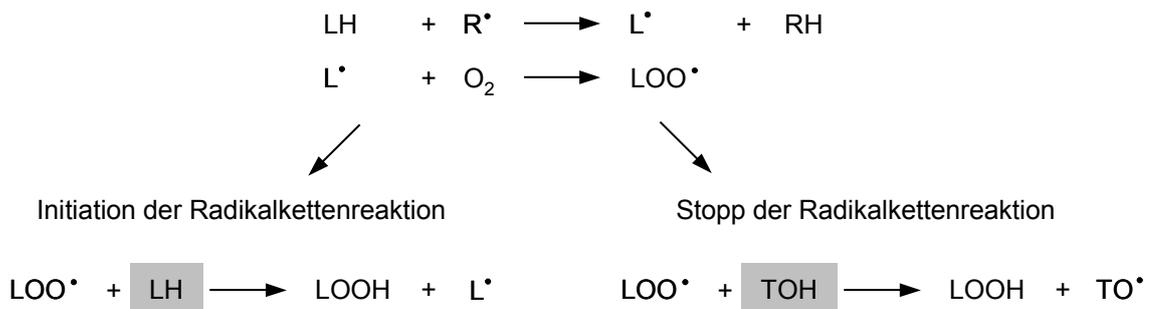
### Abb. 3: Metabolismus des Vitamin E

Dargestellt ist der Abbauweg der Vitamin E-Formen. Er erfolgt über die Verkürzung der Seitenkette und beginnt mit einer  $\omega$ -Hydroxylierung, gefolgt von mehreren  $\beta$ -Oxidationsschritten. Für die vollständige Darstellung des Abbauweges mit allen Zwischenprodukten und beteiligten Enzymen siehe Brigelius-Flohé 2003 [65].

#### 1.2.1.2 Antioxidative und nicht-antioxidative Wirkungen von Vitamin E

Seit der Entdeckung des Vitamin E im Jahre 1922 [5] und der Erkennung seiner essentiellen Natur für Tiere und Menschen sind seine Funktionen immer noch nicht eindeutig geklärt. Nachdem bereits 1931 antioxidative Eigenschaften des Vitamin E beschrieben wurden (Übersicht in [66]), wurde bzw. wird teilweise heute immer noch seine Hauptfunktion darin gesehen, Zellmembranen vor der Zerstörung durch aggressive Sauerstoffverbindungen zu schützen. Die antioxidative Wirkung des Vitamin E beruht auf der Fähigkeit, mit Radikalen zu reagieren. Die hierfür nötige Strukturvoraussetzung ist durch die phenolische OH-Gruppe an Position 6 des Chromanrings aller Vitamin E-Formen gegeben (vgl. Abb. 2 A). Als lipophiles Molekül wird Vitamin E in Membranen oder Lipoproteinen eingebaut. Hier kann es die Lipid-Peroxidation [67] durch Reaktion mit Lipidradikalen und Hemmung von Radikalkettenreaktionen reduzieren (Abb. 4). Das hierbei entstehende Tocopheroxyl-Radikal muss wieder zum entsprechenden Tocopherol reduziert werden. *In vitro* Experimente lassen vermuten, dass in Gegenwart anderer zellulärer Antioxidantien wie Vitamin C, Ubichinon und Glutathion das Tocopheroxyl-Radikal direkt oder indirekt schnell wieder zum Tocopherol reduziert wird [68-70]. Wenn entsprechende Co-Antioxi-

danzien fehlen, kann es auch zu prooxidativen Wirkungen des Vitamin E kommen [71, 72].  $\gamma$ -Tocopherol kann nicht nur mit ROS, sondern auch mit RNS reagieren (illustriert in [73]). Die unsubstituierte Position 5 am Chromanring erlaubt die Reaktion mit den reaktiven Stickstoff-Spezies, wie  $\text{NO}_2$  und Peroxynitrit, unter Bildung von 5-Nitro- $\gamma$ -Tocopherol [74-76].



**Abb. 4: Lipid-Peroxidation durch freie Radikale**

In einer Initiationsreaktion werden ungesättigte Fettsäuren (LH) der Membran-Phospholipide oder der im Blut zirkulierenden Lipoproteine durch Radikale ( $\text{R}^\bullet$ ) zum Alkyl-Radikal ( $\text{L}^\bullet$ ) umgewandelt. Dieses reagiert mit molekularem Sauerstoff ( $\text{O}_2$ ) zum Lipid-Peroxyradikal ( $\text{LOO}^\bullet$ ). Liegt kein Vitamin E vor, kann das gebildete  $\text{LOO}^\bullet$  erneut mit ungesättigten Fettsäuren reagieren. Diese Reaktion führt zur Bildung von Lipid-Hydroperoxid ( $\text{LOOH}$ ) und  $\text{L}^\bullet$ . Dies lässt eine Kettenreaktion entstehen. In Gegenwart von Vitamin E ( $\text{TOH}$ ) reagiert  $\text{LOO}^\bullet$  mit  $\text{TOH}$  und anstelle von  $\text{L}^\bullet$  wird das Tocoperoxy-Radikal ( $\text{TO}^\bullet$ ) gebildet, das selbst relativ stabil und zu reaktionsträge ist, um erneut ein Wasserstoffatom aus einer ungesättigten Fettsäure abzuspalten. Die Kettenreaktion ist somit unterbrochen und die Lipid-Peroxidation gehemmt.

Seit ca. 15 Jahren werden immer mehr Arbeiten publiziert, die über nicht-antioxidative Wirkungen der Vitamin E-Formen berichten. Mit der Entdeckung, dass  $\alpha$ -Tocopherol die Aktivierung der Proteinkinase C über die Aktivierung der Proteinphosphatase 2A hemmt [77-79], begann ein neues Denken bezüglich der Funktion(en) von Vitamin E. Zum ersten Mal wurde eine nicht-antioxidative Eigenschaft beschrieben. Die Existenz von Vitamin E-bindenden Proteinen (Übersicht in [80]) ließ eine rein unspezifische antioxidative Rolle des Vitamin E schon immer eher unwahrscheinlich erscheinen. Die Anzahl der in den letzten Jahren gefundenen Gene, die durch Vitamin E reguliert bzw. beeinflusst sind, ist groß und wächst ständig. Die Genprodukte dieser Gene können in fünf Gruppen eingeteilt werden: Genprodukte, die 1) die Aufnahme und den Metabolismus von Vitamin E beeinflussen, 2) die bei der Lipidabsorption und der Entstehung von Atherosklerose involviert sind, 3) die extrazelluläre Proteine modulieren, 4) die bei Entzündungsprozessen eine Rolle spielen und 5) die in Zellsignalwege und Zellzyklus eingreifen (Übersicht in [81-84]). Beispielhaft sollen hier genannt sein: die Herunterregulation der HMG-CoA-Reduktase durch  $\gamma$ -Tocotrienol [85], des Scavenger Rezeptors CD36 durch

$\alpha$ -Tocopherol [86], des intrazellulären Adhäsionsmoleküls-1 durch  $\alpha$ -Tocotrienol [87], die gesteigerte Expression des PPAR $\gamma$  durch  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Tocopherol [88], des  $\alpha$ -Tropomyosin durch  $\alpha$ -Tocopherol [89], der  $\gamma$ -GCS durch  $\alpha$ -Tocopherol [90] und des  $\alpha$ -TTP durch  $\alpha$ - und  $\delta$ -Tocopherol [91] sowie die Aktivierung des PXR durch  $\alpha$ -,  $\gamma$ - und  $\delta$ -Tocopherol sowie  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Tocotrienol [92].

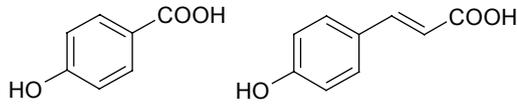
### 1.2.2 Sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe

Mit pflanzlichen Lebensmitteln werden eine Vielzahl sog. sekundärer Pflanzeninhaltsstoffe aufgenommen. Diese werden von der Pflanze u.a. als Abwehrstoffe gegen Schädlinge und Krankheiten, als Wachstumsregulatoren und als Farbstoffe synthetisiert und sind chemisch sehr unterschiedliche Verbindungen. Dazu zählen z.B. Carotinoide, Terpene, Sterine, Glucosinolate und Saponine. Die größte und wichtigste Gruppe bilden mit mehreren Tausend isolierten Formen die Polyphenole mit den phenolischen Säuren (Hydroxybenzoe- und Hydroxyzimtsäuren), Flavonoiden (Flavanone, Flavone, Flavonole, Flavanole, Anthocyanidine und Isoflavone), Stilben (*cis*- und *trans*-Stilben) und Lignanen (vgl. Abb. 5, Übersicht in [93]).

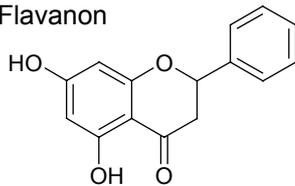
Aufgrund der großen Anzahl und der sehr unterschiedlichen chemischen Natur der Polyphenole sind Absorption, Metabolismus und Ausscheidung und somit die Bioverfügbarkeit sehr verschieden (Übersicht in [93-95]). In den Nahrungsmitteln liegen die Polyphenole überwiegend als Ester, Polymere oder Glykoside vor. Lange ging man davon aus, dass Polyphenole aufgrund ihrer glykosidischen Bindung im Dünndarm nicht resorbiert werden können und erst im Colon durch die Darmflora mikrobiell in Aglykone gespalten werden müssten. Nur diese hielt man für fähig, die Darmwand zu passieren. Am Beispiel des Flavonols Quercetin konnte jedoch gezeigt werden, dass auch deutliche Mengen glykosyliertes Quercetin im Dünndarm resorbiert werden und die Bindung an Glukose die Absorption sogar fördert [96]. Zwischenzeitlich wurde *in vitro* und *in vivo* nachgewiesen, dass Quercetin-Glykoside ein Substrat des Na<sup>+</sup>-abhängigen Glukose-Transporters SGLT1 sind [97, 98]. Im Plasma sind die Polyphenole aufgrund ihrer chemischen Struktur fast vollständig an Albumin gebunden und erreichen in Abhängigkeit von ihrer Absorptionsrate unterschiedliche Plasmakonzentrationen und Halbwertszeiten (Übersicht in [99]). Die Metabolisierung und Ausscheidung der Polyphenole erfolgt über den allgemeinen Weg der Biotransformation (vgl. 1.3). Dabei ist für die meisten Polyphenole die Spaltung der glykosidischen Bindung durch die  $\beta$ -Galaktosidase oder die Laktase-Phlorizin-Hydrolase der erste Schritt der Metabolisierung. Anschließend erfolgt eine Methylierung, Sulfatierung oder Glukuronidierung durch entsprechende Phase II-Enzyme sowie die Ausscheidung über die Galle oder den Urin.

**A****Phenolsäuren**

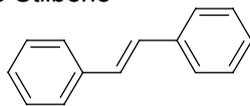
Hydroxybenzoesäure    Hydroxyzimtsäure

**Flavonoide**

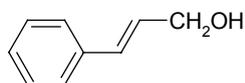
Flavanon

**Stilbene**

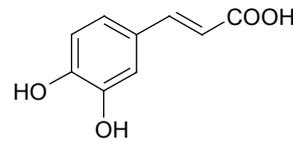
trans-Stilbene

**Lignane**

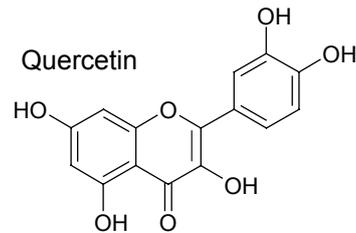
Hydroxyzimtsäurederivat

**B**

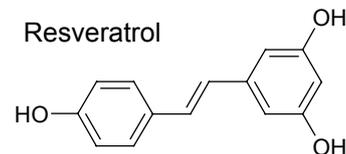
Kaffeensäure



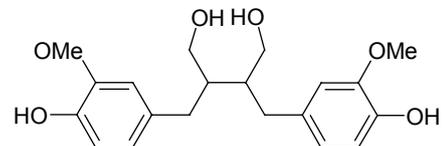
Quercetin



Resveratrol



Secoisolariciresinol

**Abb. 5: Polyphenole**

Dargestellt ist die Grundstruktur der Polyphenolgruppen (**A**) und jeweils ein Vertreter der Gruppe (**B**). Phenolsäuren basieren auf einer C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub>- (Hydroxybenzoesäuren) oder einer C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-Grundstruktur (Hydroxyzimtsäuren). Ein Vertreter der Hydroxyzimtsäuren ist die Kaffeensäure. Die Struktur aller Flavonoide basiert auf einem Flavanongerüst (zwei aromatische und ein O-heterozyklischer Kohlenstoffring). Das Flavonol Quercetin ist das am weitesten verbreitete und bekannteste Flavonoid. Die Gruppe der Stilbene besteht aus zwei Phenylringen, die über eine ungesättigte Kohlenstoffbrücke verbunden sind (es gibt jeweils eine *cis*- und *trans*-Form). Das u.a. im Rotwein vorkommende Resveratrol ist der bekannteste Vertreter dieser Gruppe. Als Lignane werden Zimtsäurederivate bezeichnet, die über ihre C-Atome der Seitenkette miteinander verknüpft sind. Das z.B. in Getreide und Beeren vorkommende Secoisolariciresinol ist ein bekannter Vertreter der Lignane.

Schon seit einigen Jahren stellen epidemiologische Studien eine Verbindung zwischen einer Obst- und Gemüse-reichen Ernährung und einer teilweise verminderten Inzidenz für Krebs, kardiovaskulären und anderen chronischen Krankheiten her (Übersicht in [100-104]). Dafür werden neben Ballaststoffen und essentiellen Mikronährstoffen, wie Vitamin E und Selen, vor allem die sekundären Pflanzeninhaltsstoffe (hier Polyphenole) verantwortlich gemacht, die in Studien mit isolierten Polyphenolen vergleichbare Ergeb-

nisse erzielt haben (Übersicht in [105-107]). Hierbei werden den Polyphenolen antioxidative Wirkungen zugeschrieben, die *in vitro* auf dem direkten Abfangen von ROS und RNS oder der Hemmung von prooxidativen bzw. Induktion von antioxidativen Enzymen beruhen (Übersicht in [108, 109]). Die Übertragung dieser Annahmen bzw. Ergebnisse auf die *in vivo* Situation ist schwierig, da eine direkte antioxidative Reaktion *in vivo* noch nicht nachgewiesen wurde und der über eine Methylierung der OH-Gruppen stattfindende Metabolismus der Polyphenole eine solche vermutlich gar nicht zulässt.

Wie für Vitamin E wurden auch für Polyphenole zahlreiche nicht-antioxidative Wirkungen und genregulatorische Effekte beschrieben, wobei die exakten molekularen Mechanismen weitgehend unklar sind. Für das Flavonol Quercetin konnten mittels Mikroarray-Analysen eine Vielzahl von Genen identifiziert werden, die durch Quercetin in ihrer Expression beeinflusst sind. Dabei handelt es sich um Gene, die z.B. bei der Zellteilung und Zelldifferenzierung, bei der Apoptose und Signalübertragung beteiligt sind oder um Tumorsuppressor- und Onkogene sowie um Phase II-Enzyme [110-113].

### 1.3 Biotransformation

Während physiologischer Stoffwechselforgänge fallen lipophile Substanzen (z.B. Gallenfarbstoffe, Steroidhormone) an, die nicht direkt über Harn oder Fäzes ausgeschieden werden können. Darüber hinaus nimmt der Organismus zusätzlich lipophile Fremdstoffe (Xenobiotika; z.B. Medikamente, Konservierungsmittel, Pestizide) aus der Umwelt mit der Nahrung auf. Die enzymatische Umwandlung dieser lipophilen endo- und exogenen Substanzen zu hydrophileren und damit ausscheidbaren Metaboliten stellt die Biotransformation (= Fremdstoffmetabolismus) dar. Die Biotransformation wird in zwei Phasen unterteilt. Die meisten Gewebe und Organe sind durch das Vorhandensein von entsprechenden Phase I- und Phase II-Enzymen zur Biotransformation befähigt. Die Hauptorte der Biotransformation sind jedoch die Leber und der Dünndarm. In der Phase I finden sog. Funktionalisierungsreaktionen statt, bei denen z.B. durch Oxidation, Reduktion oder Hydrolyse die Xenobiotika durch Einfügung oder Freisetzung von funktionellen Gruppen, wie OH-, NH<sub>2</sub>-, SH- oder COOH-Gruppen, verändert werden. Dabei können zum Teil auch hoch reaktive und mutagene Substanzen entstehen (sog. Giftung, Übersicht in [114]). Für die Phase I-Reaktionen spielen die Cytochrom P450 abhängigen Monooxygenasen (CYP) die zentrale Rolle. Bei den Phase II-Reaktionen (sog. Konjugationsreaktionen) werden die Xenobiotika über die eingefügten oder schon vorhandenen funktionellen Gruppen mit hydrophilen endogenen Molekülen, wie Glutathion, Sulfat, Aminosäuren oder Glukuronsäure, konjugiert. Dadurch entstehen leichter ausscheidbare inaktive Moleküle. Die Reaktionen der Phase II werden daher auch häufig Entgiftungs- bzw. Bioinaktivierungsreaktio-

nen genannt. Die wichtigsten Phase II-Enzyme sind die Glutathion-S-, die UDP-Glukuronosyl- und die Sulfo-Transferasen. Als Ergänzung zur klassischen Einteilung der Biotransformation in zwei Phasen werden häufig die aktiven transmembranen Transportprozesse, die die Ausscheidung der biotransformierten Xenobiotika aber auch die Aufnahme der Xenobiotika regulieren, als Phase III der Biotransformation bezeichnet. Zu den Phase III-Transportern gehören aus der ABC-Transporter-Familie das P-Glykoprotein und die MRPs (engl. *multidrug resistance associated proteins*) sowie der OATP-Transporter (engl. *organic anion transporting polypeptide*) (Übersicht in [115, 116]).

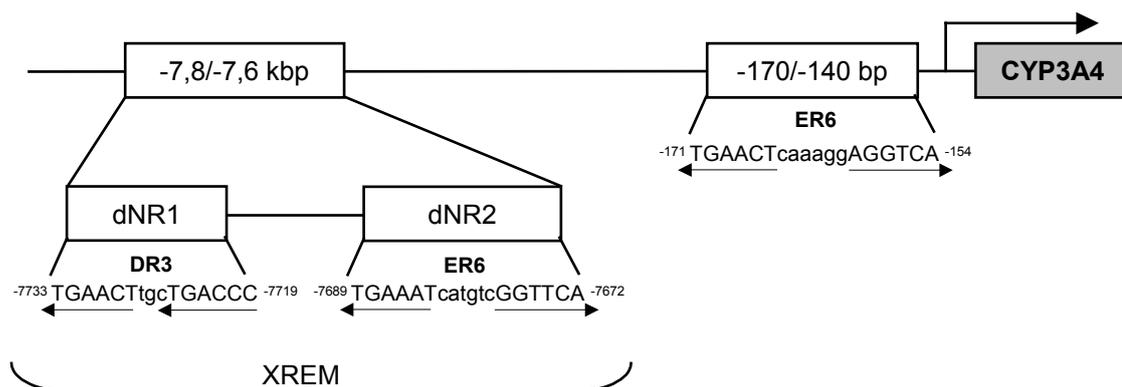
Die an der Biotransformation beteiligten Enzyme und Transporter liegen in den meisten Fällen auf einem basalen Niveau vor und werden erst nach der Aufnahme der Xenobiotika induziert. Die Beeinflussung der Biotransformation durch Hemmung bzw. Induktion der beteiligten Enzyme und Transporter gilt als Hauptmechanismus der Prävention gegen Mutagene und Karzinogene.

### 1.3.1 Regulation von Phase I-Enzymen

Die wichtigste Gruppe der Phase I-Enzyme sind die Cytochrom P450 Monooxygenasen (CYP). Sie bilden eine Superfamilie von Hämproteinen, die eine Schlüsselrolle im oxidativen Stoffwechsel zahlreicher endogener und exogener Substanzen spielt, und unterschiedlich reguliert sind (Übersicht in [117]). Beim Menschen ist innerhalb dieser Familie die CYP3A-Enzymfamilie mit den Isoformen CYP3A4, CYP3A5, CYP3A7 und CYP3A43 [118, 119] die klinisch bedeutsamste, denn ca. die Hälfte aller gegenwärtig eingesetzten Medikamente werden durch das CYP3A4/5 verstoffwechselt [120]. Die Leber ist das Organ mit dem höchsten CYP-Gehalt des Organismus. Dabei machen das CYP3A4 und das CYP3A5 zusammen ca. 30 % des gesamten CYP-Gehaltes aus [120]. Das CYP3A4 ist auch im Dünndarm exprimiert und somit häufig für eine präsystemische Biotransformation ("*first pass*") verantwortlich. Neben der zentralen Rolle des CYP3A4 bei der Biotransformation aufgrund seiner großen Substratspannweite, ist es auch am Stoffwechsel endogener Steroide wie z.B. Testosteron beteiligt (Übersicht in [121]).

Die transkriptionelle Regulation der CYP ist sehr vielfältig und erfolgt über verschiedene Kernrezeptoren (PXR, CAR, PPAR, LXR, FXR und AhR; Übersicht in [116]). Die Kernrezeptoren sind eine Familie von Transkriptionsfaktoren, die sich durch ihre DNA- und Liganden-Bindungsdomänen unterscheiden. Das für die Phase I bedeutsamste Enzym, das CYP3A4, wird hauptsächlich über den PXR reguliert. Der PXR (NR1I2; auch PAR [122] oder SXR [123] genannt) ist ein Mitglied der Kernrezeptoren-Subfamilie NR1I [124], zu der auch der VDR (NR1I1) und der CAR (NR1I3) gehören. Unter den aktivierenden Verbindungen befinden sich eine Vielzahl verschiedenster Substanzen (Übersicht in [125-127]). Obgleich eine Liganden-unabhängige nukleäre Lokalisation des PXR in hu-

manen Zellen bereits beschrieben wurde [128], wird im allgemeinen davon ausgegangen, dass in Abwesenheit eines entsprechenden Liganden der PXR assoziiert mit anderen Proteinen im Cytosol vorliegt [129]. Erst nach einer Aktivierung über einen Liganden transloziert der PXR in den Zellkern und bindet dort als Heterodimer mit dem RXR $\alpha$  (NR2B1) an seine DNA-Bindestelle (responsives Element, engl. *response element*), die aus zwei Halbseiten des Bindungsmotivs 5'-RGKTCA-3' (R = A oder G, K = G oder T; häufig AGGTCA [130, 131]) besteht (illustriert in Abb. 7). Es sind mehrere solcher responsiven Elemente für den PXR bekannt. Sie werden allgemein PXR-E genannt. Dazu zählen u.a. die DR3-Sequenz (engl. *direct repeat*), eine direkte Wiederholung des Bindungsmotivs mit einem Zwischenraum von drei Nukleotiden, und die ER6-Sequenz (engl. *everted repeat*), eine umgekehrte und entgegengesetzte Wiederholung des Bindungsmotivs mit einer Unterbrechung von sechs Nukleotiden, die sich mehrfach im CYP3A4-Promotor befinden [126, 132]. Für eine Aktivierung des CYP3A4-Promotors scheinen mehrere Erkennungselemente verantwortlich zu sein (Abb. 6, [133, 134]).



**Abb. 6: Wichtige regulatorische Elemente des CYP3A4-Promotors**

Der PXR bindet im CYP3A4-Promotor an das ER6-Motiv im proximalen Promotor und an ein DR3- und ein ER6-Motiv im distalen XREM (engl. *xenobiotic responsive enhancer module* [133]), wobei das DR3-Motiv des XREM kein komplett korrektes Bindungsmotiv aufweist. Eine maximale Induktion des CYP3A4-Gens durch den PXR benötigt sowohl das proximale ER6-Motiv als auch das distale XREM. Abbildung aus [134]; modifiziert.

In PXR knock-out-Mäusen werden sowohl Phase I- als auch Phase II- und Phase III-Gene nicht mehr exprimiert [135]. Dies macht die zentrale Stellung des PXR in allen drei Phasen des Fremdstoffmetabolismus deutlich (Übersicht in [116, 136]). Daran zeigt sich, dass allein durch den PXR und seine Agonisten die Bioverfügbarkeit von Fremdstoffen (z.B. Medikamente) stark beeinflusst sein könnte.

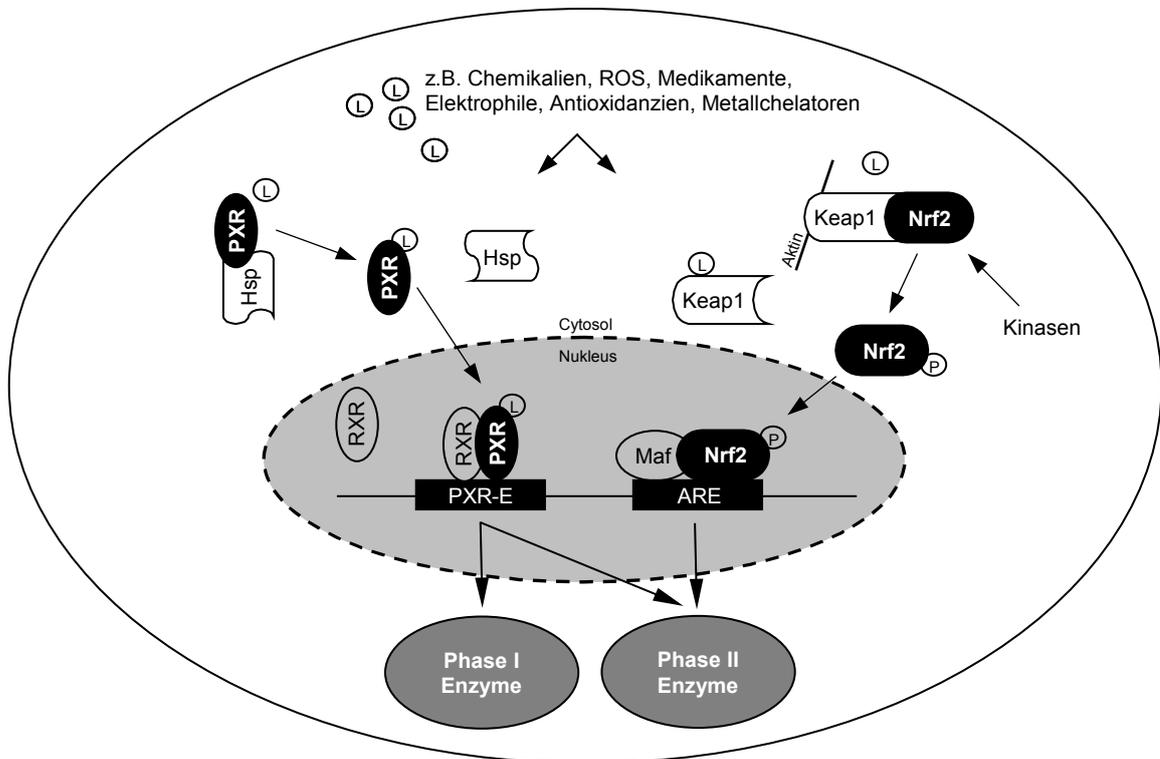
### 1.3.2 Regulation von Phase II-Enzymen

Promotor-Analysen von mehreren Phase II-Enzymen wiesen auf die Existenz von funktionellen Sequenzbereichen (sog. *cis-acting* Elemente), wie das ARE (engl. *antioxidant response element*), das XRE (engl. *xenobiotic response element*) sowie Bindungsstellen für AP-1 (engl. *activator protein-1*) und NF- $\kappa$ B (engl. *nuclear factor-kappa B*) hin. Viele Veröffentlichungen unterstützen die Annahme, dass dem ARE (häufig auch EpRE genannt; engl. *electrophile response element*) in der Regulation der Phase II-Gene eine Schlüsselrolle zukommt. Beim ARE handelt es sich um eine regulatorische Sequenz, die sowohl für die basale als auch für die induzierte Expression von Genen verantwortlich ist. Die Konsensussequenz umfasst die Basenfolge 5'-TGACnnnGC-3', wobei auch die angrenzenden Basen eine Rolle zu spielen scheinen (Übersicht in [115, 116, 137-139]).

Die transkriptionelle Regulation der Phase II-Gene mit einem ARE erfolgt über den Transkriptionsfaktor Nrf2 (engl. *NF-E2-related factor 2*) [140]. Nrf2 gehört zu den basischen Leucinezipper-Transkriptionsfaktoren und wird im unstimulierten Zustand vom am Cytoskelett verankerten cysteinreichen Keap1 (engl. *kelch-like ECH-associated protein 1*) gebunden, welches als Zink-Metalloprotein identifiziert wurde [141]. Das Keap1 agiert als negativer Regulator des Nrf2 und somit der Nrf2-vermittelten Genexpression. Dies wurde in Keap1 knock-out-Mäusen deutlich, bei denen eine konstitutive nukleäre Akkumulation von Nrf2 verbunden mit einer sehr hohen Expression von Nrf2-Zielgenen beobachtet werden konnte [142]. Im unstimulierten Zustand führt das Keap1 das Nrf2 der Ubiquitin-abhängigen Degradation zu [143]. Nrf2 wird im Normalzustand relativ schnell durch das Proteasom abgebaut und besitzt eine Halbwertszeit von nur 10 bis 30 Minuten [144]. Erst durch eine Modifikation von SH-Gruppen am Keap1 durch verschiedenste Substanzen [145] kommt es zur Konformationsänderung des Keap1 und zur Dissoziation des Nrf2. Bisher galt die Modifikation des Keap1 als Voraussetzung für die Freisetzung des Nrf2 aus einem Nrf2-Keap1-Aktin-Komplex und seiner dann möglichen Translokation in den Zellkern. Entgegen dieser Auffassung, dass Keap1 das Nrf2 im Cytosol zurückhält, postulieren neueste Veröffentlichungen, dass Nrf2 ständig neu synthetisiert wird und Keap1 allein über die Ubiquitin-abhängige Degradation im unstimulierten Zustand bzw. die Hemmung dieser Degradation nach Stimulierung die Aktivierung bzw. nukleäre Translokation von Nrf2 reguliert und gemeinsam mit Nrf2 in den Zellkern transloziert [146-149]. Bei den Theorien ist jedoch gemein, dass die Aktivierung der Nrf2/ARE-vermittelten Genexpression durch eine Modifikation am Keap1 erfolgt, die durch eine Verschiebung des Redoxstatus der Zelle in Richtung Oxidation begünstigt wird. Neben der Modifikation des Keap1 konnte auch gezeigt werden, dass verschiedene Proteinkinasen bei der Aktivierung von Nrf2 eine Rolle spielen (Übersicht in [116, 138, 139, 150]).

Nrf2 bildet im Zellkern Heterodimere mit anderen basischen Leucinezipper-Proteinen

(z.B. Maf-Proteine), bindet an die ARE-Sequenz und induziert die Transkription seiner Zielgene (vgl. Abb. 7). Die bislang identifizierten Nrf2-Zielgene sind in der Regel Phase II-Enzyme und gehören in die Gruppe der antioxidativen und/oder detoxifizierenden Enzyme [151, 152]. Ein erst vor kurzem neu entdecktes Nrf2-Zielgen ist die gastrointestinale Glutathionperoxidase (GI-GPx, GPX2) [153].



**Abb. 7: Vereinfachte Übersicht der Regulation von Phase I- und Phase II-Enzymen am Beispiel des PXR- und Nrf2-Weges**

ARE (*antioxidant response element*), PXR (*pregnane X receptor*), PXR-E (*PXR response element*), RXR (*retinoid X receptor*), Keap1 (*kelch-like ECH-associated protein 1*), Nrf2 (*NF-E2-related factor 2*), ROS (*reactive oxygen species*), Maf (*small Maf proteins*), L (Ligand/Modulator), Hsp (Hitzeschockprotein), P (Phosphorylierung)

#### 1.4 Antioxidanzien - Kritische Betrachtung

Die bisherigen biochemischen und pathophysiologischen Erkenntnisse belegen zwar die Notwendigkeit eines antioxidativen Schutzes, aber eine Prävention von Krankheiten durch Antioxidanzien in Form von isolierten Einzelsubstanzen oder bestimmter Kombinationen ist bisher nicht eindeutig bewiesen. So wird für Vitamin E ein präventiver Effekt bei Erkrankungen vermutet, die mit erhöhtem oxidativen Stress in Verbindung stehen. Inwieweit die *in vitro* vorhandenen antioxidativen Reaktionen *in vivo* ablaufen, wurde bisher jedoch nicht befriedigend geklärt. Im Focus der meisten klinischen Studien stand die Wir-

kung von Vitamin E (hier  $\alpha$ -Tocopherol) bei der Prävention und Behandlung der Atherosklerose und den damit verbundenen kardiovaskulären Erkrankungen. Die Ergebnisse der Studien, die aufgrund von unterschiedlicher Dauer,  $\alpha$ -Tocopherol-Dosis und Anamnese der Probanden nur schwer zu vergleichen sind, sind sehr widersprüchlich (Übersicht in [24, 154-157]). Nur in zwei Studien (CHAOS und SPACE) zeigte supplementiertes Vitamin E positive Effekte auf primäre kardiovaskuläre Ereignisse. Die protektive Wirkung von Vitamin E bleibt jedoch umstritten, denn mindestens sieben andere Studien (ATBC, GISSI, PPP, SECURE, HOPE, HPS und VEAPS) zeigten keinen vergleichbaren Effekt von Vitamin E. Aufgrund dieser Studienergebnisse kann keine begründete Hoffnung auf einen prophylaktischen Effekt von Vitamin E, das häufig als Nahrungsergänzungsmittel angeboten wird, auf kardiovaskuläre Erkrankungen gemacht werden. Ähnlich ist die Situation der Polyphenole. In den letzten 10 Jahren erschienen mehrere Tausend Artikel über antioxidative Wirkungen von Polyphenolen *in vitro* [158]. Bei einem Vergleich von epidemiologischen Studien und verschiedenen Interventionsstudien mit den *in vitro*-Effekten von Polyphenolen zeigte sich auch hier, vergleichbar zu der Vitamin E-Situation, dass die *in vivo*-Effekte deutlich geringer waren als es die *in vitro*-Ergebnisse hoffen ließen [106, 159]. Quercetin als ein Hauptvertreter der Flavonoide hatte z.B. *in vivo* nur einen geringen Einfluss auf verschiedene Krebs-Marker oder auf antioxidative Biomarker. Somit bleiben die häufig aufgeworfenen Fragen zum Vitamin E und anderen Nahrungsinhaltsstoffen, denen antioxidative Eigenschaften nachgesagt werden, im Raum: Antioxidanz oder nicht? Direkte oder indirekte antioxidative Effekte? [26, 84, 158, 160, 161]

Neben den *in vitro* gezeigten antioxidativen Eigenschaften einer Substanz darf man mögliche zusätzliche oder hauptsächliche Eigenschaften in einem vielschichtigen biologischen System nicht außer Acht lassen. Eines der bekanntesten Beispiele ist das Retinol, das *in vitro* als Antioxidanz gilt, aber sich *in vivo* als Retinal mit Opsin zum für das Sehvermögen essentiellen Rhodopsin verbindet. Somit wird deutlich, dass die *in vivo*-Funktion einer antioxidativen Substanz eine ganz andere als die antioxidative Funktion sein kann und in den meisten Fällen auch sein wird. Auch das Vitamin E hat antioxidative Wirkungen, doch seine Essentialität für den tierischen und menschlichen Organismus kann darin nicht begründet sein!? In vielen Fällen verlieren antioxidative Substanzen während oder nach ihrer Absorption durch Methylierung oder Glukuronidierung bzw. Metabolisierung ihre antioxidativen Eigenschaften und können nunmehr andere Eigenschaften und Funktionen besitzen. Auch toxische Wirkungen bei hochdosierter Langzeitsubstitution mit antioxidativen Substanzen sind möglich.

Die Ansicht von Azzi und Kollegen [160], dass es Zeit ist, die Periode der Forschung mit Oxidanzien und Antioxidanzien kritisch zu reflektieren und mehr über die wahren molekularen Funktionen dieser Substanzen herauszufinden, kann nur bekräftigt werden.

## 1.5 Ziele der Arbeit

Von vielen Mikronährstoffen und anderen Nahrungsinhaltsstoffen ist die physiologische Funktion nicht völlig bekannt. Auch Mangelsymptome geben keinen völligen Aufschluss über ihre Funktionen. Oft werden *in vitro* gemachte Beobachtungen überinterpretiert und den Nahrungsinhaltsstoffen insbesondere antioxidative Funktionen zugeschrieben, die sie *in vivo* nicht haben. Häufig kommt es daher bei Übersupplementierungen zu überraschenden Wirkungen. Deshalb müssen die Funktionen von Mikronährstoffen und anderen Nahrungsinhaltsstoffen genauer untersucht und identifiziert werden.

Verschiedene Mikronährstoffe besitzen regulatorische Wirkungen. So wirkt Vitamin E z.B. über genregulatorische Effekte entzündungshemmend, cholesterinsenkend und tumorprotektiv. Diese Eigenschaften lassen sich nicht allein durch das antioxidative Potential von Vitamin E erklären. Deshalb sollten bei der häufig propagierten Supplementierung von Nahrungsergänzungsmitteln immer ihre individuelle Wirkungsweise und mögliche toxische Eigenwirkungen bedacht und bekannt sein. Von großer Wichtigkeit für die biologische Wirkung eines Elementes in Organismen sind seine Aufnahme, Metabolisierung, Toxizität, Einlagerung und Ausscheidung.

- Ein Ziel dieser Arbeit war somit, aufbauend auf vorhandenen Forschungsergebnissen, die Aufnahme, den Metabolismus und die Toxizität der verschiedenen Vitamin E-Formen *in vitro* weiter aufzuklären.
- Weiteres Ziel war die Aufklärung des Einflusses von Vitamin E-Formen auf die Expression des humanen Phase I-Enzyms CYP3A4 *in vitro* und die Bestätigung der *in vitro* gefundenen Effekte im Tierexperiment.

Neben Vitamin E zeigen auch viele sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe in Zellsystemen sowie *in vivo* eine Reihe biologischer Wirkungen, deren Erklärung jedoch häufig auf die antioxidative Wirkung vieler sekundärer Pflanzeninhaltsstoffe reduziert wird. In den letzten Jahren ist jedoch vor allem der Einfluss von sekundären Pflanzeninhaltsstoffen auf die Tumorentwicklung in den Focus der Forschung gerückt. Die Beeinflussung von Phase I- und Phase II-Enzymen der Biotransformation spielt bei der Prävention gegen Mutagene und Karzinogene eine zentrale Rolle.

- Deshalb sollte der Einfluss von verschiedenen Pflanzenextrakten und sekundären Pflanzeninhaltsstoffen in Form von Reinsubstanzen, die bisher hauptsächlich als Antioxidantien klassifiziert wurden, auf die transkriptionelle Regulation von Phase I- und Phase II-Enzymen *in vitro* untersucht werden.

## 2 Materialien

### 2.1 Chemikalien und Enzyme

Wenn nicht anders vermerkt, wurden alle laborüblichen Chemikalien von Sigma (Taufkirchen), Merck (Darmstadt), Roth oder Gibco (beide Karlsruhe) bezogen. Enzyme wurden von Promega (Mannheim), NEB (Frankfurt) oder Sigma (Taufkirchen) bezogen.

### 2.2 Zellkulturmaterialien, Antibiotika und Antikörper

Kulturmedium RPMI 1640	Gibco, Karlsruhe
Kulturmedium DMEM	Gibco, Karlsruhe
L-Alanyl-L-Glutamin (Glutamax)	Gibco, Karlsruhe
MEM-nichtessentielle-Aminosäuren	Gibco, Karlsruhe
Trypsin/EDTA-Lösung	Sigma, Taufkirchen
FCS	Biochrom Seromed, Berlin
Ampicillin	Roth, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin	Gibco, Karlsruhe
Geneticin G418	Sigma, Taufkirchen
PXR-Antikörper (A-20)	Santa Cruz Biotechnologie, USA
Nrf2-Antikörper (C-20)	Santa Cruz Biotechnologie, USA
IgG-POD (AP307P, Sekundär-Antikörper)	Chemicon, Hofheim

### 2.3 Puffer und Lösungen

Die Zusammensetzung häufig benutzter Puffer und Lösungen ist hier zusammengefasst. Puffer und Lösungen, die nur einmal verwendet wurden, sind im jeweiligen Methodenteil beschrieben.

- *PBS*: 140 mM NaCl; 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 3 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH 7,4
- *10x-TBE*: 0,89 M Tris-HCl; 0,89 M Borsäure; 4 % 0,5 M EDTA (pH 8,0)

### 2.4 Plasmide

Zur *in vitro* Translation (siehe 3.4.6) und zur Analyse genregulatorischer Eigenschaften von verschiedenen Substanzen, Pflanzenextrakten oder Proteinen (siehe 3.4.9) wurden entsprechende Reporter- und Expressionsplasmide eingesetzt.

## 2.4.1 Reporter- und Expressionsplasmide

**Tab. 1: Verwendete Reporter- und Expressionsplasmide**

Plasmid	Beschreibung/Verwendung	Referenz
<b>Reporterplasmide</b>		
pGL3-basic	kommerzieller „leerer“ Luciferase-Vektor ohne Promotor zur Klonierung von Promotorfragmenten und als Kontrolle	www.promega.com
pGL3-CYP3A4-3	pGL3-basic mit 3.557 bp des CYP3A4-Promotors für Promotorstudien	[162]
pGL3-CYP3A4-6	pGL3-basic mit 6.954 bp des CYP3A4-Promotors für Promotorstudien	[162]
pGL3-CYP3A4-9	pGL3-basic mit 9.388 bp des CYP3A4-Promotors für Promotorstudien	[162]
pGL3-GI-prom-I	pGL3-basic mit 2.111 bp des GI-GPx-Promotors für Promotorstudien	[153]
pGL3-GI-prom-VI	pGL3-basic mit 172 bp des GI-GPx-Promotors für Promotorstudien	[153]
pGL3-GI-prom-I-mut	pGL3-GI-prom-I mit Punktmutation im Bereich des GI-GPx-ARE	[153]
pGL3-promoter	kommerzieller „leerer“ Luciferase-Vektor mit SV40 Minimalpromotor zur Klonierung von Promotorfragmenten und als Kontrolle	www.promega.com
pGL3-HO-ARE	pGL3-promoter mit dem Hämooxygenase-ARE für Studien zum Transkriptionsfaktor Nrf2	[153]
pGL3-GI-ARE	pGL3-promoter mit GI-GPx-ARE für Studien zum Transkriptionsfaktor Nrf2	[153]
pGL3-(DR3) <sub>2</sub>	pGL3-promoter mit zwei DR3-Elementen für Studien zum Transkriptionsfaktor PXR	diese Arbeit
pBLCAT2-(DR3) <sub>2</sub>	pBLCAT2 mit zwei DR3-Elementen aus dem CYP3A1-Promotor der Ratte zur Umklonierung der DR3-Elemente in den pGL3-promoter	[163]
<b>Expressionsplasmide</b>		
pSV-β-Gal	kommerzieller Vektor zur Expression von β-Galaktosidase zur Transfektionskontrolle und -normierung	www.promega.com
pSG5	kommerzieller „leerer“ Vektor zur Klonierung von zu exprimierenden Genen und als Kontrolle	www.stratagene.com
pSG5-hPXR	Expression des humanen PXR	[163]
pCMX-hRXR $\alpha$	Expression des humanen RXR $\alpha$	[164]

Die Plasmide pGL3-CYP3A4-3, pGL3-CYP3A4-6 und pGL3-CYP3A4-9 wurden freundlicherweise von Dr. Ramiro Jover (Universität Valencia, Spanien) und die Plasmide pGL3-GI-prom-I und pGL3-prom-VI von Dr. Zewen Zhou (Deutsches Institut für Ernäh-

rungsforschung, Potsdam-Rehbrücke) zur Verfügung gestellt. Die Plasmide pBLCAT2-(DR3)<sub>2</sub> und pSG5-hPXR wurden von Dr. Steven A. Kliewer (Glaxo Wellcome, Research Triangle Park, North Carolina, USA) bereitgestellt. Das Plasmid pCMX-hRXR $\alpha$  wurde von Dr. Ralph Rühl (Institut für Ernährungswissenschaft, Universität Potsdam) zur Verfügung gestellt. Die Plasmide pGL3-GI-prom-I-mut, pGL3-HO-ARE, pGL3-GI-ARE und pGL3-(DR3)<sub>2</sub> sind mit Unterstützung von und in Zusammenarbeit mit Dr. Antje Banning selbst generiert worden (siehe 3.4.8).

## 2.4.2 Allgemeine Plasmide

Tab. 2: Plasmide zur Klonierung von Oligonukleotiden

Plasmid	Beschreibung/Verwendung	Referenz
pBluescript II KS+	kommerzieller Vektor	www.stratagene.com
pCR <sup>®</sup> II-Topo <sup>®</sup>	kommerzieller Vektor zur TA-Klonierung	www.invitrogen.com

## 2.5 Oligonukleotide

Tab. 3: Oligonukleotide

Gen Spezies Genbank-Nr.	Sequenz 5'→ 3' • 5'-Oligonukleotid • 3'-Oligonukleotid	Temperatur Zyklenzahl MgCl <sub>2</sub>	Produkt- größe
<b>CYP3A4</b> Mensch, M14096	• GGGAAGCAGAGACAGGCAAG • GAGCGTTTCATTACCACCA	60°C 32 2 mM	608 bp
<b>CYP3A5</b> Mensch J04813	• GAAGAAAAGTCGCCTCAAC • AAGAAGTCCTTGCGTGTCTA	60°C 28 4 mM	679 bp
<b><math>\beta</math>-Actin</b> Mensch X00351	• CAAGAGATGGCCACGGCTGCT • TCCTTCTGCATCCTGTCTGGCA	60°C 23 2 mM	275 bp
<b>Cyp3a11</b> Maus NM_007818	• TTTGGTAAAGTACTTGAGGCAGA • CTGGGTTGTTGAGGGAATC	64°C 40 2 mM	134 bp
<b><math>\alpha</math>-TTP</b> Maus XM_131274	• ATGGCTACCTACTGGAAAGAAATA • AGATGAACTGTCCTGAGATGAGAT	62°C 40 2 mM	132 bp
<b>HPRT</b> Maus NM_013556	• GCAGTCCCAGCGTCGTG • GGCCTCCCATCTCCTTCAT	68°C 40 1 mM	168 bp

Die Synthese der verwendeten Oligonukleotide wurde bei den Firmen BioTeZ Berlin-Buch GmbH (Berlin) oder MWG-Biotech AG (Ebersberg) in Auftrag gegeben. Zur Optimie-

zung der PCR-Bedingungen wurden für jedes Oligonukleotidpaar die optimale Hybridisierungstemperatur, Zyklenzahl und Magnesiumkonzentration experimentell bestimmt. Dies ist besonders bei der real-time PCR wichtig, da sich das für den Nachweis doppelsträngiger DNA verwendete Agens SYBR<sup>®</sup>Green I auch in Oligonukleotiddimere einlagern kann und somit das Fluoreszenzsignal des PCR-Produkts verfälscht. Die Sequenzen der Oligonukleotide und die jeweiligen PCR-Bedingungen sind in Tab. 3 aufgeführt.

## 2.6 Pflanzenextrakte und Substanzen

Die in der dieser Arbeit verwendeten Pflanzenextrakte und ein Teil der eingesetzten Substanzen wurden freundlicherweise von Prof. Rune Blomhoff (Department of Nutrition, Institute of Basic Medical Sciences, University of Oslo) zur Verfügung gestellt. Das verwendete  $\gamma$ -Tocotrienol war ein Geschenk von Dr. Peter Hoppe (BASF AG, Ludwigshafen).

**Tab. 4: Verwendete Pflanzenextrakte**

<b>Pflanzenextrakte<sup>1</sup></b>			
Name (deutsch)	Name (englisch)	Stammlösung <sup>1</sup>	Lösungsmittel
Blaubeere	Blueberry	2 g/ml	H <sub>2</sub> O
Gewürznelke	Clove	2 g/ml	50 % DMSO
Himbeere	Raspberry	2 g/ml	H <sub>2</sub> O
Nelkenpeffer, Piment	Allspice	2 g/ml	20 % DMSO
Thymian	Thyme	2 g/ml	20 % DMSO
Walnuss	Walnut	2 g/ml	10 % DMSO

<sup>1</sup> Extraktion/Konzentrationsangabe vgl. [111]

**Tab. 5: Verwendete nicht kommerziell erworbene Substanzen**

<b>Substanzen</b>			
Name	Bemerkung	Stammlösung	Lösungsmittel
Curcumin	Polyphenol (Farbstoff aus der Gelbwurz)	100 mM	100 % DMSO
EGCG	Polyphenol (Flavonoid aus grünen Teeblättern)	100 mM	100 % DMSO
Medox	Polyphenol (Anthocyanidin aus der Blaubeere)	100 mg/ml	100 % DMSO
Quercetin	Polyphenol (Flavonol)	100 mM	100 % DMSO
Resveratrol	Polyphenol (Stilben)	100 mM	100 % DMSO
$\gamma$ -Tocotrienol	Vitamin E-Form	97,8 % Reinheit	80 % Ethanol

## 3 Methoden

### 3.1 Die Zellkultur als *in vitro* Testsystem

Als *in vitro* System wurden die aus einem humanen Leberkarzinom isolierte Hepatoblastom-Zelllinie HepG2 (ATCC; HB8065) und die aus einem humanen Adenocarcinom isolierte Zelllinie Caco-2 (DSMZ; ACC 169) benutzt [165, 166]. Bei beiden Zelllinien handelt es sich um häufig in der Forschung verwendete adhärenz Zellen. Neben den HepG2-Wildtypzellen wurden auch HepG2-Zellen verwendet, die das  $\alpha$ -Tocopherol-Transfer-Protein überexprimieren (HepG2 <sup>$\alpha$ TTP</sup>-Zellen). Diese wurde von Frau Dr. Kirstin Wingler (Deutsches Institut für Ernährungsforschung, Potsdam-Rehbrücke) hergestellt. Die gesamte Arbeit mit den Zellkulturen wurde unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

#### 3.1.1 Kultivierung der Zellen

HepG2- und Caco-2-Zellen wurden in ihren jeweiligen Kulturmedien als Monolayer-Kulturen in einem Brutschrank bei 37°C in einer wasserdampfgesättigten Luftatmosphäre, angereichert mit 5 % CO<sub>2</sub>, kultiviert. Die Kultivierung erfolgte je nach Zielsetzung in unterschiedlichen Kulturgefäßen aus Polystyren (siehe Tab. 6). Die HepG2-Zelllinie wurde in RPMI 1640 mit 10 % FCS, 2 mM L-Alanyl-L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin und einem pH-Wert von 7,1 kultiviert. Die HepG2 <sup>$\alpha$ TTP</sup>-Zellen erhielten zur Selektion zusätzlich 400 µg/ml Geneticin G418. Die Caco-2-Zelllinie wurde in DMEM-*high-glucose* mit ebenfalls 10 % FCS, 1 % MEM nichtessentielle Aminosäuren, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin und einem pH-Wert von 7,1 kultiviert.

**Tab. 6: Verwendete Zellkulturgefäße**

Kulturgefäß	Bodenfläche	Mediumzugabe	Verwendung
6-Loch Platte	9,40 cm <sup>2</sup>	4 – 8 ml	RNA- und Proteingewinnung Gehalt/Metabolismus von Vitamin E
24-Loch Platte	1,88 cm <sup>2</sup>	1 ml	Transfektionen
96-Loch Platte	0,32 cm <sup>2</sup>	0,2 ml	MTT-Test
T-75 Flasche	75 cm <sup>2</sup>	20 ml	Zellerhaltung
T-175 Flasche	175 cm <sup>2</sup>	50 ml	Zellerhaltung Gewinnung von Kernprotein

### 3.1.2 Subkultivierung der Zellen

Kurz vor dem Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen subkultiviert. Dies erfolgte in einem Wechsel von 3 bis 4 Tagen. Zur Subkultivierung wurden die Zellen mit PBS gespült und anschließend durch die Einwirkung einer 37°C warmen Trypsin/EDTA-Lösung (0,05 % Trypsin, 0,02 % EDTA in PBS, pH 7,4) für ca. 5 min im Brutschrank vom Flaschenboden abgelöst (Trypsinieren). Die Trypsin-Reaktion wurde durch die Zugabe von serumhaltigen Medium gestoppt. Nach einem Zentrifugationsschritt (8 min bei 250 x g) wurde das Zellpellet resuspendiert, um einen Faktor von 5 verdünnt und in frischem Medium ausgesät. Die Zellen befanden sich für ca. 30 – 35 Passagen in Kultur.

### 3.1.3 Bestimmung der Zellzahl

Die Zellen wurden mit einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Vor der Zählung wurden 20 µl Zellsuspension mit 20 µl Trypanblaulösung gemischt, so dass lebende nicht angefärbte Zellen von toten angefärbten Zellen unterschieden werden konnten.

### 3.1.4 Auftauen der Zellen

Um die in flüssigem Stickstoff kryokonservierten Zellen (Kulturmedium mit 20 % FCS und 10 % DMSO) wieder in Kultur zu nehmen, wurden diese im Wasserbad kurz angetaut und in 50 ml des entsprechenden Kulturmediums überführt. Zur Entfernung von toten Zellen und DMSO wurden die Zellen anschließend kurz bei 250 x g bei RT abzentrifugiert, in frischem Kulturmedium resuspendiert und erneut ausgesät.

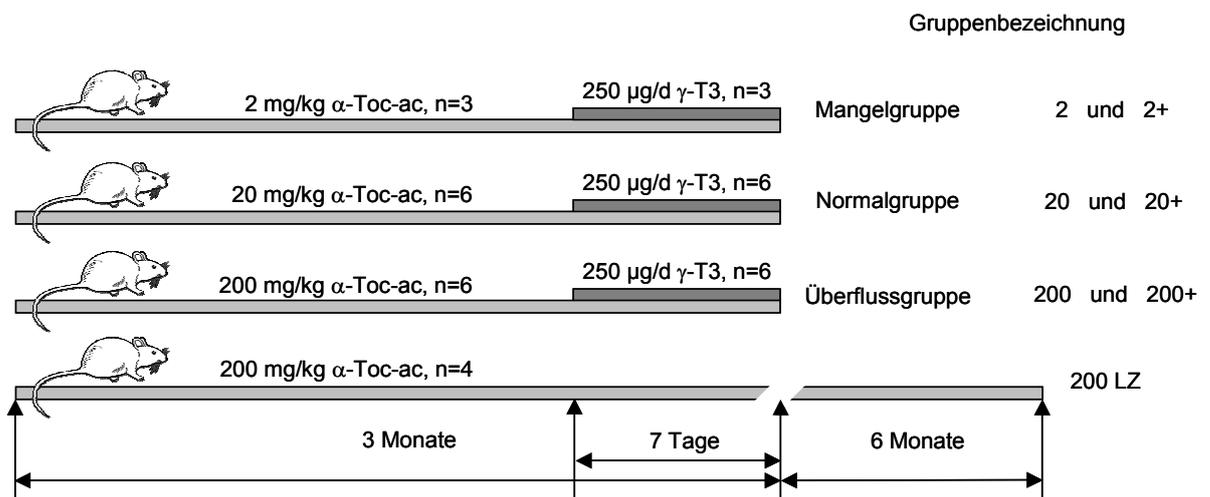
## 3.2 Das Tierexperiment als *in vivo* Testsystem

### 3.2.1 Tiermodell und Haltungsbedingungen

Das Tierexperiment ermöglicht es, die *in vivo* Situation zu untersuchen. Es wurde sich für das Maus-Modell entschieden, da dieses gut charakterisiert ist und eine kurze Generationszeit sowie unkomplizierte Haltungsbedingungen die Versuchsdurchführung erleichtern. Männliche Mäuse vom Stamm C57BL6 wurden unter Standardbedingungen (Temperatur 22°C, relative Luftfeuchte 50 – 60 %, 12 h Tag-Nacht-Rhythmus) gehalten. Bei Versuchsbeginn waren die Mäuse einen Monat alt. Die Haltung der Tiere erfolgte entsprechend den Festlegungen der Tierversuchsgenehmigungsbehörde und den gesetzlichen Bestimmungen der *Federation of European Laboratory Animal Science Association* (FELASA). Futter und Wasser standen den Tieren *ad libitum* zur Verfügung.

### 3.2.2 Versuchsaufbau und -ablauf

Um den Einfluss von Vitamin E auf die Genexpression *in vivo* zu untersuchen, wurden die Tiere in drei Fütterungsgruppen mit unterschiedlichem  $\alpha$ -Tocopherol-Gehalt aufgeteilt. Für diesen Zweck wurden dem Grundfutter verschiedene Mengen an *RRR*- $\alpha$ -Tocopherylacetat (Sigma, Deisenhofen) beigemischt. Das *RRR*- $\alpha$ -Tocopherylacetat wird nach der Aufnahme über den Dünndarm im Körper zu *RRR*- $\alpha$ -Tocopherol hydrolysiert [33]. Die Acetat-Form des  $\alpha$ -Tocopherols wurde deshalb gewählt, da diese gegenüber einem oxidativen Abbau unempfindlicher ist. Nach dem Erreichen der verschiedenen  $\alpha$ -Tocopherol-Stadien wurde am Ende der Fütterungsperiode jeweils der Hälfte der Tiere aus einer Gruppe  $\gamma$ -Tocotrienol verabreicht (siehe Abb. 8). Es wurde erwartet, einen möglichen Effekt von  $\gamma$ -Tocotrienol auf der Basis einer unterschiedlichen  $\alpha$ -Tocopherol-Versorgung feststellen zu können.



**Abb. 8: schematische Darstellung des Tierversuches**

Die Gruppenbezeichnung ist an den Tocopherolgehalten der Diäten angepasst. Das „+“ steht für die zusätzliche Schlündefelung mit  $\gamma$ -Tocotrienol.

Das Grundfutter wurde für eine Vitamin E-Mangeldiät mit 2 mg/kg *RRR*- $\alpha$ -Tocopherylacetat (6 Tiere), für eine Vitamin E-Normaldiät mit 20 mg/kg *RRR*- $\alpha$ -Tocopherylacetat (12 Tiere) und für eine Vitamin E-Überflussdiät mit 200 mg/kg *RRR*- $\alpha$ -Tocopherylacetat (16 Tiere) angereichert. Die Diäten wurden 3 Monate gefüttert. Vier Tiere der Vitamin E-Überflussdiät wurden 9 Monate gefüttert, um Langzeiteffekte zu untersuchen. Drei Tiere der Vitamin E-Mangelgruppe, 6 Tiere der Vitamin E-Normalgruppe und 6 Tiere der Vitamin E-Überflussgruppe erhielten an den letzten 7 Tagen des Versuches täglich 250  $\mu$ g in Olivenöl gelöstes  $\gamma$ -Tocotrienol geschlündelt. Um Schlündefeffekte auszuschließen, wurden die restlichen Tiere der jeweiligen Gruppen nur mit Olivenöl geschlündelt. Die 4 Tiere,

denen die Überflusdiät für 9 Monate verabreicht wurde, erhielten kein  $\gamma$ -Tocotrienol (Abb. 8). Einen Tag vor Ablauf des Versuches wurden jeweils 3 Tiere jeder Gruppe in einen Stoffwechsellkäfig gesetzt und der Urin von 24 h gesammelt.

Für die Entnahme der Gewebe wurden die Tiere nach vorheriger Betäubung mit Flurene® (Abbot, Wiesbaden) durch Dekapitation getötet. Neben der Leber wurden weitere Organe (Großhirn, Kleinhirn, Dünndarm, Dickdarm, Haut, Muskulatur, Herz, Lunge, Nieren und Hoden) entnommen und zusätzlich Blut und Kot aufgefangen. Alle Organe und der Kot wurden sofort nach Entnahme in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. Aus dem Blut wurde sofort durch Abzentrifugation (3.000 x g, 4 min, 4°C) der festen Blutbestandteile Plasma gewonnen.

- *Grundfutter (sniff - Spezialdiäten GmbH, Soest):* 240 g/kg Casein; 500 g/kg Stärke; 110 g/kg Glukose; 30 g/kg Kokusnussöl; 50 g/kg Zellulose; 60 g/kg Mineralien- und Spurenelementemix; 60 g/kg Vitaminmix (ohne Vitamin E)

### 3.3 Vitamin E-Analytik

Für die Messung der Tocopherole und Tocotrienole sowie ihrer Metabolite wurde die *High Performance/Pressure Liquid Chromatography* (HPLC) angewandt.

#### 3.3.1 Probengewinnung

Ca.  $1,8 \times 10^5$  HepG2-Zellen bzw. Caco-2-Zellen wurden in 6-Loch-Platten ausgesät. Nach 72 h und dem Erreichen einer 80 %igen Konfluenz der Zellen erfolgte ein Mediumwechsel. Dem neuen Kulturmedium (8 ml) wurden die zu untersuchenden Tocopherole und Tocotrienole mit einer Endkonzentration von jeweils 50  $\mu$ M zugesetzt. Nach der gewählten Inkubationszeit wurde das Medium vorsichtig abgenommen und in Falcon-Röhrchen überführt. Die Zellen wurden 3x mit PBS gewaschen, mit einem Zellschaber vom Plattenboden gelöst und mit insgesamt 1,5 ml PBS in Falcon-Röhrchen überführt.

Erfolgte keine sofortige Aufarbeitung, wurden Medium bzw. Zellen zur Verhinderung einer möglichen Oxidation der Vitamin E-Formen und ihrer Metabolite mit Stickstoff begast und bei -20°C gelagert.

#### 3.3.2 Messung des Vitamin E-Gehalts in Zellen

Die Zellen wurden durch Ultraschallbehandlung aufgebrochen (20 Stöße, Amplitude 60 %; Zyklus 0,5 s; Dr. Hielscher UP 50 H). Für die Proteinbestimmung (siehe 3.4.2) wur-

den die Zelltrümmer kurz mit 21.000 x g bei 4°C abzentrifugiert und ein Aliquot von 50 µl des Überstandes abgenommen. Zu den aufgebrochenen Zellen (1,45 ml) wurden 5 ml Hexan, 1 ml Methanol sowie der interne Standard  $\delta$ -Tocopherol (4,3 nmol) gegeben und für 1 min gut durchmischt. Die organische Phase wurde in ein neues Falcon-Röhrchen überführt. Die Extraktion wurde durch erneute Zugabe von 5 ml Hexan insgesamt dreimal durchgeführt, bevor die gesammelte organische Phase im Vakuumkonzentrator (RC 10.22, Jouan, Frankreich) eingeeengt wurde.

Der aus der organischen Phase bis zur Trockne eingeeengte Rest wurde in 200 µl Ethanol gelöst und in ein HPLC-Probengefäß überführt. Bis zur Messung der Proben wurden diese bei -20°C aufbewahrt. Die Elution der untersuchten Vitamin E-Formen erfolgte isokratisch mit einem Methanol-Wasser-Gemisch (98:2) und die Detektion bei einer Wellenlänge von 293 nm mittels eines UV-Detektors. Der Lösungsmittelfluss betrug 0,5 ml/min. Der Vitamin E-Gehalt konnte über die Fläche und die Konzentration des internen Standards  $\delta$ -Tocopherol berechnet werden.

*Verwendete HPLC-Anlage:*

- L-6200A Pumpe; L-7400 UV-Detektor; AS-2000A Autosampler; ERC-3215 Entgaser (alles Merck-Hitachi, Deutschland); 250 x 3 mm 6 µm Partikel-Größe RP-18 Säule (SEPSERV, Deutschland)
- Software: Merck-Hitachi Model D-7000, Chromatography Data Software, Vers. 4

### 3.3.3 Messung der Vitamin E-Metabolite im Medium

Zum Medium (8 ml) wurden 1,6 ml einer 0,1 M Natriumacetatlösung (pH 4,5) sowie der interne Standard  $\alpha$ -Carboxypropylhydroxychroman ( $\alpha$ -CPHC; 0,6 nmol) zugegeben. Beim  $\alpha$ -CPHC handelt es sich um einen synthetischen Standard, dessen Seitenkette im Vergleich zum natürlichen Metaboliten  $\alpha$ -CEHC um 1 C-Atom verlängert ist. Die Extraktion der Metabolite aus dem Medium erfolgte mit 2 x 15 ml und 1 x 10 ml tert. Butylmethylether. Es wurde jeweils die organische Phase abgenommen, in einem Falcon-Röhrchen gesammelt und anschließend mittels Vakuumkonzentrator (RC 10.22, Jouan, Frankreich) bis zur Trockne eingeeengt. Der Rückstand wurde durch Ultraschallbehandlung und zusätzliches Vortexen in 200 µl HPLC-Puffer gelöst, in ein HPLC-Probengefäß überführt und bis zur Messung bei -20°C eingefroren.

Die Detektion der Metabolite erfolgte elektrochemisch, da durch diese Methode auch sehr geringe Mengen noch sicher bestimmt werden können. Bei der elektrochemischen Detektion werden die zu bestimmenden Substanzen einer chemischen Reaktion an einer Elektrode im ECD unterworfen. Dabei werden den Metaboliten zwei Elektronen entzogen

(illustriert in [167]). Verwendet wurde ein coulometrischer Detektor, bei dem der Analyt während der elektrochemischen Detektion vollständig umgesetzt wird. Der bei der Oxidation entstehende Stromfluss ist daher zur Menge des Metaboliten direkt proportional und kann als Messgröße herangezogen werden. Die angelegte Spannung wurde konstant gehalten und die Spannung gemessen, die nötig ist, um die bei der elektrochemischen Reaktion entstandene Stromänderung auszugleichen.

Für die Auftrennung der Metabolite wurde als Laufmittel ein HPLC-Puffer mit einem hohen Acetonitril-Anteil verwendet. Dieser beschleunigt die Eluierung der hydrophoberen Metabolite. Um auch die unpolaren Metabolite (die Polarität nimmt vom CEHC bis zum Tocopherol bzw. Tocotrienol immer mehr ab) von der Säule zu spülen, wurde ein binärer Stufengradient gefahren. Dazu wurde Acetonitril als zweites Laufmittel eingesetzt.

- *HPLC-Puffer*: 540 ml H<sub>2</sub>O; 186 mg EDTA-Dinatriumsalz; 430 ml Acetonitril; 25 ml 20 % Tetraethylammoniumhydroxid (TEAH); pH 5,5
- *binärer Stufengradient; HPLC-Puffer (A), Acetonitril (B)*: 0 – 34 min: 100 % A, 0 % B; 35 – 52 min: 100 – 55 % A, 0 – 45 % B; 53 – 55 min: 55 – 4 % A, 55 – 96 % B; 56 – 65 min: 4 % A, 96 % B; 66 – 68 min: 4 – 100 % A, 96 – 0 % B; 69 – 78 min: 100 % A, 0 % B

*Verwendete HPLC-Anlage:*

- 580 Pump; ED 50 Electrochemical Detector; ASI-100 Automatic Sample Injector, UVD 170 U Column Oven (alles Dionex, Deutschland); 250 x 4 mm RP-18 Säule (Merck, Deutschland)
- Software: Chromeleon Version 6.60

### 3.3.4 Bestimmung von Response-Faktoren

Für die Quantifizierung der Vitamin E-Formen und ihrer Metabolite wurde vor den Messungen ein entsprechender Response-Faktor ermittelt und bei der Berechnung der Konzentration einbezogen. Der Response-Faktor berücksichtigt die unterschiedliche Empfindlichkeit des Detektors für Analyt (Substanz) und den verwendeten internen Standard. Er gibt somit Aufschluss darüber, in wie weit die über die HPLC-Chromatogramme ermittelten Flächen verschiedener Substanzen miteinander vergleichbar sind. Er ist nicht nur von den Substanzen, sondern auch vom Detektionsverfahren, den verwendeten Laufmitteln und Gradienten abhängig. Die jeweiligen Responsefaktoren wurden mit Stammlösungen der Vitamin E-Formen bzw. der synthetischen Metabolite bestimmt. Dazu wurden verschiedene Konzentrationen der Tocopherole und Tocotrienole (jeweils  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Form)

sowie der Metabolite ( $\alpha$ - und  $\gamma$ -CEHC,  $\alpha$ -CMBHC) mit einer konstanten Konzentration eines internen Standards (bei den Vitamin E-Formen  $\delta$ -Tocopherol bzw. bei den Metaboliten  $\alpha$ -CPHC) gemischt. Der Responsefaktor errechnete sich aus den gemittelten Quotienten der eingesetzten Soll-Konzentrationen und der chromatografisch bestimmten Ist-Konzentration, bezogen auf den jeweiligen internen Standard.

Für alle untersuchten Vitamin E-Formen und Metabolite (ausgenommen das  $\gamma$ -CMBHC, da hier kein synthetischer Standard vorlag) konnte so vor den jeweiligen Messungen der zu berücksichtigende Responsefaktor ermittelt werden. Ausgehend von der Beobachtung, dass die Responsefaktoren von  $\alpha$ - und  $\gamma$ -CEHC zueinander immer sehr ähnlich waren und der Annahme, dass dies auch bei den CMBHC-Metaboliten zutrifft, wurde für das  $\gamma$ -CMBHC der entsprechende Responsefaktor des  $\alpha$ -CMBHC zur Berechnung der Konzentration verwendet [57].

### 3.4 Molekularbiologische und biochemische Methoden

#### 3.4.1 MTT-Test

Soweit keine Erkenntnisse über zytotoxische Eigenschaften der verwendeten Substanzen und Extrakte vorlagen, wurden mindestens die verwendeten maximalen Konzentrationen auf zytotoxische Effekte mit Hilfe des MTT-Tests untersucht. Der MTT-Test ist ein Test, der vitale Zellen durch ihre Stoffwechselaktivität nachweist. Das wasserlösliche gelbe Tetrazoliumsalz MTT wird von mitochondrialen Dehydrogenasen vitaler Zellen in einer NADH-abhängigen Reaktion irreversibel zum wasserunlöslichen blauen Formazan reduziert. Da nur vitale Zellen Reduktionsäquivalente in Form von NADH zur Verfügung stellen können, sind die Farbintensität des gebildeten Formazan und die Vitalität der Zellen einander direkt proportional [168].

Für die Durchführung des Tests wurden  $3,7 \times 10^4$  Zellen in 96-Loch-Platten mit den zu untersuchenden Konzentrationen der Substanzen und Extrakte im jeweiligen Kulturmedium im Brutschrank angezogen. Vor dem Messzeitpunkt wurden die Zellen mit 0,5 mg/ml MTT (in PBS) für 40 min im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde das Medium abgeschlagen und jeder Zellansatz mit 100  $\mu$ l Lysepuffer (95 % Isopropanol, 5 % Methansäure) für 10 min unter intensivem Schütteln lysiert. Die photometrische Auswertung erfolgte durch Messung der Extinktion bei einer Wellenlänge von 550 nm im Elisa-Reader MR5000 (Dynatech, Denkendorf). Eine Vitalitätsabnahme bis auf maximal 80 % des Ausgangswertes wurde als nicht toxisch gewertet.

### 3.4.2 Proteinbestimmung

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde die Methode von Bradford [169] angewendet. Diese beruht auf einer Verschiebung des Extinktionsmaximums des Farbstoffs Coomassie Brilliant Blau G 250 von 465 nm nach 595 nm, wenn der Farbstoff mit Proteinen Komplexe bildet. Nach einer entsprechenden Verdünnung wurden 10 µl der zu testenden Proteinlösung mit je 200 µl Bradford-Färbelösung (BioRad, München) versetzt und 15 min bei RT inkubiert. Zur Quantifizierung wurden sieben Standards von BSA-Stammlösungen (20 - 300 µg/ml) erstellt und gleich behandelt. Die BSA-Stammlösungen waren für die Messung von Kernproteinen in 1 N NaOH und für die Messung der Proteine von Cytosolen bzw. Gesamtlysaten in H<sub>2</sub>O gelöst. Die Messung der Extinktion erfolgte bei einer Wellenlänge von 630 nm im Elisa-Reader MR5000 (Dynatech, Denkendorf).

### 3.4.3 RNA-Isolierung

#### 3.4.3.1 RNA-Extraktion aus Zellen

Die RNA-Extraktion aus den Zellen erfolgte mit dem Invisorb Spin Cell RNA Mini Kit (Invitek GmbH, Berlin). Dieser Kit ist für die Isolation geringer RNA-Mengen aus menschlichen und tierischen Zellen optimiert. Zur Vorbereitung der RNA-Extraktion wurden die Zellen nach Beendigung des Versuches 2x mit PBS gewaschen und durch Trypsinieren (siehe 3.1.2) steril geerntet. Das nach der Zentrifugation erhaltene Zellpellet wurde 2x mit eiskaltem PBS gewaschen und bei -80°C eingefroren, sofern die RNA-Extraktion nicht sofort erfolgte. Die Präparation der RNA aus dem Zellpellet erfolgte entsprechend der Anleitung des Kits. Die RNA wurde bei -80°C gelagert.

#### 3.4.3.2 RNA-Extraktion aus Mäuse-Gewebe

Die RNA von ca. 20 – 50 mg des bei -80°C gelagerten Gewebes wurde mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden) entsprechend der Anleitung des Herstellers isoliert. Zur Entfernung von möglichen DNA-Verunreinigungen wurde zusätzlich für 15 min ein DNA-Verdau mit RNase freier DNase (Qiagen, Hilden) durchgeführt. Die Homogenisierung des Gewebes erfolgte in einem Potter-S-Homogenisator (Braun, Melsungen) unter Eiskühlung mit mindestens 20 Hüben bei 500 U/min. Um die Ausbeute an RNA zu verbessern, wurde das gepotterte Gewebe zusätzlich durch eine Kanüle (Ø 0,8 mm) mindestens 10x auf- und abgezogen. Es wurde ausschließlich mit frisch autoklavierten Materialien bzw. für mindestens 3 h bei 240°C ausgeheizten Materialien und unter Verwendung von DEPC-behandeltem Wasser gearbeitet. Ein Teil der isolierten RNA wurde sofort in cDNA umgeschrieben (siehe 3.4.4.1) und der Rest bei -80°C gelagert.

### 3.4.3.3 Bestimmung von Konzentration und Reinheit der RNA

Die Konzentration und Reinheit der isolierten RNA können photometrisch bestimmt werden [170]. Bei einer Küvettendicke von 1 cm und einer Wellenlänge von 260 nm entspricht eine Extinktion von 1 gleich 40 µg/ml RNA. Die Konzentration der isolierten RNA wurde nach geeigneten Verdünnungen mit Quarzküvetten im Photometer (Smart Spec 3000, Bio-Rad, München) dreifach gemessen und wie folgt berechnet: RNA-Konzentration [µg/ml] =  $E_{260} \times 40 \text{ µg/ml} \times \text{Verdünnungsfaktor}$ . Die Reinheit wurde durch die Bestimmung des Quotienten  $E_{260}/E_{280}$  untersucht. Ein Quotient von 1,8 bis 2,0 steht für reine Nukleinsäuren ohne Kontaminationen mit Proteinen oder Detergenzien. Je nach Lösungsmittel kann der Quotient trotz reiner Nukleinsäuren auch andere Werte besitzen [171, 172].

Bei der Isolierung der RNA aus den Mäuse-Geweben wurde die Reinheit stichprobenartig zusätzlich durch eine Auftrennung im Agarosegel untersucht. Bei guten RNA-Präparationen laufen 28S-RNA (4,7 kb) und 18S-RNA (1,9 kb) als zwei scharfe, getrennte Banden und dienen als Marker für die Reinheit der RNA. Für das Gel wurden 1,2 g RNase-freie Agarose in 80 ml RNase-freiem Wasser aufgekocht. Nach dem Abkühlen auf ca. 70°C wurden 10 ml 10x-MOPS-Puffer und 5,4 ml Formaldehyd (37 %) dazu pipettiert. Zur Vorbereitung der RNA-Proben wurden 10 µg der aus dem Gewebe isolierten RNA in einer Vakuumzentrifuge (RC 10.22, Jouan, Frankreich) getrocknet, in 15 µl Probenpuffer aufgenommen, für 5 min bei 95°C im Wasserbad denaturiert und anschließend sofort auf Eis gestellt. Die RNA-Proben wurden auf das ausgehärtete Gel geladen und bei 70 V für ca. 1 h im Laufpuffer aufgetrennt.

- *10x-MOPS-Puffer*: 400 mM MOPS; 50 mM Natriumacetat; 10 ml EDTA-Na<sub>2</sub>-2xH<sub>2</sub>O; pH 7,2
- *Probenpuffer*: 7,2 ml Formamid (deionisiert); 1,6 ml 10x-MOPS-Puffer; 2,6 ml 37 % Formaldehyd; 1,8 ml H<sub>2</sub>O (RNase-frei); 1 ml Glycerin (RNase-frei); 0,8 ml Bromphenolblau-Lösung
- *Laufpuffer*: 100 ml 10x-MOPS-Puffer; 20 ml 37 % Formaldehyd; 880 ml H<sub>2</sub>O

### 3.4.4 DNA-Gewinnung

#### 3.4.4.1 Reverse-Transkriptase-Reaktion

Jeweils 3 µg der aus den Zellen und Geweben isolierten RNA wurden unter Verwendung von 150 pmol Oligo-dT(15)-Nukleotiden, die an das für die mRNA charakteristische Poly-dA 3'-Ende binden, und 180 U Moloney's murine leukemia virus RNase H- reversen Transkriptase (M-MLV) für 2 h bei 37°C in cDNA in einem Thermocycler (Biometra, Göttingen) umgeschrieben. Zur Enzyminaktivierung wurde der Reaktionsansatz nach der

Umschreibung für 10 min auf 94°C erhitzt. Um einen RNA-Abbau während der Umschreibung zu verhindern, wurden dem jeweiligen Ansatz 30 U eines RNase-Hemmers (rRNasin) beigefügt. Die gewonnene cDNA wurde bei -20°C gelagert.

#### 3.4.4.2 Bestimmung von Konzentration und Reinheit der cDNA

Die Konzentration und Reinheit der cDNA wurde analog zur der unter Punkt 3.4.3.3 beschriebenen Art und Weise ebenfalls photometrisch bestimmt. Bei DNA entspricht eine Extinktion von 1 bei einer Küvettendicke von 1 cm und einer Wellenlänge von 260 nm bei einzelsträngiger DNA 33 µg/ml bzw. bei doppelsträngiger DNA 50 µg/ml.

#### 3.4.5 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Mit der PCR kann die Expression ausgewählter DNA-Bereiche mit Hilfe einer hitzestabilen Polymerase und sequenzspezifischen Oligonukleotiden (siehe Tab. 3) *in vitro* untersucht werden [173]. Die Protokolle der PCR sind in Tab. 7 zusammengefasst.

**Tab. 7: Standard-PCR-Protokolle**

	semiquantitative PCR	real-time PCR
RNA-Äquivalent (cDNA)	133 ng <sup>1</sup> bzw. 16 ng <sup>2</sup>	133 ng
10x Polymerase-Puffer	1x	1x
MgCl <sub>2</sub>	1 mM <sup>3</sup> , 2 mM <sup>4</sup>	1 mM <sup>3</sup> , 2 mM <sup>4</sup>
dNTP	0,05 mM	0,05 mM
5'-Oligonukleotide	500 nM	500 nM
3'-Oligonukleotide	500 nM	500 nM
Fluorescein	--	10 nM
SYBR®Green I	--	0,1x
Taq-Polymerase	0,625 U	0,625 U
steriles H <sub>2</sub> O bidest.	ad 25 µl oder 50 µl	ad 25 µl

<sup>1</sup> CYP3A4, CYP3A5 <sup>2</sup> β-Aktin <sup>3</sup> CYP3A4, HPRT, β-Aktin <sup>4</sup> CYP3A5, Cyp3a11, α-TTP

Die semiquantitative PCR wurde neben der Amplifikation von spezifischen DNA-Abschnitten auch zum Einfügen von Mutationen oder Schnittstellen eingesetzt (Mutagenese-PCR, siehe 3.4.7.1). Durch den Einbau spezifischer Restriktionsstellen in die PCR-Oligonukleotide und somit in das PCR-Produkt konnte eine Klonierung der PCR-Produkte in Expressions- oder Reporterplasmide erfolgen. Neben der konventionellen semiquantitativen PCR wurde auch die Methode der real-time PCR (Echtzeit PCR) angewen-

det. Die real-time PCR ist eine konventionelle PCR, die jedoch eine Auswertung der Genexpression während des eigentlichen Amplifikationsprozesses ermöglicht. Das Prinzip der Methode beruht darauf, dass bei der Amplifikation ein fluoreszierender Farbstoff interkaliert und ein Fluoreszenzsignal entsteht, welches während jeder Hybridisierungs- und Synthese-Phase der einzelnen Zyklen der PCR detektiert wird. Das Fluoreszenzsignal ist in der exponentiellen Phase der PCR zur Menge des entstehenden PCR-Produkts direkt proportional. Es wurde der iCycler von BioRad (München) und der Cyaninfluoreszenzfarbstoff SYBR<sup>®</sup>Green I (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet. SYBR<sup>®</sup>Green I interkaliert in das entstehende doppelsträngige DNA-Produkt der konventionellen PCR, welches somit spezifisch nachweisbar ist.

#### **3.4.5.1 Quantifizierung der Genexpression mittels semiquantitativer PCR (Gelelektrophorese)**

Je nach Größe des erwarteten PCR-Produkts wurden 1 – 2,5 % (w/v) Agarose in TBE-Puffer aufgekocht. Das abgekühlte und ausgehärtete Agarosegel wurde in eine Gelkammer mit TBE-Puffer eingesetzt. Der PCR-Ansatz wurde mit 12 % (v/v) 10x-DNA-Laufpuffer gemischt und 10 µl dieses Gemisches dann in die Probenaschen des Agarosegels aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung der DNA erfolgte mit ca. 80 - 90 V in TBE-Puffer. Nach Abschluss der Auftrennung wurde das Gel mit Ethidiumbromid (5 µg/ml in TBE-Puffer) gefärbt und die DNA mittels UV-Licht sichtbar gemacht. Die semiquantitative Auswertung erfolgte densitometrisch mit dem GelDoc2000 (Bio-Rad, München) und der dazugehörigen Software „Quantity One 4.2.3“. Die Länge der DNA-Fragmente wurde mit Hilfe eines parallel getrennten DNA-Längenstandardmixes (DNA-Leiter-Mix; PEQLAB Biotechnologie GMBH, Erlangen) kontrolliert.

- *1x DNA-Laufpuffer*: 20 % Ficoll 400; 0,1 M EDTA pH 8,0; 1 % SDS; 0,025 % Bromphenolblau in H<sub>2</sub>O

#### **3.4.5.2 Quantifizierung der Genexpression mittels real-time PCR**

Die Quantifizierung der Genexpression erfolgte mit Hilfe der zum iCycler gehörigen Software „iCycler iQTM Real-Time Detection System Software“ von BioRad (München) und unter Anwendung der komparativen Methode durch den Vergleich von C<sub>T</sub>-Werten (relative Quantifizierung; sog.  $\Delta\Delta C_T$ -Methode). Der C<sub>T</sub>-Wert gibt den PCR-Zyklus an, bei dem zum ersten Mal ein Fluoreszenzsignal des PCR-Produkts über einem selbst definierten Schwellenwert gemessen wird. Der Schwellenwert wird dabei üblicherweise in den Anfang der exponentiellen Phase der PCR gelegt. Bei der  $\Delta\Delta C_T$ -Methode wird im ersten

Schritt für jede untersuchte Probe der  $C_T$ -Wert des Referenzgens vom  $C_T$ -Wert des Zielgens subtrahiert ( $\Delta C_T = C_{T\text{Zielgen}} - C_{T\text{Referenzgen}}$ ). Nach dieser Normierung wird vom  $\Delta C_T$ -Wert der behandelten Probe der  $\Delta C_T$ -Wert der Kontrolle subtrahiert und man erhält den  $\Delta\Delta C_T$ -Wert (Maß für die relative mRNA). Der relative Expressionsunterschied zur Kontrolle ergibt sich dann aus der arithmetischen Formel  $2^{-\Delta\Delta C_T}$ .

Die  $\Delta\Delta C_T$ -Methode kann nur dann angewendet werden, wenn Ziel- und Referenzgen mit gleicher Effizienz amplifiziert werden (Applied Biosystems User Bulletin #2). Dies wurde mittels Kalibrierungsstandards getestet. Ausgehend von der Berechnung – „1 µg von 1.000 bp DNA = 1,52 pmol =  $9,1 \times 10^{11}$  Moleküle“ - wurden für alle PCR-Produkte der zu untersuchenden Gene, die zuvor durch PCR und Isolierung aus einem Agarosegel (siehe 3.4.8.2) gewonnen wurden, Standardreihen von  $1 \times 10^3$  bis  $1 \times 10^8$  Molekülen hergestellt. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Standards nicht mit Ethidiumbromid angefärbt wurden, um so eine eventuelle Beeinflussung der Einlagerung des Fluoreszenzfarbstoff SYBR<sup>®</sup>Green I in die DNA auszuschließen. Die Standards wurden gleichzeitig mit der zu untersuchenden Proben-DNA unter gleichen Bedingungen amplifiziert und gemessen. Liegt bei einer Auftragung der eingesetzten Moleküle gegen den  $\Delta C_T$ -Wert der Anstieg der Gerade zwischen 0 und  $\pm 0,1$  kann die  $\Delta\Delta C_T$ -Methode angewendet werden. Ist das nicht der Fall, ist die Quantifizierung über eine Standardgerade möglich.

### 3.4.6 In vitro Transkription und Translation von humanen PXR und RXR

Die *in vitro* Translation ermöglicht eine zellfreie Synthese eines Proteins in hoher Ausbeute und Reinheit. Die Proteinsequenz wird durch eine plasmidlokalisierte DNA-Sequenz definiert. Die *in vitro* Transkription und Translation erfolgte in sterilen silanisierten Reaktionsgefäßen mit Hilfe eines gekoppelten Systems. Hierzu wurde der Kit „TNT<sup>®</sup> T7 Coupled Reticulocyte Lysate Systems“ (Promega, Mannheim) entsprechend den Herstellerangaben verwendet. Als DNA-Matrize dienten Expressionsvektoren (vgl. Tab. 1) mit den codierenden Sequenzen für das humane PXR-Protein (pSG5-hPXR) und das humane RXR $\alpha$ -Protein (pCMX-hRXR $\alpha$ ). Das TNT-Lysat mit den *in vitro* translatierten Proteinen wurde bis zur Verwendung bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert.

### 3.4.7 EMSA

Im *electrophoretic mobility shift assay* (EMSA) werden Bindungen von Proteinen an spezifische DNA-Sequenzen, oft die Bindung von Transkriptionsfaktoren an ihre responsiven Elemente, nachgewiesen. Dazu werden radioaktiv markierte DNA-Fragmente mit Zellkernlysaten oder aufgereinigten Proteinen inkubiert und anschließend durch ein natives Polyacrylamidgel elektrophoretisch getrennt.

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Bindungsversuche zwischen DNA und Protein wurde ein Oligonukleotid gewählt, welches die spezifische Konsensussequenz eines responsiven Elements des humanen PXR aus dem Promotor des CYP3A4 beinhaltet (ER6-sense: 5'-GATCCATATGAACTCAAAGGAGGTCAGTG-3', ER6-antisense: 5'-GATC CACTGACCTCCTTTGAGTTCATATG-3'). Die Hybridisierung von äquimolaren Mengen der komplementären Einzelstränge erfolgte durch Erwärmen auf 98°C für 5 min und eine anschließende schrittweise Abkühlung bis auf 4°C mit 0,01°C/min. Die radioaktive Markierung von 2,5 pmol des doppelsträngigen Oligonukleotids wurde mit 10 U T4-Polynukleotidkinase und 30 µCi [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-ATP (Hartmann Analytic, Braunschweig) in einem 20 µl Ansatz für 45 min bei 37°C durchgeführt. Nach anschließender Zugabe von 0,5 µl EDTA (0,5 M, pH 8,0) und 29,5 µl STE-Puffer diente eine anschließende Gelfiltration mit einer *Probe Quant™* G-50 Mikro-Säule (Millipore, Eschborn) zur Entfernung von überschüssigem [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-ATP. Zur Bildung des DNA-Protein-Komplexes wurden jeweils 0,5 µl des TNT-Ansatzes für PXR und RXR (siehe 3.4.6) und 50 fmol des radioaktiv markierten Oligonukleotids in 11 µl Bindepuffer für 35 min bei RT inkubiert. Die Bindungsreaktion wurde durch Zugabe von 2 µl Stopppuffer beendet. Die Elektrophorese der Proben erfolgte mit einem nativen Polyacrylamidgel in 0,25x TBE-Puffer bei einer Spannung von 100 – 200 V. Nach der vollständigen Auftrennung wurde das Gel mit einem Geltrockner (Maxidry D-64; Biometra, Göttingen) vakuumgetrocknet und in einer lichtdichten Kassette auf einen Röntgenfilm (Kodak® BioMax MS Film; Sigma-Aldrich, München) aufgelegt, der für eine angemessene Zeit bei –80°C exponiert wurde.

Für Untersuchungen zur Spezifität der Bindungsreaktion wurden ausgewählte Proben mit einem 100x Überschuss an nicht-radiomarkiertem Oligonukleotid im Bindepuffer oder 1 µg PXR-Antikörper 20 min vor Ende der Bindungsreaktion inkubiert.

- *Polyacrylamidgel*: 3,75 ml Polyacrylamid; 0,75 ml 10x-TBE-Puffer; 125 µl 40 % APS; 30 µl 100 % TEMED; 25,35 ml H<sub>2</sub>O
- *Bindepuffer*: 10 mM Tris-HCl (pH 8,0); 40 mM KCl; 6 % Glycerol; 0,5 µg dl-dC (Promega, Mannheim); 1 mM DTT; 0,05 % Nonidet P-40 (Boehringer, Mannheim)
- *STE-Puffer*: 10 mM Tris; 1 mM EDTA; 150 mM NaCl; pH 8,0
- *Stopppuffer*: 50 % Glycerin, 0,05 % Bromphenolblau in H<sub>2</sub>O

#### 3.4.7.1 Mutagenese PCR

Um eine ortsgerechtere punktuelle Mutation in der ARE-Sequenz des GI-GPx-Promotors im pGL3-GI-prom-I durch einen ortsspezifischen Austausch von Basen (antisense: 5'-TGACTtaGC → 5'-TGACTtaAT) zu erreichen, wurde eine Mutagenese mittels

„*PCR-Overlap-Extension*“ durchgeführt (illustriert in [174]). In zwei parallelen PCR-Ansätzen (PCR1, PCR2) mit gleicher DNA-Matrize (pGL3-GI-prom-I) aber verschiedenen Mutagenese- und Amplifikations-Oligonukleotiden wurden zwei überlappende PCR-Produkte hergestellt. Der Überlappungsbereich, der die gewünschte Mutation enthält, wurde durch die Verwendung von zueinander komplementären Mutagenese-Oligonukleotiden erzeugt. Die PCR-Produkte dienten als Ausgangsprodukt für eine dritte PCR mit den entsprechenden Amplifikations-Oligonukleotiden aus PCR1 und PCR2. Um anschließend den pGL3-GI-prom-I-mut zu generieren, wurde das PCR-Produkt der PCR3 über ein präparatives Agarosegel aufgereinigt (siehe 3.4.8.3), entsprechend den Angaben des Herstellers (Invitrogen, Karlsruhe) mittels TOPO TA-Cloning<sup>®</sup>-Kit in den pCR<sup>®</sup>II-Topo<sup>®</sup> kloniert, mit den Restriktionsenzymen *Kpn I* und *Mlu I* herausgeschnitten und das Fragment in den pGL3-basic kloniert.

- *PCR1*: DNA-Matrize (pGL3-GI-prom-I); Amplifikations-Oligonukleotid 1 (5'-CCAC TGAATTGGAATCACTGGAGG-3') und Mutagenese-Oligonukleotid 1 (5'-CCAG GATGACTTATAAAAAACAGGTCC-3')
- *PCR2*: DNA-Matrize (pGL3-GI-prom-I); Amplifikations-Oligonukleotid 2 mit *Mlu I*-Schnittstelle (5'-TTGGCAATGAAACGCGTGGTGAAGC-3') und Mutagenese-Oligonukleotid 2 (5'-GGACCTGTTTTTTTATAAGTCATCCTGG-3')
- *PCR3*: DNA-Matrize (PCR-Produkt 1 und PCR-Produkt 2); Oligonukleotide (Amplifikations-Oligonukleotid 1 und Amplifikations-Oligonukleotid 2)

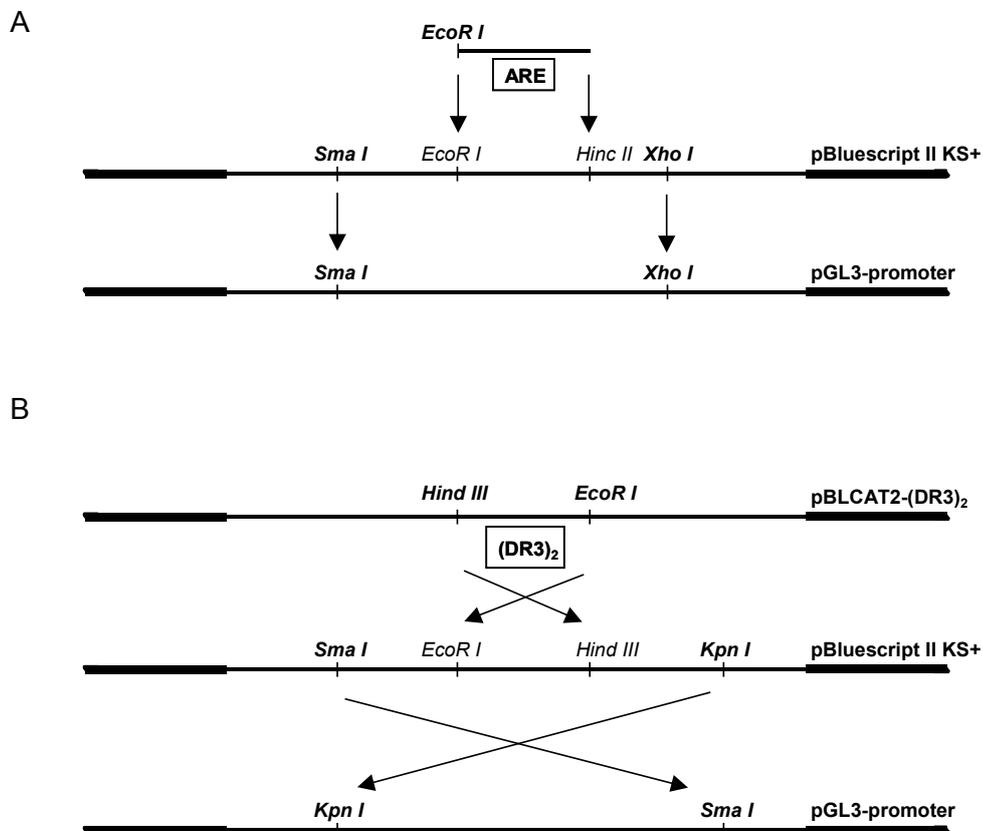
### 3.4.8 Herstellung von Reportergenkonstrukten

#### 3.4.8.1 Klonierung

Für Reportergenanalysen zur Untersuchung der Aktivierung von Nrf2 und PXR wurden Oligonukleotide mit den entsprechenden responsiven Elementen in den pGL3-promoter (Promega, Mannheim) kloniert. Die Plasmide pGL3-HO-ARE, pGL3-GI-ARE und pGL3-(DR3)<sub>2</sub> wurden entsprechend der in Abb. 9 dargestellten Klonierungsstrategie generiert und enthielten als responsives Element für das Nrf2 das ARE (TGACnnnGC) bzw. für den PXR zweimal die DR3-Sequenz (TGAACnnnTGAAC).

Die Restriktionsenzyme wurden in den jeweiligen Puffersystemen und bei den jeweiligen Temperaturen entsprechend den Angaben des Herstellers (NEB, Frankfurt) verwendet. Beim Doppelverdau mit *Sma I* und *Xho I* bzw. *Kpn I* wurde zuerst mit *Sma I* geschnitten, die DNA gefällt und anschließend mit dem zweiten Restriktionsenzym behandelt. Der Restriktionsverdau erfolgte in der Regel für 1 – 2 h. Zur Vermeidung von Rückligationen wurden die Vektorfragmente durch Gelelektrophorese und anschließende Extraktion des

gewünschten Fragments aus dem Agarosegel von den anderen Fragmenten getrennt (siehe 3.4.8.3).



#### Abb. 9: Klonierungsstrategie

**(A)** Die Plasmide pGL3-HO-ARE und pGL3-GI-ARE wurden durch Spaltung der synthetischen doppelsträngigen Oligonukleotide mit einer eingefügten *EcoR I*-Schnittstelle (HO-ARE-Sequenz: 5'-GGAATTCTGTTTTCGCTGAGTCATGGTC-3', GI-ARE-Sequenz: 5'-GGAATTCTGTTTTGCTAAGTCATCCTGGGA-3') mit *EcoR I* und anschließender Klonierung in den mit *EcoR I* und *Hinc II* geschnittenen pBluescript II KS+ generiert. Aus dem entstandenen Plasmid wurde das Oligonukleotid mit *Sma I* und *Xho I* ausgeschnitten und in den entsprechend geöffneten pGL3-promoter ligiert.

**(B)** Zur Generierung des pGL3-(DR3)<sub>2</sub> wurden die zwei DR3-Elemente des pBLCAT2-(DR3)<sub>2</sub> mit *Hind III* und *EcoR I* ausgeschnitten und in den entsprechend geöffneten pBluescript II KS+ ligiert. Aus dem pBluescript II KS+ wurden die zwei DR3-Elemente mit *Sma I* und *Kpn I* ausgeschnitten und in den pGL3-promoter kloniert.

#### 3.4.8.2 DNA-Fällung

Zur Fällung der DNA wurde die DNA-Lösung mit 0,1 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 4,5) und 2 Volumen an eiskaltem Ethanol versetzt, gemischt und 15 min auf Eis inkubiert. Nach der Zentrifugation mit 21.000 x g bei 4°C für 15 min wurde der Überstand verworfen und das Pellet mit kaltem 70 %-igen Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet getrocknet und in H<sub>2</sub>O im gewünschten Volumen gelöst. Die gelöste DNA wurde bei max. 4°C gelagert.

### 3.4.8.3 Fragmentelution aus Agarosegelen

Die Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte nach dem Ausschneiden der entsprechenden Banden unter UV-Licht mit dem „Invisorb Spin DNA Extraktion Kit“ (Invitex, Berlin) nach den Anweisungen des Herstellers.

### 3.4.8.4 Ligation von DNA-Fragmenten

Für die Bildung von Phosphodiester-Bindungen zwischen einer 5'-Phosphatgruppe und der 3'-Hydroxygruppe der DNA werden DNA-Ligasen verwendet. Die mit den entsprechenden Restriktionsenzymen geschnittenen PCR-Produkte oder synthetischen Oligonukleotide wurden mit einer T4-DNA-Ligase für 12 h bei 16°C in den ebenfalls entsprechend geschnittenen Zielvektor ligiert. Bei der Enzymmenge wurde sich an den Herstellerangaben orientiert. Um eine effektive Ligation zu erreichen, wurden Vektor- und Insert-DNA - so weit möglich - im Verhältnis von 1 : 5 eingesetzt.

### 3.4.8.5 Transformation von *E. coli*

Bei der Transformation wird die natürliche Fähigkeit mancher Bakterien ausgenutzt, freie DNA aus der Umgebung aufzunehmen (Kompetenz). Die Transformation der generierten Plasmide aus den Ligationsansätzen erfolgte in *E. coli* vom Typ TOP10. Um eine effiziente Aufnahme der DNA zu gewährleisten, wurden kompetente Zellen hergestellt, deren Zellmembran zur Aufnahme von DNA deutlich permeabel ist. Dazu wurde ein aus einer 250 ml *E. coli* - Kultur ( $OD_{600} \approx 0,5$ ) mit 5.000 x g bei 4°C abzentrifugiertes Bakterienpellet mit 30 ml  $CaCl_2$  (100 mM) für 30 min auf Eis inkubiert. Das anschließend durch erneute Zentrifugation erhaltene Bakterienpellet wurde in 5 ml  $CaCl_2$  (100 mM) und 15 % (v/v) Glycerin aufgenommen und in Aliquots zu je 100 µl bei -80°C bis zur Nutzung eingefroren. Für die Transformation wurden 50 µl kompetente Zellen auf Eis aufgetaut, mit 10 µl Ligationsansatz oder aufgereinigter Plasmid-DNA vorsichtig gemischt und 15 min auf Eis inkubiert. Durch Hitzeschock bei 42°C für 30 s wurde die Aufnahme von DNA gestoppt. Der Transformationsansatz wurde sofort wieder auf Eis gestellt, 250 µl SOC-Medium hinzugegeben und 60 min bei 37°C geschüttelt. Je 10 – 100 µl wurden auf S1-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Im Falle einer „Blau-Weiss-Selektion“, basierend auf der Umsetzung von X-Gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranosid) durch das Enzym β-Galaktosidase, wurden die Agarplatten zuvor noch mit je 70 µl X-Gal (40 mg/ml in DMF; Roth, Karlsruhe) bestrichen.

Die resultierenden Kolonien wurden in 5 ml S1-Medium in Übernachtskulturen vermehrt und die Richtigkeit der enthaltenen Plasmid-DNA durch Restriktionsverdau analysiert. Positive Klone wurden bei -80°C in S1-Medium mit 5 % DMSO eingefroren.

- *SOC-Medium*: 2 % Trypton; 0,5 % Hefeextrakt (Difco Laboratories, Detroit, USA); 10 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 10 mM MgSO<sub>4</sub>; 20 mM Glucose
- *S1-Agarplatten*: Standard I-Nähragar mit 100 µg/ml Ampicillin
- *S1-Medium*: Standard I-Nährbouillon mit 100 µg/ml Ampicillin

#### 3.4.8.6 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien und Sequenzierung

Die Isolierung der Plasmid-DNA aus *E. coli*-Übernachtukturen (200 rpm, 37°C, Ceromat®R und H; Braun, Melsungen) erfolgte mit dem Plasmid Mini- bzw. Midi-Kit (Qiagen, Hilden) nach der Anleitung des Herstellers. Die DNA wurde in 30 – 50 µl H<sub>2</sub>O resuspendiert und die DNA-Konzentration bestimmt (siehe 3.4.4.2). Die Sequenzierung der gereinigten Plasmid-DNA wurde bei der Firma MWG-Biotech (Ebersberg) in Auftrag gegeben.

#### 3.4.9 Transiente Transfektion von Luciferase-Reportervektoren

Das Einschleusen von Fremd-DNA in eukaryontische Zellen wird als Transfektion bezeichnet. Bei der transienten Transfektion soll es dabei zu einer vorübergehenden Expression eines Gens kommen. Ein Reporter-genversuch erlaubt eine quantitative Analyse von Faktoren, die die Genexpression eukaryontischer Zellen beeinflusst. Dazu werden Zellen transient mit einem Reporter-genkonstrukt transfiziert, das vorzugsweise für das Luciferasegen des Leuchtkäfers *Photinus pyralis* kodiert. Da die Expression des Luciferasegens von vorgeschalteten Promotor- oder Enhancerelementen kontrolliert wird, ist die gemessene Enzymaktivität ein direktes Maß für die Aktivität bzw. transkriptionsaktivierende Effizienz dieser Elemente durch die eingesetzten Substanzen, Extrakte oder auch Proteine aus kotransfizierten Expressionsvektoren.

Als Transfektionsverfahren wurde die Lipofektion mit Tfx<sup>TM</sup>-20 (Promega, Mannheim) gewählt. Tfx<sup>TM</sup>-20 besteht aus einem synthetischen kationischen Lipid, welches mit der negativ geladenen DNA interagiert. Die sich bildenden Komplexe aus Transfektionsreagenz und DNA werden per Endozytose von den Zellen aufgenommen.

Am Vortag der Transfektion wurden ca.  $2,5 \times 10^5$  Zellen/Loch in 24-Loch-Platten in 1 ml des jeweiligen Kulturmediums ausgesät und über Nacht im Brutschrank kultiviert. Bis zur Transfektion erreichten die Zellen so eine Konfluenz von ca. 70 %. Die Transfektion erfolgte entsprechend des Protokolls des Herstellers, wobei auf 1 µg DNA maximal 3 µl Tfx<sup>TM</sup>-20 eingesetzt wurden. Bei HepG2-Zellen stellte sich ein Verhältnis von 1 : 1,5 am effektivsten heraus. Zur Überprüfung der Transfektionseffizienz und zur Normierung der Luciferaseaktivität wurde bei allen Transfektionen ein β-Galaktosidasevektor (pSV-β-Gal) kotransfiziert. Der β-Galaktosidasevektor wird proportional zu den verwendeten Reporter-

gen- und Expressionsvektoren in die Zellen aufgenommen. Standardmäßig wurden 0,5 µg pSV-β-Galaktosidasevektor, 0,15 µg Reporter-gen- und 0,15 µg Expressionsvektor transfiziert. Musste, z.B. aufgrund einer schwachen Expression des Reportergens infolge zu großer Inserts, mehr Reporter-genvektor eingesetzt werden, wurde darauf geachtet, dass die Gesamtmenge der zu transfizierenden DNA 0,8 µg nicht überstieg. Bei Stimulationsversuchen wurden die Zellen 24 h nach der Transfektion mit dem entsprechenden Stimulus für 24 h in serumfreiem Medium inkubiert. Im Fall von Vitamin E wurde die Stimulation mit serumhaltigem Medium (10 % FCS) durchgeführt. Die Vitamin E-Formen wurden dazu vor der Stimulation mindestens 8 h in FCS inkubiert.

#### **3.4.9.1 Lyse transfizierter Zellen**

Die adhärennten Zellen wurden in der 24-Loch-Platte lysiert, in der die Transfektion erfolgte. Dazu wurde das Medium vollständig abgesaugt und die Zellen 1x mit PBS gewaschen. Nach dem Absaugen des PBS wurden 150 µl Reporter-Lysepuffer (Promega, Mannheim) zum Lysieren der Zellen verwendet. Nach einer Inkubation von 15 min bei RT auf einem Schüttler wurde das Lysat in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und zur Steigerung der Lyse für 24 h bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Nach dem Auftauen der Lysate wurden diese zur Abtrennung von Zelltrümmern 10 min mit  $21.000 \times g$  bei  $4^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert und der klare Überstand für die Bestimmung der Reporter-genaktivität weiter verwendet.

#### **3.4.10 Bestimmung der Reporter-genaktivität**

Die relative Reporter-genaktivität wurde durch den Vergleich der Luciferaseaktivität zwischen unbehandelten und behandelten Zellen ermittelt. Hierzu wurden zuvor zwei Normierungen vorgenommen. Zuerst wurde zur Berücksichtigung der Transfektionseffizienz die ermittelte Luciferaseaktivität durch Division mit den jeweiligen β-Galaktosidase-Werten auf deren Aktivität normiert. Anschließend erfolgte durch eine erneute Division eine Normierung auf die Reporter-genaktivitäten der jeweiligen leeren Vektoren (pGL3-basic, pGL3-promoter), um eine mögliche Beeinflussung dieser Vektoren durch die eingesetzten Substanzen und Extrakte zu berücksichtigen. Der doppelt-normierte Wert der Luciferaseaktivität in unbehandelten Zellen wurde auf 1 gesetzt und die doppelt-normierten Werte der Luciferaseaktivitäten aller behandelten Zellen darauf bezogen.

##### **3.4.10.1 Luciferasemessung**

Luciferase oxidiert ihr Substrat Luciferin in Gegenwart von ATP,  $\text{O}_2$  und  $\text{Mg}^{2+}$ . Bei dieser Oxidation entstehen AMP,  $\text{CO}_2$  und Licht mit einem Emissionsmaximum bei

562 nm. Die Lichtemission ist proportional zur Luciferasemenge und lässt sich mit einem Luminometer messen [175, 176].

Die Messung der Luciferaseaktivität erfolgte im Luminoskan Ascent (Labsystems, Finnland). Dazu wurden 20 µl des Zelllysats der transfizierten Zellen (siehe 3.4.9.1) in eine lichtundurchlässige 96-Loch-Platte pipettiert. Die Chemilumineszenz wurde nach einer automatischen Injektion von 100 µl Luciferingemisch (Luciferin und Reaktionspuffer) für 3 s in RLU (relative Lichteinheiten, engl. *relative light units*) gemessen.

- *Reaktionspuffer*: 20 mM Tricin; 1,07 mM MgCO<sub>3</sub>; 0,1 mM EDTA; 33,3 mM DTT; 2,67 mM MgSO<sub>4</sub>; pH 7,8 – 8,0
- *Luciferin*: zu 5 ml 100 mM Tris (pH 7,8) wurden 6,2 mg Coenzym A (Sigma, Taufkirchen), 4,3 mg Luciferin (P.J.K., Kleinblittersdorf) und 8,84 mg ATP (Sigma, Taufkirchen) gegeben, bei –80°C tiefgefroren und gefriertrocknet
- 500 µl gefriergetrocknetes Luciferin wurden kurz vor der Messung mit auf 37°C angewärmten 3 ml Reaktionspuffer vereinigt

### 3.4.10.2 β-Galaktosidasemessung

Die Aktivität der in den transfizierten Zellen gebildeten β-Galaktosidase wurde durch die Reaktion mit *o*-Nitrophenyl-β-D-galactopyranosid (ONPG) quantifiziert. Die β-Galaktosidase hydrolysiert ONPG zu *o*-Nitrophenol und Galaktose. Die Menge des gelben *o*-Nitrophenol ist ein Maß für die β-Galaktosidaseaktivität und kann bei 405 nm gemessen werden. Je 50 µl des Zelllysats der transfizierten Zellen (siehe 3.4.9.1) wurden in eine lichtdurchlässige 96-Loch-Platte pipettiert und mit 70 µl β-Galaktosidasepuffer und 30 µl ONPG-Lösung bei 37°C bis zur Gelbfärbung inkubiert. Die Extinktion wurde im Elisa-Reader MR5000 (Dynatech, Denkendorf) bestimmt. Als Blindwert diente der Lysepuffer.

- *β-Galaktosidasepuffer*: 120 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 80 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 20 mM KCl; 2 mM MgCl<sub>2</sub>; 100 mM β-Mercaptoethanol; pH 7,3
- *ONPG-Lösung*: 4 mg/ml ONPG in 60 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; pH 7,5

### 3.4.11 SDS-Gelelektrophorese und Western-Blot

#### 3.4.11.1 Gewinnung von Kernlysaten

Die Zellen wurden durch Trypsinieren (vgl. 3.1.2) geerntet und in Homogenisationspuffer, der jeweils frisch mit Nonidet P-40 versehen wurde, für max. 7 min bei 4°C und ständiger Rotation lysiert. Der Überstand wurde nach einer 1-minütigen Zentrifugation bei

4°C und 6.800 x g vollständig abgenommen und das Pellet in 100 µl Kernlysepuffer aufgenommen. Die Lyse der Zellkerne erfolgte nach Zugabe von 6,25 µl 5 M NaCl für 30 min auf Eis. Das nach erneuter Zentrifugation (30 min, 21.000 x g, 4°C) erhaltene Kernlysate wurde bis zur weiteren Verwendung bei –80°C gelagert.

- *Homogenisationspuffer*: 10 mM Hepes, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 10 mM KCl; 0,5 mM DTT; 0,5 mM PMSF; 0,1 % Nonidet P-40; pH 7,9 (1,2 ml für 10<sup>7</sup> Zellen)
- *Kernlysepuffer*: 40 mM Hepes; 400 mM KCl; 10 % Glycerol; 1 mM DTT; 0,1 mM PMSF; pH 7,9

### 3.4.11.2 SDS-PAGE

Bei der SDS-PAGE werden Proteine durch die Einlagerung von SDS aufgefaltet und mit einer negativen Oberflächenladung versehen. Dies erlaubt in der Gelelektrophorese eine Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht [177]. Die Proteinproben wurden für 5 min bei 95°C mit Laemmli-Puffer denaturiert und in einem 7,5-%igem Polyacrylamidgel aufgetrennt. Um eine schärfere Bandentrennung zu erreichen, wurde über das Trenngel ein 5 %iges Sammelgel gegossen. Die Matrix im Sammelgel besitzt größere Poren und einen anderen pH-Wert als das Trenngel (Tab. 8). Zur Größenbestimmung wurde mit den Proben zusätzlich ein Protein-Marker (BioRad, München) mit Markerproteinen definierter Größe auf das Gel aufgetragen. Die Gelelektrophorese erfolgte in einer Minigelapparatur zur vertikalen PAGE (BioRad, München) bei einer Stromstärke von 15 mA bis die Bromphenolblau-Bande den unteren Rand des Gels erreicht hatte.

- *Laemmli-Puffer*: 62,5 mM Tris (pH 6,8); 2 % SDS; 2,5 % β-Mercaptoethanol; 10 % Glycerin; 1,25 ‰ Bromphenolblau

**Tab. 8: Zusammensetzung von Sammel- und Trenngel**

	Sammelgel 5 %	Trenngel 7,5 %
H <sub>2</sub> O	3,06 ml	3,21 ml
40 % Acrylamid/Bisacrylamid (29:1)	638 µl	1,12 ml
Puffer (0,5 M Tris; pH 6,8)	1,25 ml	-
Puffer (1,5 M Tris ; pH 8,8)	-	1,5 ml
10 % SDS	50 µl	60 µl
10 % APS	50 µl	60 µl
10 % TEMED	50 µl	60 µl

### 3.4.11.3 Western Blot

Nach der Gelelektrophorese erfolgte der Transfer der aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulosemembran (Schleicher & Schüll, Dassel). Dazu wurde das Gel auf eine mit Transferpuffer B angefeuchtete Nitrozellulosemembran gelegt und zusammen mit Filterpapieren, die in elektrolythaltigen Transferpuffern getränkt wurden, in eine Hoefer® SemiPhor™-Blotapparatur (Amersham Biosciences, Freiburg) gelegt. Zwei Filterpapiere, die in Transferpuffer A, und ein Filterpapier, das in Transferpuffer B getränkt wurden, wurden unter die Membran und drei Filterpapiere, die in Transferpuffer C getränkt wurden, auf das Gel gelegt. Durch das Erzeugen eines elektrischen Feldes mit  $1,2 \text{ mA/cm}^2$  Membran für 2 h bei  $4^\circ\text{C}$  wurden die Proteine senkrecht zum Gel auf die Membran übertragen. Zur Blockierung unspezifischer Bindungen wurde die Membran für mindestens 1 h in 5 %iger Magermilchlösung (in TTBS gelöst) inkubiert und daraufhin mehrfach mit TTBS gewaschen.

Die Membran wurde mit dem in TTBS verdünnten Primär-Antikörper entweder für 2 h bei RT oder bei  $4^\circ\text{C}$  über Nacht inkubiert. Nach erneutem mehrmaligen Waschen der Membran mit TTBS wurde diese mit dem in TTBS verdünnten Peroxidase-konjugierten Sekundär-Antikörper (IgG-POD) für 1 h bei RT inkubiert. Nach Überschichtung der Membran mit einer Peroxidase-Substrat-Lösung (SuperSignal® West Dura Extended Duration Substrate; Perbio, Bonn) erfolgte die Detektion der Chemilumineszenz mit einem Fuji LAS1000-CCD-Kamerasystem und der AIDA Image Analyser Software (Version 4.04).

- *TTBS*: 50 mM Tris; 150 mM NaCl; 0,1 % Tween-20; pH 7,5
- *Transferpuffer A*: 20 % Methanol; 0,3 M Tris; pH 10,4
- *Transferpuffer B*: 20 % Methanol; 0,025 M Tris; pH 10,4
- *Transferpuffer C*: 20 % Methanol; 0,025 M Tris; 0,04 M Aminocaprinsäure; pH 9,4

## 3.5 Statistik

Aus den Einzelwerten oder Mittelwerten einzelner Versuche wurden Mittelwerte und Standardabweichungen aller Versuche berechnet (Software: Microsoft® Excel 2000).

*in vitro* Daten: Signifikanzen wurden mittels ungepaarten, zweiseitigen *t*-Test (Software: Microsoft® Excel 2000) ermittelt.

*in vivo* Daten: Die statistische Auswertung der Daten aus den Einzelgruppen erfolgte mittels zweiseitigen ANOVA-Test und anschließendem Bonferroni Post-Hoc Test (Software: GraphPad Prism 4). Ausnahme bildet der Vergleich der beiden Vitamin E-Überflussdiäten. Hier erfolgte der Test auf signifikante Unterschiede mit Hilfe des ungepaarten, zweiseitigen *t*-Test (Software: Microsoft® Excel 2000).

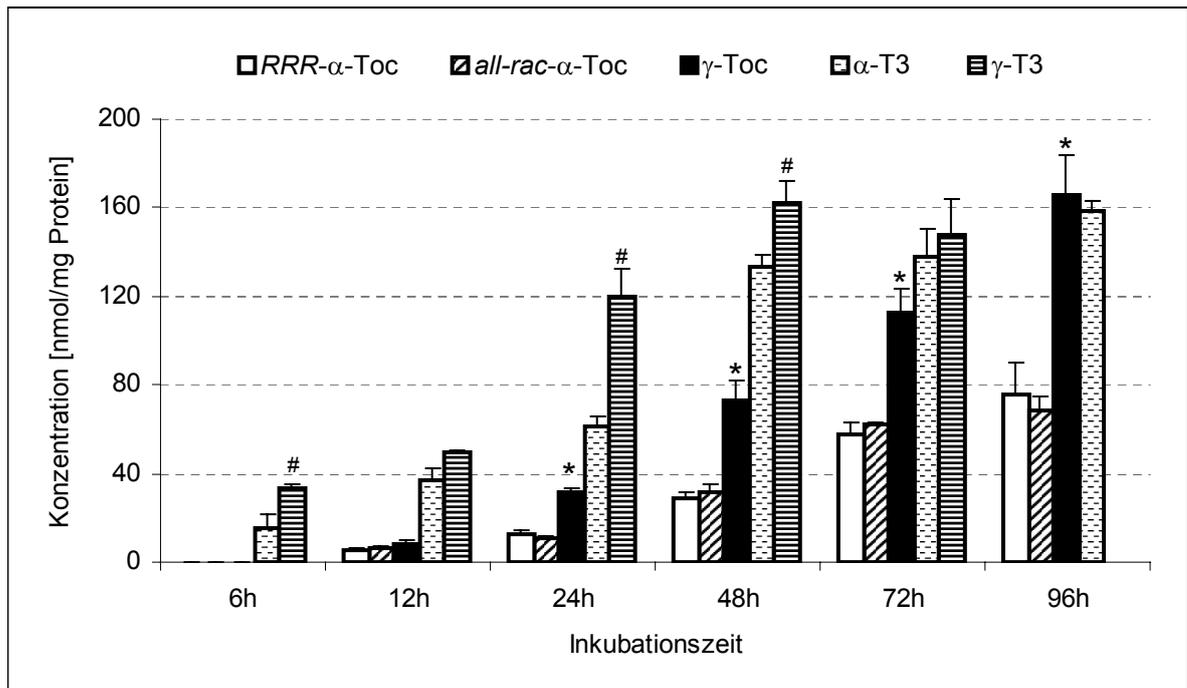
## 4 Ergebnisse

### 4.1 Zelluläre Akkumulation, Metabolismus und Toxizität von Vitamin E

#### 4.1.1 Vitamin E-Gehalt in Zellen ist abhängig von der angebotenen Vitamin E-Form

Um neue Funktionen von Vitamin E erforschen zu können, ist es wichtig zu wissen, ob und in welchem Maße Vitamin E vom Organismus aufgenommen wird und ob es Unterschiede zwischen den verschiedenen Vitamin E-Formen gibt. Die Aufnahme von Vitamin E wurde in HepG2-Zellen untersucht, die unterschiedlich lange mit je 50  $\mu\text{M}$  der in der Nahrung des Menschen am häufigsten vorkommenden Vitamin E-Formen (*RRR*- und *all-rac*- $\alpha$ -Tocopherol,  $\gamma$ -Tocopherol,  $\alpha$ -Tocotrienol und  $\gamma$ -Tocotrienol) inkubiert wurden. Nach der Extraktion der Vitamin E-Formen aus den Zellen und der Messung des jeweiligen Vitamin E-Gehalts mittels HPLC zeigten sich Unterschiede im zellulären Gehalt der einzelnen Vitamin E-Formen. Aus Abb. 10 wird deutlich, dass nach 6-stündiger Inkubation bereits geringe Mengen an  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Tocotrienol, jedoch noch keine Tocopherole in den Zellen nachzuweisen waren. Relevante Konzentrationen an  $\alpha$ - oder  $\gamma$ -Tocopherol konnten erstmals nach 12 h gemessen werden. Sie lagen für die  $\alpha$ -Formen bei allen Messzeitpunkten und für die  $\gamma$ -Form bis einschließlich 48 h signifikant unter den Konzentrationen der entsprechenden Tocotrienol-Form. Bei Tocopherolen und Tocotrienolen war jeweils die  $\gamma$ -Form bis zum Erreichen einer Konzentration von ca. 120 - 160 nmol/mg Protein die Form mit den höheren Konzentrationen in den Zellen. Mit Ausnahme der  $\alpha$ -Tocopherol-Formen, die den Konzentrationsbereich von ca.  $140 \pm 20$  nmol/mg Protein im gewählten maximalen Inkubationszeitraum nicht erreichten, stellt diese Konzentration ein Konzentrationsmaximum für alle anderen Formen dar.  $\gamma$ -Tocotrienol erreichte dieses Maximum schon nach 24 h,  $\alpha$ -Tocotrienol nach 48 h und  $\gamma$ -Tocopherol nach 96 h. Das Konzentrationsmaximum des natürlichen und synthetischen  $\alpha$ -Tocopherols lag bei ca. 80 nmol/mg Protein und somit deutlich unter dem der anderen Vitamin E-Formen.

Zusammenfassend kann zum Vitamin E-Gehalt in HepG2-Zellen festgestellt werden, dass (I) die Vitamin E-Formen unterschiedlich schnell und in unterschiedlichem Ausmaß akkumuliert werden ( $\gamma$ -Tocotrienol >  $\alpha$ -Tocotrienol >  $\gamma$ -Tocopherol >  $\alpha$ -Tocopherol), (II) es unterschiedliche Konzentrationsmaxima für  $\alpha$ -Tocopherol (ca. 80 nmol/mg Protein) und alle anderen Formen (ca. 160 nmol/mg Protein) gibt, (III) Tocotrienole schneller und bis zum Erreichen des Konzentrationsmaximums bei gleichen Inkubationszeiten mit höheren Konzentrationen nachzuweisen sind und (IV) die  $\gamma$ -Form der Tocopherole bzw. Tocotrienole im Vergleich zu der jeweiligen  $\alpha$ -Form in höheren Konzentrationen vorliegt.



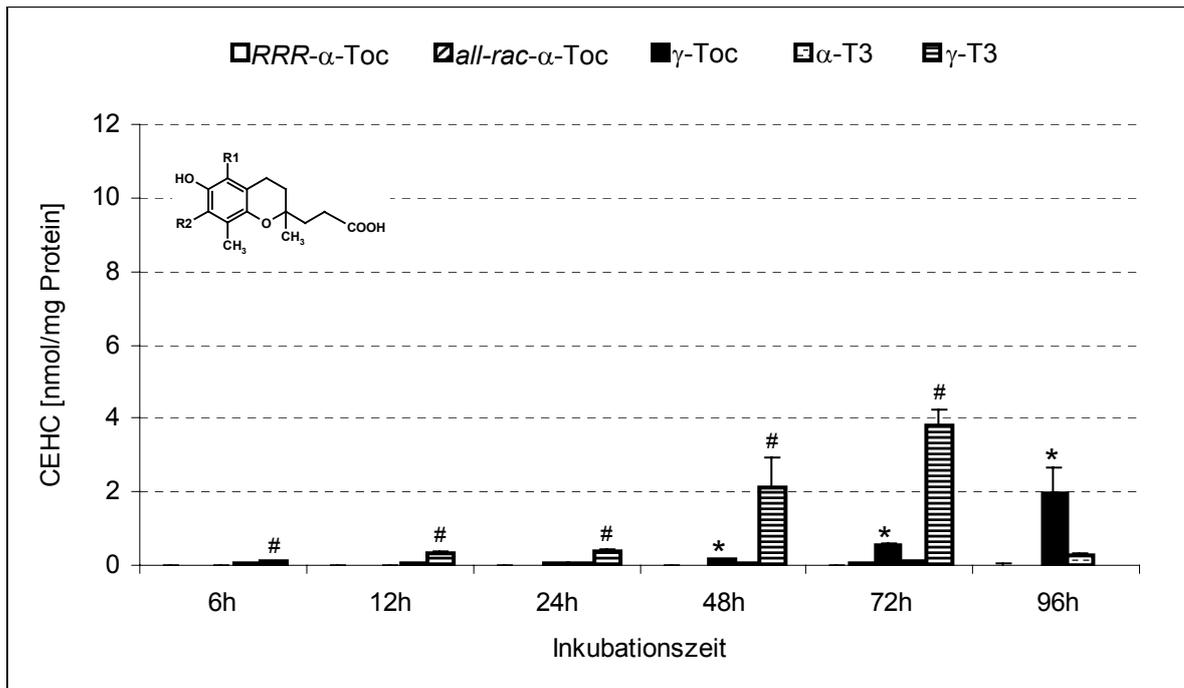
**Abb. 10: Vitamin E-Gehalt in HepG2-Zellen nach Inkubation mit Vitamin E**

HepG2-Zellen wurden für 6 h, 12 h, 24 h, 48 h, 72 h oder 96 h mit je 50  $\mu$ M *RRR*- $\alpha$ -Tocopherol (*RRR*- $\alpha$ -Toc), *all-rac*- $\alpha$ -Tocopherol (*all-rac*- $\alpha$ -Toc),  $\gamma$ -Tocopherol ( $\gamma$ -Toc),  $\alpha$ -Tocotrienol ( $\alpha$ -T3) oder  $\gamma$ -Tocotrienol ( $\gamma$ -T3) im Kulturmedium inkubiert. Nach der Zellernte und Extraktion der Vitamin E-Formen aus den Zellen erfolgte die Messung der jeweiligen Konzentrationen mittels HPLC (UV-Detektion). Die Daten stellen einen Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung aus drei Einzelwerten dar; in den jeweiligen Kontrollen konnten keine Konzentrationen der Vitamin E-Formen gemessen werden (Kontrollbalken nicht abgebildet). Für  $\gamma$ -Tocotrienol konnte bei 96 h kein Wert ermittelt werden, da nicht genügend Zellen aufgrund der toxischen Eigenschaften des  $\gamma$ -Tocotrienols (vgl. 4.1.4) überlebt haben. \* $p < 0,05$  vs. *RRR*- und *all-rac*- $\alpha$ -Toc, # $p < 0,05$  vs.  $\alpha$ -T3.

#### 4.1.2 Die Metabolisierungsrate der Vitamin E-Formen ist unterschiedlich

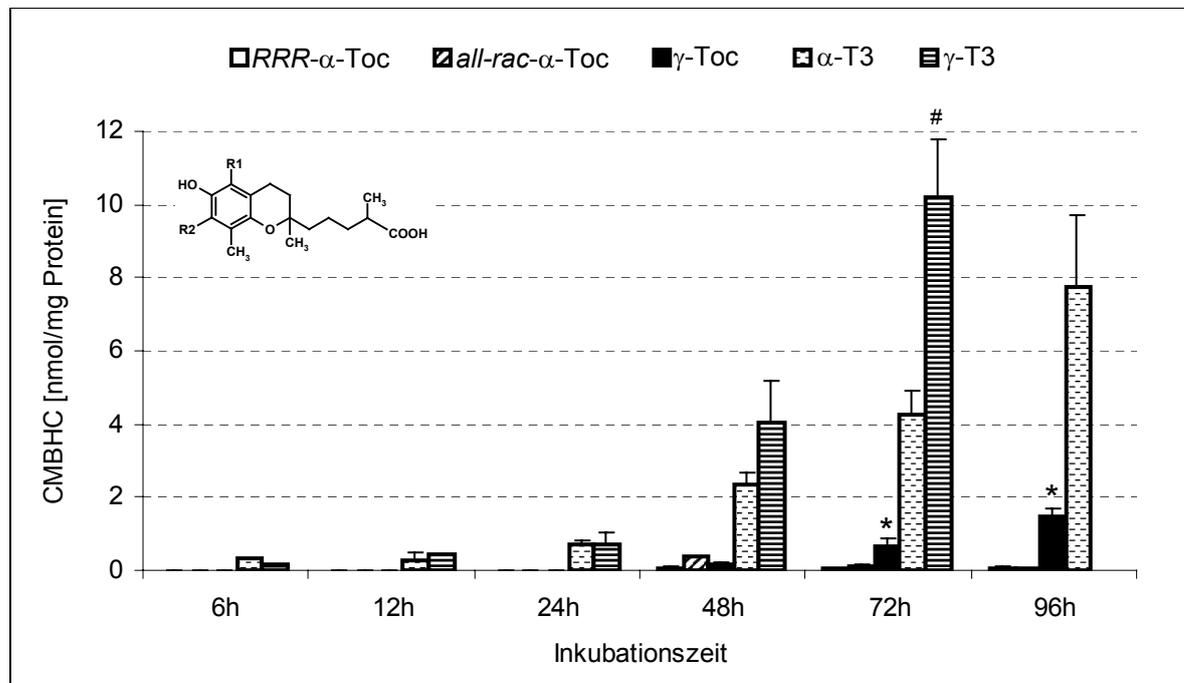
Die Ergebnisse von 4.1.1 haben gezeigt, dass nach einer gleichen Inkubation mit den verschiedenen Vitamin E-Formen deren Gehalt in den HepG2-Zellen unterschiedlich ist. Um zu prüfen, ob dies die Folge einer unterschiedlichen Metabolisierung der Vitamin E-Formen ist, wurde die CEHC- und CMBHC-Freisetzung der Zellen gemessen. Die Metabolite wurden aus dem gesammelten Kulturmedium extrahiert und ihre Konzentration mittels elektrochemischer Detektion gemessen.

Bei der Auswertung der Metaboliten-Freisetzung zeigten sich Unterschiede zwischen den Vitamin E-Formen. Auf CEHC-Ebene war das  $\alpha$ -CEHC von den  $\alpha$ -Tocopherol-Formen gar nicht und das des  $\alpha$ -Tocotrienols kaum zu bestimmen (die Nachweisgrenze lag bei ca. 1 pmol).  $\gamma$ -CEHC aus  $\gamma$ -Tocopherol konnte nach 48 h und aus  $\gamma$ -Tocotrienol bereits nach 6 h nachgewiesen werden (Abb. 11). Daraus wird deutlich, dass die  $\gamma$ -Formen des Vitamin E schneller verstoffwechselt werden als die  $\alpha$ -Formen. Soweit die CEHC-Freisetzung messbar war, nahm diese mit zunehmender Inkubationszeit kontinuierlich zu. Eine Sättigung wurde im Messzeitraum nicht erreicht.



**Abb. 11: CEHC-Freisetzung nach Inkubation mit Vitamin E**

Gemessen wurde die Freisetzung des Metaboliten CEHC von HepG2-Zellen nach Inkubation mit je 50  $\mu\text{M}$  *RRR*- $\alpha$ -Tocopherol (*RRR*- $\alpha$ -Toc), *all-rac*- $\alpha$ -Tocopherol (*all-rac*- $\alpha$ -Toc),  $\gamma$ -Tocopherol ( $\gamma$ -Toc),  $\alpha$ -Tocotrienol ( $\alpha$ -T3) oder  $\gamma$ -Tocotrienol ( $\gamma$ -T3) für 6 h, 12 h, 24 h, 48 h, 72 h oder 96 h. Die Messung erfolgte mittels HPLC (elektrochemische Detektion). Die sich im Kulturmedium befindliche Metabolitmenge wurde zur Vergleichbarkeit auf den Proteingehalt der Zellen bezogen. Die Daten stellen einen Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung aus drei Einzelwerten dar. Für das  $\gamma$ -Tocotrienol konnte bei 96 h aufgrund seiner toxischen Eigenschaften (vgl. 4.1.4) kein Wert ermittelt werden; eine Normalisierung auf die Proteinwerte war nicht möglich. \* $p < 0,05$  vs. *RRR*- und *all-rac*- $\alpha$ -Toc, # $p < 0,05$  vs.  $\alpha$ -T3.



**Abb. 12: CMBHC-Freisetzung nach Inkubation mit Vitamin E**

Gemessen wurde die Freisetzung des Metaboliten CMBHC von HepG2-Zellen ins Kulturmedium. Die Behandlung der Zellen, die Messung des Metaboliten und die Auswertung der Daten entspricht den bei Abb. 11 gemachten Ausführungen.

Legt man den Vorläufer des CEHC das CMBHC für die Analyse des Metabolismus zugrunde (Abb. 12), zeigt sich, dass nicht die  $\gamma$ -Form bevorzugt abgebaut wird, sondern der Abbau der Tocotrienole im Vergleich zu den Tocopherolen schneller erfolgt. Das CMBHC beider untersuchten Tocotrienole konnte bereits nach 6 h nachgewiesen werden, während das CMBHC der Tocopherole erst nach 48 h Inkubation detektiert wurde.  $\alpha$ -Tocotrienol wird somit in wesentlich höherem Ausmaß verstoffwechselt, als es die CEHC-Freisetzung vermuten lässt. Der Metabolismus des  $\alpha$ -Tocotrienols stellt daher eine Ausnahme bei den untersuchten Vitamin E-Formen dar. Trotz hoher CMBHC-Konzentrationen ist die CEHC-Konzentration kaum messbar und liegt auf dem Niveau der CEHC-Freisetzung der  $\alpha$ -Tocopherole. Vermutlich gibt es einen limitierenden Faktor für die letzte  $\beta$ -Oxidation vom  $\alpha$ -CMBHC zum  $\alpha$ -CEHC. Vergleichbar zu den CEHC-Daten war auch bei den CMBHC-Daten keine Sättigung im Messzeitraum zu beobachten.

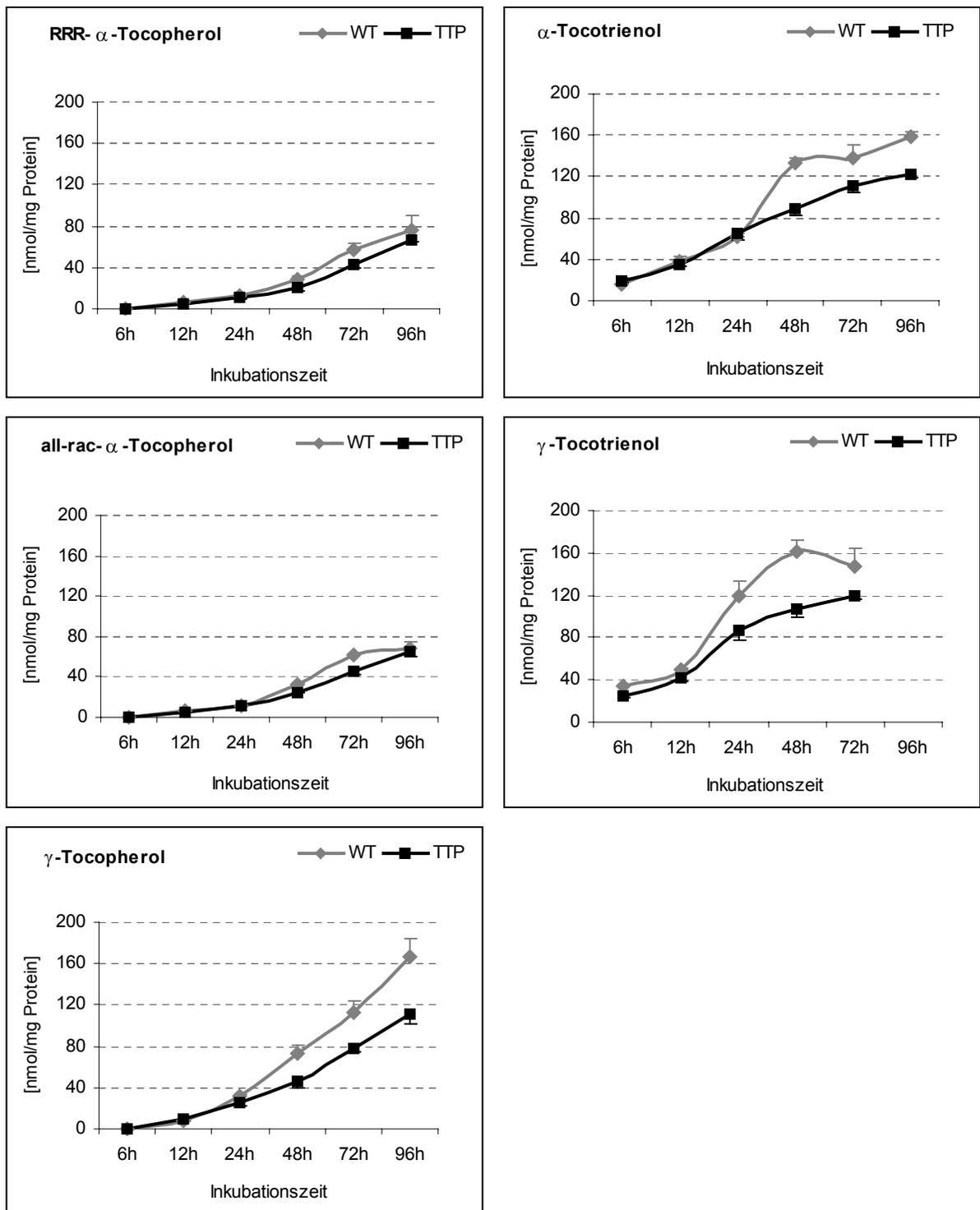
Zusammengefasst konnte gezeigt werden, dass trotz gleichen Abbauweges die Metabolisierungsrate der Vitamin E-Formen sehr unterschiedlich ist. Im Zusammenhang mit den Ergebnissen von 4.1.1 zeigt sich, dass die Metabolisierungsrate keine Ursache für den unterschiedlichen Gehalt der Vitamin E-Formen in den Zellen ist. Möglicherweise ist sie jedoch eine Folge des zellulären Gehalts, d.h. je höher die Konzentration in der Zelle desto stärker die Metabolisierung der entsprechenden Vitamin E-Form.

#### 4.1.3 Zelluläre Akkumulation von Vitamin E ist nicht vom $\alpha$ -TTP abhängig

Nachdem festgestellt wurde, dass nicht der Metabolismus für den unterschiedlichen Gehalt der verschiedenen Vitamin E-Formen in den HepG2-Zellen verantwortlich ist, war es von Interesse, ob das  $\alpha$ -Tocopherol-Transfer-Protein ( $\alpha$ -TTP) die zelluläre Vitamin E-Akkumulation beeinflusst. Deshalb wurde untersucht, ob HepG2-Zellen, die das  $\alpha$ -TTP stabil überexprimieren (HepG2 <sup>$\alpha$ TTP</sup>-Zellen), nach einer entsprechenden Behandlung einen veränderten Gehalt der verschiedenen Vitamin E-Formen im Vergleich zu den Wildtypzellen (HepG2-Zellen) aufwiesen.

HepG2-Zellen und HepG2 <sup>$\alpha$ TTP</sup>-Zellen wurden mit je 50  $\mu$ M *RRR*- und *all-rac*- $\alpha$ -Tocopherol,  $\gamma$ -Tocopherol,  $\alpha$ -Tocotrienol oder  $\gamma$ -Tocotrienol für unterschiedlich lange Zeiten inkubiert. Die Zellen wurden nach der Inkubation auf ihren Vitamin E-Gehalt mittels HPLC-Analytik untersucht (Abb. 13). Abgesehen vom  $\gamma$ -Tocotrienol zeigten sich bis zu einer Inkubationszeit von 24 h bei allen anderen untersuchten Vitamin E-Formen keine oder nur geringe Unterschiede im Vitamin E-Gehalt zwischen HepG2- und HepG2 <sup>$\alpha$ TTP</sup>-Zellen. Nach diesem Zeitpunkt lagen die Tocopherol- bzw. Tocotrienol-Konzentrationen in den HepG2 <sup>$\alpha$ TTP</sup>-Zellen stets unterhalb der Konzentrationen der Wildtypzellen und näherten sich diesen erst wieder vor dem Erreichen der Sättigungskonzentrationen (vgl. 4.1.1) an.

Festzuhalten ist, dass das  $\alpha$ -TTP auf die unterschiedliche Akkumulation der verschiedenen Vitamin E-Formen in den HepG2-Zellen keinen Einfluss hat. Das Verteilungsmuster, Tocotrienole > Tocopherole und  $\gamma$ -Form >  $\alpha$ -Form, bleibt auch durch eine Überexpression des  $\alpha$ -TTP unbeeinflusst.



**Abb. 13: Vitamin E-Gehalt in HepG2-Zellen und HepG2 $\alpha$ TTP-Zellen nach Inkubation mit Vitamin E**

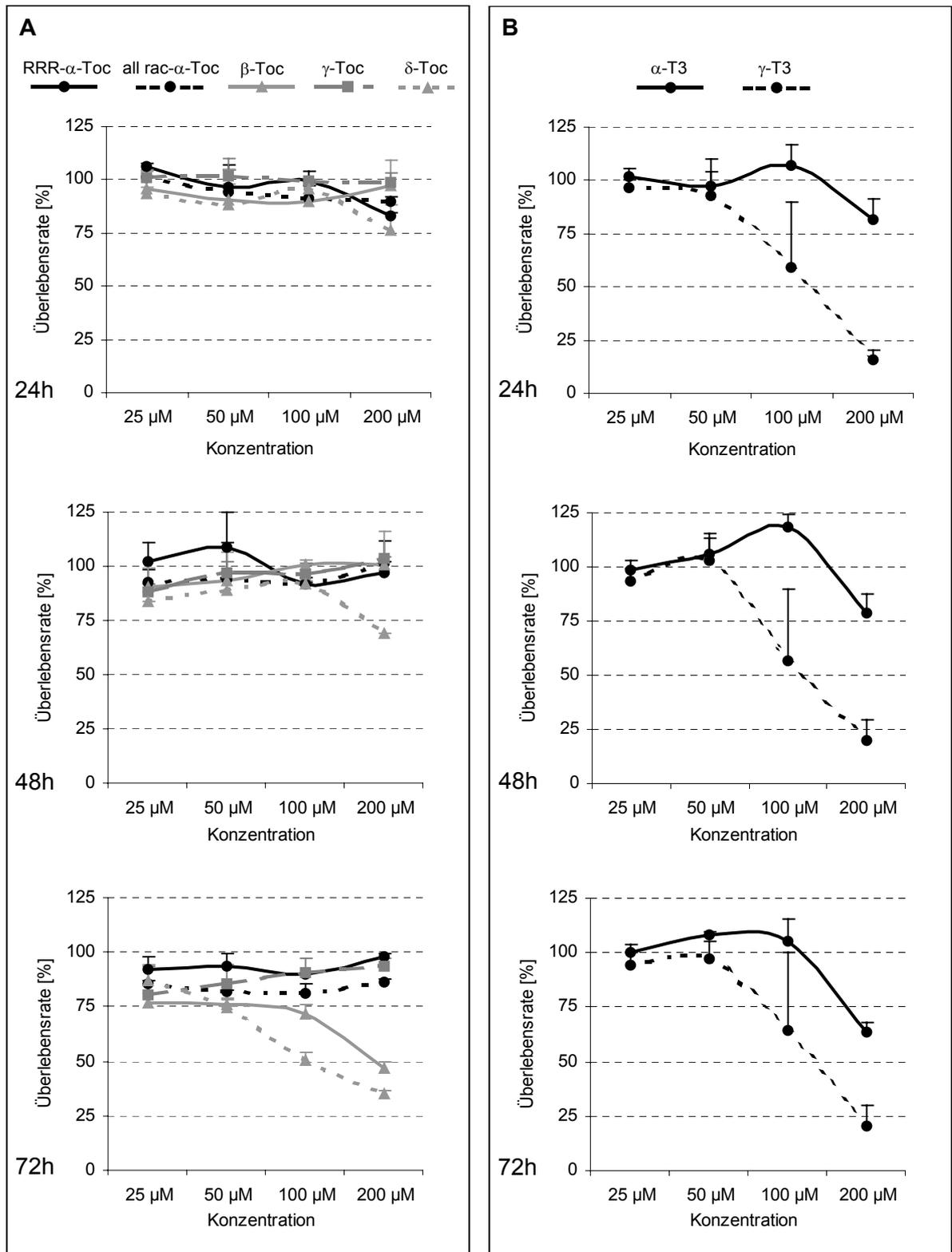
Gemessen wurde der Vitamin E-Gehalt in HepG2-Zellen (WT) und HepG2 $\alpha$ TTP-Zellen (TTP). Die Behandlung der Zellen, die Messung des Vitamin E-Gehaltes und die Auswertung der Daten entspricht den bei Abb. 10 gemachten Ausführungen.

#### 4.1.4 Unterschiedliche Toxizität der verschiedenen Vitamin E-Formen

Häufig ist eine starke Metabolisierung mit der Toxizität einer Substanz in Verbindung zu bringen. Da die Vitamin E-Formen unterschiedlich stark metabolisiert wurden (vgl. 4.1.2), blieb zu prüfen, ob dies ein Hinweis auf zytotoxische Eigenschaften der Vitamin E-Formen ist. HepG2-Zellen wurden mit 25  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$  oder 200  $\mu\text{M}$  aller Tocopherole (*RRR*- $\alpha$ -, *all-rac*- $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - und  $\delta$ -Form) und zweier Tocotrienole ( $\alpha$ - und  $\gamma$ -Form) unterschiedlich lange inkubiert, um so Konzentrations-Zeit-Verläufe zu untersuchen. Die Toxizität wurde mittels MTT-Test bestimmt. Eine Vitalitätsabnahme bis auf 80 % wurde als nicht toxisch gewertet. Zytotoxische Eigenschaften zeigten bei den Tocopherolen (Abb. 14 A) in Abhängigkeit von Konzentration und Inkubationszeit die  $\beta$ - und  $\delta$ -Form. Eine 72-stündige Inkubation mit 100 bzw. 200  $\mu\text{M}$  verursachte bei diesen beiden Tocopherolen eine Vitalitätsabnahme auf unter 50 %. Beide  $\alpha$ -Formen und die  $\gamma$ -Form zeigten keine zytotoxischen Eigenschaften. Bei den Tocotrienolen konnten bei der  $\gamma$ -Form zytotoxische Effekte beobachtet werden (Abb. 14 B). Während  $\alpha$ -Tocotrienol nur bei 200  $\mu\text{M}$  einen negativen Einfluss auf die Vitalität der Zellen zeigte, war das  $\gamma$ -Tocotrienol bei Konzentrationen von 100 und 200  $\mu\text{M}$  bei allen Messzeitpunkten zytotoxisch. Die Zellvitalität sank mit 100  $\mu\text{M}$   $\gamma$ -Tocotrienol bereits bei einer Inkubation von 24 h auf ca. 50 %. Bei 200  $\mu\text{M}$  überlebten zu allen Zeitpunkten nur ein Viertel der Zellen die Inkubation mit  $\gamma$ -Tocotrienol.

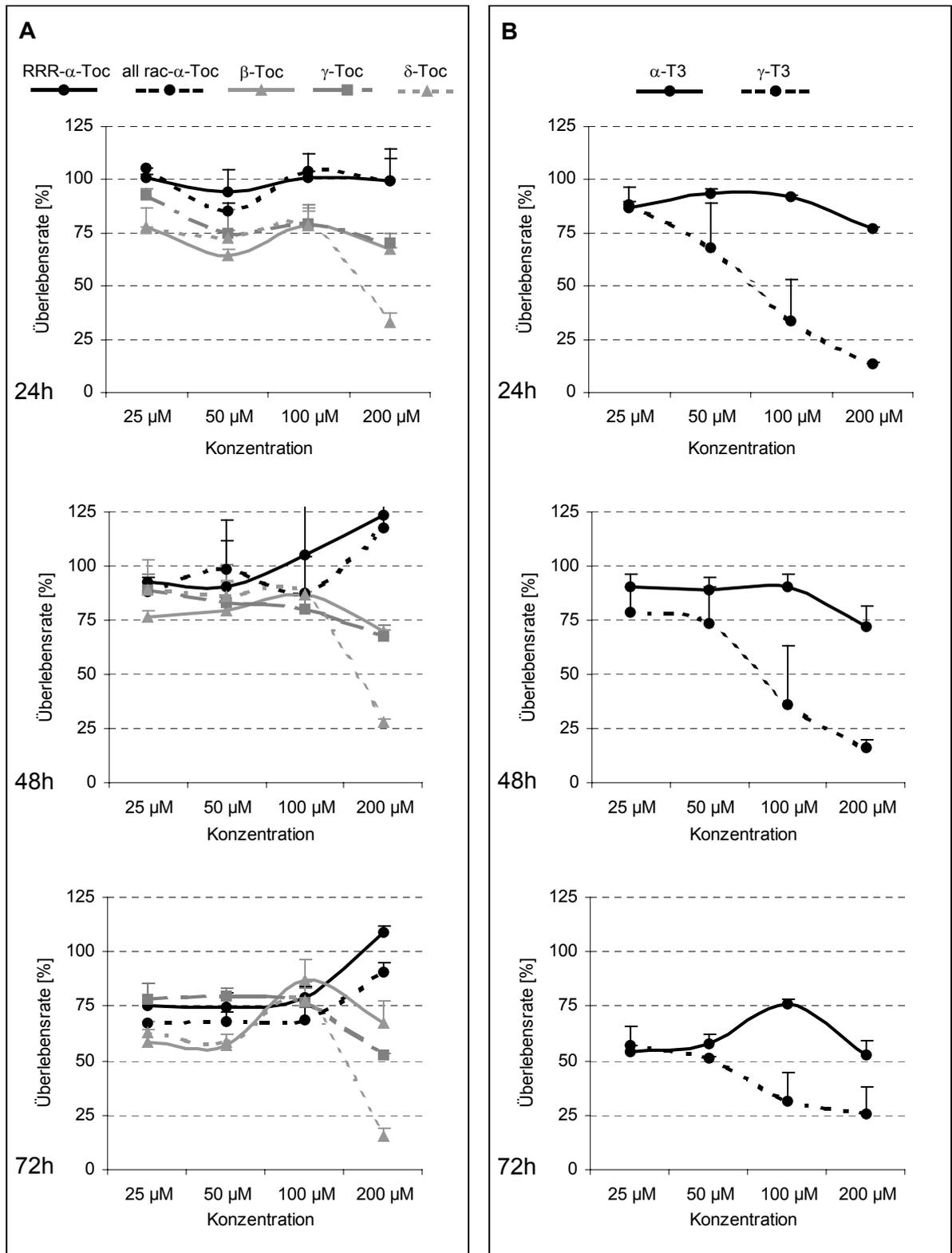
Zytotoxische Effekte des Vitamin E wurden bisher nur ganz selten publiziert [178, 179]. Im Allgemeinen geht man davon aus, dass selbst hohe Dosen keine toxischen Eigenschaften besitzen. Daher war es von Interesse, die Ergebnisse zur Toxizität in einem anderen Zellsystem zu bestätigen. Caco-2-Zellen wurden in einem identischen Versuchsaufbau ebenfalls mit den Vitamin E-Formen inkubiert. Im Vergleich zu den HepG2-Zellen zeigten sich bei den Caco-2-Zellen stärkere zytotoxische Wirkungen der Tocopherole (Abb. 15 A). Bereits nach 24 h hatten Konzentrationen von mehr als 25  $\mu\text{M}$   $\beta$ -,  $\gamma$ - und  $\delta$ -Tocopherol schwache bis starke negative Einflüsse auf die Vitalität der Zellen. Bei einer Inkubation von 72 h senkten alle Tocopherole bei Konzentrationen von bis zu 100  $\mu\text{M}$  die Zellvitalität auf ca. 75 %. Der Einfluss der Tocotrienole auf die Zellvitalität der Caco-2-Zellen war vergleichbar mit dem auf die HepG2-Zellen, wobei bei einer Inkubation von 72 h  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Tocotrienol bei Konzentrationen von bis zu 50  $\mu\text{M}$  sofort toxisch waren und die Zellvitalität auf ca. 50 % senkten (Abb. 15 B).

Es konnte gezeigt werden, dass sowohl Tocopherole als auch Tocotrienole zytotoxische Eigenschaften besitzen, wobei jeweils die  $\alpha$ -Formen im Vergleich zu den anderen Formen die geringsten Einflüsse auf die Zellvitalität hatten. Bis zu einer Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  zeigten sich bei allen Vitamin E-Formen kaum zytotoxische Eigenschaften, so dass bei allen weiteren Versuchen mit dieser Konzentration weiter gearbeitet wurde.



**Abb. 14: Zytotoxizität der Vitamin E-Formen in HepG2-Zellen**

Die Messung der Zytotoxizität erfolgte mittels MTT-Test. Dafür wurden HepG2-Zellen für 24 h, 48 h oder 72 h mit 25  $\mu$ M, 50  $\mu$ M, 100  $\mu$ M oder 200  $\mu$ M *RRR*- $\alpha$ -Tocopherol (*RRR*- $\alpha$ -Toc), *all-rac*- $\alpha$ -Tocopherol (*all-rac*- $\alpha$ -Toc),  $\beta$ -Tocopherol ( $\beta$ -Toc),  $\gamma$ -Tocopherol ( $\gamma$ -Toc),  $\delta$ -Tocopherol ( $\delta$ -Toc),  $\alpha$ -Tocotrienol ( $\alpha$ -T3) oder  $\gamma$ -Tocotrienol ( $\gamma$ -T3) inkubiert. **(A)** Toxizität der Tocopherole **(B)** Toxizität der Tocotrienole. Die Daten stellen einen Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung aus zwei Versuchen mit je drei Einzelwerten dar. Unbehandelte Zellen = 100 %.



**Abb. 15: Zytotoxizität der Vitamin E-Formen in Caco-2-Zellen**

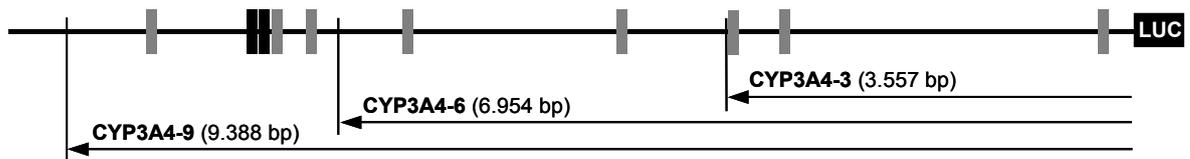
(A) Toxizität der Tocopherole (B) Toxizität der Tocotrienole. Die Behandlung der Zellen, die Messung der Toxizität und die Auswertung der Daten entspricht den bei Abb. 14 gemachten Ausführungen.

## 4.2 Regulation von Phase I-Enzymen durch Vitamin E und antioxidative sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe

### 4.2.1 Vitamin E induziert die Genexpression von Phase I-Enzymen *in vitro*

#### 4.2.1.1 Vitamin E-Formen aktivieren den Promotor des CYP3A4

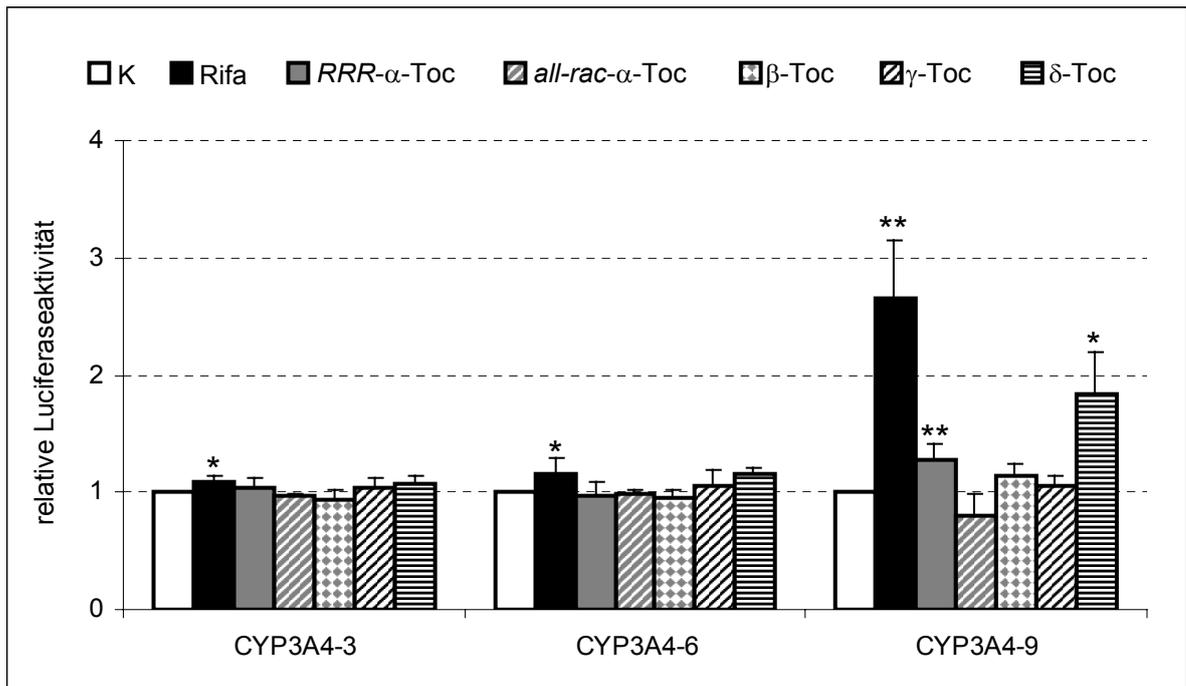
Als fremdstoffmetabolisierendes Enzym wird das CYP3A4 häufig auch durch seine eigenen Substrate in seiner Aktivität beeinflusst. Während die Hemmung des Enzyms durch reversible sterische Einwirkungen des Substrats am Protein verursacht wird, erfolgt die Induktion auf transkriptioneller Ebene. Nachdem bereits gezeigt werden konnte, dass Vitamin E-Formen den PXR aktivieren [92] und aufgrund der Annahme, dass die Vitamin E-Formen auch Substrate des CYP3A4 sind [59], war nun von Interesse, ob Vitamin E die Expression des CYP3A4 beeinflusst. Aus diesem Grund wurde die Wirkung der verschiedenen Vitamin E-Formen auf den Promotor des CYP3A4 untersucht. Dazu wurden drei Luciferase-Reportergenkonstrukte mit unterschiedlich langen CYP3A4-Promotorfragmenten transient in HepG2-Zellen transfiziert (Abb. 16).



**Abb. 16: Potentielle PXR/RXR-Bindungsstellen im CYP3A4-Promotor**

Die transfizierten Promotorfragmente pGL3-CYP3A4-3 (CYP3A4-3), pGL3-CYP3A4-6 (CYP3A4-6) und pGL3-CYP3A4-9 (CYP3A4-9) hatten Längen von 3.557 bp, 6.954 bp bzw. 9.388 bp. Nach einer Analyse der CYP3A4-Promotorsequenz (Genbank-Nr. AF185589) durch das Computerprogramm „MatInspector“ [180] enthält der CYP3A4-Promotor mehrere potentielle PXR/RXR-Bindungsstellen, deren Positionen durch Balken gekennzeichnet sind. Ein distaler Enhancer, der ca. 7,8 kb vom Transkriptionsstart entfernt liegt (vgl. auch Abb. 6), enthält zwei Erkennungselemente (schwarze Balken), an die das PXR/RXR $\alpha$ -Heterodimer binden kann. Nach Goodwin *et al.* [133] ist dieses Enhancer-Element essentiell für die Transaktivierung durch Rifampicin, dem bekanntesten Induktor des CYP3A4 *in vitro* und *in vivo*.

24 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit 10  $\mu$ M Rifampicin als Positivkontrolle oder 50  $\mu$ M der verschiedenen Vitamin E-Formen für weitere 24 h inkubiert. Nach der Ernte und Lyse der Zellen wurde die relative Reporteraktivität bestimmt. Die Luciferaseaktivität der beiden kürzeren Promotorfragmente (pGL3-CYP3A4-3 und -6) wurde sowohl durch das als Positivkontrolle verwendete Rifampicin als auch durch die eingesetzten Tocopherole kaum bzw. gar nicht reguliert. Erst das längste Promotorfragment mit 9.388 bp (pGL3-CYP3A4-9) wurde durch Rifampicin (Faktor 2,7), aber auch durch  $\alpha$ -Tocopherol und  $\delta$ -Tocopherol mit Faktoren von 1,3 bzw. 1,8 signifikant aktiviert (Abb. 17). *All-rac*- $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Tocopherol zeigten keinen Einfluss auf den CYP3A4-Promotor.

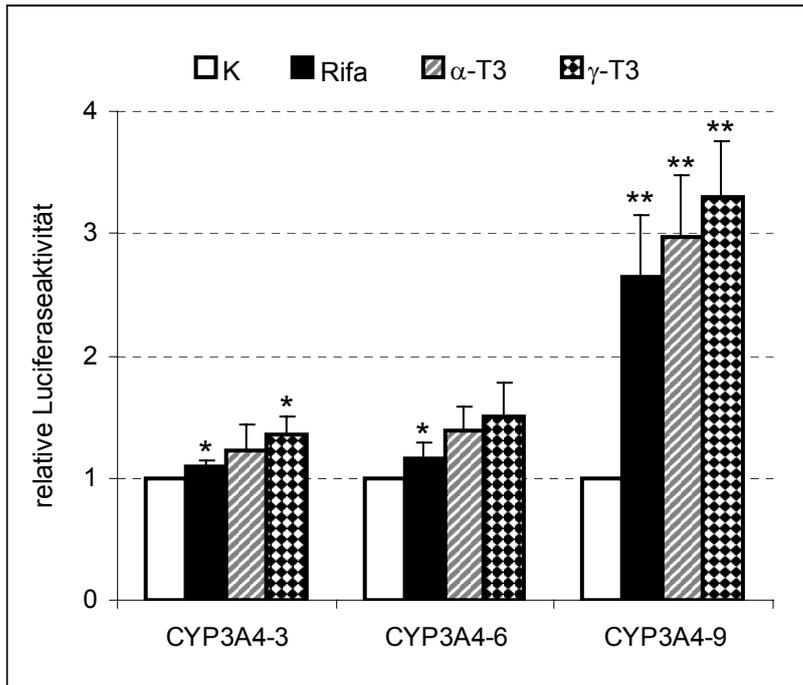


**Abb. 17: Aktivierung des CYP3A4-Promotors durch Tocopherole**

HepG2-Zellen wurden mit 0,4  $\mu$ g der Reporter-genkonstrukte pGL3-basic, pGL3-CYP3A4-3, pGL3-CYP3A4-6 oder pGL3-CYP3A4-9 transient transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit 10  $\mu$ M Rifampicin (Rifa; Positivkontrolle) bzw. jeweils 50  $\mu$ M *RRR*- $\alpha$ -Tocopherol (*RRR*- $\alpha$ -Toc), *all-rac*- $\alpha$ -Tocopherol (*all-rac*- $\alpha$ -Toc),  $\beta$ -Tocopherol ( $\beta$ -Toc),  $\gamma$ -Tocopherol ( $\gamma$ -Toc) oder  $\delta$ -Tocopherol ( $\delta$ -Toc) für 24 h inkubiert. Nach der Lyse der Zellen wurde die relative Reporter-genaktivität (siehe 3.4.10) bestimmt. Die unstimulierten Konstrukte (Ethanol, K, Kontrolle) wurden auf jeweils 1 gesetzt und alle anderen Werte darauf bezogen. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  vs. Kontrolle, ( $n \geq 2$  für CYP3A4-3 und -6;  $n \geq 3$  für CYP3A4-9).

Der Einfluss der Tocotrienole auf den CYP3A4-Promotor ist in Abb. 18 dargestellt. Hier erwies sich sowohl  $\alpha$ - als auch  $\gamma$ -Tocotrienol als starker Aktivator des CYP3A4-Promotors. Die Luciferaseaktivität des Plasmids mit dem längsten Promotorfragment lag mit Faktoren von 3,0 für das  $\alpha$ -Tocotrienol und 3,3 für das  $\gamma$ -Tocotrienol sogar geringfügig über der der Positivkontrolle Rifampicin. Im Gegensatz zu den Tocopherolen war auch die Luciferaseaktivität der beiden kürzeren Promotorfragmente ein wenig gesteigert.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass Vitamin E-Formen das CYP3A4, ein Enzym des Fremdstoffmetabolismus, auf transkriptioneller Ebene regulieren können. Dabei zeigen die Tocotrienole die stärkste Aktivierung, gefolgt vom  $\delta$ - und vom *RRR*- $\alpha$ -Tocopherol.  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Tocotrienol aktivieren den CYP3A4-Promotor etwa gleich stark und auf dem Niveau des Rifampicins. Die Aktivierung des Promotors durch  $\delta$ - und *RRR*- $\alpha$ -Tocopherol ist deutlich geringer. Abgesehen vom  $\gamma$ -Tocopherol entspricht die gezeigte Aktivierung des CYP3A4-Promotors durch *RRR*- $\alpha$ -Tocopherol,  $\delta$ -Tocopherol,  $\alpha$ -Tocotrienol und  $\gamma$ -Tocotrienol der von Landes *et al.* [92] gezeigten Aktivierung des PXR.



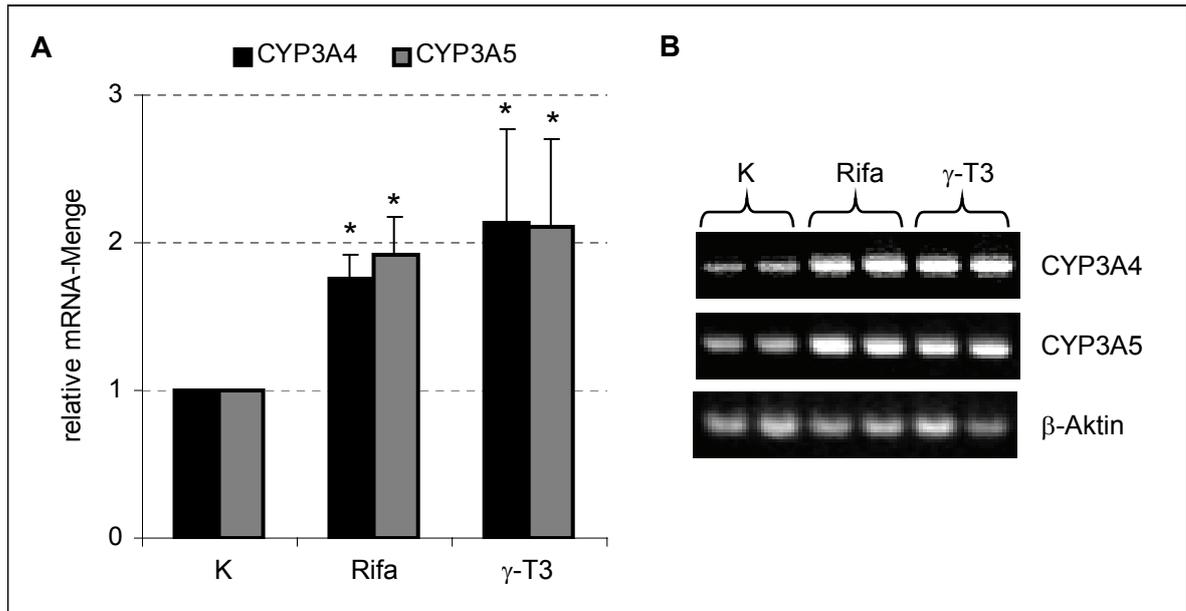
**Abb. 18: Aktivierung des CYP3A4-Promotors durch Tocotrienole**

HepG2-Zellen wurden transient transfiziert und 24 h mit 10  $\mu$ M Rifampicin (Rifa), 50  $\mu$ M  $\alpha$ -Tocotrienol ( $\alpha$ -T3) oder 50  $\mu$ M  $\gamma$ -Tocotrienol ( $\gamma$ -T3) inkubiert. Die Transfektion und Auswertung der Daten entspricht den bei Abb. 17 gemachten Ausführungen. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  vs. Kontrolle, ( $n \geq 2$  für CYP3A4-3 und -6;  $n \geq 3$  für CYP3A4-9).

#### 4.2.1.2 $\gamma$ -Tocotrienol induziert die Expression der endogenen mRNA von CYP3A4 und CYP3A5

Wenn Vitamin E-Formen den Promotor des CYP3A4 induzieren können, ist eine erhöhte Expression der mRNA in den Zellen zu erwarten. Aus diesem Grund wurde von den aktivierenden Vitamin E-Formen das  $\gamma$ -Tocotrienol als stärkster Aktivator (vgl. Abb. 18) ausgewählt, um den Einfluss auf die endogene Expression der mRNA des CYP3A4 zu untersuchen. Zusätzlich wurde der Einfluss auf die endogene mRNA-Expression eines weiteren Mitgliedes der humanen Cytochrom P450 3A-Subfamilie, des CYP3A5, betrachtet. Dazu wurden HepG2-Zellen für 48 h in serumfreiem Kulturmedium mit 50  $\mu$ M Rifampicin (Positivkontrolle) oder 50  $\mu$ M  $\gamma$ -Tocotrienol inkubiert. Die Behandlung mit  $\gamma$ -Tocotrienol resultierte in einer deutlichen Steigerung der mRNA-Expression des CYP3A4 und des CYP3A5. Die densitometrische Auswertung ergab eine 2-fache Steigerung der mRNA-Expression. Die Induktion durch  $\gamma$ -Tocotrienol war vergleichbar mit der Induktion durch Rifampicin (Abb. 19).

Somit konnte gezeigt werden, dass mindestens eine Vitamin E-Form, das  $\gamma$ -Tocotrienol, die Expression von zwei Isoformen der Cytochrom P450 3A-Subfamilie (CYP3A4 und CYP3A5) als Enzyme des Fremdstoffmetabolismus, induziert.



**Abb. 19: Endogene Expression der mRNA von CYP3A4 und CYP3A5**

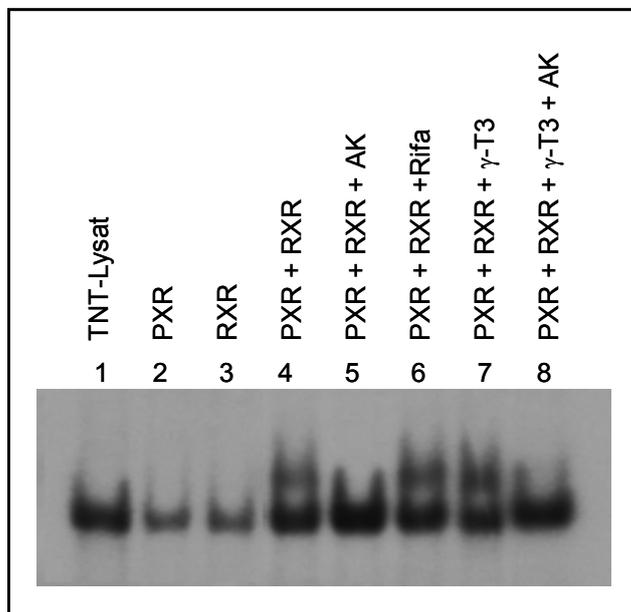
HepG2-Zellen wurden 48 h in serumfreiem Kulturmedium mit 50  $\mu$ M Rifampicin (Rifa) und 50  $\mu$ M  $\gamma$ -Tocotrienol ( $\gamma$ -T3) kultiviert. Nach RNA-Extraktion, reverser Transkription und PCR mit genspezifischen Oligonukleotiden wurden die PCR-Produkte auf ein 1,5 %iges Agarosegel aufgetragen.  $\beta$ -Aktin diente als Referenzgen. **(A)** Densitometrische Auswertung der relativen mRNA-Menge. Der Mittelwert der Kontrollzellen (Ethanol, K) wurde auf 1 gesetzt und alle anderen Werte darauf bezogen. Die Daten stellen einen Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung aus vier Einzelwerten dar. \* $p < 0,05$  vs. Kontrolle. **(B)** Abgebildet ist ein repräsentatives Gel mit zwei Einzelwerten.

#### 4.2.1.3 $\gamma$ -Tocotrienol beeinflusst nicht die Bindung des PXR an die DNA

Da das CYP3A4 ein Zielgen des PXR ist und schon gezeigt werden konnte, dass  $\gamma$ -Tocotrienol an den PXR bindet und diesen aktiviert [92, 181], war von Interesse, ob  $\gamma$ -Tocotrienol auf die Bindung des PXR an die DNA einen Einfluss hat. Für Gelshiftexperimente (EMSA) wurde ein synthetisches Oligonukleotid mit einer Länge von 29 bp, welches das responsive Element ER6 aus dem CYP3A4- und dem CYP3A5-Promotor enthält [182], radioaktiv markiert und mit *in vitro* translatiertem humanen PXR und/oder RXR inkubiert. Zu diesen Ansätzen wurden 10  $\mu$ M Rifampicin als Positivkontrolle oder 50  $\mu$ M  $\gamma$ -Tocotrienol gegeben.

Im Gel konnten zwei Banden auf unterschiedlichen Höhen detektiert werden. Die untere Bande trat bereits beim TNT-Lysat alleine auf, so dass es sich hier um eine unspezifische Bindung an das Oligonukleotid handelt (Abb. 20, Spur 1). Die obere Bande trat auf, wenn PXR und RXR zusammen inkubiert wurden (Abb. 20, Spur 4). Die Spezifität dieser Bande wurde durch die Zugabe eines PXR-Antikörpers überprüft. Bindet ein hinzugegebener Antikörper spezifisch an den DNA-Protein-Komplex, hat dieser größere Komplex eine langsamere Laufgeschwindigkeit im Gel, so dass die Bande nach oben „geschifft“ wird (sog. Supershift). Da der PXR-Antikörper gegen die DNA-bindende Domäne des PXR gerichtet ist, kommt es hier nicht zum Supershift, sondern zur vollständigen Aufhe-

bung der DNA-Protein Interaktion (Abb. 20, Spuren 5 und 8). Das Verschwinden der Bande beweist die Bindung von PXR an das radioaktiv markierte ER6-Oligonukleotid. Die Intensität dieser Bande wurde aber weder durch 10  $\mu\text{M}$  Rifampicin noch durch 50  $\mu\text{M}$   $\gamma$ -Tocotrienol beeinflusst (Abb. 20, Spuren 6 und 7).



**Abb. 20: Einfluss von  $\gamma$ -Tocotrienol auf die Bindung des PXR an die DNA**

Ein mit [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]-ATP radioaktiv markiertes ER6-Oligonukleotid wurde mit *in vitro* translatiertem humanen PXR (2), RXR (3) oder PXR und RXR zusammen (4-8) inkubiert. Neben der alleinigen gemeinsamen Inkubation von PXR und RXR (4) wurden zusätzlich Proben mit 1  $\mu\text{g}$  PXR-Antikörper (AK; 5), 10  $\mu\text{M}$  Rifampicin (Rifa; 6), 50  $\mu\text{M}$   $\gamma$ -Tocotrienol ( $\gamma$ -T3; 7) oder 50  $\mu\text{M}$   $\gamma$ -Tocotrienol und 1  $\mu\text{g}$  PXR-Antikörper (8) versetzt. Abgebildet ist ein repräsentatives Gel ( $n = 3$ ).

Zusätzlich wurde die Spezifität der betrachteten Banden durch einen Kompetitionversuch kontrolliert. Die Zugabe von nicht radioaktiv markiertem Oligonukleotid in 25-, 50- und 100-fachem Überschuss im Vergleich zum radioaktiv markierten Oligonukleotid führte zum Verschwinden der Banden (Gele nicht abgebildet).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass Rifampicin und  $\gamma$ -Tocotrienol als Liganden des PXR keinen Einfluss auf die Bindung des PXR an sein responsives Element (ER6) haben. Zusätzlich konnte *in vitro* gezeigt werden, dass das Heterodimer PXR und RXR auch ohne Liganden an die DNA bindet.

## 4.2.2 Vitamin E induziert die Genexpression von Phase I-Enzymen *in vivo*

### 4.2.2.1 $\alpha$ -Tocopherol induziert die mRNA von Cyp3a11 in der Leber

*In vitro* konnte sowohl die Aktivierung des CYP3A4-Promotors (vgl. 4.2.1.1) als auch die Induktion der Expression der endogenen CYP3A4- und CYP3A5-mRNA (vgl. 4.2.1.2) durch einzelne oder mehrere Vitamin E-Formen gezeigt werden. Um zu untersuchen, ob diese Ergebnisse auch auf die *in vivo*-Situation übertragbar sind, wurde ein Tierversuch durchgeführt. Männliche Mäuse wurden dazu in vier Fütterungsgruppen eingeteilt. Für 3 Monate erhielt eine Gruppe 2 mg  $\alpha$ -Tocopherylacetat/kg Futter (Vitamin E-Mangeldiät),

eine zweite Gruppe 20 mg  $\alpha$ -Tocopherylacetat/kg Futter (Vitamin E-Normaldiät) und eine dritte Gruppe 200 mg  $\alpha$ -Tocopherylacetat/kg Futter (Vitamin E-Überflusdiät). Um Langzeiteffekte zu ermitteln, erhielt eine vierte Gruppe die Überflusdiät für 9 Monate (vgl. Abb. 8). Der  $\alpha$ -Tocopherol-Gehalt nahm in der Leber und im Plasma mit zunehmendem Gehalt an  $\alpha$ -Tocopherylacetat im Futter zu (Tab. 9). Bei den Überflusdiät-Gruppen war der Gehalt an  $\alpha$ -Tocopherol nach einer Fütterungsdauer von 9 Monaten in der Leber und im Plasma nochmals höher als nach einer 3-monatigen Fütterung.

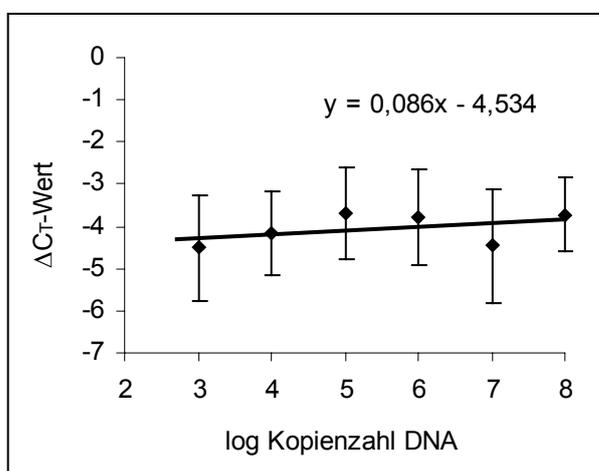
**Tab. 9:  $\alpha$ -Tocopherol-Gehalt in Leber und Plasma<sup>1</sup>**

\*\* $p < 0,01$  vs. Mangel- und Normaldiät; # $p < 0,05$  vs. Überflusdiät

Diät ( $\alpha$ -Tocopherylacetat/kg Futter)	$\alpha$ -Tocopherol-Gehalt	
	Leber [nmol/g Gewebe]	Plasma [ $\mu$ M]
Mangeldiät (2 mg/kg)	23,8 $\pm$ 11,7	1,3 $\pm$ 0,0
Normaldiät (20 mg/kg)	30,5 $\pm$ 10,5	2,7 $\pm$ 0,4
Überflusdiät (200 mg/kg)	141,2 $\pm$ 61,2 **	5,7 $\pm$ 2,3 **
Langzeit-Überflusdiät (200 mg/kg)	204,6 $\pm$ 48,8	9,5 $\pm$ 1,5 #

<sup>1</sup> nach [183]

Der unterschiedliche  $\alpha$ -Tocopherol-Gehalt in der Leber in den vier Fütterungsgruppen war Voraussetzung für die Untersuchung der Genexpression in der Leber mittels real-time PCR. Zur Quantifizierung auf der Grundlage der  $\Delta\Delta C_T$ -Methode (vgl. 3.4.5.2) musste zunächst geprüft werden, ob Zielgen (Cyp3a11) und Referenzgen (HPRT) unter den gewählten Bedingungen mit gleicher Effizienz amplifiziert werden. Dazu wurden sechs Verdünnungen von  $10^3 - 10^8$  Kopien des PCR-Produkts der jeweiligen Gene mit genspezifischen Oligonukleotiden mittels real-time PCR amplifiziert. Die Auftragung der eingesetzten Kopienzahl gegen den  $\Delta C_T$ -Wert ergab einen Anstieg der Geraden von +0,086 (Abb.



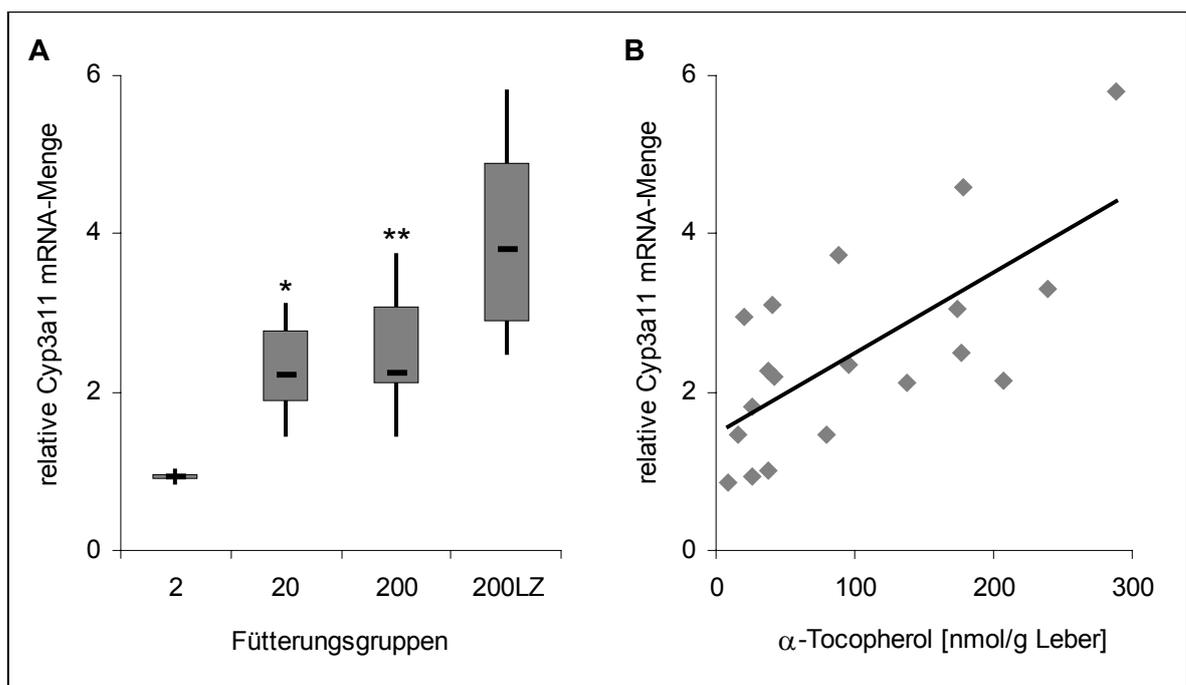
21), so dass die  $\Delta\Delta C_T$ -Methode angewendet werden konnte.

**Abb. 21:  $\Delta C_T$ -Wert-Vergleich**

Aus Agarosegel isolierte PCR-Produkte des Cyp3a11 und der HPRT wurden in definierten Kopienzahlen (vgl. 3.4.5.2) mittels real-time PCR amplifiziert. Der  $\Delta C_T$ -Wert ( $C_{T\text{-Wert}_{\text{Cyp3a11}}} - C_{T\text{-Wert}_{\text{HPRT}}}$ ) wurde gegen die Kopienzahl des PCR-Produkts aufgetragen (n=3).

Zur Bestimmung der Genexpression des Cyp3a11 wurde aus den homogenisierten Lebern aller Tiere RNA isoliert und über real-time PCR quantifiziert. Abb. 22 A zeigt die relative Menge an Cyp3a11 mRNA in den verschiedenen Fütterungsgruppen. Bezogen auf die Mangeldiät (2) stieg die Expression der Cyp3a11 mRNA in der Normal- (20) und Überschussdiät (200) auf Mediane von 2,23 (Min 1,45; Max 3,10) bzw. 2,25 (Min 1,47; Max 3,73) an. Die Langzeitfütterung mit der Überflusdiät (200LZ) ließ die Expression der Cyp3a11 mRNA noch mal zusätzlich steigen. Hier lag der Median bei 3,82 (Min 2,50; Max 5,80). Demnach stieg die Expression der Cyp3a11 mRNA in den Lebern der Mäuse mit zunehmender  $\alpha$ -Tocopherylacetat-Konzentration im Futter (Abb. 22 A).

Betrachtet man die relative Cyp3a11 mRNA-Menge nicht in Abhängigkeit vom Vitamin E-Gehalt im Futter, sondern vom tatsächlichen  $\alpha$ -Tocopherol-Gehalt in den Lebern der Einzeltiere (Abb. 22 B), wird erneut deutlich, dass es eine positive Korrelation zwischen  $\alpha$ -Tocopherol-Gehalt in der Leber und Expression der Cyp3a11 mRNA gibt.



**Abb. 22: Expression der Cyp3a11 mRNA in Abhängigkeit von  $\alpha$ -Tocopherol**

Mäuse wurden 3 Monate mit 2 mg (2), 20 mg (20) oder 200 mg (200)  $\alpha$ -Tocopherylacetat/kg Futter gefüttert. Eine Langzeit-Gruppe wurde mit 200 mg  $\alpha$ -Tocopherylacetat/kg Futter für 9 Monate gefüttert (200LZ). Die RNA wurde aus den homogenisierten Lebern der Tiere isoliert, revers transkribiert und mittels real-time PCR mit genspezifischen Oligonukleotiden amplifiziert. Die Daten stellen die relative Cyp3a11 mRNA-Menge, basierend auf den entsprechenden  $\Delta\Delta C_T$ -Werten (siehe 3.4.5.2), dar. Der  $\Delta\Delta C_T$ -Wert eines Tieres aus der Mangeldiät (Gruppe 2) wurde auf 1 gesetzt und die Werte aller anderen Tiere darauf bezogen. Die  $C_T$ -Werte des Cyp3a11 wurden auf die  $C_T$ -Werte der HPRT normalisiert. (A) Abgebildet ist der relative Expressionsunterschied der Cyp3a11 mRNA in den verschiedenen Fütterungsgruppen. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  vs. 2. (B) Abgebildet ist die relative Cyp3a11 mRNA-Menge in Abhängigkeit vom  $\alpha$ -Tocopherol-Gehalt in der Leber aller Einzeltiere.

Zusammenfassend konnte *in vivo* gezeigt werden, dass es in der Leber eine positive Korrelation zwischen der Expression des Cyp3a11 und  $\alpha$ -Tocopherol gibt und somit  $\alpha$ -Tocopherol auch *in vivo* die Expression des wichtigsten fremdstoffmetabolisierenden Enzyms steigert.

#### 4.2.2.2 $\gamma$ -Tocotrienol hat keinen Einfluss auf die Cyp3a11 Expression in der Leber

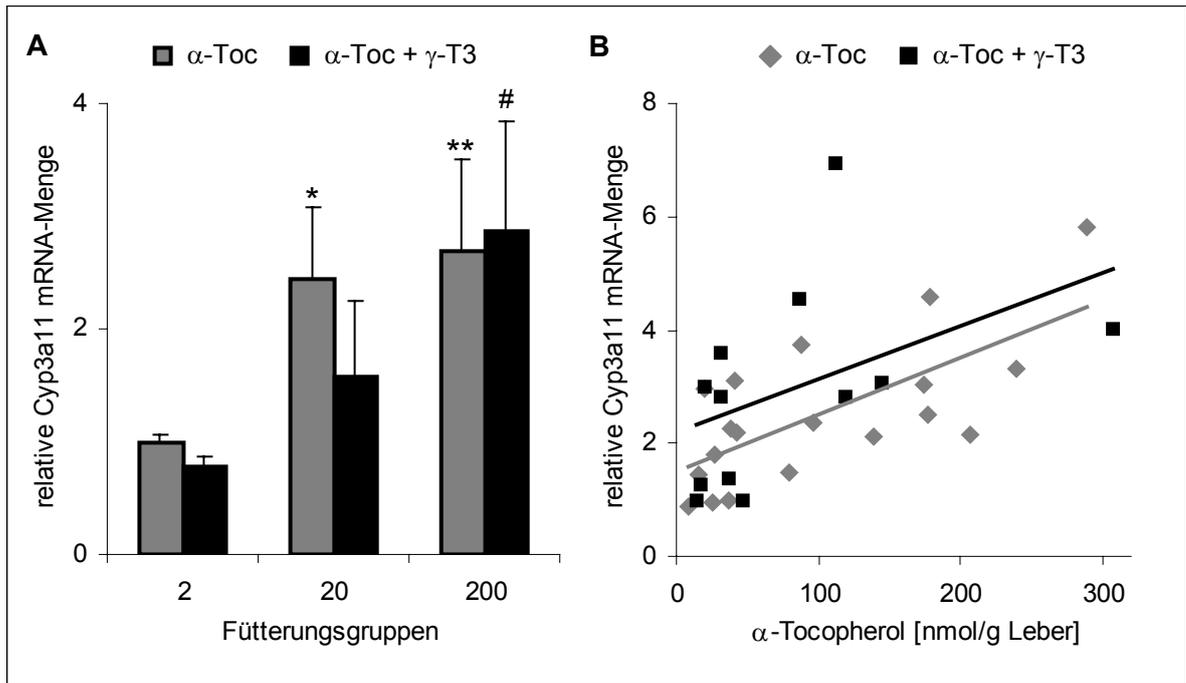
In den *in vitro* Versuchen stellte sich  $\gamma$ -Tocotrienol als stärkster Aktivator des CYP3A4-Promotors sowie Induktor der mRNA-Expression von CYP3A4 und CYP3A5 heraus. Um dies auch *in vivo* zu überprüfen, wurde jeweils der Hälfte der Mäuse aus den drei Vitamin E-Fütterungsgruppen (Mangel, Normal, Überfluss)  $\gamma$ -Tocotrienol verabreicht. Dazu wurde den Tieren in 50  $\mu$ l Olivenöl gelöstes  $\gamma$ -Tocotrienol (250  $\mu$ g) 7 Tage vor Beendigung des Versuches täglich geschlündelt. Der Kontrollgruppe wurde die gleiche Menge Olivenöl geschlündelt. Die Supplementierung mit  $\gamma$ -Tocotrienol hatte keinen signifikanten Einfluss auf den  $\alpha$ -Tocopherol-Gehalt in der Leber (Tab. 10). Lediglich in der Vitamin E-Mangelgruppe zeigte sich eine leichte nicht signifikante Reduzierung des  $\alpha$ -Tocopherol-Gehalts.  $\gamma$ -Tocotrienol lag teilweise unter der Nachweisgrenze (Daten nicht abgebildet).

**Tab. 10: Einfluss von  $\gamma$ -Tocotrienol auf den  $\alpha$ -Tocopherol-Gehalt in der Leber<sup>1</sup>**

Diät	$\alpha$ -Tocopherol [nmol/g Gewebe]	Diät	$\alpha$ -Tocopherol [nmol/g Gewebe]
Mangeldiät	23,8 $\pm$ 11,7	Mangeldiät + $\gamma$ -Tocotrienol	16,4 $\pm$ 1,1
Normaldiät	30,5 $\pm$ 10,5	Normaldiät + $\gamma$ -Tocotrienol	31,6 $\pm$ 8,4
Überflussdiät	141,2 $\pm$ 61,2	Überflussdiät + $\gamma$ -Tocotrienol	161,0 $\pm$ 73,8

<sup>1</sup> nach [183]

Die Expression der Cyp3a11 mRNA in den mit  $\gamma$ -Tocotrienol geschlündelten Gruppen ist mit der Expression der nicht mit  $\gamma$ -Tocotrienol geschlündelten Gruppen vergleichbar (Abb. 23 A). Teilt man die Mäuse nicht in ihre Fütterungsgruppen auf, sondern korreliert den tatsächlichen  $\alpha$ -Tocopherol-Gehalt in der Leber mit der relativen Expression der Cyp3a11 mRNA, zeigt sich eine geringfügige nach oben gerichtete Verschiebung der Trendlinie durch die Daten (Abb. 23 B). Dies weist auf einen geringen Einfluss von  $\gamma$ -Tocotrienol hin, der aus dem Mittelwert der Cyp3a11 mRNA aller Tiere der einzelnen Fütterungsgruppen nicht deutlich wird. Der nahezu gleiche Anstieg beider Trendlinien zeigt aber auch, dass  $\gamma$ -Tocotrienol den Einfluss von  $\alpha$ -Tocopherol auf die Expression der Cyp3a11 mRNA nicht beeinflusst, sondern nur geringfügig verstärkt.

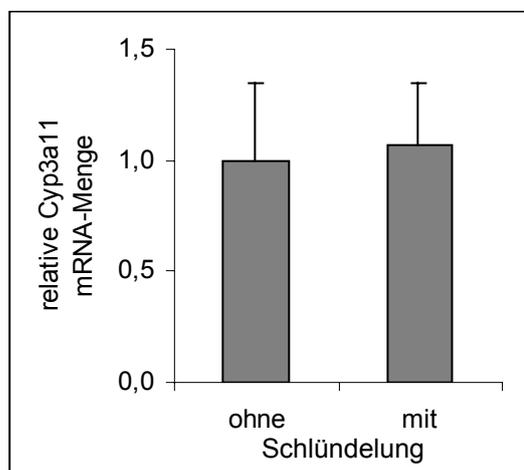


**Abb. 23: Expression der Cyp3a11 mRNA in Abhängigkeit von  $\gamma$ -Tocotrienol**

Drei Mäusegruppen wurden 3 Monate mit 2 mg (2), 20 mg (20) oder 200 mg (200)  $\alpha$ -Tocopherylacetat ( $\alpha$ -Toc)/kg Futter gefüttert. Sieben Tage vor Ende des Versuchs wurde den Tieren täglich 50  $\mu$ l Olivenöl mit oder ohne 250  $\mu$ g  $\gamma$ -Tocotrienol ( $\gamma$ -T3) geschlündelt. Die Ermittlung der relativen Cyp3a11 mRNA-Menge entspricht den Ausführungen bei Abb. 22. **(A)** Abgebildet ist der relative Expressionsunterschied der Cyp3a11 mRNA in den verschiedenen Fütterungsgruppen mit und ohne  $\gamma$ -Tocotrienol. Der Mittelwert der Mangeldiät ohne  $\gamma$ -Tocotrienol (2  $\alpha$ -Toc) wurde auf 1 gesetzt und alle anderen Mittelwerte der Gruppen darauf bezogen. \* $p < 0,05$  vs. 2 (ohne  $\gamma$ -T3); \*\* $p < 0,01$  vs. 2 (ohne  $\gamma$ -T3); # $p < 0,01$  vs. 2 (mit  $\gamma$ -T3), # $p < 0,05$  vs. 20 (mit  $\gamma$ -T3). **(B)** Abgebildet ist die relative Cyp3a11 mRNA-Menge in Abhängigkeit vom  $\alpha$ -Tocopherol-Gehalt in der Leber aller Einzeltiere. Der  $\Delta\Delta C_T$ -Wert eines Tieres aus der Mangeldiät ohne  $\gamma$ -Tocotrienol ( $\alpha$ -Toc) wurde auf 1 gesetzt und die Werte aller anderen Tiere darauf bezogen.

Um ausschließen zu können, dass die Schlündelung einen Einfluss auf die Expression der Cyp3a11 mRNA hatte, wurde diese zwischen den zum Versuch gehörenden geschlündelten Mäusen der Vitamin E-Normaldiät und ungeschlündelten nicht zum eigentlichen Versuch gehörenden Mäusen der gleichen Diät verglichen. Die Schlündelung

hatte keinen Effekt auf die untersuchte Expression der Cyp3a11 mRNA (Abb. 24).



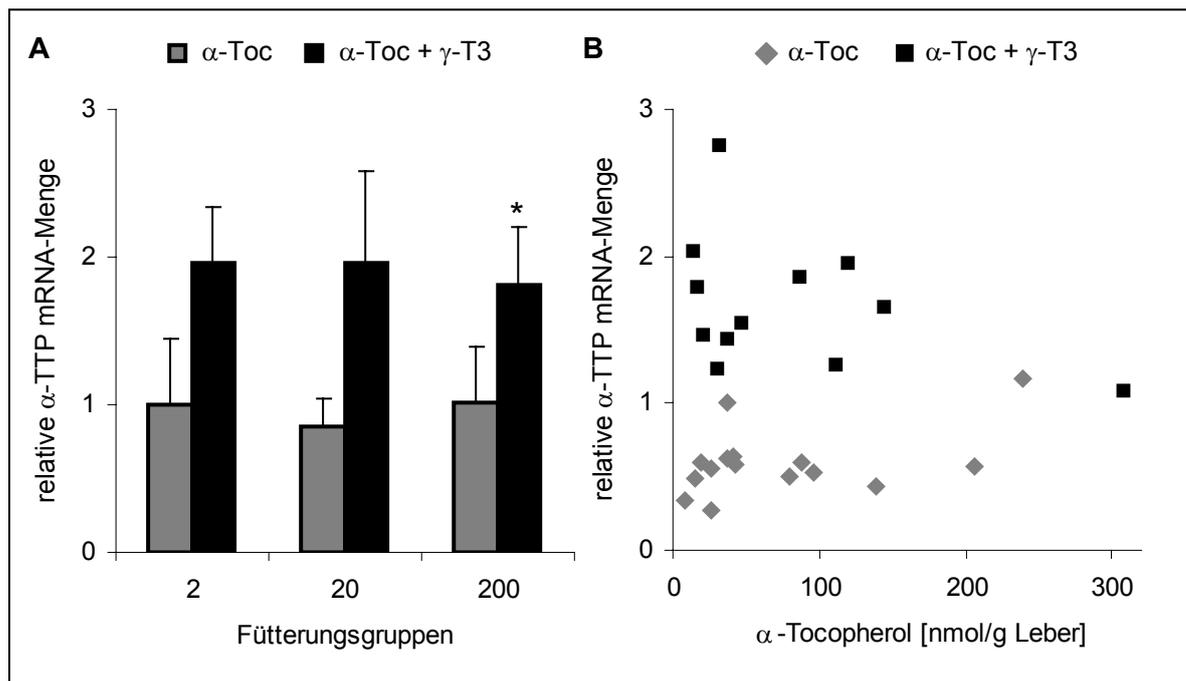
**Abb. 24: Einfluss der Schlündelung auf die Expression der Cyp3a11 mRNA**

Die Expression der Cyp3a11 mRNA der mit 50  $\mu$ l Olivenöl geschlündelten Mäuse wurde mit der Expression von ungeschlündelten Mäusen ( $n = 3$ ; Mittelwert auf 1 gesetzt) verglichen. Die Berechnung der relativen Cyp3a11 mRNA-Menge entspricht den bei Abb. 22 gemachten Ausführungen.

#### 4.2.2.3 $\gamma$ -Tocotrienol erhöht die $\alpha$ -TTP mRNA-Expression in der Leber

Analog zur Messung der Cyp3a11 mRNA wurde auch für die Messung der  $\alpha$ -TTP mRNA zuvor getestet, ob die  $\Delta\Delta C_T$ -Methode anwendbar war und ob es Schlündelungseffekte auf die Expression der  $\alpha$ -TTP mRNA gab (vgl. 4.2.2.1). Beim Vergleich der  $\Delta C_T$ -Werte ( $C_T$ -Wert $_{\alpha\text{-TTP}}$  –  $C_T$ -Wert $_{\text{HPRT}}$ ) ergab sich ein Anstieg von -0,088, so dass die  $\Delta\Delta C_T$ -Methode zur Auswertung der Genexpression angewendet werden konnte (Daten nicht abgebildet). Der Vergleich zwischen den mit Olivenöl geschlündelten und ungeschlündelten Mäusen der Vitamin E-Normaldiät zeigte keinen signifikanten Unterschied in der Expression der  $\alpha$ -TTP mRNA (Daten nicht abgebildet).

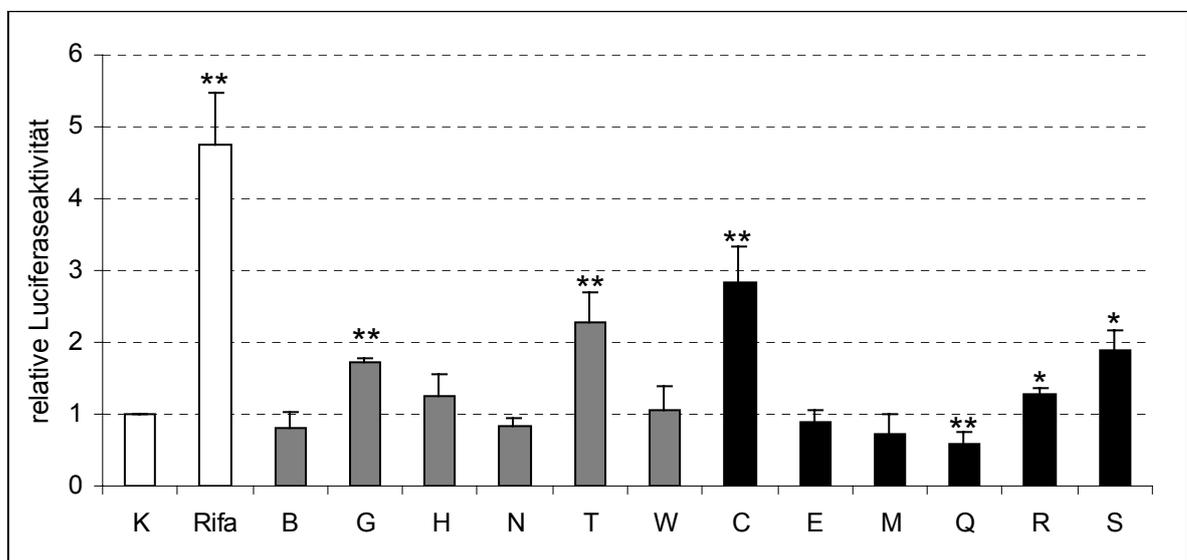
Der  $\alpha$ -Tocopherylacetat-Gehalt im Futter der verschiedenen Fütterungsgruppen beeinflusste nicht die  $\alpha$ -TTP mRNA-Expression in den Lebern der Mäuse. Dagegen führte die Supplementation der Mäuse mit je 250  $\mu\text{g/d}$   $\gamma$ -Tocotrienol an den letzten 7 Tagen des Versuches in allen drei Fütterungsgruppen zu einer Steigerung der Expression der  $\alpha$ -TTP mRNA (Abb. 25).



### 4.2.3 Antioxidative sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe und die Genexpression von Phase I-Enzymen

#### 4.2.3.1 Einfluss von sekundären Pflanzeninhaltsstoffen auf die PXR-Aktivierung

Da Vitamin E auf der Genexpressionsebene modulierend auf Phase I-Enzyme wirkt (vgl. 4.2.1), war es von Interesse, ob auch andere sog. Antioxidanzien ihre Wirkung über die Regulation von Genaktivitäten ausüben können. Verschiedene Substanzen und Pflanzenextrakte wurden daher zunächst auf ihre Fähigkeit zur Aktivierung des PXR untersucht. Von den Pflanzenextrakten zeigten die Extrakte von Gewürznelke und Thymian eine ca. 2-fache Luciferaseaktivität im Vergleich zur Kontrolle. Bei den Substanzen waren vergleichbare Aktivitäten nach Stimulation mit Curcumin und Sulforaphan sowie eine geringe Aktivitätssteigerung durch Resveratrol zu beobachten. 25  $\mu\text{M}$  Quercetin hemmte die Luciferaseaktivität (Abb. 26). Um zu überprüfen, ob die gemessene Steigerung bzw. Hemmung der Luciferaseaktivität durch den PXR vermittelt war, wurden alle Stimulationsversuche auch ohne das Expressionsplasmid für das humane PXR (pSG5-hPXR) durchgeführt. Abgesehen von einer geringen Aktivierung durch Rifampicin (Faktor 1,6) konnten bei den anderen Substanzen und Pflanzenextrakten keine signifikanten Steigerungen der Luciferaseaktivität gemessen werden; Hemmungen der Luciferaseaktivität wurden durch Blaubeeren- und Nelkenpfefferextrakt sowie Medox hervorgerufen (Daten nicht gezeigt).



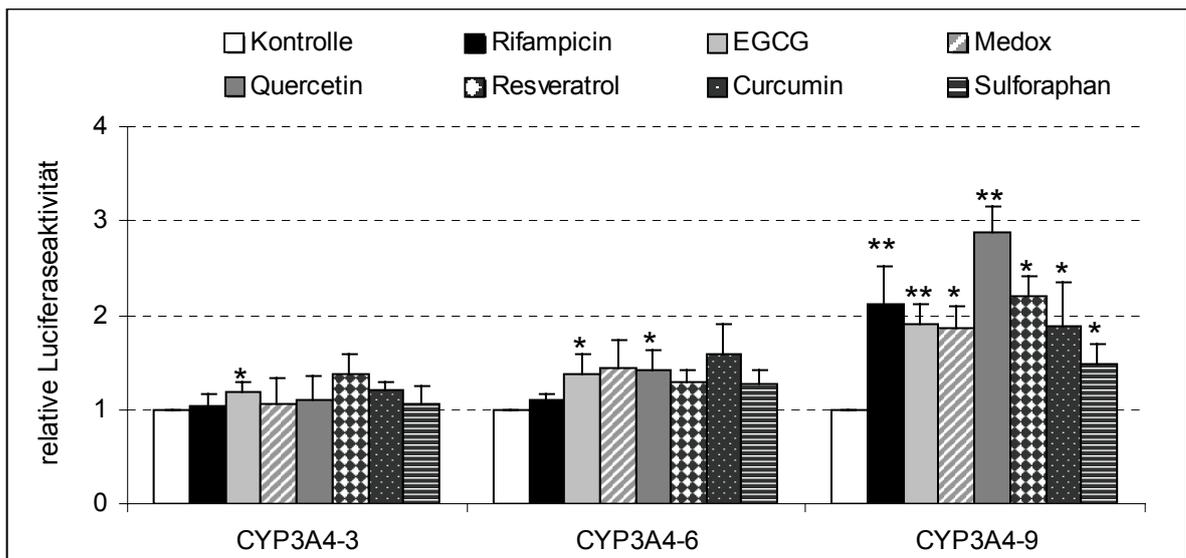
**Abb. 26: Aktivierung des responsiven Elements des PXR (DR3)**

Verschiedene Pflanzenextrakte (graue Balken) und Substanzen (schwarze Balken) wurden auf ihren Einfluss auf den PXR hin getestet. Dazu wurden HepG2-Zellen mit 0,15  $\mu\text{g}$  pGL3-(DR3)<sub>2</sub> und 0,15  $\mu\text{g}$  pSG5-hPXR transient transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit 3 mg/ml Blaubeerextrakt (B), 1 mg/ml Gewürznelkenextrakt (G), 3 mg/ml Himbeerextrakt (H), 3 mg/ml Nelkenpfefferextrakt (N), 3 mg/ml Thymianextrakt (T), 3 mg/ml Walnussextrakt (W), 25  $\mu\text{M}$  Curcumin (C), 25  $\mu\text{M}$  EGCG (E), 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Medox (M), 25  $\mu\text{M}$  Quercetin (Q), 25  $\mu\text{M}$  Resveratrol (R) oder 5  $\mu\text{M}$  Sulforaphan (S) für 24 h in serumfreiem Medium stimuliert. Als Positivkontrolle dienten 10  $\mu\text{M}$  Rifampicin (R). Nach Ernte und Lyse der Zellen wurde die relative Luciferaseaktivität bestimmt. Die unbehandelten Konstrukte (DMSO, K, Kontrolle) wurden auf 1 normiert und alle anderen Werte dazu ins Verhältnis gesetzt. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  vs. Kontrolle ( $n \geq 3$ ).

Die durchgeführten Transfektionsversuche haben gezeigt, dass die getesteten Substanzen und Pflanzenextrakte, denen antioxidative Wirkungen zugeschrieben werden, den PXR beeinflussen. Diese Beeinflussung resultierte sowohl in einer Aktivierung als auch in einer Hemmung der PXR-vermittelten Luciferaseaktivität.

#### 4.2.3.2 Aktivierung des CYP3A4-Promotors

Nachdem festgestellt wurde, dass der PXR durch die getesteten Substanzen und Pflanzenextrakte beeinflusst wird, wurde zusätzlich getestet, ob dies auch zu einer Beeinflussung des CYP3A4-Gens auf Promotorebene führt. HepG2-Zellen wurden mit verschiedenen langen Luciferase-Reporterkonstrukten (pGL3-CYP3A4-3, pGL3-CYP3A4-6 und pGL3-CYP3A4-9) transient transfiziert und 24 h mit 10  $\mu$ M Rifampicin als Positivkontrolle sowie verschiedenen antioxidativen Substanzen und Pflanzenextrakten inkubiert. Nach der Ernte und Lyse der Zellen wurde die relative Reporteraktivität bestimmt.



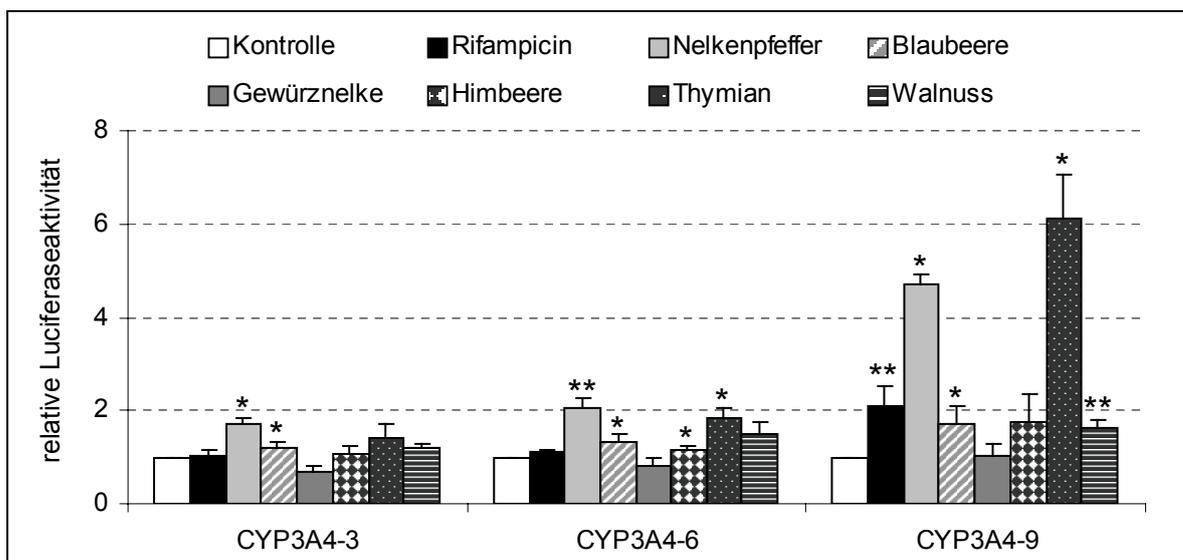
**Abb. 27: Aktivierung des CYP3A4-Promotors durch antioxidative Substanzen**

HepG2-Zellen wurden mit 0,4  $\mu$ g der Reporterkonstrukte pGL3-basic, pGL3-CYP3A4-3, pGL3-CYP3A4-6 oder pGL3-CYP3A4-9 transient transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit 10  $\mu$ M Rifampicin (Positivkontrolle), 25  $\mu$ M EGCG, 50  $\mu$ g/ml Medox, 25  $\mu$ M Quercetin, 25  $\mu$ M Resveratrol, 25  $\mu$ M Curcumin oder 5  $\mu$ M Sulforaphan für 24 h in serumfreiem Medium inkubiert. Nach der Lyse der Zellen wurde die relative Reporteraktivität (siehe 3.4.10) bestimmt. Die unstimulierten Konstrukte (DMSO; Kontrolle) wurden jeweils auf 1 gesetzt und alle anderen Werte darauf bezogen. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  vs. Kontrolle, ( $n \geq 3$ ).

Vergleichbar mit der Aktivierung des CYP3A4-Promotors durch einige Vitamin E-Formen war auch hier die jeweils stärkste Aktivierung beim längsten Promotorfragment zu beobachten. Die Luciferaseaktivität des pGL3-CYP3A4-9 wurde durch alle getesteten Substanzen gesteigert und erreichte nach einer Stimulation mit 25  $\mu$ M Quercetin einen Induktionsfaktor (2,9), der über dem des Rifampicins (2,3) lag. Abgesehen vom Sulfo-

raphan mit einem Faktor von 1,5 konnten alle anderen Substanzen die Luciferaseaktivität um einen Faktor von ca. 2 steigern (Abb. 27). Während Rifampicin als Positivkontrolle keinen Effekt auf die Promotorfragmente pGL3-CYP3A4-3 und -6 ausübte, war die Luciferaseaktivität zumindest auch beim pGL3-CYP3A4-6 durch die eingesetzten Substanzen geringfügig induziert.

Verschiedene Pflanzenextrakte stimulierten die Luciferaseaktivität aller CYP3A4-Promotor-Reporterkonstrukte (Abb. 28). Auffallend war die starke Aktivierung durch die Extrakte aus Nelkenpfeffer und Thymian. Obwohl es keine Aktivierung des PXR durch den Extrakt aus Nelkenpfeffer gab (vgl. Abb. 26), konnte dieser beim längsten Promotorfragment die Luciferaseaktivität um einen Faktor von 4,7 zur Kontrolle und um einen Faktor von 2,0 zur Positivkontrolle Rifampicin erhöhen. Beim Thymianextrakt, der den PXR aktiviert hat, lagen diese Faktoren mit 6,1 bzw. 2,6 sogar noch etwas höher. Auch die relative Luciferaseaktivität der Plasmide mit den beiden kürzeren Promotorfragmenten konnte im Gegensatz zu Rifampicin durch die Extrakte aus Nelkenpfeffer und Thymian erhöht werden. 3 mg/ml Blau- oder Himbeerextrakt induzierten ebenfalls die Luciferase- und somit die CYP3A4-Promotoraktivität.



**Abb. 28: Aktivierung des CYP3A4-Promotors durch verschiedene Pflanzenextrakte**

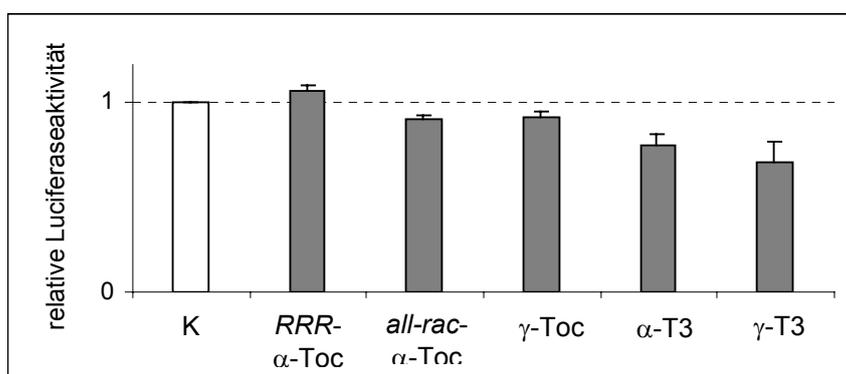
HepG2-Zellen wurden mit 0,4 µg der Reporter-genkonstrukte pGL3-basic, pGL3-CYP3A4-3, pGL3-CYP3A4-6 oder pGL3-CYP3A4-9 transient transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit 10 µM Rifampicin (Positivkontrolle), 3 mg/ml Nelkenpfefferextrakt, 3 mg/ml Blaubeerextrakt, 1 mg/ml Gewürznelkenextrakt, 3 mg/ml Himbeerextrakt, 3 mg/ml Thymianextrakt oder 3 mg/ml Walnussextrakt für 24 h in serumfreiem Medium inkubiert. Nach der Lyse der Zellen wurde die relative Reporter-genaktivität (siehe 3.4.10) bestimmt. Die unstimulierten Konstrukte (DMSO; Kontrolle) wurden jeweils auf 1 gesetzt und alle anderen Werte darauf bezogen. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  vs. Kontrolle, ( $n \geq 3$ ).

### 4.3 Regulation von Phase II-Enzymen durch Vitamin E und antioxidative sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe

Viele Phase II-Enzyme werden über den Transkriptionsfaktor Nrf2 reguliert und gehören in die Gruppe der antioxidativen und/oder detoxifizierenden Enzyme. So werden viele intrazelluläre antioxidative Schutzmechanismen, wie z.B. die Enzyme Katalase, Superoxiddismutase und die gastrointestinale Glutathionperoxidase (GI-GPx) sowie die  $\gamma$ -Glutamylcystein-Synthetase als Enzym der Glutathion-Biosynthese, durch den Transkriptionsfaktor Nrf2 reguliert [153, 184, 185]. Vitamin E und allen anderen bisher in dieser Arbeit in Form von reinen Substanzen oder Pflanzenextrakten getesteten sekundären Pflanzeninhaltsstoffen werden antioxidative Eigenschaften zugeschrieben. Ob sie auch die Expression antioxidativer Enzyme beeinflussen und somit indirekt antioxidativ wirken, sollte getestet werden.

#### 4.3.1 Vitamin E wirkt nicht auf das Nrf2/Keap1-System

Von Interesse war, ob Vitamin E Nrf2 aktivieren und somit auch die Expression der GI-GPx stimulieren kann. Um dies zu untersuchen, wurden die Sequenz des responsiven Elements des Nrf2 (ARE) aus dem Promotor der Hämoxxygenase-1 (HO-ARE) und der GI-GPx (GI-ARE) sowie die Sequenz des GI-GPx-Promotors in ein Luciferase-Reportergenplasmid kloniert und dessen Aktivierung gemessen. Dazu wurden HepG2-Zellen mit pGL3-HO-ARE, pGL3-GI-ARE oder mit pGL3-GI-prom-I transient transfiziert und mit jeweils 50  $\mu$ M *RRR*- $\alpha$ - bzw. *all-rac*- $\alpha$ -Tocopherol,  $\gamma$ -Tocopherol,  $\alpha$ -Tocotrienol oder  $\gamma$ -Tocotrienol inkubiert. Keine der getesteten Vitamin E-Formen hatte einen signifikanten Einfluss auf die Aktivität des GI-GPx-Promotors (Abb. 29). Gleiches zeigte sich



auch bei der HO-ARE- bzw. GI-ARE-regulierten Luciferaseaktivität (Daten nicht abgebildet).

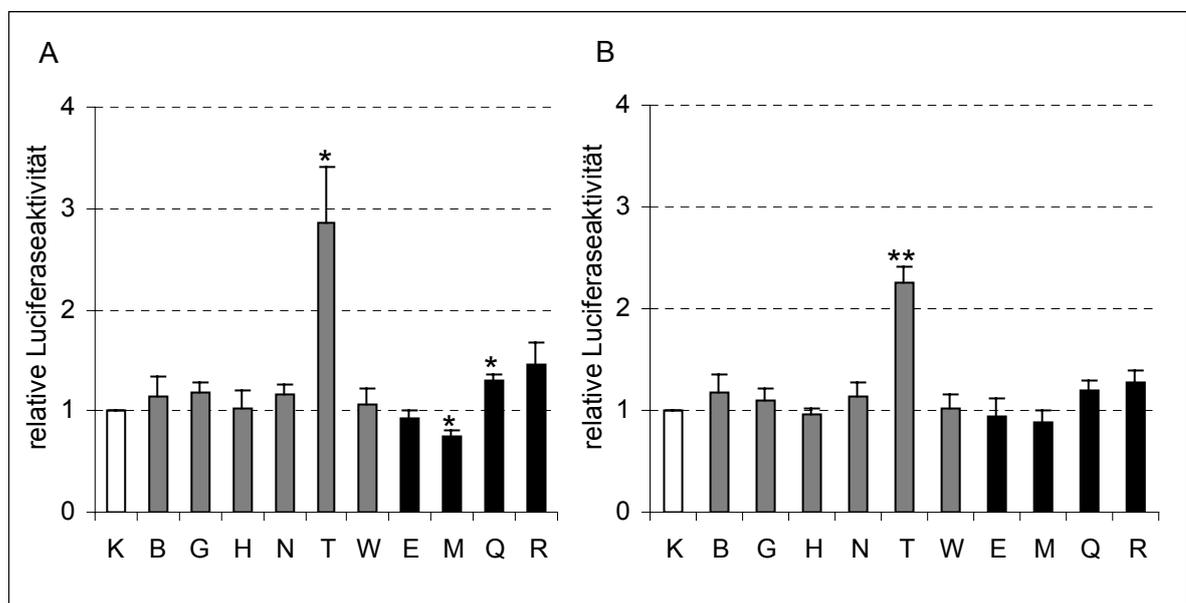
#### Abb. 29: Einfluss von Vitamin E auf die GI-GPx-Promotoraktivität

HepG2-Zellen wurden mit 0,15  $\mu$ g Reportergenkonstrukt pGL3-GI-prom-I transient transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit 50  $\mu$ M *RRR*- $\alpha$ -Tocopherol (*RRR*- $\alpha$ -Toc), *all-rac*- $\alpha$ -Tocopherol (*all-rac*- $\alpha$ -Toc),  $\gamma$ -Tocopherol ( $\gamma$ -Toc),  $\alpha$ -Tocotrienol ( $\alpha$ -T3) oder  $\gamma$ -Tocotrienol ( $\gamma$ -T3) für 24 h in Medium stimuliert. Nach Ernte und Lyse der Zellen wurde die relative Luciferaseaktivität bestimmt. Die unbehandelten Konstrukte (Ethanol; K, Kontrolle) wurden auf 1 normiert und alle anderen Werte dazu ins Verhältnis gesetzt (n = 2).

### 4.3.2 Einfluss von sekundären Pflanzeninhaltsstoffen auf das Nrf2/Keap1-System

#### 4.3.2.1 Aktivierung des „Antioxidant Response Elements“ (ARE)

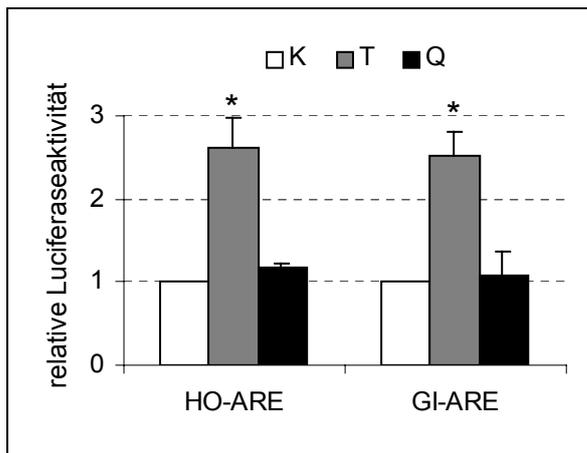
Um zu testen, ob die antioxidativen Substanzen und Pflanzenextrakte Nrf2 aktivieren können, wurden HepG2-Zellen transient mit dem pGL3-HO-ARE und dem pGL3-GI-ARE transfiziert und mit den Substanzen und Pflanzenextrakten für 24 h inkubiert. Eine Aktivierung des HO-ARE wurde durch Thymianextrakt, Quercetin und Resveratrol bewirkt (Abb. 30 A), die leicht vermindert auch beim GI-ARE noch messbar blieb (Abb. 30 B). Abgesehen von einer leichten Hemmung des HO-ARE durch Medox, beeinflussten alle anderen getesteten Substanzen und Pflanzenextrakte die Aktivierung des ARE nicht.



**Abb. 30: Aktivierung des HO- und GI-ARE in HepG2-Zellen**

Pflanzenextrakte (graue Balken) und Substanzen (schwarze Balken) wurden auf ihren Einfluss auf das ARE hin getestet. HepG2-Zellen wurden transient mit 0,15 µg Reportergenkonstrukten (A) pGL3-HO-ARE oder (B) pGL3-GI-ARE transfiziert. Als Kontrolle diente das leere Reportergenplasmid pGL3-promoter. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit 3 mg/ml Blaubeerextrakt (B), 3 mg/ml Gewürznelkenextrakt (G), 3 mg/ml Himbeerextrakt (H), 3 mg/ml Nelkenpfefferextrakt (N), 3 mg/ml Thymianextrakt (T), 3 mg/ml Walsnussextrakt (W), 25 µM EGCG (E), 50 µg/ml Medox (M), 25 µM Quercetin (Q) oder 25 µM Resveratrol (R) für 24 h in serumfreiem Medium stimuliert. Nach Ernte und Lyse der Zellen wurde die relative Luciferaseaktivität bestimmt. Die unbehandelten Konstrukte (DMSO; K, Kontrolle) wurden auf 1 normiert und alle anderen Werte dazu ins Verhältnis gesetzt. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  vs. Kontrolle (n = 3).

Um zu testen, ob die gemessene Aktivierung des HO-ARE und des GI-ARE auf die HepG2-Zellen beschränkt ist, wurde die Aktivierung in einem anderen Zellsystem getestet. Dazu wurden Transfektionen mit Caco-2-Zellen durchgeführt. Die Stimulation erfolgte mit 3 mg/ml Thymianextrakt und 25 µM Quercetin. Nur die in den HepG2-Zellen gemessene Aktivierung des HO-ARE und des GI-ARE durch Thymianextrakt konnte in den Caco-2-Zellen bestätigt werden (Abb. 31).



**Abb. 31: Aktivierung des HO- und GI-ARE in Caco-2-Zellen**

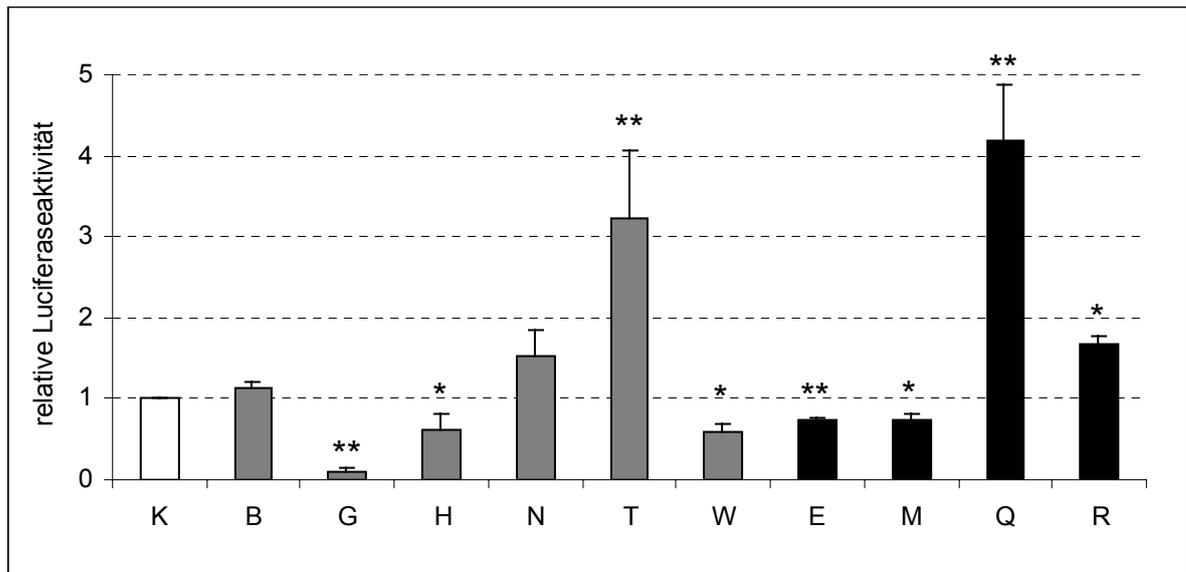
Caco-2-Zellen wurden transient mit 0,15 µg Reportergenkonstrukten pGL3-HO-ARE (HO-ARE) pGL3-GI-ARE (GI-ARE) transfiziert. Als Kontrolle diente das leere Reporterplasmid pGL3-promoter. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit 3 mg/ml Thymianextrakt (T) oder 25 µM Quercetin (Q) für 24 h in serumfreiem Medium stimuliert. Nach Ernte und Lyse der Zellen wurde die relative Luciferaseaktivität bestimmt. Die unbehandelten Konstrukte (DMSO; K, Kontrolle) wurden auf 1 normiert und alle anderen Werte dazu ins Verhältnis gesetzt. \* $p < 0,05$  vs. Kontrolle (n = 3).

Es konnte somit gezeigt werden, dass Thymianextrakt das HO-ARE und GI-ARE sowohl in HepG2- als auch in Caco-2-Zellen aktiviert. Quercetin und Resveratrol zeigten eine geringe Aktivierung des HO-ARE in HepG2-Zellen.

#### 4.3.2.2 Aktivierung des GI-GPx-Promotors

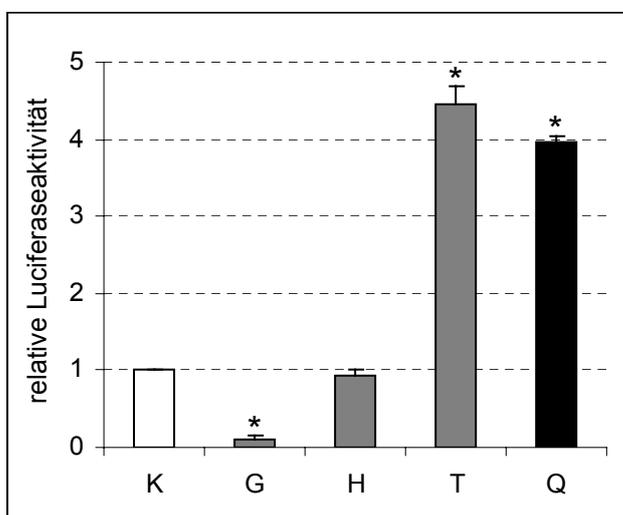
Um zu überprüfen, ob die antioxidativen Substanzen und Pflanzenextrakte einen Einfluss auf die Expression der GI-GPx haben, wurden HepG2-Zellen mit dem Luciferase-Reportergenkonstrukt, welches 2.111 bp des GI-GPx-Promotors enthielt (pGL3-GI-prom-I), transient transfiziert. Die Inkubation mit den zu testenden Substanzen und Pflanzenextrakten erfolgte für 24 h in serumfreiem Medium. Entsprechend der bereits gezeigten Aktivierung des GI-ARE (vgl. Abb. 30) konnten 3 mg/ml Thymianextrakt die Luciferaseaktivität um einen Faktor von 3,2 deutlich steigern. Auch 25 µM Resveratrol oder Quercetin steigerten die Luciferaseaktivität signifikant um Faktoren von 1,7 bzw. 4,2. EGCG, Medox und die Extrakte aus Gewürznelken, Himbeeren und Walnüssen senkten die Luciferaseaktivität des pGL3-GI-prom-I. Auffallend war hier die Hemmung der Aktivität auf einen Faktor von ca. 0,1 durch 3 mg/ml Gewürznelkenextrakt im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 32).

Zusätzlich zum pGL3-GI-prom-I mit 2.111 bp des GI-GPx-Promotors wurde ein sehr kurzes Promotorfragment mit 172 bp (pGL3-GI-prom-VI), welches aber noch die ARE-Sequenz enthält, getestet. Dazu wurden zwei Aktivatoren (Thymianextrakt und Quercetin) und zwei Hemmer (Gewürznelken- und Himbeerenextrakt) des pGL3-GI-prom-I verwendet. Während die Veränderung der relativen Luciferaseaktivität durch die Inkubation mit 3 mg/ml Thymianextrakt, 25 µM Quercetin und 3 mg/ml Gewürznelkenextrakt nahezu unverändert blieb, war eine hemmende Wirkung des Himbeerenextraktes wie beim pGL3-GI-prom-I nicht mehr zu beobachten (Abb. 33).



**Abb. 32: Einfluss auf die GI-GPx-Promotoraktivität**

Pflanzenextrakte (graue Balken) und Substanzen (schwarze Balken) wurden auf ihren Einfluss auf den GI-GPx-Promotor hin getestet. Dazu wurden HepG2-Zellen transient mit 0,15 µg Reporter-genkonstrukt pGL3-GI-prom-I transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit 3 mg/ml Blaubeerextrakt (B), 3 mg/ml Gewürznelkenextrakt (G), 3 mg/ml Himbeerextrakt (H), 3 mg/ml Nelkenpfefferextrakt (N), 3 mg/ml Thymianextrakt (T), 3 mg/ml Walnusseextrakt (W), 25 µM EGCG (E), 50 µg/ml Medox (M), 25 µM Quercetin (Q) oder 25 µM Resveratrol (R) für 24 h in serumfreiem Medium stimuliert. Nach Ernte und Lyse der Zellen wurde die relative Luciferaseaktivität bestimmt. Die unbehandelten Konstrukte (DMSO; K, Kontrolle) wurden auf 1 normiert und alle anderen Werte dazu ins Verhältnis gesetzt. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  vs. Kontrolle ( $n \geq 3$ ).

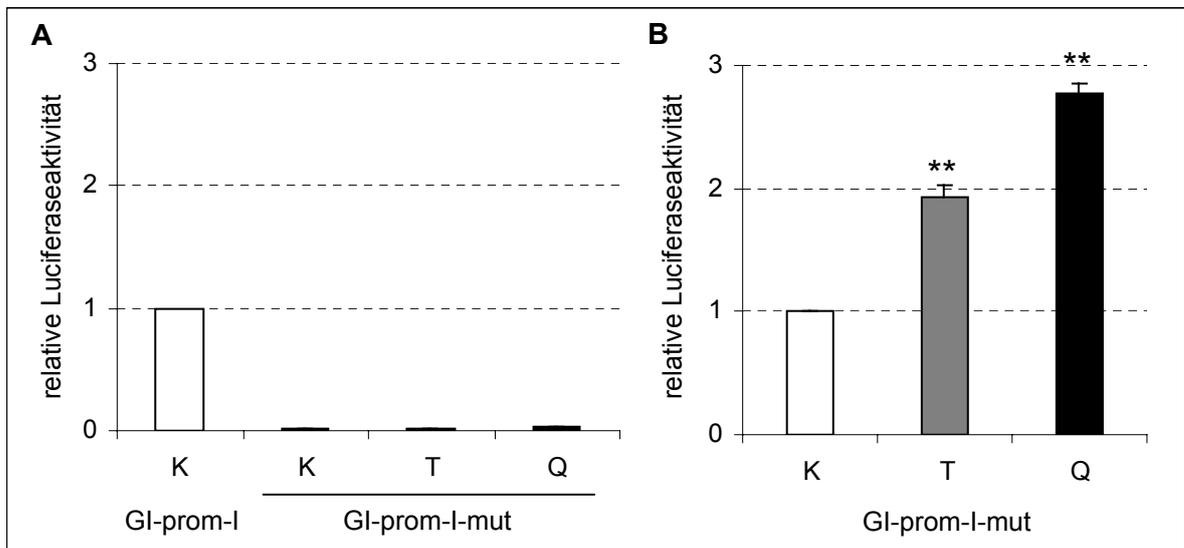


**Abb. 33: Einfluss auf die GI-GPx-Promotoraktivität**

HepG2-Zellen wurden mit 0,15 µg Reporter-genkonstrukt pGL3-GI-prom-VI transient transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit 3 mg/ml Gewürznelkenextrakt (G), 3 mg/ml Himbeerextrakt (H), 3 mg/ml Thymianextrakt (T) oder 25 µM Quercetin (Q) für 24 h in serumfreiem Medium stimuliert. Nach Ernte und Lyse der Zellen wurde die relative Luciferaseaktivität bestimmt. Die unbehandelten Konstrukte (DMSO; K, Kontrolle) wurden auf 1 normiert und alle anderen Werte dazu ins Verhältnis gesetzt. \* $p < 0,05$  vs. Kontrolle ( $n = 2$ ).

Um herauszufinden, ob die Aktivierung des GI-GPx-Promotors durch Thymianextrakt und Quercetin tatsächlich auf das ARE und somit auf die Aktivierung des Nrf2 zurückzuführen ist, wurde die ARE-Sequenz im pGL3-GI-prom-I mittels Mutagenese-PCR (siehe 3.4.7.1) mutiert. Die Mutation führte zum völligen Verlust der Luciferaseaktivität des Reporter-genkonstruktes. Betrachtet man den pGL3-GI-prom-I-mut allein, wird jedoch deutlich, dass 3 mg/ml Thymianextrakt und 25 µM Quercetin auch die Luciferaseaktivität unter

Regulation des pGL3-GI-prom-I-mut noch induzieren, auch wenn der Faktor der Induzierbarkeit geringer ist als beim pGL3-GI-prom-I (Abb. 34 B, Abb. 32).



**Abb. 34: Rolle der ARE-Sequenz bei der Aktivierung des GI-GPx-Promotors durch Thymianextrakt und Quercetin**

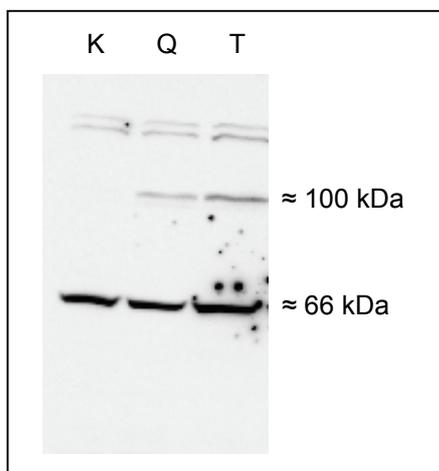
HepG2-Zellen wurden mit 0,15 µg Reportergenkonstrukt pGL3-GI-prom-I oder pGL3-GI-prom-I-mut transient transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit 3 mg/ml Thymianextrakt (T) oder 25 µM Quercetin (Q) für 24 h in serumfreiem Medium stimuliert. Nach Ernte und Lyse der Zellen wurde die relative Luciferaseaktivität bestimmt. (A) Der unbehandelte pGL3-GI-prom-I (DMSO; K, Kontrolle) wurde auf 1 normiert und alle anderen Werte dazu ins Verhältnis gesetzt. (B) Der unbehandelte pGL3-GI-prom-I-mut (DMSO; K, Kontrolle) wurde auf 1 normiert und die Werte der stimulierten Proben dazu ins Verhältnis gesetzt. \*\* $p < 0,01$  vs. Kontrolle ( $n = 2$ ).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass Thymianextrakt und sog. antioxidative Substanzen wie Quercetin und Resveratrol in der Lage sind, das ARE zu aktivieren. Diese Aktivierung spiegelt sich auch in einer Aktivierung des Promotors der GI-GPx als Zielgen von Nrf2 wider. Die starke Aktivierung des Promotors durch Quercetin im Gegensatz zu der doch relativ schwachen Aktivierung des GI-ARE und die Beeinflussung des Promotors durch Pflanzenextrakte und Substanzen, die das GI-ARE nicht aktivierten oder hemmten, sowie die nicht vollständig verloren gegangene Aktivierung des mutierten Promotorfragments durch Thymianextrakt und Quercetin weisen auf zusätzlich existierende regulierende Transkriptionsfaktoren für den GI-GPx-Promotor hin.

#### 4.3.2.3 Translokation von Nrf2 in den Kern

Nachdem gezeigt werden konnte, dass Thymianextrakt und Quercetin das ARE aktivieren können, wurde die nukleäre Translokation von Nrf2 getestet. Dazu wurden HepG2-Zellen für 4 h mit 25 µM Quercetin oder 3 mg/ml Thymianextrakt inkubiert. Anschließend wurden die Kernlysate der unbehandelten und behandelten Zellen auf das Vorhandensein von Nrf2 (66 kDa) untersucht. Für das Nrf2 wurde beschrieben, dass neben der eigentlich

zu erwartenden Protein-Bande bei 66 kDa zusätzlich eine weitere Bande bei ca. 100 kDa detektiert wird. Hier wird eine Komplexbildung zwischen Nrf2 und Aktin vermutet [186]. Aus Abb. 35 ist ersichtlich, dass nach Behandlung mit Quercetin und Thymianextrakt beide Protein-Banden vorhanden sind. Betrachtet man die Protein-Bande bei 66 kDa, scheint nur die Thymian-Behandlung zu einer erhöhten Nrf2-Menge im Kern zu führen. Dagegen war die Protein-Bande bei 100 kDa sowohl in den Kernen der mit Thymianextrakt als auch in den Kernen der mit Quercetin behandelten Zellen deutlich nachzuweisen, fehlte jedoch in den Kernen der unbehandelten Zellen.



**Abb. 35: Translokation von Nrf2 in den Kern**

HepG2-Zellen wurden für 4 h in serumfreiem Medium mit DMSO (K), 25 µM Quercetin (Q) oder 3 mg/ml Thymianextrakt (T) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen geerntet und Kernlysate gewonnen. Dargestellt ist ein repräsentativer Western Blot von drei unabhängigen Versuchen.

Es konnte gezeigt werden, dass eine Inkubation mit Quercetin und Thymianextrakt zu einer verstärkten nukleären Akkumulation von Nrf2 in HepG2-Zellen führt, was die Aktivierung des GI-GPx-Promotors erklären kann.

## 5 Diskussion

Zu Beginn dieser Arbeit war der Metabolismus der Vitamin E-Formen auch durch Forschungsergebnisse unserer Arbeitsgruppe nahezu aufgeklärt (Übersicht in [65]). Bei der Suche nach molekularen Wirkungen des Vitamin E stellt sich die Frage nach einer ausreichenden Bioverfügbarkeit der Vitamin E-Formen, die durch die Aufnahme in die Zelle und den Metabolismus bestimmt ist. Daher hatte die vorliegende Arbeit das Ziel, neben der transkriptionellen Regulation von Phase I- und Phase II-Enzymen des Fremdstoffmetabolismus durch Vitamin E und antioxidative sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe, auch die zelluläre Akkumulation und den Metabolismus von Vitamin E zu untersuchen.

### 5.1 Zelluläre Akkumulation und Metabolismus von Vitamin E

#### 5.1.1 Die zelluläre Akkumulation ist abhängig von der Vitamin E-Form

Vitamin E ist für Tiere und Menschen essentiell und besitzt eine bisher auf molekularer Ebene unbekannt Rolle bei der Reproduktion. Zusätzlich ist es an vielen zellulären regulativen Prozessen beteiligt und schützt Zellen vor der Schädigung durch Lipid-Peroxidation.  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Tocopherol sind die beiden Vitamin E-Formen, die vorrangig mit der Nahrung aufgenommen werden, wobei aufgrund unterschiedlicher Nahrungsgewohnheiten in der europäischen Ernährung  $\alpha$ -Tocopherol und in der US-amerikanischen Ernährung  $\gamma$ -Tocopherol die dominierende Form ist. Nach der Resorption über den Dünndarm gelangt das Vitamin E in den Blutkreislauf und über die Leber zu den Geweben und Organen. Die Leber spielt bei der Vitamin E-Versorgung der Gewebe und Organe eine zentrale Rolle (Übersicht in [27]).

Von allen Vitamin E-Formen besitzt  $\alpha$ -Tocopherol *in vivo* die höchste Bioaktivität [18]. Für die Bioaktivität einer Substanz ist seine Aufnahme in die Zelle von entscheidender Bedeutung. Obwohl diese im Zusammenhang mit den verschiedenen Vitamin E-Formen und humanen Leberzellen bisher kaum untersucht wurde, wird allgemein davon ausgegangen, dass während der Resorptionsvorgänge im Dünndarm und bei der Aufnahme in die Leber keine Unterscheidung zwischen den Vitamin E-Formen und Stereoisomeren stattfindet (illustriert in [29]). In dem hier benutzten Zellkulturmodell war die zelluläre Akkumulation der verschiedenen Vitamin E-Formen in HepG2-Zellen aber sehr unterschiedlich und erfolgte nach folgendem Muster:  $\gamma$ -Tocotrienol >  $\alpha$ -Tocotrienol >  $\gamma$ -Tocopherol > *all-rac*- $\alpha$ -Tocopherol = *RRR*- $\alpha$ -Tocopherol (Abb. 10). Bezogen auf den Vergleich zwi-

schen Tocopherol- und Tocotrienol-Aufnahme machten verschiedene Arbeitsgruppen in unterschiedlichen Zelltypen die gleichen Beobachtungen [187-189]. Neben der ungleichen Akkumulation von Tocopherolen und Tocotrienolen besteht auch in Abhängigkeit der Methylierung des Chromanrings ein Unterschied bei der zellulären Akkumulation. Die  $\gamma$ -Formen werden im Vergleich zu den entsprechenden  $\alpha$ -Formen schneller und in höheren Konzentrationen akkumuliert (Abb. 10). Dieses Ergebnis steht für  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Tocopherol im Widerspruch zu dem bisher einzigen bekannten analogen Vergleich in HepG2-Zellen, bei dem nach 24 h in Abhängigkeit von der angebotenen Konzentration teilweise sogar mehr  $\alpha$ - als  $\gamma$ -Tocopherol in den Zellen detektiert wurde [190]. In mehreren anderen Zelltypen wurde jedoch ebenfalls eine erhöhte zelluläre Akkumulation der  $\gamma$ -Form von Tocopherolen und/oder Tocotrienolen im Vergleich zur entsprechenden  $\alpha$ -Form beobachtet [188, 189, 191, 192]. Es bleibt aber offen, in wie weit dies auf die *in vivo*-Situation übertragen werden kann. Alle Nicht- $\alpha$ -Tocopherol-Formen erreichen außerhalb der Leber nur sehr geringe Konzentrationen, was in der Funktion des  $\alpha$ -TTP begründet liegt.

Die zelluläre Akkumulation der Vitamin E-Formen ist mindestens durch die Parameter Aufnahme, Metabolismus und Ausscheidung beeinflusst. Die Aufnahme des Vitamin E erfolgt nach dem bisherigen Kenntnisstand über den LDL-Rezeptor und über den SR-B1-Rezeptor (Übersicht in [34]). Es ist bekannt, dass  $\alpha$ -Tocopherol beide Rezeptoren gegensätzlich beeinflusst. Während  $\alpha$ -Tocopherol im Gegensatz zu  $\gamma$ -Tocopherol *in vitro* die Proteinexpression und Aktivität des LDL-Rezeptors steigert [190], hemmt es *in vitro* und *in vivo* die Proteinexpression des SR-B1-Rezeptors [193, 194]. Eine Hemmung der PKC $\alpha$  führt ebenfalls zur Reduzierung der Expression des SR-B1-Rezeptors [194]. Dies lässt den Schluss zu, dass die Hemmung des SR-B1-Rezeptors durch  $\alpha$ -Tocopherol über die  $\alpha$ -Tocopherol-induzierte Hemmung der PKC $\alpha$  [78, 79] erfolgt. Bisher wurde der Einfluss von Vitamin E auf die PKC $\alpha$  nur für zwei Vitamin E-Formen ( $\alpha$ - und  $\beta$ -Tocopherol) untersucht. Da aber  $\beta$ -Tocopherol nur einen sehr geringen bis gar keinen Einfluss auf die PKC $\alpha$  hatte [78, 79], kann auch von einem spezifischen und nicht für alle Vitamin E-Formen gültigen Effekt des  $\alpha$ -Tocopherols auf den SR-B1-Rezeptor ausgegangen werden. Die auch für HepG2-Zellen gezeigte Beeinflussung des SR-B1-Rezeptors durch  $\alpha$ -Tocopherol [194] erklärt so möglicherweise den unterschiedlichen zellulären Gehalt der verschiedenen Vitamin E-Formen. Die Ergebnisse nach Abb. 10 lassen vermuten, dass die angebotene  $\alpha$ -Tocopherol-Konzentration die zelluläre Aufnahme aller Vitamin E-Formen reguliert. Wird  $\alpha$ -Tocopherol angeboten, kommt es durch eine gehemmte Expression des SR-B1-Rezeptors zu einer verringerten Aufnahme des  $\alpha$ -Tocopherols. Bei Abwesenheit von  $\alpha$ -Tocopherol kommt es zu einer Steigerung der Expression des SR-B1-Rezeptors [194] und so zu einer verstärkten Aufnahme aller Nicht- $\alpha$ -Tocopherol-Formen.

Diese Annahme würde jedoch voraussetzen, dass keine Aufnahme über den LDL-Rezeptor erfolgt. Eine durch  $\alpha$ -Tocopherol erhöhte und durch  $\gamma$ -Tocopherol reduzierte LDL-Rezeptoraktivität [190] widerspricht der beobachteten Zellakkumulation von  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Tocopherol. Geht man jedoch davon aus, dass die Aufnahme der Vitamin E-Formen in die HepG2-Zellen auch über den LDL-Rezeptor erfolgt, wäre eine analoge Hochregulation des LDL-Rezeptors durch Tocotrienole - vergleichbar zur der beobachteten Hochregulation durch ungesättigte Fettsäuren [195] - eine Erklärung für die vermehrte Aufnahme von Tocotrienolen im Vergleich zu Tocopherolen. Letztendlich bleibt unklar, ob die unterschiedliche zelluläre Akkumulation der verschiedenen Vitamin E-Formen durch eine unterschiedliche Zellaufnahme hervorgerufen wird oder intrazelluläre Prozesse diese begründen.

### ***Rolle des $\alpha$ -Tocopherol-Transfer-Proteins ( $\alpha$ -TTP)***

Die Ausscheidung des Vitamin E aus der Leber erfolgt selektiv zugunsten des  $\alpha$ -Tocopherols über das  $\alpha$ -TTP (Übersicht in [29]). Dabei ist jedoch die Funktionsweise des  $\alpha$ -TTP noch nicht vollständig aufgeklärt. Grundsätzlich wird angenommen, dass das  $\alpha$ -TTP den zellulären Gehalt von  $\alpha$ -Tocopherol reguliert, indem es das  $\alpha$ -Tocopherol aus der Zelle herausschafft. Dem widerspricht die Beobachtung, dass  $\alpha$ -TTP<sup>-/-</sup>-Mäuse bei gleicher Fütterung weniger  $\alpha$ -Tocopherol in der Leber aufweisen, als  $\alpha$ -TTP<sup>+/+</sup>-Mäuse [196]. Hier wird postuliert, dass das  $\alpha$ -TTP dem metabolisierenden System das  $\alpha$ -Tocopherol entzieht und es so vor dem Abbau schützt. Gleiches wird für Menschen mit einem  $\alpha$ -TTP-Defekt (AVED-Patienten) postuliert, die im Vergleich zu gesunden Menschen eine höhere  $\alpha$ -CEHC-Ausscheidung aufweisen [197].  $\alpha$ -TTP überexprimierende Zellen müssten demnach einen veränderten zellulären  $\alpha$ -Tocopherol-Gehalt aufweisen, als entsprechende Wildtyp-Zellen, die im Fall der verwendeten HepG2-Zellen kaum  $\alpha$ -TTP exprimieren. Auf alle anderen Vitamin E-Formen dürfte sich die Überexprimierung entsprechend den Affinitäten des  $\alpha$ -TTP ( $\alpha$ -Tocopherol 100 %,  $\gamma$ -Tocopherol 8,9 %,  $\alpha$ -Tocotrienol 12,4 %,  $\gamma$ -Tocotrienol unbekannt) kaum auswirken [41]. Ein Einfluss des  $\alpha$ -TTP auf die zelluläre Akkumulation der Vitamin E-Formen war zu erwarten, ließ sich aber mit den erzielten Ergebnissen nicht bestätigen (Abb. 13). Die  $\alpha$ -TTP-Überexpression hatte wenig Einfluss auf die zelluläre Akkumulation vom  $\alpha$ -Tocopherol, vielmehr ließ es den Zellgehalt von  $\gamma$ -Tocopherol sowie von  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Tocotrienol geringfügig sinken. Dies ist möglicherweise auf einen  $\alpha$ -TTP bedingten vermehrten Metabolismus dieser Formen zurückzuführen. Dies konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Lediglich auf CMBHC-Ebene kam es bei  $\alpha$ -TTP-überexprimierenden Zellen zu einem geringen, aber nicht signifikanten Anstieg der Metaboliten-Konzentration im Vergleich zu den Wildtypzellen (Daten nicht gezeigt). Letzt-

lich bleibt das zelluläre Akkumulationsmuster (Tocotrienole > Tocopherole und  $\gamma$ -Form >  $\alpha$ -Form) durch die Überexpression von  $\alpha$ -TTP unbeeinflusst. Auch wenn es denkbar ist, dass das  $\alpha$ -TTP über die Steuerung der Ausscheidung oder den Schutz vor Metabolismus den zellulären Gehalt von  $\alpha$ -Tocopherol in beide Richtungen beeinflussen könnte, bleibt auch nach den Ergebnissen dieser Arbeit ein konkreter Nachweis dafür offen.

### **Vergleich zur *in vivo*-Situation**

Es gibt nur wenige *in vivo*-Studien, die gleichzeitig verschiedene Vitamin E-Formen untersucht haben. Versuche mit Ratten, denen  $\alpha$ - und/oder  $\gamma$ -Tocopherol gefüttert wurde, haben jedoch gezeigt, dass entgegen den in dieser Arbeit ermittelten *in vitro*-Daten stets  $\alpha$ -Tocopherol die dominierende Form in der Leber war [198]. Enthielt das Futter 30 mg/kg  $\alpha$ -Tocopherol, so lag der Lebergehalt an  $\alpha$ -Tocopherol bei 33,6 nM/g Leber<sup>1</sup>, während bei einem Futter mit gleicher Konzentration an  $\gamma$ -Tocopherol der Lebergehalt an  $\gamma$ -Tocopherol nur bei 4,0 nM/g Leber lag. Selbst wenn das Futter fünf mal mehr  $\gamma$ - als  $\alpha$ -Tocopherol enthielt (150 mg/kg Futter  $\gamma$ -Tocopherol, 30 mg/kg Futter  $\alpha$ -Tocopherol), lag der Lebergehalt von  $\gamma$ -Tocopherol bei nur 10,0 nM/g Leber im Vergleich zum  $\alpha$ -Tocopherol-Gehalt von 43,5 nM/g Leber. Ähnliches konnte auch in anderen Versuchen mit Ratten und Mäusen gezeigt werden, auch wenn hier die Konzentrationen der im Futter enthaltenen Vitamin E-Formen nicht immer gleich waren.  $\alpha$ -Tocopherol war ebenfalls im Vergleich zu allen anderen Tocopherolen oder Tocotrienolen in der Leber die vorherrschende Vitamin E-Form [199-201]. Auch wenn hierfür keine Erklärung gegeben wird, lässt es sich möglicherweise über den bereits diskutierten Einfluss des  $\alpha$ -Tocopherols auf den LDL-Rezeptor erklären [190]. Bei verschiedenen Versuchen fiel auf, dass die gleichzeitige Gabe von  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Tocopherol *in vitro* [192] und *in vivo* [198] zu einem höheren  $\alpha$ -Tocopherol-Lebergehalt geführt hat, als wenn  $\alpha$ -Tocopherol in der gleichen Konzentration alleine gegeben wurde. Dies ist ein Hinweis darauf, dass  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Tocopherol *in vivo* bezüglich der Aufnahme in die Leber nicht konkurrieren. Gleichzeitig wurde für diese Beobachtung die Hypothese aufgestellt, dass  $\gamma$ -Tocopherol möglicherweise  $\alpha$ -Tocopherol vor Metabolismus und Oxidation schützt. Die Daten einer aktuellen humanen *in vivo*-Studie bekräftigen diese Hypothese nur zum Teil. Hier lag die urinäre  $\alpha$ -CEHC-Ausscheidung nach  $\gamma$ -Tocopherol-Supplementation zu den verschiedenen Messpunkten sowohl unter, aber auch teilweise über der  $\alpha$ -CEHC-Ausscheidung ohne  $\gamma$ -Tocopherol-Supplementation [202].

Da es sich bei den *in vivo*-Leberkonzentrationen um Ergebnisse aus Tierversuchen handelt und vergleichbare humane Studien nicht zur Verfügung stehen, bleibt offen, in wie

---

<sup>1</sup> Konzentrationsangabe entsprechend [198]

weit die in dieser Arbeit *in vitro* beobachtete unterschiedliche zelluläre Akkumulation der Vitamin E-Formen mit der *in vivo*-Situation im Menschen vergleichbar ist bzw. ob die Daten der Tierversuche ohne weiteres auf den Menschen übertragbar sind. Auch wenn die Ursache für die ungleiche zelluläre Akkumulation der verschiedenen Vitamin E-Formen hier nicht geklärt werden konnte, muss sie aber bei der Interpretation von physiologischen Effekten durch verschiedene Vitamin E-Formen insbesondere bei *in vitro*-Versuchen Berücksichtigung finden.

### 5.1.2 Verschiedene Vitamin E-Formen werden unterschiedlich stark metabolisiert

Der Abbauweg der Tocopherole und Tocotrienole über die Verkürzung der Seitenketten wurde oft postuliert und ist inzwischen durch den Nachweis aller Zwischenprodukte und Metabolite weitgehend akzeptiert. Noch keine absolute Klarheit besteht über das Enzym, welches die erforderliche initiale  $\omega$ -Hydroxylierung katalysiert. Aus Hemmungs- und Induktionsversuchen gibt es sowohl Hinweise auf das CYP3A4 als auch auf das CYP4F2 (Übersicht in [65]).

Im Rahmen dieser Arbeit sollte geklärt werden, ob der Metabolismus der Vitamin E-Formen für deren unterschiedliche zelluläre Akkumulation in humanen Leberzellen (Abb. 10) verantwortlich ist. Ist die Annahme weiter berechtigt, dass es vor dem Wirken des  $\alpha$ -TTP keine Diskriminierung zwischen den Vitamin E-Formen gibt, dann müssten die Formen mit geringer Zellkonzentration einen höheren Metabolismus aufweisen. Im hier getesteten Zellsystem war die Metabolisierungsrate der Vitamin E-Formen zwar unterschiedlich, aber dem zellulären Akkumulationsmuster annähernd proportional:  $\gamma$ -Tocotrienol >  $\alpha$ -Tocotrienol >  $\gamma$ -Tocotrienol > *all-rac*- $\alpha$ -Tocopherol  $\geq$  *RRR*- $\alpha$ -Tocopherol (Abb. 11/12). Gleiches wurde zwischenzeitlich in einer Prostata-Krebs-Zelllinie [203] und ebenfalls in HepG2-Zellen [204] gezeigt. Die unterschiedliche Metabolismusrate kann daher nicht Ursache der unterschiedlichen zellulären Konzentrationen der Vitamin E-Formen sein. Der Vergleich von zellulärer Akkumulation (Abb. 10) und Metabolismusrate (Abb. 11/12) lässt eher vermuten, dass die Metabolismusrate der entsprechenden Vitamin E-Formen der Höhe ihrer zellulären Konzentrationen direkt proportional ist. Wie auch bei der zellulären Akkumulation gibt es einen Unterschied zwischen  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Formen. Dass die Tocopherole, die eine Methylgruppe an Position 5 des Chromanrings tragen ( $\alpha$ - und  $\beta$ -Tocopherol), weitaus weniger metabolisiert werden als die ohne entsprechende Methylgruppe ( $\gamma$ - und  $\delta$ -Tocopherol), konnte auch schon durch Birringer *et al.* [59] gezeigt werden. Unterschiede in der chemischen Struktur, wie die Anzahl und Stellung der Substituenten am Chromanring, als auch die Stereochemie der Seitenkette beeinflussen möglicherweise die Affinitäten der abbauenden Enzyme für die einzelnen Vitamin E-Formen

und erklären somit deren unterschiedliche Metabolisierungsrate. Auch ist es denkbar, dass die  $\omega$ -Hydroxylierung der Vitamin E-Formen durch unterschiedliche Enzyme katalysiert wird. Der Vergleich der CEHC- (Abb. 11) mit der CMBHC-Freisetzung (Abb. 12) der Vitamin E-Formen macht auch deutlich, dass es bei der  $\beta$ -Oxidation vom CMBHC zum CEHC bei den  $\alpha$ -Formen im Vergleich zu den  $\gamma$ -Formen einen limitierenden Faktor geben muss. Während der CEHC/CMBHC-Quotient beim  $\gamma$ -Tocopherol im Mittelwert bei 1,2 und beim  $\gamma$ -Tocotrienol bei 0,5 liegt, sinkt dieser Quotient bei den  $\alpha$ -Tocopherolen auf 0,3 und beim  $\alpha$ -Tocotrienol auf unter 0,1. Das bedeutet, dass bei den  $\alpha$ -Formen im Vergleich zu den entsprechenden  $\gamma$ -Formen ca. 4 – 5 mal weniger CEHC aus CMBHC gebildet wird.

Geht man davon aus, dass das CYP3A4 die Schlüsselrolle beim Metabolismus der Vitamin E-Formen spielt, könnte die hohe Metabolismusrate, zumindest für die Tocotrienole, in der Aktivierung des PXR und damit in der Induktion des abbauenden Enzyms durch die Vitamin E-Formen [92, 181] begründet sein. Auch wenn bei den für die Metabolismus-Versuche eingesetzten Konzentrationen in HepG2-Zellen, im Gegensatz zu den Caco-2-Zellen, kaum toxische Effekte zu verzeichnen waren (Abb. 14/15), kann ein erhöhter Metabolismus auch in toxischen Eigenschaften einiger Vitamin E-Formen begründet sein.

### **Vergleich zur *in vivo*-Situation**

Humane Studien haben gezeigt, dass auch *in vivo* ein ungleicher Abbau der Vitamin E-Formen erfolgt. Während etwa 50 % der oral aufgenommenen Menge von  $\gamma$ -Tocopherol zum entsprechenden CEHC verstoffwechselt und als solches mit dem Urin ausgeschieden wird [205], sind es vom  $\alpha$ -Tocopherol nur ca. 1 – 3 % [197]. Tocotrienole werden ebenfalls nur wenig verstoffwechselt. Im Gegensatz zu der hohen Verstoffwechslung in den HepG2-Zellen (Abb. 11/12) werden *in vivo* lediglich 1 – 2 % des verabreichten  $\alpha$ -Tocotrienols und 4 – 6 % des verabreichten  $\gamma$ -Tocotrienols als  $\alpha$ - bzw.  $\gamma$ -CEHC über den Urin ausgeschieden [56]. Vergleichbar zu den *in vitro*-Ergebnissen werden auch *in vivo* die  $\gamma$ -Formen stärker als die  $\alpha$ -Formen metabolisiert. Auch die *in vivo* beobachtete 3 – 4 mal stärkere Metabolisierung der synthetischen  $\alpha$ -Tocopherol-Form im Vergleich zur natürlichen Form [206] zeigt sich aus den vorliegenden Ergebnissen in HepG2-Zellen nicht. Vollständige Studien, die auch die längerkettigen Vorstufen des CEHC berücksichtigen, wurden allerdings bislang nicht beschrieben und könnten eine vielleicht eine ganz andere Situation widerspiegeln. Der starke Abbau des  $\gamma$ -Tocopherols zu  $\gamma$ -CEHC ist von besonderem Interesse, da das  $\gamma$ -CEHC bisher der einzige Vitamin E-Metabolit ist, dem eine physiologische Aktivität direkt nachgewiesen wurde. Neben einer natriuretischen Wirkung [53] hemmt es auch die Aktivität der COX-2 [191]. Allerdings wurden solche Effekte bisher bei Menschen mit hohem  $\gamma$ -Tocopherol-Verzehr nicht beobachtet.

## 5.2 Regulation von Phase I- und Phase II-Enzymen durch antioxidative Nahrungsinhaltsstoffe

Die Phase I- und Phase II-Enzyme sind die Enzyme der Biotransformation, die eine Aktivierung (Giftung), eine Inaktivierung (Entgiftung) oder eine Verbesserung der Ausscheidungsfähigkeit von endogenen und exogenen Substanzen bewirkt (siehe 1.3). Die durch Phase I- und Phase II-Enzyme katalysierten Umbauprozesse dieser Substanzen beeinflussen deren Wirkungsumfang und -dauer und spielen aus pharmakokinetischen Gesichtspunkten eine entscheidende Rolle. Während Phase II-Enzyme meist entgiftend und protektiv wirken, können Phase I-Enzyme die Ursache der Giftung (Biotoxifikation) sein. Daher gelten allgemein die Hemmung von Phase I-Enzymen und die Induktion von Phase II-Enzymen als Hauptmechanismen der Chemoprävention gegen Mutagene und Karzinogene.

### 5.2.1 Regulation durch Vitamin E

#### ***Einfluss von Vitamin E auf die Phase I-Enzyme CYP3A4 und Cyp3a11***

Das CYP3A4 kann durch Xenobiotika, d.h. durch seine eigenen Substrate induziert werden. Auch Vitamin E aktivierte in HepG2-Zellen den Promotor des CYP3A4 (Abb. 17/18), wobei sich  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Tocotrienol effektiver als *RRR*- $\alpha$ - und  $\delta$ -Tocopherol erwiesen. Ob dies in der unterschiedlichen Struktur der Seitenkette oder in der höheren zellulären Akkumulation der Tocotrienole (Abb. 10) begründet liegt, lässt sich hier nicht abschließend beurteilen. Keinen Einfluss auf den CYP3A4-Promotor hatten *all-rac*- $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Tocopherol. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass der PXR bei der transkriptionellen Regulation des CYP3A4 die Schlüsselrolle einnimmt und durch eine große Anzahl von Fremdstoffen, wie z.B. Rifampicin, aktivierbar ist (Übersicht in [126]). Rifampicin wurde daher als Referenzsubstanz verwendet. Ein endogener Ligand des PXR konnte bisher nicht eindeutig identifiziert werden, obwohl Gallensäuren und deren Vorstufen mögliche Kandidaten zu sein scheinen [207, 208]. Auch wenn bereits transkriptionelle Aktivierungen des CYP3A4 über den GR (NR3C1, engl. *glucocorticoid receptor*) und den CAR (NR113, engl. *constitutive androstane receptor*) beschrieben wurden (Übersicht in [209]), liegt es trotzdem nahe, dass die hier gezeigte Vitamin E-vermittelte Aktivierung über den PXR erfolgte. Dafür spricht, dass die Aktivierung des CYP3A4-Promotors durch die Vitamin E-Formen

- (I) mit der in unserer Arbeitsgruppe beobachteten PXR-Aktivierung durch Vitamin E-Formen [92] weitgehend korreliert,
- (II) dem Aktivierungsmuster des starken PXR-Aktivators Rifampicin entspricht, denn wie beim Rifampicin war auch durch die Vitamin E-Formen nur das

längste Promotorkonstrukt aktivierbar (pGL3-CYP3A4-9, vgl. 4.2.1.1), das nach Goodwin *et al.* [133] für die Rifampicin-vermittelte maximale transkriptionelle Aktivierung des CYP3A4 essentielle distale Enhancer-Element (XREM, vgl. Abb. 6) enthält, und

- (III) eine direkte Bindung von Vitamin E-Formen an den PXR bereits durch unsere Arbeitsgruppe [210] und durch Zhou *et al.* [181] gezeigt werden konnte, obgleich diese Bindung keinen Einfluss auf die DNA-Bindung des PXR an sein responsives Element hat (Abb. 20).

Die Induktion der CYP3A4 mRNA durch  $\gamma$ -Tocotrienol bestätigt die Aktivierung des CYP3A4-Promotors durch Vitamin E (Abb. 19). Im Tierversuch kam es ebenfalls zu einer Vitamin E-vermittelten Induktion des Cyp3a11, dem murinen Homolog zum humanen CYP3A4 [211]. Mit steigenden Konzentrationen von  $\alpha$ -Tocopherylacteat im Futter der Tiere, stieg in der Leber zusammen mit der Konzentration von  $\alpha$ -Tocopherol (Tab. 9) auch die Expression der Cyp3a11 mRNA (Abb. 22). Die Cyp3a11 mRNA-Expression lag in den normal- und überflussversorgten Gruppen ca. 2,5-fach höher als in der mangelversorgten Gruppe (Abb. 22 A) und korrelierte direkt mit der  $\alpha$ -Tocopherol-Konzentration in der Leber (Abb. 22 B). Dass die  $\alpha$ -Tocopherol-Konzentration in der Leber für die Expression der Cyp3a11 mRNA tatsächlich verantwortlich ist, wird zusätzlich daran deutlich, dass Tiere, die über einen längeren Zeitraum mit der Überflussdiät versorgt wurden, neben einer nochmaligen Erhöhung der  $\alpha$ -Tocopherol-Konzentration in der Leber auch eine nochmalige Erhöhung der Cyp3a11 mRNA aufwiesen (Tab. 9/Abb. 22 A). Der Einfluss von  $\alpha$ -Tocopherol auf die Expression von Cyp3a-Enzymen konnte zwischenzeitlich von einer anderen Arbeitsgruppe bestätigt werden. In der Leber von Mäusen stieg die Cyp3a-Proteinmenge in Abhängigkeit vom  $\alpha$ -Tocopherol-Gehalt [212].

Entgegen den Erwartungen aus den *in vitro*-Daten hatte die zusätzliche Gabe von  $\gamma$ -Tocotrienol keinen Einfluss auf die Expression der Cyp3a11 mRNA. Die  $\alpha$ -Tocopherol-induzierte Expression der Cyp3a11 mRNA blieb durch  $\gamma$ -Tocotrienol nahezu unbeeinflusst (Abb. 23). Dies kann mehrere Gründe haben. Neben einer zu kurzen Fütterungsphase ist eine spezie-spezifische Aktivierung des PXR denkbar. Eine unterschiedliche Aktivierung des PXR von Mensch, Kaninchen, Maus und Ratte durch verschiedene Substanzen wurde bereits gezeigt [213], aber für  $\gamma$ -Tocotrienol bisher nicht getestet. Auch eine geringe Bioverfügbarkeit des  $\gamma$ -Tocotrienols ist wahrscheinlich. Die urinäre  $\gamma$ -CEHC-Ausscheidung der Mäuse lag ca. 40-fach höher als die  $\alpha$ -CEHC-Ausscheidung [214], was für einen schnellen Abbau des  $\gamma$ -Tocotrienols spricht. Diese in den Mäusen beobachtete extreme Verstoffwechslung des  $\gamma$ -Tocotrienols bis zum  $\gamma$ -CEHC stellt im Vergleich zur *in vivo*-Situation des Menschen, bei dem  $\gamma$ -Tocotrienol nur geringfügig mehr verstoffwechselt wird

als  $\alpha$ -Tocopherol [56, 197], einen Unterschied zwischen Maus und Mensch dar. Letztlich ist auch eine nicht über den PXR vermittelte Expression der Cyp3a11 mRNA denkbar, denn in PXR<sup>-/-</sup>-Mäusen konnte die Expression der Cyp3a11 mRNA gezeigt und durch Phenobarbital (sowohl PXR- als auch CAR-Aktivator) induziert werden [215, 216].

Es bleibt jedoch festzuhalten, dass Vitamin E *in vitro* und *in vivo* die Expression des Phase I-Enzyms CYP3A4 bzw. Cyp3a11 induziert.

### **Folgen einer Induktion des CYP3A4 durch Vitamin E**

Die Übertragung der Ergebnisse dieser Arbeit auf die *in vivo*-Situation des Menschen liegt nahe, bleibt aber offen. Wenn die Ergebnisse übertragen werden können, müssen sie als Indiz für eine zu erwartende Interaktion zwischen Vitamin E und dem Fremdstoffmetabolismus bzw. Arzneimittelstoffwechsel gewertet werden, da die Cytochrome 3A4 und 3A5 als klinisch bedeutsamste Phase I-Enzyme etwa die Hälfte aller gegenwärtig eingesetzten Medikamente verstoffwechseln [120]. Aus der Tatsache, dass viele Medikamente durch das CYP3A4 metabolisiert werden, ergeben sich ein beträchtliches Interaktionspotential und kinetische Konsequenzen für Arzneimittel. Die Induktion der CYP3A4 Expression ist die Ursache vieler Arzneimittelwechselwirkungen. Das bedeutet, dass nicht ausgeschlossen werden kann, dass Arzneimittel durch Vitamin E schneller abgebaut werden und ihre Wirkung dadurch verändert wird. Als Beispiel für einen vergleichbaren Fall soll hier die durch Johanniskraut (lat. *Hypericum perforatum*) verursachte Interaktion mit Arzneimitteln aufgezeigt werden. Rezeptfrei erhältliche Johanniskraut-Präparate, die als pflanzliche Antidepressiva eingesetzt werden, induzieren über den Wirkstoff Hyperforin die Expression von CYP3A4 [217-219] und verursachen so Arzneimittelinteraktionen mit CYP3A4-Substraten. So kann es durch die Einnahme von Johanniskraut-Präparaten *in vivo* z.B. zu einem beschleunigten Metabolismus und damit verbundenen gesenkten Plasmaspiegeln von oralen Kontrazeptiva, dem Immunsuppressivum Cyclosporin, den HIV-Medikamenten Indinavir und Nevirapine, dem Kardiakum Digoxin und dem Antidepressivum Sertraline kommen (Übersicht in [220]). Eine bisher wenig untersuchte, aber vermutlich ebenfalls wichtige Rolle, scheint in diesem Zusammenhang auch das P-Glykoprotein zu spielen, welches als Transport- und Barriereprotein fungiert, ebenfalls über den PXR reguliert wird [221, 222] und sowohl durch Johanniskraut [217] als auch durch Vitamin E [181] in seiner Expression beeinflusst wird. Die nicht auszuschließende Wirkung von Vitamin E auf den Arzneimittelstoffwechsel und der daraus resultierenden Beeinflussung der Wirksamkeit von Medikamenten, ist gerade im Zusammenhang mit einer umstrittenen Meta-Analyse [223], nach der Vitamin E in hohen Dosierungen von mehr als 400 IU/d die Sterblichkeit erhöhen soll, zu sehen. Die den meisten klinischen Studien zugrundeliegenden Daten werden in der Regel an bereits chronisch erkrankten Patienten

erhoben, die medikamentös behandelt werden. Die Gabe von hohen Dosen Vitamin E an chronisch kranke Personen muss somit unter Berücksichtigung der Ergebnisse dieser Arbeit kritisch reflektiert werden. Auch die häufig propagierte Supplementierung von gesunden Menschen bleibt fragwürdig, da die Dosierung der meisten Vitamin E-Präparate weit über dem natürlichen Bedarf liegt. Die DGE (Deutsche Gesellschaft für Ernährung e.V.) beziffert ihn auf 12 mg  $\alpha$ -Tocopherol-Äquivalente ( $\approx 18$  IU) für Frauen und 14 mg  $\alpha$ -Tocopherol-Äquivalente ( $\approx 21$  IU) für Männer. Diese Menge kann über normale Lebensmittel im Rahmen einer gesunden und abwechslungsreichen Ernährung aufgenommen werden.

Neben der Arzneimittelinteraktion ist eine weitere Wirkung des Vitamin E durch die Induktion des CYP3A4 möglich. Einige Substanzen werden in einer nicht-aktiven Form aufgenommen und erst durch Phase I-Enzyme in die eigentliche oftmals karziogene Wirkform übertragen (Übersicht in [114]). Die für das CYP3A4 bekannteste Giftungsreaktion ist die CYP3A4-abhängige Epoxidierung des extrem starken Karzinogens Aflatoxin B<sub>1</sub> (Toxin des Schimmelpilzes, lat. *Aspergillus flavus*) [224, 225]. Die reaktionsfähigen Epoxide des Aflatoxin B<sub>1</sub> gehen mit der DNA kovalente Bindungen ein, führen zu DNA-Schädigungen und sind so neben chronischer Hepatitis oder Alkohol ein weiterer Auslöser für das Leberzellkarzinom, einer der häufigsten malignen Tumore in Afrika, aber mit zunehmender Inzidenz auch in den westlichen Ländern [226].

Die Induktion des CYP3A4 durch Vitamin E hat auch Auswirkungen auf seinen eigenen Metabolismus. Birringer *et al.* [59] zeigten, dass HepG2-Zellen nach Inkubation mit Rifampicin  $\alpha$ -Tocopherol stärker verstoffwechseln und postulierten einen CYP3A4-abhängigen Metabolismus von  $\alpha$ -Tocopherol. Es kommt häufig vor, dass Substrate von Cytochromen P450 gleichzeitig auch Induktoren derselben Cytochrome sind. Vitamin E würde so durch die Induktion des CYP3A4 auf seinen eigenen Metabolismus Einfluss nehmen. Auch bisher nicht veröffentlichte Daten aus unserer Arbeitsgruppe, die zeigen, dass  $\gamma$ -Tocotrienol zu einer verringerten Metabolisierung von  $\alpha$ -Tocopherol führt, unterstützen diese Annahme, obgleich aufgrund der Induktion des CYP3A4 durch  $\gamma$ -Tocotrienol (Abb. 19) eher ein verstärkter Metabolismus erwartet wurde. Berücksichtigt man aber die in dieser Arbeit ebenfalls gezeigte Induktion der  $\alpha$ -TTP mRNA durch  $\gamma$ -Tocotrienol (Abb. 25) lässt sich der verringerte Metabolismus des  $\alpha$ -Tocopherol durch den  $\alpha$ -TTP-vermittelten Schutz vor Metabolismus möglicherweise nunmehr erklären.

#### **“cross-talk” CAR and PXR**

Cytochrome der Subfamilie 3A können sowohl durch den Kernrezeptor PXR als auch durch den Kernrezeptor CAR transkriptionell aktiviert werden (Übersicht in [118]). In PXR<sup>-/-</sup>-Mäusen wurde die Expression der Cyp3a11 mRNA durch Phenobarbital induziert

[215, 216]. Dies legt die Vermutung nahe, dass die transkriptionelle Aktivierung über den CAR erfolgte. CAR und PXR gehören zur selben Kernrezeptorfamilie (NR11; [124]) und ähneln sich zu etwa 45 % in ihrer Ligandenbindungsdomäne. Viele PXR-Liganden sind daher auch CAR-Liganden. Beide Rezeptoren sind in der Lage, Gene über dieselben responsiven Elemente zu regulieren, was einen „cross-talk“ in der Transkription nahe legt. Daher muss von funktionellen Überkreuzungen der PXR- und CAR-Mechanismen ausgegangen werden (Übersicht [116-118, 125, 126, 227]).

Auch wenn bisher nur eine direkte Interaktion zwischen Vitamin E und dem PXR gezeigt wurde [92, 181], ist eine Aktivierung des CAR durch Vitamin E nicht auszuschließen. Auch die in dieser Arbeit *in vivo* gezeigte Expressionssteigerung der Cyp3a11 mRNA könnte somit sowohl in einer Aktivierung des PXR als auch des CAR begründet liegen.

### ***Einfluss auf Phase II-Enzyme durch Vitamin E***

Ein Einfluss von Vitamin E auf das Nrf2/Keap1-System, das für die Expression der meisten Phase II-Enzyme verantwortlich ist, konnte nicht gezeigt werden (siehe 4.3.1), obgleich Hinweise auf einen derartigen Einfluss vorliegen. Masaki *et al.* [90] beschrieb eine Induktion der  $\gamma$ -GCS durch  $\alpha$ -Tocopherol. Die  $\gamma$ -GCS wird über den Nrf2/Keap1-Weg aktiviert [184]. Unabhängig davon bleibt ein Einfluss von Vitamin E auf Phase II-Enzyme über die Aktivierung des PXR denkbar, denn unter den PXR-regulierten Genen befinden sich neben Cytochromen P450 z.B. auch die UDP-Glukuronosyl- und Sulfo-Transferasen als klassische Phase II-Enzyme [228, 229].

## **5.2.2 Regulation durch sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe**

Die in dieser Arbeit getesteten sekundären Pflanzeninhaltsstoffe gehören zu den Polyphenolen (EGCG, Medox, Quercetin, Curcumin und Resveratrol) und Isothiocyanaten (Sulforaphan). Zusätzlich wurden Extrakte von Pflanzen (Blaubeere, Himbeere, Walnuss, Thymian, Gewürznelke und Nelkenpfeffer) verwendet, deren Inhaltsstoffe *in vitro* eine zum Teil sehr hohe antioxidative Kapazität aufweisen [230].

### **5.2.2.1 Einfluss auf PXR und CYP3A4**

#### ***... durch Polyphenole***

Die Untersuchungen hinsichtlich des Einflusses von Polyphenolen auf den PXR ergaben ein unterschiedliches Wirkungsverhalten. Der Einfluss reichte von einer Hemmung bis zur einer Induktion der PXR-Aktivität (Abb. 26). Während Curcumin und Resveratrol den PXR aktivierten, hemmten Medox und das Flavonoid Quercetin dessen Aktivität. EGCG zeigte keinen Effekt. Der direkte Einfluss der hier verwendeten Polyphenolen auf

den PXR ist bisher kaum untersucht worden. Lediglich für Quercetin und Resveratrol (jeweils 10  $\mu\text{M}$ ) wurde eine Aktivierung des PXR beschrieben [219, 231]. Eine Aktivierung durch Quercetin konnte in dieser Arbeit nicht gezeigt werden. Im Gegenteil, 25  $\mu\text{M}$  Quercetin hemmten sogar die PXR-Aktivität. Das kann am abweichenden *in vitro*-Modell liegen, aber auch am speziell für Quercetin bereits beschriebenen biphasischen Effekt [232, 233]. Z.B. aktivierten 5 und 10  $\mu\text{M}$  Quercetin den P-Glykoprotein-vermittelten Efflux von [ $^3\text{H}$ ]-Vincristin (Zytostatikum), 25 und 50  $\mu\text{M}$  Quercetin hingegen hemmten den Efflux [232]. Da es sich beim P-Glykoprotein um ein PXR-Zielgen handelt [221], liegt ein biphasischer Effekt von Quercetin bei der PXR-Aktivierung nahe und würde die hier beobachtete Hemmung des PXR durch 25  $\mu\text{M}$  Quercetin im Vergleich zu der bereits beschriebenen Aktivierung durch 10  $\mu\text{M}$  Quercetin erklären. Ein Vergleich von 97 Studien zur Bioverfügbarkeit von Polyphenolen [99] hat gezeigt, dass die Plasmakonzentration von Quercetin kaum über 1  $\mu\text{mol/l}$  steigt, so dass eine Hemmung des PXR außerhalb von Darm und Leber vermutlich keine physiologische Rolle spielen wird. Die Aktivierung des PXR ist charakteristisch für Fremdstoffe und so ist seine Aktivierung durch Curcumin- und Resveratrol neben einer möglichen physiologischen Funktion auch als Indiz dafür zu sehen, dass Curcumin und Resveratrol in den verwendeten Konzentrationen als Fremdstoffe erkannt und verstoffwechselt werden. Die PXR-vermittelte Aktivierung der Transkription von CYP3A4 durch Curcumin konnte zwischenzeitlich ebenfalls in HepG2-Zellen durch eine chinesische Arbeitsgruppe bestätigt werden [234].

Häufig werden für Flavonoide eher hemmende Wirkungen auf die Expression von Phase I-Enzymen beschrieben. So wird z.B. auch die Hemmung des CYP3A4 durch Grapefruitsaft u.a. den im Saft enthaltenen Flavonoiden zugeschrieben (Übersicht in [235]). Während die PXR-Aktivierung durch die getesteten Polyphenole unterschiedlich war, war die Aktivierung des Promotors des CYP3A4 als Zielgen des PXR gleich. Alle Polyphenole aktivierten den CYP3A4-Promotor (Abb. 27). Da auch die Polyphenole, die den PXR nicht aktiviert oder sogar gehemmt haben, eine Aktivierung des CYP3A4-Promotors erzeugten, ist es denkbar, dass die Aktivierung in diesem Fall nicht durch den PXR, sondern aus der Aktivierung eines anderen Transkriptionsfaktors resultiert. Neben dem PXR spielen bei der CYP3A4 Aktivierung auch der GR (NR3C1) und der CAR (NR1I3) eine Rolle (Übersicht in [118]).

### **... durch das Isothiocyanat Sulforaphan**

In der Pflanzenfamilie Brassicaceae weit verbreitet sind Isothiocyanate in glycosidischer Form (Glucosinolate). Schwefelhaltige Glucosinolate dienen den Pflanzen hauptsächlich als Fraßschutz, denn bei einer Verletzung der Zellen katalysiert das Enzym Myrosinase die Bildung des geschmacksintensiven Sulforaphans (1-Isothiocyanato-4-

Methylsulfinylbutan) aus der nicht reaktiven Vorstufe Methylsulfinylbutylglucosinolat (Glucoraphanin). Das Isothiocyanat Sulforaphan wird vor allem wegen der Modulation von Phase II-Enzymen über das Nrf2/Keap1-System als antikanzerogen eingestuft [138, 236]. Neben der bekannten Nrf2-Aktivierung verursachte Sulforaphan im Rahmen der Untersuchungen dieser Arbeit in HepG2-Zellen eine Aktivierung des PXR und des CYP3A4-Promotors (Abb. 26/27). Ein solcher Effekt von Sulforaphan wurde bisher nicht beschrieben. Während Mahéo *et al.* [237] in humanen Hepatozyten eine Hemmung der mRNA-Expression des CYP3A4 und eine Hemmung der Oxidation von Nifedipin (CYP3A4-Substrat) durch Sulforaphan beschrieben hat, konnten Paolini *et al.* [238] in Ratten eine gesteigerte Aktivität des CYP3A1, dem Homolog zum humanen CYP3A4 [211], durch Glucoraphanin, der biologischen Vorstufe des Sulforaphans, zeigen. Die Wirkungen des Sulforaphans scheinen daher zell- und/oder speziesspezifisch zu sein. Über die verantwortlichen Mechanismen für eine Hemmung oder Induktion von Phase I-Enzymen durch Sulforaphan ist bisher nichts bekannt. Die hier gezeigte Beeinflussung des PXR durch Sulforaphan gibt eine erste mögliche Erklärung.

### **... durch Pflanzenextrakte**

Von den getesteten Pflanzenextrakten konnten die Extrakte aus Gewürznelken und Thymian den PXR aktivieren (Abb. 26). Obwohl bereits eine Aktivierung des PXR durch Lignane beschrieben wurde [231], zeigten die hier getesteten Lignan-haltigen Beerenextrakte (Himbeer- und Blaubeerextrakt) keine Wirkung auf den PXR. Auch das in Walnüssen vorhandene Vitamin E zeigte keinen Effekt, was vermutlich auf die geringe Konzentration zurückgeführt werden kann.

Während sich die Aktivierung des PXR durch Thymianextrakt auch auf die Aktivierung des CYP3A4-Promotors übertrug, blieb diese beim Gewürznelkenextrakt aus (Abb. 28). Dem entgegen aktivierten Extrakte aus Nelkenpfeffer, Blaubeere, Himbeere und Walnuss trotz fehlender PXR-Aktivierung den CYP3A4-Promotor (Abb. 28). Hier wird ähnlich wie bei den Polyphenolen deutlich, dass ein Einfluss auf den CYP3A4-Promotor nicht zwingend eine PXR-Aktivierung voraussetzt. Insbesondere die Aktivierung der Promotorfragmente, die das für eine PXR-vermittelte Aktivierung des CYP3A4-Promotors essentielle XREM nicht mehr enthalten (vgl. Abb. 16 in Verbindung mit Abb. 28), macht eine zumindest zum Teil PXR-unabhängige Aktivierung des CYP3A4-Promotors wahrscheinlich. Das zeigte sich insbesondere beim Nelkenpfefferextrakt, der keine PXR-Aktivierung, aber eine deutliche Aktivierung des CYP3A4-Promotors in allen Promotorkonstrukten verursachte (Abb. 28). Die für die beobachtete Aktivierung verantwortlichen Bestandteile der Extrakte lassen sich nur durch eine Extraktion von reinen Inhaltsstoffen ermitteln. Kobayashi *et al.* [239] isolierten aus Nelkenpfeffer- und Thymianextrakten die aktiven Be-

standteile. Für Nelkenpfeffer war es das Pimentol und für Thymian waren es Rosmarinsäure und Luteolin-7-O- $\beta$ -glukosid. Ob diese sekundären Pflanzeninhaltsstoffe tatsächlich für die starke Aktivierung des CYP3A4-Promotors verantwortlich sind, konnte in dieser Arbeit nicht mehr geklärt werden und bleibt zu testen.

Letztendlich hat die Aktivierung des PXR bzw. die Aktivierung des CYP3A4 durch die getesteten sekundären Pflanzeninhaltsstoffe und Pflanzenextrakte die gleichen Auswirkungen, wie die bereits unter Punkt 5.2.1 beschriebenen möglichen Folgen einer Induktion des CYP3A4 durch Vitamin E und ist somit insbesondere in Bezug auf mögliche Wechselwirkungen mit Arzneimitteln zu beachten.

### 5.2.2.2 Einfluss auf das Nrf2/Keap1-System und den GI-GPx-Promotor

#### ... durch Polyphenole

Der Einfluss verschiedener Polyphenole auf Nrf2 wurde mit Hilfe von in Luciferase-Reportergenplasmide klonierten ARE-Sequenzen aus dem Promoter der Hämoxigenase-1 (HO-ARE), einem Enzym, das als Prototyp der Nrf2-regulierten Enzyme gilt, und der gastrointestinalen Glutathionperoxidase (GI-ARE) getestet. Die Sequenz des HO- bzw. GI-ARE stimmt mit der veröffentlichten ARE-Konsensussequenz [240] überein. Das ARE ist ein Enhancer-Element, welches sich im Promoter vieler antioxidativ wirkender und detoxifizierender Phase II-Enzyme befindet. Die transkriptionelle Regulation der Gene mit einem ARE erfolgt über Nrf2 [140]. *In vivo*-Modelle mit Nrf2<sup>-/-</sup>-Mäusen bestätigen die essentielle Rolle des Nrf2 bei der Expression vieler Phase II-Enzyme [241, 242].

Die getesteten Polyphenole Quercetin und Resveratrol zeigten einen geringen aktivierenden und Medox einen geringen hemmenden Einfluss auf die Aktivität des HO-ARE (Abb. 30 A). Dies lässt eine grundsätzliche Aktivierung bzw. Hemmung des Nrf2/Keap1-Systems vermuten, da diese Einflüsse beim GI-ARE ebenfalls messbar waren (Abb. 30 B). Die für das Quercetin untersuchte nukleäre Translokation des Nrf2 bestätigt diese Annahme (Abb. 35). Myhrstad *et al.* [111] postulierten ebenfalls eine Aktivierung des Nrf2/Keap1-Systems durch Quercetin, nachdem sie zeigen konnten, dass Quercetin konzentrationsabhängig die Promotoraktivität der katalytischen Untereinheit der  $\gamma$ -GCS als Nrf2-Zielgen aktiviert. Auch die Induktion der mRNA-Expression der NQO1 durch Quercetin bestätigt diesen Einfluss auf die Nrf2-Aktivierung [112]. Die beobachtete Aktivierung des Nrf2/Keap1-Systems durch Quercetin ist über mehrere Wege denkbar. Bei alkalischen oder physiologischen pH-Werten kommt es zu einer nicht-enzymatischen Oxidation des Quercetins (illustriert in [243]). Da oxidiertes Quercetin bevorzugt mit Thiolen reagiert [244], kann es direkt das Keap1 modifizieren oder aber auch durch die Reaktion mit dem zellulären Glutathion den Redoxstatus der Zelle in Richtung oxidierten Zustand lenken. Über eine dadurch erhöhte Thiolreaktivität in der Zelle kommt auch eine indirekte Wirkung

des Quercetins auf das Keap1 in Betracht. Die direkte oder indirekte Modifizierung der Thiolgruppen des Keap1 würde eine Aktivierung des Nrf2 zur Folge haben. Unabhängig von dieser denkbaren Modifikation des Keap1 sind zwei weitere Wege der Nrf2-Aktivierung durch Quercetin nicht auszuschließen. (I) Nachdem der Einfluss von Quercetin auf Proteinkinasen, die auch an der Nrf2-Aktivierung beteiligt sind, gezeigt wurde, ist auch dieser Weg der Aktivierung denkbar [245]. (II) Da es sich beim Keap1 um ein Zink-Metalloprotein handelt [141], ist auch ein Einfluss von vielen Flavonoiden über ihre Eigenschaft als Metallchelatoren nicht ausgeschlossen.

Zur Untersuchung, ob sich die gezeigte Beeinflussung des Nrf2/Keap1-System durch die getesteten Polyphenole auch auf ein Zielgen des Nrf2 übertragen lässt, wurde die Wirkung der Polyphenole auf den GI-GPx-Promotor untersucht. Nachdem die GI-GPx als ein Zielgen des Nrf2 identifiziert wurde [153], reiht sie sich möglicherweise als antioxidatives Enzym in die Gruppe von Enzymen ein, denen anti-karzinogene Eigenschaften zugeschrieben werden. Kenntnisse über ihre Beeinflussung sind daher von besonderem Interesse. Diese Annahme einer anti-karzinogenen Eigenschaft der GI-GPx wird durch eine kürzlich erschienene Publikation von Esworthy *et al.* [246] untermauert. Hier konnte in doppel-ko-Mäusen (cGPx und GI-GPx) gezeigt werden, dass die GI-GPx vor einer das Krebsrisiko erhöhenden Colitis schützt. Die für das HO- und GI-ARE gezeigte Aktivierung des Nrf2 durch Quercetin und Resveratrol bzw. dessen Hemmung durch Medox (Abb. 30 A) spiegelt sich beim Einfluss der Polyphenole auf den GI-GPx-Promotor wider (Abb. 32). Während die Aktivierung des GI-GPx-Promotors durch Resveratrol (Faktor 1,7) etwa dem Niveau der HO-ARE- (Faktor 1,5) bzw. GI-ARE-Aktivierung (Faktor 1,3) entsprach, lag die Aktivierung des GI-GPx-Promotors durch Quercetin mit einem Faktor von 4,2 deutlich über der Aktivierung des HO- bzw. GI-ARE mit Faktoren von 1,3 bzw. 1,2. Das lässt für das Quercetin einen anderen Mechanismus der Aktivierung des GI-GPx-Promotors vermuten. Diese Vermutung wird dadurch bekräftigt, dass der GI-GPx-Promotor trotz mutierter GI-ARE-Sequenz noch durch Quercetin aktivierbar war (Abb. 34 B). Obwohl das GI-ARE essentiell für die basale Aktivität des GI-GPx-Promotors ist (Abb. 34 A, [153]), wird durch diese Ergebnisse deutlich, dass die GI-GPx auch durch andere Transkriptionsfaktoren in ihrer Expression beeinflusst wird. Ein solcher Transkriptionsfaktor muss seine DNA-Bindungsstelle in den ersten 172 bp des Promotors haben, da die Quercetin-vermittelte Aktivierung des GI-GPx-Promotors hier noch vollständig vorhanden war (Abb. 33). Nachdem eine Überexpression des AP-1-Proteins c-Jun durch Quercetin [247] gezeigt wurde und unter Berücksichtigung, dass das mutierte ARE immer noch eine AP-1-Bindestelle darstellt, ist eine Aktivierung des GI-GPx-Promotor durch Quercetin über c-Jun denkbar. c-Jun formt mit verwandten Proteinen (JunD, JunB) Homodimere oder mit verschiedenen Mitgliedern der Fos-Familie Heterodimere und bildet so den AP-1

Transkriptionsfaktorkomplex, der den GI-GPx-Promotor aktivieren könnte. AP-1 spielt eine zentrale Rolle bei der Kontrolle von Zellwachstum und fungiert als positiver oder negativer Regulator der Apoptose (Übersicht in [4]).

Der Einfluss von Polyphenolen, insbesondere von Quercetin, auf die transkriptionelle Regulation von Genen ist nicht unbekannt [110]. Die Hemmung der Promotoraktivität der COX-2 durch Quercetin und Resveratrol [248] ist im Zusammenhang mit der in dieser Arbeit gezeigten Aktivierung des Nrf2/Keap1-Systems und des GI-GPx-Promotors durch eben diese Substanzen von besonderem Interesse. Bei der Hemmung der COX-2-Promotoraktivität wird eine strukturabhängige Beeinflussung der Promotoraktivität in Betracht gezogen. Alle durch Mutoh *et al.* [248] untersuchten COX-2-Promotor-hemmenden Substanzen besitzen Resorcinol-ähnliche Strukturelemente (Resorcinol = m-Dihydroxybenzol) und somit Metallchelator-Eigenschaften, was im Fall der Aktivierung des Nrf2/Keap1-Systems einen Einfluss über das Zink-Metalloprotein Keap1 wahrscheinlich macht. Obwohl EGCG ebenfalls ein Resorcinol-ähnliches Strukturelement enthält, hemmte es weder den COX-2-Promotor [248] noch aktiviert es den GI-GPx-Promotor. Eine Resorcinol-ähnliche Struktur allein kann für die beobachteten Effekte somit nicht verantwortlich sein. Betrachtet man die Arbeit von Mutoh *et al.* [248] im Zusammenhang mit den Ergebnissen aus dieser Arbeit wird die durch unsere Arbeitsgruppe postulierte Annahme einer direkten gegenläufigen Regulation von COX-2 und GI-GPx [249] weiter bekräftigt, da die gleichen Substanzen den COX-2-Promotor hemmen und gleichzeitig den GI-GPx-Promotor aktivieren.

### **... durch Pflanzenextrakte**

Von den sechs getesteten Pflanzenextrakten verursachte der Thymianextrakt eine sehr starke Aktivierung des HO- und GI-ARE sowohl in HepG2-Zellen als auch in Caco-2-Zellen (Abb. 30/31). Da sich dieser Einfluss mit gleicher Intensität beim GI-GPx-Promotor und nur noch abgeschwächt beim GI-GPx-Promotor mit mutierter ARE-Sequenz zeigte (Abb. 32/33), ist eine direkte Nrf2-Aktivierung durch Substanzen im Thymian sehr wahrscheinlich. Dies wird durch die Translokation von Nrf2 in den Kern der mit Thymianextrakt behandelten HepG2-Zellen bestätigt (Abb. 35).

Obwohl das GI-ARE von allen Pflanzenextrakten nur durch den Thymianextrakt aktiviert wurde, zeigten sich auf der Ebene des GI-GPx-Promotor auch deutliche regulatorische Effekte durch andere Pflanzenextrakte. So hemmten die Extrakte aus Himbeeren, Walnüssen und Gewürznelken die GI-GPx-Promotoraktivität, während zusätzlich zum Thymianextrakt auch der Extrakt aus Nelkenpfeffer eine Aktivitätssteigerung des Promotors hervorrief (Abb. 32). Vergleicht man den Einfluss der Extrakte auf das Nrf2/Keap1-System und den GI-GPx-Promotor wird erneut deutlich, dass der GI-GPx-Promotor nicht

nur durch Nrf2 beeinflusst wird. Ein drastischer Effekt ist die nahezu vollständige Hemmung der GI-GPx-Promotoraktivität durch den Gewürznelkenextrakt. Den beiden aktiven Wirkstoffen der Gewürznelke (Eugenol und Isoeugenol) werden anti-inflammatorische Wirkungen über die Hemmung des NF- $\kappa$ B zugeschrieben (Übersicht in [250]). Da sich im GI-GPx-Promotor nur wenige Basenpaare vom ARE entfernt auch eine NF- $\kappa$ B-Bindestelle befindet und der Gewürznelkenextrakt auch im kurzen Promotorfragment (172 bp) seine hemmende Wirkung zeigte (Abb. 33), ist es durchaus denkbar, dass bei der Regulation der GI-GPx-Promotoraktivität auch NF- $\kappa$ B eine Rolle spielt.

Letztlich können die Einflüsse von Extrakten nur schwer analysiert werden, da sie eine Vielzahl von bekannten oder unbekanntem sekundären Pflanzeninhaltsstoffen enthalten, die alle für die beobachteten Effekte verantwortlich sein können. Gleichzeitig bringt dies jedoch den Vorteil, dass weitaus stärkere Effekte zu erwarten sind als mit isolierten Substanzen. Hinzu kommt, dass Pflanzenextrakte die reale Ernährungssituation und somit die Auswirkung der Ernährung auf molekulare Prozesse besser widerspiegeln als einzelne Testsubstanzen. Häufig ist gerade die Kombination von verschiedenen Pflanzeninhaltsstoffen Voraussetzung für eine physiologische Wirkung.

### **Folgen einer Aktivierung von Nrf2 und Phase II-Enzymen**

Eine Aktivierung des Nrf2/Keap1-Systems lässt eine große Spannbreite von physiologischen Wirkungen erwarten, da eine große Anzahl von Genen als Nrf2-Zielgene identifiziert wurden [151, 152]. Hinzu kommt, dass den Nrf2-aktivierenden Substanzen häufig chemopräventive Eigenschaften zugeschrieben werden [138]. Epidemiologische Studien die das Krebsrisiko mit der Einnahme von *Brassicaceae* (z.B. Brokkoli, Rosen- oder Weißkohl) korrelieren, zeigen eine direkte Korrelation zwischen dem Verzehr von *Brassicaceae* und einem gesenkten Risiko für verschiedene Krebserkrankungen (Übersicht in [251]). Hierfür wird allgemein das in *Brassicaceae* vorkommende Glucoraphanin und sein Hydrolyseprodukt Sulforaphan, als Nrf2-aktivierende Substanz, verantwortlich gemacht. *In vivo*-Modelle mit Nrf2<sup>-/-</sup>-Mäusen bestätigen die essentielle Rolle des Nrf2 bei der Verhinderung einer Tumorbildung [241, 242]. Somit wird deutlich, dass Substanzen oder Pflanzenextrakten, die Nrf2 aktivieren, durchaus gesundheitsfördernde Eigenschaften zugeschrieben werden können.

## **5.3 Genregulation durch Nahrungsinhaltsstoffe - „Nutrigenomics“**

Lange Zeit waren die Forschungsbereiche Ernährung und Molekularbiologie klar voneinander getrennt, doch immer mehr nachgewiesene direkte Interaktionen zwischen Nahrungsinhaltsstoffen und genregulatorischen Prozessen lassen diese Bereiche mehr

zusammen und in den Focus der Forschung rücken. Das völlig neue Forschungsfeld „Nutrigenomics“ ist entstanden. Die Europäische Kommission hat erst kürzlich die *European NutriGenomics Organization* (NuGO) eingerichtet, die die Forschung auf diesem Gebiet koordinieren soll. Die Liste der bioaktiven Bestandteile der Ernährung, die häufig über eine Genregulation in viele zelluläre Mechanismen (z.B. Zelldifferenzierung, Zellwachstum, DNA-Reparatur und -Methylierung, Fremdstoffmetabolismus) eingreifen, wird immer umfangreicher. Zu ihnen gehören u.a. Vitamine, Mineralien und viele sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe, wie Isothiocyanate und Polyphenole. Verschiedene Transkriptionsfaktoren stellen einen sog. „*nutrient sensor*“ da. Insbesondere die zur Familie der nukleären Hormonrezeptoren gehörenden Rezeptoren (z.B. PXR, VDR, PPAR, RAR) binden Mikronährstoffe und ihre Metabolite. Den bioaktiven Mikronährstoffen und anderen Nahrungsinhaltsstoffen kommt immer mehr eine Schlüsselrolle bei der Entwicklung bzw. Verhinderung von chronischen Krankheiten zu (Übersicht in [252]).

### ***Antioxidanzien, Genregulation und „adaptive response“***

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass auch Mikronährstoffe und sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe, denen bisher hauptsächlich rein antioxidative Funktionen zugeschrieben wurden, über die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren genregulatorische Eigenschaften besitzen und z.B. Phase I- und Phase II-Enzyme in ihrer transkriptionellen Regulation beeinflussen. Eine Vielzahl von Genen oder zellulären Signalwegen ist bekannt, die über Veränderungen des zellulären Redoxstatus beeinflusst sind (umfassende Übersicht in [253]). Die genregulatorischen Effekte von Antioxidanzien werden in der Regel zu Unrecht allein durch das Wegfangen von schädigenden Radikalen (ROS/RNS) erklärt, denn die molekularen Mechanismen der redoxabhängigen Regulation von Transkriptionsfaktoren ist noch nicht vollständig verstanden. In den meisten Fällen wird von einer Oxidation oder Reduktion von Proteinthiolen ausgegangen, in dessen Folge DNA-Bindeaktivitäten, Komplexbildungen oder -auflösungen gesteuert werden (Übersicht in [253]). Da nicht alle redox-sensitiven zellulären Signalwege durch jedes Antioxidanz beeinflusst werden, kann daher das Redoxpotential von Antioxidanzien nur teilweise für genregulatorische Effekte verantwortlich gemacht werden. Konzentrationsabhängige Induktionen von verschiedenen Genen durch sog. Antioxidanzien sind vielmehr ein Indiz dafür, dass es sich um spezifische physiologische Wirkungen handelt.

Die hier gezeigten Ergebnisse lassen die Wirkung von Antioxidanzien als reine Radikalfänger, wie sie vor allem noch heute häufig für das Vitamin E suggeriert werden, in den Hintergrund rücken. Die mit Vitamin E und anderen antioxidativen Nahrungsinhaltsstoffen in Verbindung gebrachten protektiven Wirkungen lassen sich vielmehr über die Induktion zelleigener Schutzsysteme, einschließlich der Phase I- und Phase II-Enzyme, erklären



## 6 Zusammenfassung

Immer mehr Interaktionen zwischen Nahrungsinhaltsstoffen und genregulatorischen Prozessen werden gegenwärtig publiziert. Dies gilt auch für Nahrungsinhaltsstoffe, die als reine Antioxidanzien klassifiziert werden. Dazu zählen neben verschiedenen sekundären Pflanzeninhaltsstoffen insbesondere auch das Vitamin E.

Vitamin E ist ein Sammelbegriff für lipophile Verbindungen, dessen Grundgerüst ein an Position 6 hydroxylierter Chromanring mit Seitenkette bildet. In Abhängigkeit von der Methylierung des Chromanrings werden jeweils eine  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - oder  $\delta$ -Form und in Abhängigkeit vom Sättigungsgrad der Seitenkette Tocopherole (gesättigte Seitenkette) und Tocotrienole (dreifach ungesättigte Seitenkette) unterschieden. Zahlreiche *in vivo*-Studien machen deutlich, dass von allen Vitamin E-Formen das natürliche  $\alpha$ -Tocopherol (*RRR*- $\alpha$ -Tocopherol) die höchste biologische Aktivität besitzt und die dominierende Form im Plasma und extrahepatischem Gewebe ist. Im ersten Teil dieser Arbeit wurde die zelluläre Akkumulation der verschiedenen Vitamin E-Formen in HepG2-Zellen untersucht. Von allen getesteten Vitamin E-Formen wurden die geringsten zellulären Konzentrationen beim  $\alpha$ -Tocopherol gemessen. Beim Vergleich von Tocopherolen und Tocotrienolen (jeweils  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Form) ergab sich folgendes zelluläres Akkumulationsmuster: Tocotrienole > Tocopherole und  $\gamma$ -Form >  $\alpha$ -Form. Die ebenfalls untersuchte Metabolisierungsrate weist ein ähnliches Muster auf. Das Ausmaß der Metabolisierung entspricht somit der zellulären Konzentration der verschiedenen Vitamin E-Formen. Die getesteten Tocotrienole werden deutlich schneller als die Tocopherole und die  $\gamma$ -Formen schneller als die  $\alpha$ -Formen verstoffwechselt. Die Methylierung des Chromanrings der verschiedenen Vitamin E-Formen und deren Sättigungsgrad der Seitenkette scheinen somit eine wesentliche Rolle bei der zellulären Akkumulation und beim Metabolismus zu spielen. Auch wenn die Gründe der unterschiedlichen zellulären Akkumulation, die neben dem Metabolismus auch in einer unterschiedlichen zellulären Aufnahme bzw. - gerade im Fall des  $\alpha$ -Tocopherols in einer verstärkten - Abgabe der Vitamin E-Formen begründet sein kann, nicht abschließend geklärt werden konnten, bleibt diese Beobachtung zur Interpretation von unterschiedlichen physiologischen Effekten der Vitamin E-Formen von Bedeutung.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden Untersuchungen zur transkriptionellen Regulation von Phase I- und Phase II-Enzymen durchgeführt. Dabei wurde der Einfluss von Vitamin E, sekundären Pflanzeninhaltsstoffen und verschiedenen Pflanzenextrakten auf die Aktivierung des PXR und Nrf2 als wichtige Transkriptionsfaktoren der Phase I- und Phase II-Enzyme mittels Reportergerananalysen untersucht. Des Weiteren wurde jeweils der Promotor eines Zielgens des PXR und des Nrf2 auf dessen Aktivierbarkeit getestet. Dabei

stellte sich heraus, dass es sowohl zu Aktivierungen als auch zu Hemmungen der Transkriptionsfaktoren kam, was direkte genregulatorische Effekte der getesteten Substanzen mit unterschiedlichen Konsequenzen erwarten lässt (Übersicht in Tab. 11). Während eine Aktivierung von PXR bzw. Induktion von CYP3A4 in Bezug auf mögliche Arzneimittelwechselwirkungen eher negative Folgen hat, ist eine Aktivierung von Nrf2 bzw. Induktion von GI-GPx in Bezug auf mögliche anti-karzinogene Eigenschaften eher gewünscht. Zusätzlich zum gezeigten genregulatorischen Effekt der verschiedenen getesteten Nahrungsinhaltsstoffe wird aus den Ergebnissen deutlich, dass in einigen Fällen trotz fehlender Aktivierung der untersuchten Transkriptionsfaktoren eine Regulation des entsprechenden Zielgens erfolgte. Das lässt den Schluss auf alternative und bisher teilweise unbekannte Regulationswege für das jeweilige Zielgen zu.

**Tab. 11: Übersicht der *in vitro*-Ergebnisse zur transkriptionellen Regulation von Phase I- und Phase II-Enzymen**

Einfluss auf das DR3-Element (PXR) bzw. HO-ARE (Nrf2) und die Promotoren des CYP3A4 bzw. der GI-GPx (zwei Pfeile ≈ Verdoppelung/Halbierung der Aktivität); \* kein Ergebnis dieser Arbeit

	Phase I		Phase II	
	PXR	CYP3A4	Nrf2	GI-GPx
<b>Vitamin E</b>	↑↑*	↑↑	--	--
<b>Sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe</b>				
Curcumin	↑↑	↑↑	↑*	↑*
EGCG	--	↑↑	--	↓
Medox	↓	↑↑	--	↓
Quercetin	↓↓	↑↑	↑	↑↑↑
Resveratrol	↑	↑↑	↑	↑
Sulforaphan	↑↑	↑	↑↑*	↑↑↑*
<b>Pflanzenextrakte aus ...</b>				
Blaubeeren	--	↑↑	--	--
Gewürznelken	↑	--	--	↓↓↓
Himbeeren	↑	↑	--	↓
Nelkenpfeffer	--	↑↑↑	--	↑
Thymian	↑↑	↑↑↑	↑↑	↑↑↑
Walnüsse	--	↑	--	↓

Die *in vitro* gezeigte Promotoraktivierung des humanen fremdstoffmetabolisierenden Phase I-Enzyms CYP3A4 durch Vitamin E wurde zusätzlich auf mRNA-Ebene untersucht.

Neben dem biologisch bedeutsamen natürlichen  $\alpha$ -Tocopherol und dem  $\alpha$ -Tocotrienol erwies sich das  $\gamma$ -Tocotrienol als stärkster Aktivator des CYP3A4-Promotors. Gleichzeitig induzierte es die Expression der CYP3A4- und CYP3A5-mRNA in HepG2-Zellen vergleichbar zum bekanntesten Induktor Rifampicin. In einem Tierexperiment konnte diese genregulatorische Wirkung von Vitamin E auf die *in vivo*-Situation übertragen werden. *In vivo* zeigte sich in der Leber der Mäuse eine direkte Korrelation zwischen der  $\alpha$ -Tocopherol-Konzentration und der Cyp3a11 mRNA-Expression, dem murinen Homolog zum humanen CYP3A4. Entgegen zur *in vitro*-Situation hatte  $\gamma$ -Tocotrienol einen kaum nachweisbaren Effekt auf die Expression der Cyp3a11 mRNA, da es in hohem Maß metabolisiert und als  $\gamma$ -CEHC ausgeschieden wurde.

### **Ausblick**

Eine Supplementierung mit vermeintlich „harmlosen“ Antioxidanzien wird häufig ungeachtet der Tatsache, dass weder über die Bioverfügbarkeit noch über die tatsächlichen physiologischen Wirkungen der eingesetzten Substanzen ausreichend Informationen vorhanden sind, empfohlen. Gerade diese Informationen sind jedoch essentiell, will man eine aussagekräftige Beurteilung der gesundheitsfördernden Relevanz dieser Verbindungen geben.

Die hier gezeigten Effekte von Vitamin E und verschiedenen sekundären Pflanzeninhaltsstoffen auf Transkriptionsfaktoren von Phase I- und Phase II-Enzymen und deren Zielgene lässt weitere physiologische Wirkungen vermuten, die es *in vitro* und *in vivo* zu untersuchen gilt. Pharmakokinetische Wechselwirkungen entstehen häufig durch die Induktion oder Hemmung der Biotransformation und/oder des aktiven Transports von Arzneimitteln (besonders P-Glykoprotein). Die gezielte Modulation von der Biotransformation und des Transports bietet innovative Möglichkeiten, Probleme der Arzneimittelanwendung wie *Multidrug-Resistance* oder unzureichende Bioverfügbarkeit zu überwinden. Sollten sich die *in vitro*-Ergebnisse insbesondere für die Aktivierung des PXR und des CYP3A4 auf mRNA-, Protein- und Aktivitätsebene bestätigen lassen, führen sie zu neuen Erkenntnissen u.a. auch bei Bekämpfung von Krebserkrankungen. Neben dem Arzneimittelabbau durch CYP3A4 stellt die *Multidrug Resistance* eines der Hauptprobleme einer erfolgreichen Zytostatika-Therapie maligner Tumore dar. Ein entscheidender Faktor für die Manifestierung dieser Resistenz ist die Überexpression des PXR-regulierten P-Glykoproteins.

Weitere Untersuchungen zum Einfluss der getesteten Substanzen auf das Nrf2/Keap1-System und der damit zu erwartenden Beeinflussung des *adaptive response* über die endogenen Schutzsysteme der Zelle auf Protein und Aktivitätsebene sowohl *in vitro* als auch *in vivo* erscheinen vielversprechend. Gerade der Verzehr von Nrf2-Aktivatoren wird mit gesundheitsfördernden Wirkungen in Verbindung gebracht.

## 7 Literatur

- [1] Sies, H. (ed.). Oxidative Stress: Oxidants and Antioxidants, *London Academic Press*, 1991.
- [2] Sies, H. (1993). Strategies of antioxidant defense, *Eur J Biochem* 215, 213-219.
- [3] Hofmann, B., Hecht, H. J. and Flohé, L. (2002). Peroxiredoxins, *Biol Chem* 383, 347-364.
- [4] Valko, M., Rhodes, C. J., Moncol, J., Izakovic, M. and Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer, *Chem Biol Interact* 160, 1-40.
- [5] Evans, H. M. and Bishop, K. S. (1922). On the existence of a hitherto unrecognized dietary factor essential for reproduction, *Science* LVI, 650-651.
- [6] Sure, B. (1924). Dietary requirements for reproduction. II. The existence of a specific vitamin for reproduction, *J Biol Chem* 58, 693-709.
- [7] Evans, H. M., Emerson, O. H. and Emerson, G. A. (1936). The isolation from wheat germ oil of an alcohol, alpha-tocopherol, having the properties of vitamin E, *J Biol Chem* 113, 319-332.
- [8] Fernholz, E. (1938). On the constitution of alpha-tocopherol, *J Am Chem Soc* 60, 700-705.
- [9] Karrer, P., Fritzsche, H., Ringier, B. H. and Salomon, H. (1938). Synthese des alpha-Tocopherols, *Helv Chim Acta* 21, 820-825.
- [10] Green, J., Mamalis, S., Marcinkiewicz, S. and McHale, D. (1960). Structure of epsilon-tocopherol, *Chem Ind*, 73-74.
- [11] Bunyan, J., McHale, D., Green, J. and Marcinkiewicz, S. (1961). Biological potencies of epsilon- and zeta1-tocopherol and 5-methyltolcol, *Br J Nutr* 15, 253-257.
- [12] Schudel, P., Mayer, H., Metzger, J., Rüegg, R. and Isler, O. (1963). Über die Chemie des Vitamin E. Die Synthese des rac. all-trans-zeta1- und -epsilon-Tocopherol, *Helv Chim Acta* 46, 2517-2526.
- [13] Scott, J. W., Bizzarro, F. T., Parrish, D. R. and Saucy, G. (1976). Syntheses of (2R, 4'R, 8'R)-alpha-Tocopherol and (2R, 3'E, 7'E)-alpha-Tocotrienol, *Helv Chim Acta* 59, 290-306.
- [14] Collakova, E. and DellaPenna, D. (2001). Isolation and functional analysis of homogentisate phytyltransferase from *Synechocystis* sp. PCC 6803 and *Arabidopsis*, *Plant Physiol* 127, 1113-1124.
- [15] Collakova, E. and DellaPenna, D. (2003). Homogentisate phytyltransferase activity is limiting for tocopherol biosynthesis in *Arabidopsis*, *Plant Physiol* 131, 632-642.
- [16] Kamal-Eldin, A. and Appelqvist, L. A. (1996). The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols, *Lipids* 31, 671-701.
- [17] United States Pharmacopeia (1984). 21st revision. Rockville: USP Convention.
- [18] Weiser, H. and Vecchi, M. (1982). Stereoisomers of alpha-tocopheryl acetate. II. Biopotencies of all eight stereoisomers, individually or in mixtures, as determined by rat resorption-gestation tests, *Int J Vitam Nutr Res* 52, 351-370.
- [19] Drevon, C. A. (1991). Absorption, transport and metabolism of vitamin E, *Free Radic Res Commun* 14, 229-246.

- 
- [20] Cohn, W., Gross, P., Grun, H., Loechleiter, F., Muller, D. P. and Zulauf, M. (1992). Tocopherol transport and absorption, *Proc Nutr Soc* 51, 179-188.
- [21] Kayden, H. J. and Traber, M. G. (1993). Absorption, lipoprotein transport, and regulation of plasma concentrations of vitamin E in humans, *J Lipid Res* 34, 343-358.
- [22] Traber, M. G. and Sies, H. (1996). Vitamin E in humans: demand and delivery, *Annu Rev Nutr* 16, 321-347.
- [23] Herrera, E. and Barbas, C. (2001). Vitamin E: action, metabolism and perspectives, *J Physiol Biochem* 57, 43-56.
- [24] Brigelius-Flohé, R., Kelly, F. J., Salonen, J., Neuzil, J., Zingg, J.-M. and Azzi, A. (2002). The European perspective on vitamin E: current knowledge and future research, *Am J Clin Nutr* 76, 703-716.
- [25] Stahl, W., van den Berg, H., Arthur, J., Bast, A., Dainty, J., Faulks, R. M., Gartner, C., Haenen, G., Hollman, P., Holst, B., et al. (2002). Bioavailability and metabolism, *Mol Aspects Med* 23, 39-100.
- [26] Munteanu, A., Zingg, J. M. and Azzi, A. (2004). Anti-atherosclerotic effects of vitamin E - myth or reality?, *J Cell Mol Med* 8, 59-76.
- [27] Debier, C. and Larondelle, Y. (2005). Vitamins A and E: metabolism, roles and transfer to offspring, *Br J Nutr* 93, 153-174.
- [28] Mathias, P. M., Harries, J. T., Peters, T. J. and Muller, D. P. (1981). Studies on the in vivo absorption of micellar solutions of tocopherol and tocopheryl acetate in the rat: demonstration and partial characterization of a mucosal esterase localized to the endoplasmic reticulum of the enterocyte, *J Lipid Res* 22, 829-837.
- [29] Kaempf-Rotzoll, D. E., Traber, M. G. and Arai, H. (2003). Vitamin E and transfer proteins, *Curr Opin Lipidol* 14, 249-254.
- [30] Arita, M., Nomura, K., Arai, H. and Inoue, K. (1997). alpha-tocopherol transfer protein stimulates the secretion of alpha-tocopherol from a cultured liver cell line through a brefeldin A-insensitive pathway, *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 12437-12441.
- [31] Oram, J. F., Vaughan, A. M. and Stocker, R. (2001). ATP-binding cassette transporter A1 mediates cellular secretion of alpha-tocopherol, *J Biol Chem* 276, 39898-39902.
- [32] Oram, J. F. and Lawn, R. M. (2001). ABCA1. The gatekeeper for eliminating excess tissue cholesterol, *J Lipid Res* 42, 1173-1179.
- [33] Burton, G. W. and Traber, M. G. (1990). Vitamin E: antioxidant activity, biokinetics, and bioavailability, *Annu Rev Nutr* 10, 357-382.
- [34] Mardones, P. and Rigotti, A. (2004). Cellular mechanisms of vitamin E uptake: relevance in alpha-tocopherol metabolism and potential implications for disease, *J Nutr Biochem* 15, 252-260.
- [35] Catignani, G. L. (1975). An alpha-tocopherol binding protein in rat liver cytoplasm, *Biochem Biophys Res Commun* 67, 66-72.
- [36] Catignani, G. L. and Bieri, J. G. (1977). Rat liver alpha-tocopherol binding protein, *Biochim Biophys Acta* 497, 349-357.
- [37] Arita, M., Sato, Y., Miyata, A., Tanabe, T., Takahashi, E., Kayden, H. J., Arai, H. and Inoue, K. (1995). Human alpha-tocopherol transfer protein: cDNA cloning, expression and chromosomal localization, *Biochem J* 306 ( Pt 2), 437-443.

- [38] Kaempf-Rotzoll, D. E., Horiguchi, M., Hashiguchi, K., Aoki, J., Tamai, H., Linderkamp, O. and Arai, H. (2003). Human placental trophoblast cells express alpha-tocopherol transfer protein, *Placenta* 24, 439-444.
- [39] Müller-Schmehl, K., Beninde, J., Finckh, B., Florian, S., Dudenhausen, J. W., Brigelius-Flohé, R. and Schuelke, M. (2004). Localization of  $\alpha$ -tocopherol transfer protein in trophoblast, fetal capillaries' endothelium and amnion epithelium of human term placenta, *Free Rad Res* 38, 413-420.
- [40] Copp, R. P., Wisniewski, T., Hentati, F., Larnaout, A., Ben Hamida, M. and Kayden, H. (1999). Localization of  $\alpha$ -tocopherol transfer protein in the brains of patients with ataxia with vitamin E deficiency and other oxidative stress related neurodegenerative disorders, *Brain Res* 822, 80-87.
- [41] Hosomi, A., Arita, M., Sato, Y., Kiyose, C., Ueda, T., Igarashi, O., Arai, H. and Inoue, K. (1997). Affinity of  $\alpha$ -tocopherol transfer protein as a determinant of the biological activities of vitamin E analogs, *FEBS Lett* 409, 105-108.
- [42] Qian, J., Morley, S., Wilson, K., Nava, P., Atkinson, J. and Manor, D. (2005). Intracellular trafficking of vitamin E in hepatocytes: the role of tocopherol transfer protein, *J Lipid Res* 46, 2072-2082.
- [43] Gotoda, T., Arita, M., Arai, H., Inoue, K., Yokota, T., Fukuo, Y., Yazaki, Y. and Yamada, N. (1995). Adult-onset spinocerebellar dysfunction caused by a mutation in the gene for the  $\alpha$ -tocopherol-transfer protein, *New Engl J Med* 333, 1313-1352.
- [44] Ouahchi, K., Arita, M., Kayden, H., Hentati, F., Hamida, M. B., Sokol, R., Arai, H., Inoue, K., Mandel, J.-L. and Koenig, M. (1995). Ataxia with isolated vitamin E deficiency is caused by mutations in the alpha-tocopherol transfer protein, *Nat Genet* 9, 141-145.
- [45] Yokota, T., Shiojiri, T., Gotoda, T. and Arai, H. (1996). Retinitis pigmentosa and ataxia caused by a mutation in the gene for the alpha-tocopherol-transfer protein, *N Engl J Med* 335, 1770-1771.
- [46] Yokota, T., Uchihara, T., Kumagai, J., Shiojiri, T., Pang, J. J., Arita, M., Arai, H., Hayashi, M., Kiyosawa, M., Okeda, R. and Mizusawa, H. (2000). Postmortem study of ataxia with retinitis pigmentosa by mutation of the alpha-tocopherol transfer protein gene, *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 68, 521-525.
- [47] Gohil, K., Godzdanker, R., O'Roark, E., Schock, B. C., Kaini, R. R., Packer, L., Cross, C. E. and Traber, M. G. (2004). Alpha-tocopherol transfer protein deficiency in mice causes multi-organ deregulation of gene networks and behavioral deficits with age, *Ann N Y Acad Sci* 1031, 109-126.
- [48] Dutta-Roy, A. K., Leishman, D. J., Gordon, M. J., Campbell, F. M. and Duthie, G. G. (1993). Identification of a low molecular mass (14.2 kDa) alpha-tocopherol-binding protein in the cytosol of rat liver and heart, *Biochem Biophys Res Commun* 196, 1108-1112.
- [49] Kostner, G. M., Oettl, K., Jauhainen, M., Ehnholm, C., Esterbauer, H. and Dieplinger, H. (1995). Human plasma phospholipid transfer protein accelerates exchange/transfer of alpha-tocopherol between lipoproteins and cells, *Biochem J* 305, 659-667.
- [50] Zimmer, S., Stocker, A., Sarbolouki, M. N., Spycher, S. E., Sassoon, J. and Azzi, A. (2000). A novel human tocopherol-associated protein: cloning, in vitro expression, and characterization, *J Biol Chem* 275, 25672-25680.
- [51] Simon, E. J., Eisengart, A., Sundheim, L. and Milhorat, A. T. (1956). The metabolism of vitamin E II. Purification and characterization of urinary metabolites of alpha-tocopherol, *J Biol Chem* 221, 807-817.

- [52] Schönfeld, A., Schultz, M., Petrizka, M. and Gassmann, B. (1993). A novel metabolite of RRR- $\alpha$ -tocopherol in human urine, *Nahrung* 37, 498-500.
- [53] Wechter, J. W., Kantoci, D., Murray, E. D., D'Amico, D. C., Jung, M. E. and Wang, W.-H. (1996). A new endogenous natriuretic factor: LLU- $\alpha$ , *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 6002-6007.
- [54] Chiku, S., Hamamura, K. and Nakamura, T. (1984). Novel urinary metabolite of d-delta-tocopherol in rats, *J Lipid Res* 25, 40-48.
- [55] Hattori, A., Fukushima, T., Yoshimura, H., Abe, K. and Ima, K. (2000). Production of LLU- $\alpha$  following an oral administration of gamma-tocotrienol or gamma-tocopherol to rats, *Biol Pharm Bull* 23, 1395-1397.
- [56] Lodge, J. K., Ridlington, J., Leonard, S., Vaule, H. and Traber, M. G. (2001). Alpha- and gamma-tocotrienols are metabolized to carboxyethyl- hydroxychroman derivatives and excreted in human urine, *Lipids* 36, 43-48.
- [57] Birringer, M., Pfluger, P., Kluth, D., Landes, N. and Brigelius-Flohé, R. (2002). Identities and differences in the metabolism of tocotrienols and tocopherols in HepG2 cells, *J Nutr* 132, 3113-3118.
- [58] Parker, R. S., Sontag, T. J. and Swanson, J. E. (2000). Cytochrome P4503A-Dependent Metabolism of Tocopherols and Inhibition by Sesamin, *Biochem Biophys Res Commun* 277, 531-534.
- [59] Birringer, M., Drohan, D. and Brigelius-Flohé, R. (2001). Tocopherols are metabolized in HepG2 cells by side chain  $\omega$ -oxidation and consecutive  $\beta$ -oxidation, *Free Radic Biol Med* 31, 226-232.
- [60] Ikeda, S., Tohyama, T. and Yamashita, K. (2002). Dietary sesame seed and its lignans inhibit 2,7,8-trimethyl- 2(2'- carboxyethyl)-6-hydroxychroman excretion into urine of rats fed gamma- tocopherol, *J Nutr* 132, 961-966.
- [61] Sontag, T. J. and Parker, R. S. (2002). Cytochrome P450 omega -hydroxylase pathway of tocopherol catabolism: Novel mechanism of regulation of vitamin E status, *J Biol Chem* 277, 25290-25296.
- [62] Schultz, M., Leist, M., Petrizka, M., Gassmann, B. and Brigelius-Flohé, R. (1995). Novel urinary metabolite of alpha-tocopherol, 2,5,7,8-tetramethyl-2(2'-carboxyethyl)-6-hydroxychroman, as an indicator of an adequate vitamin E supply?, *Am J Clin Nutr* 62, 1527S-1534S.
- [63] Pope, S. A., Burtin, G. E., Clayton, P. T., Madge, D. J. and Muller, D. P. (2001). New synthesis of (+/-)-alpha-CMBHC and its confirmation as a metabolite of alpha-tocopherol (vitamin E), *Bioorg Med Chem* 9, 1337-1343.
- [64] Pope, S. A., Burtin, G. E., Clayton, P. T., Madge, D. J. and Muller, D. P. (2002). Synthesis and analysis of conjugates of the major vitamin E metabolite, alpha-CEHC, *Free Radic Biol Med* 33, 807-817.
- [65] Brigelius-Flohé, R. (2003). Vitamin E and drug metabolism, *Biochem Biophys Res Commun* 305, 737-740.
- [66] Wolf, G. (2005). The discovery of the antioxidant function of vitamin E: the contribution of Henry A. Mattill, *J Nutr* 135, 363-366.
- [67] Niki, E., Yoshida, Y., Saito, Y. and Noguchi, N. (2005). Lipid peroxidation: mechanisms, inhibition, and biological effects, *Biochem Biophys Res Commun* 338, 668-676.

- [68] Packer, J. E., Slater, T. F. and Willson, R. L. (1979). Direct observation of a free radical interaction between vitamin E and vitamin C, *Nature* 278, 737-738.
- [69] Lass, A. and Sohal, R. S. (1998). Electron transport-linked ubiquinone-dependent recycling of alpha-tocopherol inhibits autooxidation of mitochondrial membranes, *Arch Biochem Biophys* 352, 229-236.
- [70] Leedle, R. A. and Aust, S. D. (1990). The effect of glutathione on the vitamin E requirement for inhibition of liver microsomal lipid peroxidation, *Lipids* 25, 241-245.
- [71] Bowry, V. W. and Stocker, R. (1993). Tocopherol-mediated peroxidation. The prooxidant effect of vitamin E on the radical-initiated oxidation of human low-density lipoprotein, *J Am Chem Soc* 115, 6029 - 6044.
- [72] Kontush, A., Finckh, B., Karten, B., Kohlschütter, A. and Beisiegel, U. (1996). Antioxidant and prooxidant activity of  $\alpha$ -tocopherol in human plasma and low density lipoprotein, *J Lipid Res* 37, 1436-1448.
- [73] Jiang, Q., Christen, S., Shigenaga, M. K. and Ames, B. N. (2001). Gamma-tocopherol, the major form of vitamin E in the US diet, deserves more attention, *Am J Clin Nutr* 74, 714-722.
- [74] Cooney, R. V., Franke, A. A., Harwood, P. J., Hatch-Pigott, V., Custer, L. J. and Mordan, L. J. (1993). Gamma-tocopherol detoxification of nitrogen dioxide: superiority to alpha-tocopherol, *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 1771-1775.
- [75] Christen, S., Woodall, A. A., Shigenaga, M. K., Southwell-Keely, P. T., Duncan, M. W. and Ames, B. N. (1997). gamma-tocopherol traps mutagenic electrophiles such as NO(X) and complements alpha-tocopherol: physiological implications, *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 3217-3222.
- [76] Hoglen, N. C., Waller, S. C., Sipes, I. G. and Liebler, D. C. (1997). Reactions of peroxy-nitrite with gamma-tocopherol, *Chem Res Toxicol* 10, 401-407.
- [77] Mahoney, C. W. and Azzi, A. (1988). Vitamin E inhibits protein kinase C activity, *Biochem Biophys Res Commun* 154, 694-697.
- [78] Tasinato, A., Boscoboinik, D., Bartoli, G. M., Maroni, P. and Azzi, A. (1995). D-alpha-Tocopherol inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation occurs at physiological concentrations, correlates with protein kinase C inhibition, and is independent of its antioxidant properties, *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 12190-12194.
- [79] Ricciarelli, R., Tasinato, A., Clement, S., Özer, N. K., Boscoboinik, D. and Azzi, A. (1998). alpha-Tocopherol specifically inactivates cellular protein kinase C  $\alpha$  by changing its phosphorylation state, *Biochem J* 334, 243-249.
- [80] Stocker, A. and Azzi, A. (2000). Tocopherol-binding proteins: their function and physiological significance, *Antioxid Redox Signal* 2, 397-404.
- [81] Zingg, J. M. and Azzi, A. (2004). Non-antioxidant activities of vitamin E, *Curr Med Chem* 11, 1113-1133.
- [82] Azzi, A., Gysin, R., Kempna, P., Munteanu, A., Villacorta, L., Visarius, T. and Zingg, J. M. (2004). Regulation of gene expression by alpha-tocopherol, *Biol Chem* 385, 585-591.
- [83] Azzi, A., Gysin, R., Kempna, P., Munteanu, A., Negis, Y., Villacorta, L., Visarius, T. and Zingg, J. M. (2004). Vitamin E mediates cell signaling and regulation of gene expression, *Ann N Y Acad Sci* 1031, 86-95.
- [84] Pfluger, P., Kluth, D., Landes, N., Bumke-Vogt, C. and Brigelius-Flohé, R. (2004). Vitamin E: underestimated as an antioxidant, *Redox Rep* 9, 249-254.

- [85] Parker, R. A., Pearce, B. C., Clark, R. W., Gordon, D. A. and Wright, J. J. (1993). Tocotrienols regulate cholesterol production in mammalian cells by post-transcriptional suppression of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase, *J Biol Chem* 268, 11230-11238.
- [86] Ricciarelli, R., Zingg, J. M. and Azzi, A. (2000). Vitamin E reduces the uptake of oxidized LDL by inhibiting CD36 scavenger receptor expression in cultured aortic smooth muscle cells, *Circulation* 102, 82-87.
- [87] Theriault, A., Chao, J. T. and Gapor, A. (2002). Tocotrienol is the most effective vitamin E for reducing endothelial expression of adhesion molecules and adhesion to monocytes, *Atherosclerosis* 160, 21-30.
- [88] Campbell, S. E., Stone, W. L., Whaley, S. G., Qui, M. and Krishnan, K. (2003). Gamma (g) tocopherol upregulates peroxisome proliferator activated receptor (PPAR) gamma (g) expression in SW 480 human colon cancer cell lines, *BMC Cancer* 3:25.
- [89] Aratri, E., Spycher, S. E., Breyer, I. and Azzi, A. (1999). Modulation of alpha-tropomyosin expression by alpha-tocopherol in rat vascular smooth muscle cells, *FEBS Lett* 447, 91-94.
- [90] Masaki, H., Okano, Y., Ochiai, Y., Obayashi, K., Akamatsu, H. and Sakurai, H. (2002). alpha-tocopherol increases the intracellular glutathione level in HaCaT keratinocytes, *Free Radic Res* 36, 705-709.
- [91] Fechner, H., Schlame, M., Guthmann, F., Stevens, P. A. and Rustow, B. (1998). alpha- and delta-tocopherol induce expression of hepatic alpha-tocopherol-transfer-protein mRNA, *Biochem J* 331, 577-581.
- [92] Landes, N., Pfluger, P., Kluth, D., Birringer, M., Rühl, R., Böhl, G. F., Glatt, H. and Brigelius-Flohé, R. (2003). Vitamin E activates gene expression via the pregnane X receptor, *Biochem Pharmacol* 65, 269-273.
- [93] Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Remesy, C. and Jimenez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability, *Am J Clin Nutr* 79, 727-747.
- [94] Scalbert, A. and Williamson, G. (2000). Dietary intake and bioavailability of polyphenols, *J Nutr* 130, 2073S-2085S.
- [95] Walle, T. (2004). Absorption and metabolism of flavonoids, *Free Radic Biol Med* 36, 829-837.
- [96] Hollman, P. C., de Vries, J. H., van Leeuwen, S. D., Mengelers, M. J. and Katan, M. B. (1995). Absorption of dietary quercetin glycosides and quercetin in healthy ileostomy volunteers, *Am J Clin Nutr* 62, 1276-1282.
- [97] Walgren, R. A., Lin, J. T., Kinne, R. K. and Walle, T. (2000). Cellular uptake of dietary flavonoid quercetin 4'-beta-glucoside by sodium-dependent glucose transporter SGLT1, *J Pharmacol Exp Ther* 294, 837-843.
- [98] Wolfram, S., Block, M. and Ader, P. (2002). Quercetin-3-glucoside is transported by the glucose carrier SGLT1 across the brush border membrane of rat small intestine, *J Nutr* 132, 630-635.
- [99] Manach, C., Williamson, G., Morand, C., Scalbert, A. and Remesy, C. (2005). Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies, *Am J Clin Nutr* 81, 230S-242S.
- [100] La Vecchia, C. and Tavani, A. (1998). Fruit and vegetables, and human cancer, *Eur J Cancer Prev* 7, 3-8.

- [101] Bazzano, L. A., He, J., Ogden, L. G., Loria, C. M., Vupputuri, S., Myers, L. and Whelton, P. K. (2002). Fruit and vegetable intake and risk of cardiovascular disease in US adults: the first National Health and Nutrition Examination Survey Epidemiologic Follow-up Study, *Am J Clin Nutr* 76, 93-99.
- [102] WHO (2003). Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases, *World Health Organ Tech Rep Ser* 916, i-viii, 1-149.
- [103] Hung, H. C., Joshipura, K. J., Jiang, R., Hu, F. B., Hunter, D., Smith-Warner, S. A., Colditz, G. A., Rosner, B., Spiegelman, D. and Willett, W. C. (2004). Fruit and vegetable intake and risk of major chronic disease, *J Natl Cancer Inst* 96, 1577-1584.
- [104] Woodside, J. V., McCall, D., McGartland, C. and Young, I. S. (2005). Micronutrients: dietary intake v. supplement use, *Proc Nutr Soc* 64, 543-553.
- [105] Scalbert, A., Manach, C., Morand, C., Remesy, C. and Jimenez, L. (2005). Dietary polyphenols and the prevention of diseases, *Crit Rev Food Sci Nutr* 45, 287-306.
- [106] Arts, I. C. and Hollman, P. C. (2005). Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies, *Am J Clin Nutr* 81, 317S-325S.
- [107] Vita, J. A. (2005). Polyphenols and cardiovascular disease: effects on endothelial and platelet function, *Am J Clin Nutr* 81, 292S-297S.
- [108] Middleton, E., Jr., Kandaswami, C. and Theoharides, T. C. (2000). The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer, *Pharmacol Rev* 52, 673-751.
- [109] Frei, B. and Higdon, J. V. (2003). Antioxidant activity of tea polyphenols in vivo: evidence from animal studies, *J Nutr* 133, 3275S-3284S.
- [110] van Erk, M. J., Roepman, P., van der Lende, T. R., Stierum, R. H., Aarts, J. M., van Bladeren, P. J. and van Ommen, B. (2005). Integrated assessment by multiple gene expression analysis of quercetin bioactivity on anticancer-related mechanisms in colon cancer cells in vitro, *Eur J Nutr* 44, 143-156.
- [111] Myhrstad, M. C., Carlsen, H., Nordstrom, O., Blomhoff, R. and Moskaug, J. O. (2002). Flavonoids increase the intracellular glutathione level by transactivation of the gamma-glutamylcysteine synthetase catalytical subunit promoter, *Free Radic Biol Med* 32, 386-393.
- [112] Valerio, L. G., Jr., Kepa, J. K., Pickwell, G. V. and Quattrochi, L. C. (2001). Induction of human NAD(P)H:quinone oxidoreductase (NQO1) gene expression by the flavonol quercetin, *Toxicol Lett* 119, 49-57.
- [113] Yoon, J. H. and Baek, S. J. (2005). Molecular targets of dietary polyphenols with anti-inflammatory properties, *Yonsei Med J* 46, 585-596.
- [114] Guengerich, F. P. (1993). The 1992 Bernard B. Brodie Award Lecture. Bioactivation and detoxication of toxic and carcinogenic chemicals, *Drug Metab Dispos* 21, 1-6.
- [115] Rushmore, T. H. and Kong, A. N. (2002). Pharmacogenomics, regulation and signaling pathways of phase I and II drug metabolizing enzymes, *Curr Drug Metab* 3, 481-490.
- [116] Xu, C., Li, C. Y. and Kong, A. N. (2005). Induction of phase I, II and III drug metabolism/transport by xenobiotics, *Arch Pharm Res* 28, 249-268.
- [117] Dickins, M. (2004). Induction of cytochromes P450, *Curr Top Med Chem* 4, 1745-1766.
- [118] Burk, O. and Wojnowski, L. (2004). Cytochrome P450 3A and their regulation, *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 369, 105-124.

- [119] Nelson, D. R. <http://drnelson.utmem.edu/CytochromeP450.html>.
- [120] Guengerich, F. P. (2003). Cytochromes P450, drugs, and diseases, *Mol Interv* 3, 194-204.
- [121] Li, A. P., Kaminski, D. L. and Rasmussen, A. (1995). Substrates of human hepatic cytochrome P450 3A4, *Toxicology* 104, 1-8.
- [122] Bertilsson, G., Heidrich, J., Svensson, K., Asman, M., Jendeberg, L., Sydow-Backman, M., Ohlsson, R., Postlind, H., Blomquist, P. and Berkenstam, A. (1998). Identification of a human nuclear receptor defines a new signaling pathway for CYP3A induction, *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 12208-12213.
- [123] Blumberg, B., Sabbagh, W., Jr., Juguilon, H., Bolado, J., Jr., van Meter, C. M., Ong, E. S. and Evans, R. M. (1998). SXR, a novel steroid and xenobiotic-sensing nuclear receptor, *Genes Dev* 12, 3195-3205.
- [124] Nuclear Receptors Nomenclature Committee (1999). A unified nomenclature system for the nuclear receptor superfamily, *Cell* 97, 161-163.
- [125] Willson, T. M. and Kliewer, S. A. (2002). PXR, CAR and drug metabolism, *Nat Rev Drug Discov* 1, 259-266.
- [126] Kliewer, S. A., Goodwin, B. and Willson, T. M. (2002). The nuclear pregnane X receptor: a key regulator of xenobiotic metabolism, *Endocr Rev* 23, 687-702.
- [127] Luo, G., Guenther, T., Gan, L. S. and Humphreys, W. G. (2004). CYP3A4 induction by xenobiotics: biochemistry, experimental methods and impact on drug discovery and development, *Curr Drug Metab* 5, 483-505.
- [128] Kawana, K., Ikuta, T., Kobayashi, Y., Gotoh, O., Takeda, K. and Kawajiri, K. (2003). Molecular mechanism of nuclear translocation of an orphan nuclear receptor, SXR, *Mol Pharmacol* 63, 524-531.
- [129] Squires, E. J., Sueyoshi, T. and Negishi, M. (2004). Cytoplasmic localization of pregnane X receptor and ligand-dependent nuclear translocation in mouse liver, *J Biol Chem* 279, 49307-49314.
- [130] Glass, C. K. (1994). Differential recognition of target genes by nuclear receptor monomers, dimers, and heterodimers, *Endocr Rev* 15, 391-407.
- [131] Mangelsdorf, D. J. and Evans, R. M. (1995). The RXR heterodimers and orphan receptors, *Cell* 83, 841-850.
- [132] Goodwin, B., Redinbo, M. R. and Kliewer, S. A. (2002). Regulation of CYP3A gene transcription by the pregnane X receptor, *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 42, 1-23.
- [133] Goodwin, B., Hodgson, E. and Liddle, C. (1999). The orphan human pregnane X receptor mediates the transcriptional activation of CYP3A4 by rifampicin through a distal enhancer module, *Mol Pharmacol* 56, 1329-1339.
- [134] Sueyoshi, T. and Negishi, M. (2001). Phenobarbital response elements of cytochrome P450 genes and nuclear receptors, *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 41, 123-143.
- [135] Maglich, J. M., Stoltz, C. M., Goodwin, B., Hawkins-Brown, D., Moore, J. T. and Kliewer, S. A. (2002). Nuclear pregnane x receptor and constitutive androstane receptor regulate overlapping but distinct sets of genes involved in xenobiotic detoxification, *Mol Pharmacol* 62, 638-646.
- [136] Handschin, C. and Meyer, U. A. (2003). Induction of drug metabolism: the role of nuclear receptors, *Pharmacol Rev* 55, 649-673.

- [137] Hayes, J. D. and McMahon, M. (2001). Molecular basis for the contribution of the antioxidant responsive element to cancer chemoprevention, *Cancer Lett* 174, 103-113.
- [138] Nguyen, T., Sherratt, P. J. and Pickett, C. B. (2003). Regulatory mechanisms controlling gene expression mediated by the antioxidant response element, *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 43, 233-260.
- [139] Kwak, M. K., Wakabayashi, N. and Kensler, T. W. (2004). Chemoprevention through the Keap1-Nrf2 signaling pathway by phase 2 enzyme inducers, *Mutat Res* 555, 133-148.
- [140] Itoh, K., Chiba, T., Takahashi, S., Ishii, T., Igarashi, K., Katoh, Y., Oyake, T., Hayashi, N., Satoh, K., Hatayama, I., et al. (1997). An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements, *Biochem Biophys Res Commun* 236, 313-322.
- [141] Dinkova-Kostova, A. T., Holtzclaw, W. D. and Wakabayashi, N. (2005). Keap1, the sensor for electrophiles and oxidants that regulates the phase 2 response, is a zinc metalloprotein, *Biochemistry* 44, 6889-6899.
- [142] Wakabayashi, N., Itoh, K., Wakabayashi, J., Motohashi, H., Noda, S., Takahashi, S., Imakado, S., Kotsuji, T., Otsuka, F., Roop, D. R., et al. (2003). Keap1-null mutation leads to postnatal lethality due to constitutive Nrf2 activation, *Nat Genet* 35, 238-245.
- [143] Zhang, D. D. and Hannink, M. (2003). Distinct cysteine residues in Keap1 are required for Keap1-dependent ubiquitination of Nrf2 and for stabilization of Nrf2 by chemopreventive agents and oxidative stress, *Mol Cell Biol* 23, 8137-8151.
- [144] Nguyen, T., Sherratt, P. J., Huang, H. C., Yang, C. S. and Pickett, C. B. (2003). Increased protein stability as a mechanism that enhances Nrf2-mediated transcriptional activation of the antioxidant response element. Degradation of Nrf2 by the 26 S proteasome, *J Biol Chem* 278, 4536-4541.
- [145] Dinkova-Kostova, A. T., Massiah, M. A., Bozak, R. E., Hicks, R. J. and Talalay, P. (2001). Potency of Michael reaction acceptors as inducers of enzymes that protect against carcinogenesis depends on their reactivity with sulfhydryl groups, *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 3404-3409.
- [146] Nguyen, T., Sherratt, P. J., Nioi, P., Yang, C. S. and Pickett, C. B. (2005). Nrf2 controls constitutive and inducible expression of ARE-driven genes through a dynamic pathway involving nucleocytoplasmic shuttling by Keap1, *J Biol Chem* 280, 32485-32492.
- [147] Velichkova, M. and Hasson, T. (2005). Keap1 regulates the oxidation-sensitive shuttling of Nrf2 into and out of the nucleus via a Crm1-dependent nuclear export mechanism, *Mol Cell Biol* 25, 4501-4513.
- [148] Furukawa, M. and Xiong, Y. (2005). BTB protein Keap1 targets antioxidant transcription factor Nrf2 for ubiquitination by the Cullin 3-Roc1 ligase, *Mol Cell Biol* 25, 162-171.
- [149] Kobayashi, A., Kang, M. I., Watai, Y., Tong, K. I., Shibata, T., Uchida, K. and Yamamoto, M. (2006). Oxidative and Electrophilic Stresses Activate Nrf2 through Inhibition of Ubiquitination Activity of Keap1, *Mol Cell Biol* 26, 221-229.
- [150] Lee, J. M. and Johnson, J. A. (2004). An important role of Nrf2-ARE pathway in the cellular defense mechanism, *J Biochem Mol Biol* 37, 139-143.
- [151] Thimmulappa, R. K., Mai, K. H., Srisuma, S., Kensler, T. W., Yamamoto, M. and Biswal, S. (2002). Identification of Nrf2-regulated genes induced by the chemopreventive agent sulforaphane by oligonucleotide microarray, *Cancer Res* 62, 5196-5203.

- [152] Kwak, M. K., Wakabayashi, N., Itoh, K., Motohashi, H., Yamamoto, M. and Kensler, T. W. (2003). Modulation of gene expression by cancer chemopreventive dithiolethiones through the Keap1-Nrf2 pathway. Identification of novel gene clusters for cell survival, *J Biol Chem* 278, 8135-8145.
- [153] Banning, A., Deubel, S., Kluth, D., Zhou, Z. and Brigelius-Flohé, R. (2005). The GI-GPx gene is a target for Nrf2, *Mol Cell Biol* 25, 4914-4923.
- [154] Jialal, I., Traber, M. and Devaraj, S. (2001). Is there a vitamin E paradox?, *Curr Opin Lipidol* 12, 49-53.
- [155] Kritharides, L. and Stocker, R. (2002). The use of antioxidant supplements in coronary heart disease, *Atherosclerosis* 164, 211-219.
- [156] Violi, F. and Cangemi, R. (2005). Antioxidants and cardiovascular disease, *Curr Opin Investig Drugs* 6, 895-900.
- [157] Hathcock, J. N., Azzi, A., Blumberg, J., Bray, T., Dickinson, A., Frei, B., Jialal, I., Johnston, C. S., Kelly, F. J., Kraemer, K., et al. (2005). Vitamins E and C are safe across a broad range of intakes, *Am J Clin Nutr* 81, 736-745.
- [158] Scalbert, A., Johnson, I. T. and Saltmarsh, M. (2005). Polyphenols: antioxidants and beyond, *Am J Clin Nutr* 81, 215S-217S.
- [159] Williamson, G. and Manach, C. (2005). Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. II. Review of 93 intervention studies, *Am J Clin Nutr* 81, 243S-255S.
- [160] Azzi, A., Davies, K. J. and Kelly, F. (2004). Free radical biology - terminology and critical thinking, *FEBS Lett* 558, 3-6.
- [161] Halliwell, B., Rafter, J. and Jenner, A. (2005). Health promotion by flavonoids, tocopherols, tocotrienols, and other phenols: direct or indirect effects? Antioxidant or not?, *Am J Clin Nutr* 81, 268S-276S.
- [162] Martinez-Jimenez, C. P., Gomez-Lechon, M. J., Castell, J. V. and Jover, R. (2005). Transcriptional regulation of the human hepatic CYP3A4: identification of a new distal enhancer region responsive to CCAAT/enhancer-binding protein beta isoforms (liver activating protein and liver inhibitory protein), *Mol Pharmacol* 67, 2088-2101.
- [163] Lehmann, J. M., McKee, D. D., Watson, M. A., Willson, T. M., Moore, J. T. and Kliewer, S. A. (1998). The human orphan nuclear receptor PXR is activated by compounds that regulate CYP3A4 gene expression and cause drug interactions, *J Clin Invest* 102, 1016-1023.
- [164] Mangelsdorf, D. J., Borgmeyer, U., Heyman, R. A., Zhou, J. Y., Ong, E. S., Oro, A. E., Kikizuka, A. and Evans, R. M. (1992). Characterization of three RXR genes that mediate the action of 9-cis retinoic acid, *Genes Dev* 6, 329-344.
- [165] Aden, D. P., Fogel, A., Plotkin, S., Damjanov, I. and Knowles, B. B. (1979). Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line, *Nature* 282, 615-616.
- [166] Fogh, J., Wright, W. C. and Loveless, J. D. (1977). Absence of HeLa cell contamination in 169 cell lines derived from human tumors, *J Natl Cancer Inst* 58, 209-214.
- [167] Azzi, A. and Stocker, A. (2000). Vitamin E: non-antioxidant roles, *Prog Lipid Res* 39, 231-255.
- [168] Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *J Immunol Methods* 65, 55-63.

- [169] Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal Biochem* 72, 248-254.
- [170] Sambrook, J. and Russel, D. W. (eds.). *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2001.
- [171] Wilfinger, W. W., Mackey, K. and Chomczynski, P. (1997). Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity, *Biotechniques* 22, 474-481.
- [172] Okamoto, T. and Okabe, S. (2000). Ultraviolet absorbance at 260 and 280 nm in RNA measurement is dependent on measurement solution, *Int J Mol Med* 5, 657-659.
- [173] Mullis, K. B. and Faloona, F. A. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction, *Methods Enzymol* 155, 335-350.
- [174] Ho, S. N., Hunt, H. D., Horton, R. M., Pullen, J. K. and Pease, L. R. (1989). Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction, *Gene* 77, 51-59.
- [175] de Wet, J. R., Wood, K. V., DeLuca, M., Helinski, D. R. and Subramani, S. (1987). Firefly luciferase gene: structure and expression in mammalian cells, *Mol Cell Biol* 7, 725-737.
- [176] DeLuca, M. and McElroy, W. D. (1984). Two kinetically distinguishable ATP sites in firefly luciferase, *Biochem Biophys Res Commun* 123, 764-770.
- [177] Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227, 680-685.
- [178] McCormick, C. C. and Parker, R. S. (2004). The cytotoxicity of vitamin E is both vitamer- and cell-specific and involves a selectable trait, *J Nutr* 134, 3335-3342.
- [179] Yu, W., Simmons-Menchaca, M., Gapor, A., Sanders, B. G. and Kline, K. (1999). Induction of apoptosis in human breast cancer cells by tocopherols and tocotrienols, *Nutr Cancer* 33, 26-32.
- [180] Quandt, K., Frech, K., Karas, H., Wingender, E. and Werner, T. (1995). MatInd and MatInspector: new fast and versatile tools for detection of consensus matches in nucleotide sequence data, *Nucleic Acids Res* 23, 4878-4884.
- [181] Zhou, C., Tabb, M. M., Sadatrafiei, A., Grün, F. and Blumberg, B. (2004). Tocotrienols activate the steroid and xenobiotic receptor, SXR, and selectively regulate expression of its target genes, *Drug Metab Dispos* 32, 1075-1082.
- [182] Jounaidi, Y., Guzelian, P. S., Maurel, P. and Vilarem, M. J. (1994). Sequence of the 5'-flanking region of CYP3A5: comparative analysis with CYP3A4 and CYP3A7, *Biochem Biophys Res Commun* 205, 1741-1747.
- [183] Landes, N. (2005). Vitamin E : elucidation of the mechanism of side chain degradation and gene regulatory functions, *Dissertation* Universität Potsdam.
- [184] Jeyapaul, J. and Jaiswal, A. K. (2000). Nrf2 and c-Jun regulation of antioxidant response element (ARE)-mediated expression and induction of gamma-glutamylcysteine synthetase heavy subunit gene, *Biochem Pharmacol* 59, 1433-1439.
- [185] Chan, K. and Kan, Y. W. (1999). Nrf2 is essential for protection against acute pulmonary injury in mice, *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 12731-12736.
- [186] Kang, K. W., Lee, S. J., Park, J. W. and Kim, S. G. (2002). Phosphatidylinositol 3-kinase regulates nuclear translocation of NF-E2-related factor 2 through actin rearrangement in response to oxidative stress, *Mol Pharmacol* 62, 1001-1010.

- [187] Saito, Y., Yoshida, Y., Nishio, K., Hayakawa, M. and Niki, E. (2004). Characterization of cellular uptake and distribution of vitamin E, *Ann N Y Acad Sci* 1031, 368-375.
- [188] Noguchi, N., Hanyu, R., Nonaka, A., Okimoto, Y. and Kodama, T. (2003). Inhibition of THP-1 cell adhesion to endothelial cells by alpha-tocopherol and alpha-tocotrienol is dependent on intracellular concentration of the antioxidants, *Free Radic Biol Med* 34, 1614-1620.
- [189] Sen, C. K., Khanna, S., Roy, S. and Packer, L. (2000). Molecular basis of vitamin E action. Tocotrienol potently inhibits glutamate-induced pp60(c-Src) kinase activation and death of HT4 neuronal cells, *J Biol Chem* 275, 13049-13055.
- [190] Pal, S., Thomson, A. M., Bottema, C. D. and Roach, P. D. (2003). Alpha-tocopherol modulates the low density lipoprotein receptor of human HepG2 cells, *Nutr J* 2, 3.
- [191] Jiang, Q., Elson-Schwab, I., Courtemanche, C. and Ames, B. N. (2000). Gamma-tocopherol and its major metabolite, in contrast to alpha-tocopherol, inhibit cyclooxygenase activity in macrophages and epithelial cells, *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 11494-11499.
- [192] Gao, R., Stone, W. L., Huang, T., Papas, A. M. and Qui, M. (2002). The uptake of tocopherols by RAW 264.7 macrophages, *Nutr J* 1, 2.
- [193] Kolléck, I., Schlame, M., Fechner, H., Looman, A. C., Wissel, H. and Rustow, B. (1999). HDL is the major source of vitamin E for type II pneumocytes, *Free Radic Biol Med* 27, 882-890.
- [194] Witt, W., Kolléck, I., Fechner, H., Sinha, P. and Rustow, B. (2000). Regulation by vitamin E of the scavenger receptor BI in rat liver and HepG2 cells, *J Lipid Res* 41, 2009-2016.
- [195] Yu-Poth, S., Yin, D., Kris-Etherton, P. M., Zhao, G. and Etherton, T. D. (2005). Long-chain polyunsaturated fatty acids upregulate LDL receptor protein expression in fibroblasts and HepG2 cells, *J Nutr* 135, 2541-2545.
- [196] Leonard, S. W., Terasawa, Y., Farese, R. V., Jr. and Traber, M. G. (2002). Incorporation of deuterated RRR- or all-rac-alpha-tocopherol in plasma and tissues of alpha-tocopherol transfer protein--null mice, *Am J Clin Nutr* 75, 555-560.
- [197] Schuelke, M., Elsner, A., Finckh, B., Kohlschütter, A., Hübner, C. and Brigelius-Flohé, R. (2000). Urinary alpha-tocopherol metabolites in alpha-tocopherol transfer protein-deficient patients, *J. Lipid. Res.* 41, 1543-1551.
- [198] Clément, M. and Bourre, J. M. (1997). Graded dietary levels of RRR-gamma-tocopherol induce a marked increase in the concentrations of alpha- and gamma-tocopherol in nervous tissues, heart, liver and muscle of vitamin-E-deficient rats, *Biochim Biophys Acta* 1334, 173-181.
- [199] Podda, M., Weber, C., Traber, M. G. and Packer, L. (1996). Simultaneous determination of tissue tocopherols, tocotrienols, ubiquinol, and ubiquinone, *J Lipid Res* 37, 893-901.
- [200] Frank, J., Lundh, T., Parker, R. S., Swanson, J. E., Vessby, B. and Kamal-Eldin, A. (2003). Dietary (+)-catechin and BHT markedly increase alpha-tocopherol concentrations in rats by a tocopherol-omega-hydroxylase-independent mechanism, *J Nutr* 133, 3195-3199.
- [201] Khanna, S., Patel, V., Rink, C., Roy, S. and Sen, C. K. (2005). Delivery of orally supplemented alpha-tocotrienol to vital organs of rats and tocopherol-transport protein deficient mice, *Free Radic Biol Med* 39, 1310-1319.
- [202] Yoshikawa, S., Morinobu, T., Hamamura, K., Hirahara, F., Iwamoto, T. and Tamai, H. (2005). The effect of gamma-tocopherol administration on alpha-tocopherol levels and metabolism in humans, *Eur J Clin Nutr* 59, 900-905.

- [203] Conte, C., Floridi, A., Aisa, C., Piroddi, M. and Galli, F. (2004). Gamma-tocotrienol metabolism and antiproliferative effect in prostate cancer cells, *Ann N Y Acad Sci* 1031, 391-394.
- [204] You, C. S., Sontag, T. J., Swanson, J. E. and Parker, R. S. (2005). Long-chain carboxy-chromanols are the major metabolites of tocopherols and tocotrienols in A549 lung epithelial cells but not HepG2 cells, *J Nutr* 135, 227-232.
- [205] Swanson, J. E., Ben, R. N., Burton, G. W. and Parker, R. S. (1999). Urinary excretion of 2,7, 8-trimethyl-2-(beta-carboxyethyl)-6-hydroxychroman is a major route of elimination of  $\gamma$ -tocopherol in humans, *J Lipid Res* 40, 665-671.
- [206] Traber, M. G., Elsner, A. and Brigelius-Flohé, R. (1998). Synthetic as compared with natural vitamin E is preferentially excreted as alpha-CEHC in human urine: studies using deuterated alpha-tocopheryl acetates, *FEBS Lett* 437, 145-148.
- [207] Dussault, I., Yoo, H. D., Lin, M., Wang, E., Fan, M., Batta, A. K., Salen, G., Erickson, S. K. and Forman, B. M. (2003). Identification of an endogenous ligand that activates pregnane X receptor-mediated sterol clearance, *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 833-838.
- [208] Goodwin, B., Gauthier, K. C., Umetani, M., Watson, M. A., Lochansky, M. I., Collins, J. L., Leitersdorf, E., Mangelsdorf, D. J., Kliewer, S. A. and Repa, J. J. (2003). Identification of bile acid precursors as endogenous ligands for the nuclear xenobiotic pregnane X receptor, *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 223-228.
- [209] Plant, N. J. and Gibson, G. G. (2003). Evaluation of the toxicological relevance of CYP3A4 induction, *Curr Opin Drug Discov Devel* 6, 50-56.
- [210] Pfluger, P., Kluth, D., Brigelius-Flohe, R. and Bumke-Vogt, C. Evidence for a vitamin E induced gene expression by direct binding to the pregnane X receptor, *Poster at the annual spring meeting of the German Society for Biochemistry and Molecular Biology (GBM), Mosbach (Germany), April 1-3, 2004*, (DOI:10.1240/sav\_gbm\_2004\_m\_000450).
- [211] Nelson, D. R. (1999). Cytochrome P450 and the individuality of species, *Arch Biochem Biophys* 369, 1-10.
- [212] Traber, M. G., Siddens, L. K., Leonard, S. W., Schock, B., Gohil, K., Krueger, S. K., Cross, C. E. and Williams, D. E. (2005). alpha-Tocopherol modulates Cyp3a expression, increases gamma-CEHC production, and limits tissue gamma-tocopherol accumulation in mice fed high gamma-tocopherol diets, *Free Radic Biol Med* 38, 773-785.
- [213] Jones, S. A., Moore, L. B., Shenk, J. L., Wisely, G. B., Hamilton, G. A., McKee, D. D., Tomkinson, N. C., LeCluyse, E. L., Lambert, M. H., Willson, T. M., et al. (2000). The pregnane X receptor: a promiscuous xenobiotic receptor that has diverged during evolution, *Mol Endocrinol* 14, 27-39.
- [214] Kluth, D., Landes, N., Pfluger, P., Müller-Schmehl, K., Weiss, K., Bumke-Vogt, C., Ristow, M. and Brigelius-Flohé, R. (2005). Modulation of Cyp3a11 mRNA expression by alpha-tocopherol but not gamma-tocotrienol in mice, *Free Radic Biol Med* 38, 507-514.
- [215] Xie, W., Barwick, J. L., Simon, C. M., Pierce, A. M., Safe, S., Blumberg, B., Guzelian, P. S. and Evans, R. M. (2000). Reciprocal activation of xenobiotic response genes by nuclear receptors SXR/PXR and CAR, *Genes Dev* 14, 3014-3023.
- [216] Staudinger, J. L., Goodwin, B., Jones, S. A., Hawkins-Brown, D., MacKenzie, K. I., LaTour, A., Liu, Y., Klaassen, C. D., Brown, K. K., Reinhard, J., et al. (2001). The nuclear receptor PXR is a lithocholic acid sensor that protects against liver toxicity, *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 3369-3374.
- [217] Dürr, D., Stieger, B., Kullak-Ublick, G. A., Rentsch, K. M., Steinert, H. C., Meier, P. J. and Fattering, K. (2000). St John's Wort induces intestinal P-glycoprotein/MDR1 and intestinal and hepatic CYP3A4, *Clin Pharmacol Ther* 68, 598-604.

- [218] Wentworth, J. M., Agostini, M., Love, J., Schwabe, J. W. and Chatterjee, V. K. (2000). St John's wort, a herbal antidepressant, activates the steroid X receptor, *J Endocrinol* 166, R11-R16.
- [219] Moore, L. B., Goodwin, B., Jones, S. A., Wisely, G. B., Serabjit-Singh, C. J., Willson, T. M., Collins, J. L. and Kliewer, S. A. (2000). St. John's wort induces hepatic drug metabolism through activation of the pregnane X receptor, *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 7500-7502.
- [220] Lawvere, S. and Mahoney, M. C. (2005). St. John's wort, *Am Fam Physician* 72, 2249-2254.
- [221] Geick, A., Eichelbaum, M. and Burk, O. (2001). Nuclear receptor response elements mediate induction of intestinal MDR1 by rifampin, *J Biol Chem* 276, 14581-14587.
- [222] Synold, T. W., Dussault, I. and Forman, B. M. (2001). The orphan nuclear receptor SXR coordinately regulates drug metabolism and efflux, *Nat Med* 7, 584-590.
- [223] Miller, E. R., 3rd, Pastor-Barriuso, R., Dalal, D., Riemersma, R. A., Appel, L. J. and Guallar, E. (2005). Meta-analysis: high-dosage vitamin E supplementation may increase all-cause mortality, *Ann Intern Med* 142, 37-46.
- [224] Shimada, T. and Guengerich, F. P. (1989). Evidence for cytochrome P-450NF, the nifedipine oxidase, being the principal enzyme involved in the bioactivation of aflatoxins in human liver, *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 462-465.
- [225] Aoyama, T., Yamano, S., Guzelian, P. S., Gelboin, H. V. and Gonzalez, F. J. (1990). Five of 12 forms of vaccinia virus-expressed human hepatic cytochrome P450 metabolically activate aflatoxin B1, *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 4790-4793.
- [226] El-Serag, H. B. and Mason, A. C. (1999). Rising incidence of hepatocellular carcinoma in the United States, *N Engl J Med* 340, 745-750.
- [227] Moore, J. T., Moore, L. B., Maglich, J. M. and Kliewer, S. A. (2003). Functional and structural comparison of PXR and CAR, *Biochim Biophys Acta* 1619, 235-238.
- [228] Chen, C., Staudinger, J. L. and Klaassen, C. D. (2003). Nuclear receptor, pregnane X receptor, is required for induction of UDP-glucuronosyltransferases in mouse liver by pregnenolone-16 alpha-carbonitrile, *Drug Metab Dispos* 31, 908-915.
- [229] Sonoda, J., Xie, W., Rosenfeld, J. M., Barwick, J. L., Guzelian, P. S. and Evans, R. M. (2002). Regulation of a xenobiotic sulfonation cascade by nuclear pregnane X receptor (PXR), *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 13801-13806.
- [230] Blomhoff, R. (2005). Dietary antioxidants and cardiovascular disease, *Curr Opin Lipidol* 16, 47-54.
- [231] Jacobs, M. N., Nolan, G. T. and Hood, S. R. (2005). Lignans, bacteriocides and organochlorine compounds activate the human pregnane X receptor (PXR), *Toxicol Appl Pharmacol* 209, 123-133.
- [232] Mitsunaga, Y., Takanaga, H., Matsuo, H., Naito, M., Tsuruo, T., Ohtani, H. and Sawada, Y. (2000). Effect of bioflavonoids on vincristine transport across blood-brain barrier, *Eur J Pharmacol* 395, 193-201.
- [233] Alia, M., Mateos, R., Ramos, S., Lecumberri, E., Bravo, L. and Goya, L. (2006). Influence of quercetin and rutin on growth and antioxidant defense system of a human hepatoma cell line (HepG2), *Eur J Nutr* 45, 19-28.
- [234] Liu, D. Y., Yang, M., Zhu, H. J., Zheng, Y. F. and Zhu, X. Q. (2006). [Human pregnane X receptor-mediated transcriptional regulation of cytochrome P450 3A4 by some phytochemicals], *Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 35, 8-13, Referenz: Abstrakt.

- [235] Moon, Y. J., Wang, X. and Morris, M. E. (2006). Dietary flavonoids: Effects on xenobiotic and carcinogen metabolism, *Toxicol In Vitro* 20, 187-210.
- [236] Fahey, J. W. and Talalay, P. (1999). Antioxidant functions of sulforaphane: a potent inducer of Phase II detoxication enzymes, *Food Chem Toxicol* 37, 973-979.
- [237] Mahéo, K., Morel, F., Langouet, S., Kramer, H., Le Ferrec, E., Ketterer, B. and Guillouzo, A. (1997). Inhibition of cytochromes P-450 and induction of glutathione S-transferases by sulforaphane in primary human and rat hepatocytes, *Cancer Res* 57, 3649-3652.
- [238] Paolini, M., Perocco, P., Canistro, D., Valgimigli, L., Pedulli, G. F., Iori, R., Croce, C. D., Cantelli-Forti, G., Legator, M. S. and Abdel-Rahman, S. Z. (2004). Induction of cytochrome P450, generation of oxidative stress and in vitro cell-transforming and DNA-damaging activities by glucoraphanin, the bioprecursor of the chemopreventive agent sulforaphane found in broccoli, *Carcinogenesis* 25, 61-67.
- [239] Kobayashi, S., Watanabe, J., Fukushi, E., Kawabata, J., Nakajima, M. and Watanabe, M. (2003). Polyphenols from some foodstuffs as inhibitors of ovalbumin permeation through caco-2 cell monolayers, *Biosci Biotechnol Biochem* 67, 1250-1257.
- [240] Wasserman, W. W. and Fahl, W. E. (1997). Functional antioxidant responsive elements, *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 5361-5366.
- [241] Ramos-Gomez, M., Kwak, M. K., Dolan, P. M., Itoh, K., Yamamoto, M., Talalay, P. and Kensler, T. W. (2001). Sensitivity to carcinogenesis is increased and chemoprotective efficacy of enzyme inducers is lost in nrf2 transcription factor-deficient mice, *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 3410-3415.
- [242] Cho, H. Y., Reddy, S. P., Debiase, A., Yamamoto, M. and Kleeberger, S. R. (2005). Gene expression profiling of NRF2-mediated protection against oxidative injury, *Free Radic Biol Med* 38, 325-343.
- [243] Robak, J. and Gryglewski, R. J. (1996). Bioactivity of flavonoids, *Pol J Pharmacol* 48, 555-564.
- [244] Boots, A. W., Kubben, N., Haenen, G. R. and Bast, A. (2003). Oxidized quercetin reacts with thiols rather than with ascorbate: implication for quercetin supplementation, *Biochem Biophys Res Commun* 308, 560-565.
- [245] Nguyen, T. T., Tran, E., Nguyen, T. H., Do, P. T., Huynh, T. H. and Huynh, H. (2004). The role of activated MEK-ERK pathway in quercetin-induced growth inhibition and apoptosis in A549 lung cancer cells, *Carcinogenesis* 25, 647-659.
- [246] Esworthy, R. S., Yang, L., Frankel, P. H. and Chu, F. F. (2005). Epithelium-specific glutathione peroxidase, Gpx2, is involved in the prevention of intestinal inflammation in selenium-deficient mice, *J Nutr* 135, 740-745.
- [247] Yuan, H., Pan, Y. and Young, C. Y. (2004). Overexpression of c-Jun induced by quercetin and resverol inhibits the expression and function of the androgen receptor in human prostate cancer cells, *Cancer Lett* 213, 155-163.
- [248] Mutoh, M., Takahashi, M., Fukuda, K., Matsushima-Hibiya, Y., Mutoh, H., Sugimura, T. and Wakabayashi, K. (2000). Suppression of cyclooxygenase-2 promoter-dependent transcriptional activity in colon cancer cells by chemopreventive agents with a resorcin-type structure, *Carcinogenesis* 21, 959-963.
- [249] Thalmann, S. (2006). Funktionsanalyse der gastrointestinalen Gultathionperoxidase durch einen siRNA-vermittelten Knockdown: Regulation der COX-2 Expression in HT-29 Zellen, *Diplomarbeit* Universität Potsdam.

- 
- [250] Aggarwal, B. B. and Shishodia, S. (2004). Suppression of the nuclear factor-kappaB activation pathway by spice-derived phytochemicals: reasoning for seasoning, *Ann N Y Acad Sci* 1030, 434-441.
- [251] Verhoeven, D. T., Goldbohm, R. A., van Poppel, G., Verhagen, H. and van den Brandt, P. A. (1996). Epidemiological studies on brassica vegetables and cancer risk, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 5, 733-748.
- [252] Brigelius-Flohé, R. and Joost, H.-G. (eds.). Nutritional Genomics, Impact on Health and Disease, *WILEY-VCH Verlag, Weinheim*, 2006.
- [253] Allen, R. G. and Tresini, M. (2000). Oxidative stress and gene regulation, *Free Radic Biol Med* 28, 463-499.
- [254] Itoh, K., Tong, K. I. and Yamamoto, M. (2004). Molecular mechanism activating Nrf2-Keap1 pathway in regulation of adaptive response to electrophiles, *Free Radic Biol Med* 36, 1208-1213.
- [255] Wiese, A. G., Pacifici, R. E. and Davies, K. J. (1995). Transient adaptation of oxidative stress in mammalian cells, *Arch Biochem Biophys* 318, 231-240.

---

## Danksagung

*„Leider lässt sich eine wahrhafte Dankbarkeit mit Worten nicht ausdrücken.“*

Johann Wolfgang von Goethe (1749-1832)

Trotzdem danke ich ganz besonders Prof. Dr. Regina Brigelius-Flohé für die Ermöglichung dieser Dissertation. Ich danke ihr für die Überlassung des Themas und die stets gewährte Hilfe und Unterstützung. Vielen Dank!

Allen Gutachter/-innen bin ich für ihre Bereitschaft zur Übernahme der Gutachtertätigkeit dankbar.

Ich danke ALLEN ehemaligen und jetzigen Mitarbeiter/-innen der Abteilung „Biochemie der Mikronährstoffe“ des Deutschen Instituts für Ernährungsforschung für jegliche Hilfestellungen sowie für das sehr angenehme und freundschaftliche Arbeitsklima, welches mir eine schöne Zeit beschert hat und auch immer über – trotz aller Begeisterung – mal vorhandener „Motivationstiefs“ hinweg geholfen hat. Den technischen Mitarbeiter/-innen Elvira Krohn, Jörg-Uwe Bittner, aber ganz besonders Stefanie Deubel danke ich für ihre Hilfe und Unterstützung und das Gefühl, dass Fragen stellen erlaubt war!

Für - auf immerwährende Diskussionsbereitschaft und „offene Ohren“ beruhende – anregende und bereichernde Diskussionen und Gespräche gilt mein ganz besonders herzlicher Dank meinen Mitstreiter/-innen, mit denen ich einige Zeit im Institut und auch außerhalb verbracht habe: Antje Banning, Nico Landes, Paul Pfluger, Nadine Jurrmann, Sandra Nell, Anna Kipp, Daniela Kuka, Mandy Osterloh-Quiroz und Melanie Kny.

Meinen ministeriellen Kollegen/-innen vom Referat 23, den Kollegen Andreas Langer und Peter Kruse, sowie Hans-Jürgen Meuche danke ich für immerwährenden Zuspruch und stets gut gemeinten Ansporn.

Antje Banning und Heike Puttkammer danke sehr ich für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Nicht zuletzt danke ich auch meiner Familie, die immer Verständnis für mich und meine Wege hat, mir Rückenhalt gibt und so auch zum Zustandekommen dieser Arbeit beigetragen hat. Vielen lieben Dank! .... und alle, die ich hier nicht extra erwähnt habe, mögen mir das bitte nachsehen! Ich bin ihnen trotzdem sehr dankbar.

---

## Lebenslauf

### *persönliche Angaben*

Wohnort: Potsdam  
Geburtstag: 19.11.1970  
Geburtsort: Pritzwalk

### *schulischer, beruflicher und wissenschaftlicher Werdegang*

- 09/1977 – 08/1987 Polytechnische Oberschule „Geschwister Scholl“ in Meyenburg  
Abschluss: Mittlere Reife
- 09/1987 – 08/1989 Erweiterte Oberschule „Goethe-Schule II“ in Pritzwalk  
Abschluss: Abitur
- 09/1989 – 08/1990 Grundwehrdienst
- 09/1990 – 08/1993 Studium der Verwaltungswissenschaft an den Fachhochschulen für öffentliche Verwaltung des Landes Nordrhein-Westfalen in Münster und Düsseldorf, Fachbereich: Staatlicher Verwaltungsdienst  
Abschluss: Diplom-Verwaltungswirt (FH)
- 09/1993 – dato<sup>1</sup> Mitarbeiter im Ministerium für Bildung, Jugend und Sport des Landes Brandenburg in Potsdam
- 10/1995 – 12/2001 Studium der Biologie an der Freien Universität Berlin, Fachbereich: Biologie, Chemie und Pharmazie  
Hauptfach: Zoologie  
Nebenfächer: Zellbiologie, Humanbiologie/Anthropologie  
Abschluss: Diplom-Biologe
- 04/2001 – 12/2001:  
Diplomarbeit am Deutschen Institut für Ernährungsforschung Potsdam-Rehbrücke, Abt. Vitamine und Atherosklerose, unter Leitung von Prof. Dr. Regina Brigelius-Flohé zum Thema: „Metabolismus von Vitamin E – Qualitative und quantitative Bestimmung von Intermediaten des Abbauweges und seine Induktion“
- 01/2002 – 01/2006 Wissenschaftliche Arbeiten am Deutschen Institut für Ernährungsforschung Potsdam-Rehbrücke, Abt. Biochemie der Mikronährstoffe (ehemals Abt. Vitamine und Atherosklerose), unter Leitung von Prof. Dr. Regina Brigelius-Flohé

---

<sup>1</sup> während des Biologie- und Promotionsstudiums beurlaubt oder zur Finanzierung der Studien teilzeitbeschäftigt