

Aus der Abteilung "Biochemie der Mikronährstoffe" am
Deutschen Institut für Ernährungsforschung,
Potsdam-Rehbrücke

Der Metabolismus der Tocopherole und Tocotrienole

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

"doctor rerum naturalium"

(Dr. rer. nat.)

in der Wissenschaftsdisziplin „Biochemie der Ernährung“

eingereicht an der
Mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Potsdam

von

Paul Thomas Pfluger

Geboren am 30.10.1973 in Kaufbeuren

Potsdam, Juli 2007

Elektronisch veröffentlicht auf dem
Publikationsserver der Universität Potsdam:
<http://opus.kobv.de/ubp/volltexte/2008/1601/>
[urn:nbn:de:kobv:517-opus-16011](http://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:kobv:517-opus-16011)
[<http://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:kobv:517-opus-16011>]

If we knew what we were doing, it wouldn't be called research, would it ?

Albert Einstein (1879-1955)

Danksagung

Meinen herzlichsten Dank möchte ich gern all denen aussprechen, die mich auf dem Weg zur Entstehung dieser Doktorarbeit begleitet haben.

Ganz besonders danken möchte ich Prof. Dr. Regina Brigelius-Flohé. Nicht nur für die Überlassung des Themas und die stets gewährte Hilfe und Unterstützung, sondern v.a. für die Geduld, die sie bis zur Entstehung dieser Arbeit für mich aufgebracht hat. Herzlichen Dank !

Allen Gutachter/-innen möchte ich danken für ihre Bereitschaft zur Übernahme der Gutachtertätigkeit.

Nicht zuletzt danken möchte ich ALLEN ehemaligen und jetzigen Mitarbeiter/-innen der Abteilung „Biochemie der Mikronährstoffe“ des Deutschen Instituts für Ernährungsforschung. V.a. den technischen Mitarbeiter/-innen Elvira Krohn und Stefanie Deubel, die mir bei so vielen Experimenten geholfen hatten (und mich den Brutschrank putzen liessen). Bei den vielen damaligen und jetzigen Diplomandinnen und Doktorandinnen, die ich in der Zeit meiner Doktorarbeit erleben durfte, und die die Arbeit stets mit Enthusiasmus, einem guten Klima im Kaffeeraum, und Spass am Forschen erfüllt haben. Bei Marc Birringer, der mir die „ersten Schritte“ im Vitamin E – Metabolismus beigebracht hat, und mir mit viel Herz und Verstand den Weg durch die Doktorarbeit bereitet hat. Und natürlich bei Antje Banning, Daniela Kuka, Nadine Jurrmann, Dirk Kluth, und Nico Landes, meinen damaligen Mitstreitern, mit denen ich eine solch schöne Zeit erleben durfte. Wir waren ein tolles Team !

Auch ausserhalb der AVA gibt es viele, denen ich herzlichst danken will. Simone Florian, die mir massgeblich bei der Caspase 3 Färbung geholfen hat. Wolfram „Pummel“ Ernst, dem Filigrantechniker an Ball und LC/MS, ohne den ich heute noch keinen Metaboliten identifiziert haben würde, sowie Dr. Klaus Petzke, der mir bei allen Problemen mit der GC/MS zur Seite stand.

Nicht zuletzt danke ich auch meiner Familie und v.a. Kerstin, die immer für mich da waren, und so am Ende tatkräftig zum Zustandekommen dieser Arbeit beigetragen haben. Besonders Kerstin danke ich für die Korrekturen, und für die lange Geduld und Unterstützung, in guten wie in schlechten Zeiten. Danke !

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	VI
Abkürzungsverzeichnis	VII
Zusammenfassung	VIII
Summary	X
1 EINLEITUNG	1
1.1 Vitamin E – von der Entdeckung zur Aufklärung der Struktur	1
1.2 Das Vorkommen von Vitamin E in der menschlichen Nahrung und die empfohlene Zufuhr	2
1.3 Funktionen von Vitamin E	4
1.3.1 Die antioxidative Wirkung von Vitamin E	4
1.3.2 Nicht-antioxidative Wirkungen von Vitamin E	7
1.4 Die Bioverfügbarkeit von Vitamin E	8
1.4.1 Aufnahme und Resorption von Vitamin E	8
1.4.2 Verteilung von Vitamin E und die Rolle des α -Tocopherol-Transfer-Proteins ...	9
1.4.3 Metabolismus und Ausscheidung von Vitamin E	11
2 ZIELE DER ARBEIT	15
3 MATERIAL UND METHODEN	16
3.1 Material	16
3.1.1 Chemikalien	16
3.1.2 Vitamin E – Standards und Metaboliten	17
3.1.3 Puffer und Lösungen	18
3.2 Methoden	19
3.2.1 Zellkultur	19
3.2.2 Kultivierung der Zellen	19

3.2.3	Herstellung von Vitamin E – angereichertem Medium.....	19
3.3	Tierhaltung.....	20
3.4	Messung der Zytotoxizität verschiedener Vitamin E – Formen in HepG2-Zellen.....	21
3.4.1	MTT-Test	21
3.4.2	Nachweis von Apoptose in mit α -Tocopherol- bzw. γ -Tocotrienol-behandelten HepG2 – Zellen.....	22
3.5	Aufnahme von Vitamin E in Zellen	23
3.5.1	Kultivierung und Ernte der Zellen sowie Herstellung des Zelllysats	23
3.5.2	Extraktion von Vitamin E aus Zelllysat.....	23
3.5.3	Messung von Vitamin E in Zelllysaten mittels HPLC	24
3.5.4	Bestimmung der Proteinkonzentration der Zellen.....	24
3.6	Messung von Vitamin E - Metaboliten in Zellkulturmedien mittels HPLC	25
3.6.1	Oxidationsgeschützte Aufarbeitung von Metaboliten aus Zellkulturmedium ...	25
3.6.2	Analyse von Vitamin E- Metaboliten mittels HPLC	25
3.7	Messung von Carboxyethylhydroxychroman (CEHC) sowie Carboxymethylbutylhydroxychroman (CMBHC) in Mäuseurin mittels GC/MS	26
3.7.1	Extraktion von Vitamin E – Metaboliten aus Mäuseurin	26
3.7.2	GC/MS-Messung der urinären Metaboliten von Vitamin E	27
3.8	Messung der Hydroxylierungsrate von Vitamin E mit Hilfe von Rattenleber-Mikrosomen	28
3.8.1	Rattenleber-Mikrosomenpräparation	28
3.8.2	Bestimmung der Hydroxylierungsraten der verschiedenen Vitamin E - Formen mit Rattenleber - Mikrosomen.....	28
3.8.3	Analyse von hydroxyliertem sowie carboxyliertem Vitamin E mittels HPLC	29
3.8.4	Identifizierung der hydroxylierten sowie carboxylierten Vitamin E-Formen mittels LC/MS.....	30
4	ERGEBNISSE.....	31
4.1	Identifizierung neuer Metabolite im Abbau von Vitamin E	31
4.1.1	Toxizität der Tocopherole und Tocotrienole auf HepG2-Zellen	31

4.1.2	Nachweis von Intermediaten der β -Oxidation von α -Tocotrienol und γ -Tocotrienol	32
4.1.3	Bestätigung der initialen ω -Hydroxylierung durch die Identifizierung der hydroxylierten und carboxylierten Vitamin E – Formen	37
4.1.4	Der Abbau der Tocotrienole am Beispiel von γ -Tocotrienol	41
4.2	Quantitativer Nachweis von Vitamin E – Metaboliten <i>in vitro</i>	43
4.2.1	Aufnahme der verschiedenen Vitamin E - Formen in HepG2 - Zellen.....	43
4.2.2	Quantitativer Nachweis der Vitamin E - Metabolite α -CEHC, α -CMBHC, γ -CEHC und γ -CMBHC in HepG2-Zellen.....	44
4.2.3	ω -Hydroxylierung von Vitamin E mit Rattenleber-Mikrosomen.....	48
4.3	Metabolismus von α-Tocopherol und γ-Tocotrienol <i>in vivo</i>.....	54
4.3.1	Versuchsaufbau.....	54
4.3.2	α -Tocopherol - und γ -Tocotrienol – Gehalte in Plasma und Leber	55
4.3.3	Ausscheidung von α -Tocopherol- und γ -Tocotrienol-Metaboliten im Urin männlicher Mäuse:.....	56
4.3.4	α -CEHC- und α -CMBHC-Ausscheidung in Abhängigkeit zur Dauer der Fütterung.....	58
5	DISKUSSION	59
5.1	Seitenkettenverkürzung von Vitamin E.....	59
5.2	Quantitative Aspekte im Vitamin E – Metabolismus <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	61
5.2.1	CEHC und CMBHC bilden die Hauptmetaboliten von Vitamin E <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	61
5.2.2	α -Tocopherol wird <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i> in weit schwächerem Maße metabolisiert als die anderen Vitamin E – Formen.....	63
5.2.3	α -Tocopherol Transfer Protein schützt α -Tocopherol selektiv vor dem Abbau.....	66
5.2.4	Die ω -Hydroxylierung durch Cytochrom P450 reguliert die Höhe des Abbaus der verschiedenen Vitamin E – Formen.....	67
5.3	Die Rolle des Vitamin E – Metabolismus im Hinblick auf Bioverfügbarkeit und biologische Wirkung	70
5.3.1	Vitamin E und der Arzneimittelstoffwechsel.....	70
5.3.2	Die apoptotische Wirkung von γ -Tocotrienol.....	72

5.4	Synopsis: Die biologische Bedeutung des Vitamin E – Metabolismus	75
6	APPENDIX.....	77
7	LITERATURVERZEICHNIS.....	80

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1	Strukturformeln der Tocopherole und Tocotrienole	2
Abb. 1.4	Abbau von α -Tocopherol	13
Abb. 3.1	Umsetzung von MTT zu Formazan zur Messung der Zellvitalität	21
Abb. 4.1	MTT-Test zur Messung der Zellviabilität von HepG2-Zellen.	31
Abb. 4.2	HPLC - Chromatogramm von α -Tocotrienolmetaboliten in HepG2-Zellen.....	33
Abb. 4.3	Massenspektren der α -Tocotrienol-Metaboliten	34
Abb. 4.4	HPLC - Chromatogramm von γ -Tocotrienolmetaboliten in HepG2-Zellen.....	35
Abb. 4.5	Massenspektren der γ -Tocotrienol-Metaboliten.....	36
Abb. 4.6	LC – Chromatogramm der ω -Hydroxylierungsprodukte von α -Tocotrienol	38
Abb. 4.7	Massenspektren der hydroxylierten bzw. carboxylierten Vitamin E - Formen nach LC/MS- Messung mit APCI +	40
Abb. 4.8	Mechanismus der Seitenkettenverkürzung von Tocotrienolen am Beispiel von γ -Tocotrienol.....	42
Abb. 4.9	Aufnahme von Vitamin E in HepG2-Zellen	43
Abb. 4.10	Elektrochemische Detektion von α -Tocopherol.....	44
Abb. 4.11	Voltogramm der synthetischen Standards γ -CEHC, α -CEHC, α -CPHC sowie α -CMBHC.....	45
Abb. 4.12:	Bestimmung der Responsefaktoren von α -CEHC, γ -CEHC sowie α -CMBHC im Vergleich zum internen Standard α -CPHC.....	46
Abb. 4.13	Metabolismus von Tocopherolen (Toc) und Tocotrienolen (T3) in HepG2–Zellen.	47
Abb. 4.14	Optimierung der ω -Hydroxylierung von γ -Tocotrienol durch Rattenleber-Mikrosomen.....	49
Abb. 4.15	ω -Hydroxylierung von Vitamin E durch Rattenleber-Mikrosomen	51
Abb. 4.16	Hemmung der ω -Hydroxylierung von γ -Tocotrienol durch Ketoconazol und Metyrapon	53
Abb. 4.17	Urinäre Ausscheidung von α -Tocopherol- und γ -Tocotrienolmetaboliten.....	56
Abb. 6.1	Immunhistochemischer Nachweis von Caspase 3 in HepG2-Zellen nach 24 h Inkubation mit α -Tocopherol bzw. γ -Tocotrienol	78
Abb. 6.2	Immunhistochemischer Nachweis von Caspase 3 in HepG2-Zellen nach 48 h Inkubation mit <i>RRR</i> - α -Tocopherol bzw. γ -Tocotrienol	78

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1:	Effektivität der individuellen Vitamin E – Formen im Ratten-Resorptionstest....	3
Tabelle 3.1:	Responsefaktoren der Tocopherole und Tocotrienole.....	24
Tabelle 4.1:	Responsefaktoren von α -CEHC, γ -CEHC und α -CMBHC	46
Tabelle 4.2:	V_{\max} und K_m -Werte der ω -Hydroxylierung von Vitamin E durch Rattenleber-Mikrosomen.....	52
Tabelle 4.3:	Übersicht zu den Fütterungsgruppen, der Fütterungsdauer, sowie der Anzahl der männlichen C57BL6 Tiere, bei denen Vitamin E - Metabolite im Urin durch GC/MS bestimmt wurden.....	54
Tabelle 4.4:	α -Tocopherolgehalte in Plasma und Leber von C57BL6-Mäusen	55
Tabelle 4.5:	Urinäre Ausscheidung von α -Tocopherol- und γ -Tocotrienolmetaboliten in männlichen C57BL6-Mäusen nach einer 3-monatigen Diät.....	57
Tabelle 4.6:	α -CEHC und α -CMBHC im Urin von männlichen C57BL6-Mäusen in Abhängigkeit von der Fütterungsdauer.....	58

Abkürzungsverzeichnis

LDL	Low Density Lipoprotein
LPS	Lipopolysaccharid
IL-1	Interleukin 1
ABC-Transporter	ATP-Binding-Cassette-Transporter
AVED	Ataxia with vitamin E deficiency
APCI	Atmospheric Pressure Chemical Ionisation
BHT	Buthylhydroxytoluol
BSA	Rinderserumalbumin
BSTFA	N,O-Bis-(trimethylsilyl)-trifluoracetamid
CEHC	Carboxyethylhydroxychroman
CMBHC	Carboxymethylbutylhydroxychroman
α -CPHC	α -Carboxypropylhydroxychroman
CMHenHC	Carboxymethylhexenylhydroxychroman
CMHHC	Carboxymethylhexylhydroxychroman
CYP450	Cytochrom P450
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FCS	Fötales Kälberserum
GC/MS	Gas chromatography / Mass spectrometry
HDL	High Density Lipoprotein
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
LC/MS	Liquid Chromatography / Mass spectrometry
LDL	Low Density Lipoprotein
MTT	(Dimethylthiazol-2-yl)-Diphenyltetrazoliumbromid
N ₂	Stickstoff
NADP	β -Nicotinamid-Adenindinucleotid-2'-Phosphat
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PXR	Pregnan X Rezeptor
PBST	PBS + 0,2 % Tween 20
PCR	Polymerasekettenreaktion
PKC	Proteinkinase C
RPMI 1640	Roswell Park Memorial Institute Medium 1640
TBME	Tert-Butylmethylether
TEAH	Tetraethylammoniumhydroxid
Tris	Tris(hydroxymethyl)-amino-methan
α -TTP	α -Tocopherol-Transferprotein
Tween	Poly(oxyethylen) _n -sorbitam-monolaurat

VLDL Very Low Density Lipoprotein

Zusammenfassung

Vitamin E ist der Überbegriff für 4 Tocopherole (α , β , γ und δ) sowie 4 Tocotrienole (α , β , γ und δ), die als gemeinsames Merkmal ein Chromanolringsystem sowie eine gesättigte (Tocopherole) bzw. ungesättigte (Tocotrienole) Seitenkette aufweisen. Neben ihrer antioxidativen Wirkung (Schutz von Membranen vor Lipidperoxidation) konnten für einige Vitamin E - Formen auch eine Reihe von hochspezifischen, nicht-antioxidativen Wirkungen *in vitro* nachgewiesen werden. Meist bleibt jedoch unklar, ob ein solcher Effekt auch *in vivo*, also im Tiermodell oder direkt im Menschen, gefunden werden kann. In erster Linie müsste hierbei geklärt werden, ob die jeweilige Vitamin E - Form auch bioverfügbar, also in für eine Wirkung ausreichender Konzentration im Organismus vorhanden ist, oder aber vorher eliminiert und ausgeschieden wird. In dieser Doktorarbeit wurden deshalb wichtige Grundlagen zum Abbau der Tocopherole und Tocotrienole erarbeitet.

- In HepG2-Zellen konnte der Abbau der Tocotrienole mit Hilfe flüssig- sowie gaschromatographischer Analysemethoden vollständig aufgeklärt werden. Wie sich hierbei ergab, verläuft der Abbau weitgehend in Analogie zum Abbau der Tocopherole über eine durch Cytochrom P450 katalysierte initiale ω -Hydroxylierung mit 5 nachfolgenden β -Oxidationsschritten.
- *In vitro* konnten in HepG2 – Zellen die Abbauraten der verschiedenen Vitamin E - Formen bestimmt werden. Dies nahm in folgender Reihenfolge zu: α -Tocopherol < γ -Tocopherol < α -Tocotrienol < γ -Tocotrienol.
- Wie sich mit Hilfe eines mit Cytochrom P450 hochangereicherten Homogenats aus Rattenlebern ergab, stellt die initiale ω -Hydroxylierung einen geschwindigkeitsbestimmenden Schritt des Abbaus dar: α -Tocopherol wurde weit langsamer hydroxyliert als alle anderen Vitamin E – Formen.
- Der unterschiedliche Abbau von α -Tocopherol und γ -Tocotrienol konnte auch im Mäuseversuch *in vivo* bestätigt werden. Nach Fütterung von Mäusen mit α -Tocopherol wurden nur geringe Mengen von α -Tocopherolmetaboliten im Urin der Mäuse gefunden, während nach Applikation von γ -Tocotrienol hohe Konzentrationen der γ -Tocotrienolmetabolite nachgewiesen wurden. In Plasma und Leber wiederum wurden (dem Futtergehalt entsprechende) hohe α -Tocopherolkonzentrationen entdeckt, während γ -Tocotrienol selbst nach hoher Gabe nicht oder nur in Spuren nachweisbar war.

- In HepG2 – Zellen konnte gezeigt werden, dass γ -Tocotrienol eine cytotoxische Wirkung auf die Hepatocarcinoma-Zelllinie HepG2 entfalten kann, indem durch die Aktivierung der proteolytischen Caspase 3 die Induktion des programmierten Zelltodes (Apoptose) ausgelöst wird.

Abschliessend lässt sich festhalten, dass der Körper lediglich das natürliche α -Tocopherol vor dem Abbau bewahrt, die anderen Vitamin E – Formen jedoch als Fremdstoffe behandelt und rapide ausscheidet. Als doppelter Schutz vor Verlust des "wertvollen" α -Tocopherol dienen hierbei das α -Tocopherol Transfer Protein sowie die in dieser Arbeit gefundenen Unterschiede im ersten Schritt des Abbaus, der CytochromP450 - katalysierten ω -Hydroxylierung. Beides erklärt die bevorzugte Retention von α -Tocopherol im Organismus und seine hohe Bioaktivität. Will man deshalb *in vitro* Ergebnisse anderer Vitamin E – Formen auf die *in vivo* Situation übertragen, muss man die geringe Bioverfügbarkeit dieser Substanzen berücksichtigen.

Summary

The vitamin E family is comprised of 4 different tocopherols (Toc: α , β , γ , δ) and 4 different tocotrienols (T3: α , β , γ , δ). All share a hydroxychromanol ring and a saturated (Toc) or unsaturated (T3) side chain. Apart from their role as anti-oxidants (protection of membranes from lipid peroxidation), recent attention has focused on novel molecular, non-antioxidative functions. Numerous specific effects of tocopherols and tocotrienols were uncovered by a large variety of *in vitro* studies, *in vivo* - based evidence, however, is scarce. Moreover, little information exists on the bioavailability of the different vitamin E - forms. To better understand the biological role of the different tocopherols and tocotrienols, this thesis therefore aimed to address the basic but important aspect of tocopherol and tocotrienol metabolism.

- In HepG2 cells, the metabolic pathway of α - and γ -T3 could be elucidated by the identification of all intermediary degradation products by using high performance liquid- as well as gas-chromatography. Thus, tocotrienols are degraded in analogy to tocopherols with an initial ω -hydroxylation and 5 subsequent β -oxidation steps.
- *In vitro* (HepG2 cells), tocotrienols were degraded to a larger extent than tocopherols, and γ -Toc to a larger extent than α -Toc. Differences reached two orders of magnitude with α -Toc < γ -Toc < α -T3 < γ -T3.
- By using rat liver microsomes that were highly enriched with cytochrome P450 enzymes, the initial ω -hydroxylation was shown to be a rate limiting step in the degradation of vitamin E: α -Toc is hydrolysed to a much smaller extent than all other vitamin E forms.
- The differences in vitamin E metabolism were confirmed *in vivo* using male mice. After supplementation with α -Toc, only little amounts of α -Toc metabolites were found in urine, while oral administration of γ -T3 led to the rapid excretion of large amounts of γ -T3 metabolites. Correspondingly, in plasma and liver α -Toc levels were high but γ -T3 could hardly be detected.
- γ -T3 but no other vitamin E – form was shown to be highly cytotoxic for HepG2 cells. Immunohistochemistry stainings revealed that γ -T3 induced apoptosis by activation of the proteolytic caspase 3.

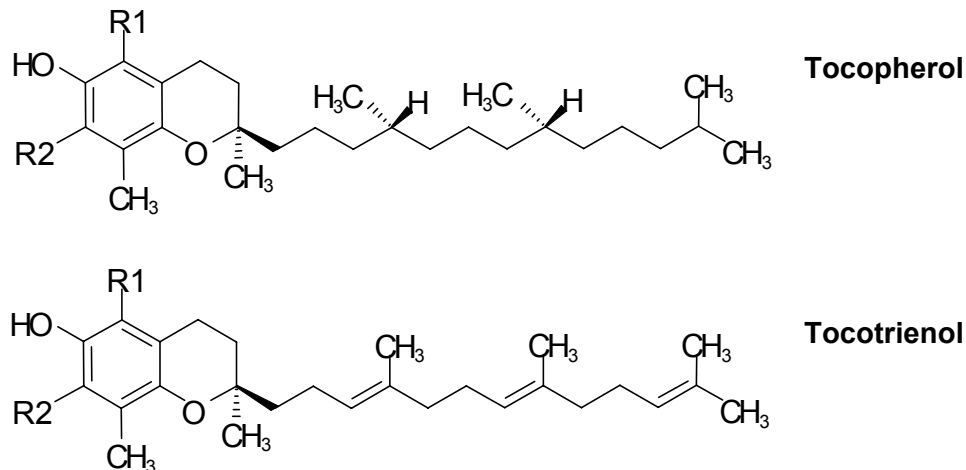
To summarize, α -Toc is metabolized to a much smaller extent than all other vitamin E - forms. Both the α -tocopherol transfer protein as well as the here described differences in the ω -hydroxylation rates provide a double protection for the “valuable” α -Toc from degradation. Both phenomena explain the high retention of α -Toc in the organism and its higher bioactivity, compared to other Vitamin E forms. The differences in the metabolism of vitamin E might therefore lead to an inequivalence of biological activities found *in vitro* vs. *in vivo*.

1 Einleitung

1.1 Vitamin E – von der Entdeckung zur Aufklärung der Struktur

Im Jahre 1922 machten der Embryologe Herbert M. Evans und seine Assistentin Katherine S. Bishop an der Universität von Kalifornien in Berkeley eher zufällig eine bahnbrechende Entdeckung. Nachdem sie Ratten mit einer vorgereinigten Diät gefüttert hatten, stellten sie fest, dass weibliche Ratten zwar trächtig werden konnten, dass sie jedoch nicht mehr in der Lage waren, die Föten auszutragen (Evans and Bishop 1922). Die Supplementation des Futters mit grünem Salat oder Weizenkeimen führte zur Wiedererlangung der Fertilität. Der von ihnen als „Faktor X“ bezeichnete Fertilitätsfaktor wurde 1924 erstmals von Dr. Bennett Sure als Vitamin E bezeichnet (Sure 1924). In den folgenden Jahren erkannte man schnell, dass es sich bei Vitamin E um einen fettlöslichen Stoff handelt. Die Isolierung von α -Tocopherol aus Weizenkeimöl gelang allerdings erst erneut durch H.M. Evans im Jahr 1936 (Evans et al. 1936). Von ihm erhielt die isolierte Vitamin E – Form auch ihren Namen Tocopherol, der von den altgriechischen Begriffen τόκος / tókos "Geburt" und φέρειν / phérein "tragen", "bringen", abgeleitet worden war und als Hinweis auf die alkoholische Struktur mit dem Suffix –ol abschloss. Im Jahre 1938 schließlich gelang mit der Strukturaufklärung von α -Tocopherol durch E. Fernholz (1938) und der chemischen Synthese von *all-rac*- α -Tocopherol durch P. Karrer (1938) die chemische Charakterisierung von Vitamin E.

In den darauf folgenden Jahren erkannte man schließlich, dass es sich bei Vitamin E um eine Stofffamilie handelt, die aus 4 Tocopherolen (α , β , γ und δ) sowie 4 Tocotrienolen (α , β , γ und δ) besteht. Gemeinsames Merkmal dieser 8 Vitamin E - Formen ist das 6-Chromanolringsystem sowie die gesättigte (Tocopherole) bzw. ungesättigte (Tocotrienole) Seitenkette. Die Unterscheidung der 4 Tocopherole und Tocotrienole wird durch Zahl und Stellung der Methylgruppen am Chromanolring bestimmt. Eine Übersicht zu den verschiedenen Formen ist in Abb. 1.1 gezeigt.

Abb. 1.1 Strukturformeln der Tocopherole und Tocotrienole

	R1	R2
α -Tocopherol/ α -Tocotrienol	CH ₃	CH ₃
β -Tocopherol/ β -Tocotrienol	CH ₃	H
γ -Tocopherol/ γ -Tocotrienol	H	CH ₃
δ -Tocopherol/ δ -Tocotrienol	H	H

Tocopherole besitzen insgesamt 3 chirale Zentren an den Positionen C2, C4' und C8', Tocotrienole besitzen ein chirales Zentrum an Position C2. Da für jedes chirale Zentrum eine *R*- oder eine *S*- Konfiguration möglich ist, kommt man auf die Zahl von jeweils 8 Stereoisomeren für die Tocopherole und jeweils 2 Stereoisomeren für die Tocotrienole. Tatsächlich jedoch findet man in der Natur lediglich 1 Isoform der Tocopherole (*RRR*) bzw. Tocotrienole (*R*), da alle chiralen Zentren nach der (pflanzlichen) Biosynthese von Vitamin E in der *R*-Konfiguration vorliegen. Während der chemischen Synthese der Tocopherole im industriellen Maßstab wird hingegen ein Racemat aus allen 8 Stereoisomeren (*RRR*, *RRS*, *RSR*, *SRR*, *RSS*, *SSS*, *SSR*, *SRS*) gebildet. In diesem Fall spricht man von *all-racemisch (all-rac)* - Tocopherol.

1.2 Das Vorkommen von Vitamin E in der menschlichen Nahrung und die empfohlene Zufuhr

Vitamin E wird ausschliesslich von Pflanzen und Cyanobakterien gebildet und kommt in unserer Nahrung meist als ein Gemisch aus verschiedenen Tocopherolen und Tocotrienolen vor. Durch seine Fettlöslichkeit ist Vitamin E dabei hauptsächlich in pflanzlichen Ölen und Samen zu finden. Hierbei variiert die Zusammensetzung der

einzelnen Vitamin E – Formen je nach Quelle des Öls. Während v.a. in Weizenkeimöl sowie in Distel- und Olivenöl α -Tocopherol mit einem Anteil von mehr als 65 % die dominierende Form ist, bildet in Sojaöl und Maiskeimöl γ -Tocopherol den Hauptbestandteil des darin enthaltenen Vitamin E. Tocotrienole sind in hohem Anteil v.a. in Palmöl (α - und γ -Tocotrienol) und Kokosfett (γ -Tocotrienol) zu finden, sind aber auch z.B. in Olivenöl (15 – 35 % β -Tocotrienol) in substantiellem Ausmaß vertreten (Chow 1985).

Durch die Deutsche Gesellschaft für Ernährung wurde für Frauen eine tägliche Zufuhr von 11 mg *RRR*- α -Tocopherol – Äquivalenten, für Männer von 14 mg *RRR*- α -Tocopherol – Äquivalenten (Alter: 25 – 51 Jahre) empfohlen. Dieser Wert wurde aufgrund der Ernährungsgewohnheiten in Mitteleuropa bestimmt, wobei der Vitamin E – Bedarf an die Polyenfettsäurezufuhr gekoppelt wurde (Deutsche Gesellschaft fuer Ernaehrung 2000). Die Angabe in mg *RRR*- α -Tocopherol - Äquivalenten wurde gewählt, um der unterschiedlichen biologischen Aktivität der verschiedenen Vitamin E - Formen Rechnung zu tragen. Diese Aktivität wurde mit Hilfe des Gestations - Resorptionstests an Vitamin E - depletierten Ratten bestimmt. Hierbei wurde die Zahl der Fötusresorptionen von Vitamin E – depletierten Ratten mit der Zahl der Resorptionen von Ratten verglichen, die mit verschiedenen Vitamin E - Formen in unterschiedlicher Konzentration gefüttert wurden. Hierdurch konnte die minimale Konzentration der individuellen Vitamin E – Formen bestimmt werden, bei der die Fötusresorption verhindert wurde. *RRR*- α -Tocopherol wurde als Referenzsubstanz benutzt und die Aktivität der anderen Formen auf *RRR*- α -Tocopherol bezogen. Tabelle 1.1 zeigt die Effektivität der individuellen Vitamin E - Formen.

Tabelle 1.1: Effektivität der individuellen Vitamin E – Formen im Ratten-Resorptionstest. Um die biologische Wirkung von 1mg *RRR*- α -Tocopherol zu erreichen, muss man beispielsweise 100mg *RRR*- δ -Tocopherol einsetzen.

1mg <i>RRR</i> - α -Tocopherol	1,49 Internationale Einheiten
	1,1mg <i>RRR</i> - α -Tocopherylacetat
	2mg <i>RRR</i> - β -Tocopherol
	4mg <i>RRR</i> - γ -Tocopherol
	100mg <i>RRR</i> - δ -Tocopherol
	3,3mg <i>RRR</i> - α -Tocotrienol
	1,49mg <i>all-rac</i> - α -Tocopherylacetat

Die auf dem Gestations - Resorptionstest an Vitamin E - depletierten Ratten basierenden Daten zur biologischen Aktivität der einzelnen Tocopherole und Tocotrienole sind heute nach wie vor in der Fachwelt gebräuchlich. Tatsächlich jedoch ist noch immer nicht bekannt, worauf ihre Wirkung beruht. Basiert sie z.B. auf einer antioxidativen Wirkung von Vitamin E? Sind molekulare Mechanismen in der plazentalen bzw. fötalen Entwicklung durch eine nicht-antioxidative Wirkung von Vitamin E beeinflusst? Lange Jahre suchte man vergeblich nach einem generellen Wirkungsprinzip von Vitamin E. Während bis zum Anfang der 90er Jahre des letzten Jahrtausends die Funktion von Vitamin E ausschliesslich in der antioxidativen Wirkung gesehen wurde, wird heute verstärktes Augenmerk auch auf nicht durch antioxidative Eigenschaften erklärbare, molekulare Wirkungen gelegt. Hierbei zeigte sich nicht nur die breite Wirkungspalette von Vitamin E, sondern auch die spezifische Wirkung einzelner Vitamin E - Formen. Das nächste Kapitel soll hierüber einen Überblick schaffen.

1.3 Funktionen von Vitamin E

1.3.1 Die antioxidative Wirkung von Vitamin E

Schon im Jahr 1937 wurde erstmals die antioxidative Wirkung von Vitamin E erkannt (Olcott and Emerson 1937). Aufgrund seiner phenolischen Struktur mit niedrigem Redoxpotential ist es in der Lage, ein Wasserstoffatom an Lipidradikale abzugeben, wodurch es zum Abbruch einer Radikalkettenreaktion kommt, da das entstehende Tocopheroxylradikal durch den Chromanring stabilisiert und damit reaktionsträge wird. Das Tocopheroxylradikal kann nun z.B. durch Reaktion mit einem Ascorbat regeneriert werden oder aber mit einem weiteren Peroxylradikal unter Spaltung des Chromanrings zum Tocopherylchinon reagieren (Burton and Ingold 1989). Da Vitamin E in biologischen Membranen lokalisiert ist, wurde es als wichtiges Antioxidanz zum Schutz von Membranlipiden, Depotfetten und Lipoproteinen definiert.

Der Schutz von Lipoproteinen vor Oxidation wird als ein entscheidender Faktor in der antioxidativen Wirkung von Vitamin E vermutet, wie zahlreiche *in vitro* sowie *ex vivo* Studien ergaben (Burton and Ingold 1989). Durch diese schützende Wirkung auf die Lipidperoxidation von LDL wird ein für die Gesundheit positiver Einfluss, z.B. in der Entstehung von Atherosklerose, vermutet. So konnte im Kaninchen gezeigt werden, dass Vitamin E die Entstehung cholesteroll-induzierter atherosklerotischer Läsionen vollständig verhinderte (Özer and Azzi 2000; Ribeiro Jorge et al. 1998). In Mäusen mit

einer Defizienz von Apolipoprotein E wurde gezeigt, dass durch Vitamin E Mangel der Schweregrad der atherosklerotischen Läsionen in der proximalen Aorta erhöht wurde (Terasawa et al. 2000).

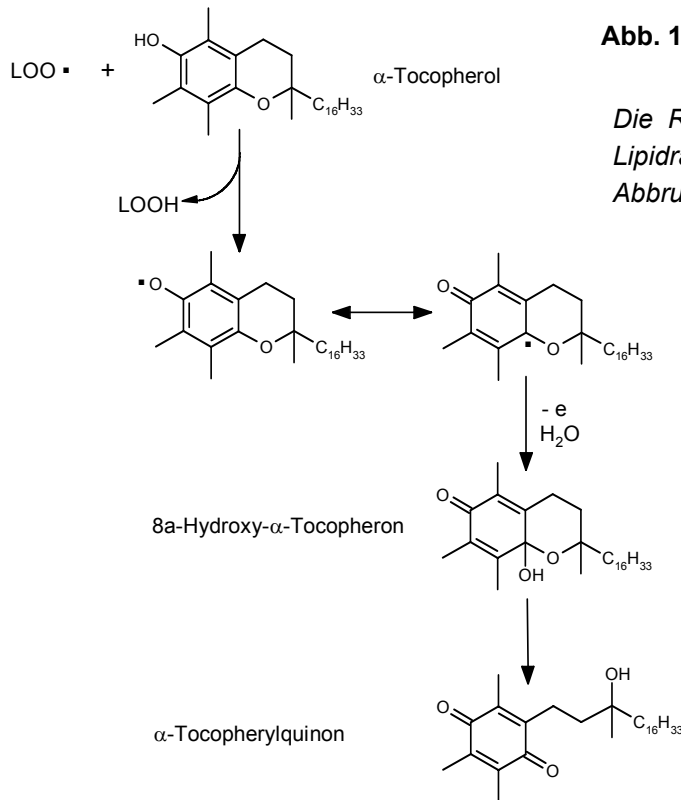


Abb. 1.2 Wirkung von α -Tocopherol als Radikalfänger

Die Reaktion von α -Tocopherol mit einem Lipidradikal ($\text{LOO}\cdot$) führt in vitro zum Abbruch einer Radikal-Kettenreaktion.

Tatsächlich wurde in einigen Humanstudien ein positiver Einfluss von Vitamin E nachgewiesen, wie z.B. die Abnahme der Fälle von nicht-tödlichen Herzinfarkten in der CHAOS-Studie (Cambridge Heart Antioxidant Study; 2002 Patienten mit angiographisch nachgewiesener Atherosklerose nach täglicher Supplementation mit 400 bzw. 800 IE Vitamin E für 510 Tage) zeigte (Stephens et al. 1996). Auch in der SPACE-Studie (Secondary Prevention with Antioxidants of Cardiovascular disease in Endstage renal disease) mit 196 Hämodialyse-Patienten mit bestehenden kardiovaskulären Erkrankungen konnte die tägliche Gabe von 800 IE Vitamin E für 519 Tage die Inzidenz von kardiovaskulären Erkrankungen und Herzinfarkten senken (Boaz et al. 2000). In zwei groß angelegten Studien an 87000 Krankenschwestern (Stampfer et al. 1993) bzw. 39000 männlichen Medizinern (Rimm et al. 1993) schließlich konnte ein deutlicher Zusammenhang zwischen der langfristigen Einnahme von Vitamin E – Supplementen und der Inzidenz von kardiovaskulären Erkrankungen festgestellt werden.

In der Mehrzahl aller Studien neueren Datums können jedoch diese positiven Effekte nicht bestätigt werden. In der Heart Protection Study beispielsweise führte die Supplementation von 20536 Patienten mit Diabetes oder kardiovaskulären bzw. arteriellen Erkrankungen mit 600 mg Vitamin E, 250 mg Vitamin C sowie 20 mg β -Carotin in einem Zeitraum von 5 Jahren nicht zur Beeinflussung des Verlaufs von kardiovaskulären Erkrankungen (Heart Protection Study Collaborative Group 2002). In der HOPE-Studie (Heart Outcomes Prevention Evaluation), einer randomisierten, doppelt blinden und Placebo-kontrollierten sowie international durchgeführten 5 Jahres - Studie, hatte die Supplementation mit 400 IE Vitamin E bei 2545 Männern und 6996 Frauen, die alle mit einem hohen Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen behaftet waren, keinen Einfluss auf den Krankheitsverlauf (Yusuf et al. 2000). Auch eine Verlängerung der Studie auf insgesamt 9 Jahre ergab keinen positiven Einfluss auf die Häufigkeit von Krebserkrankungen sowie kardiovaskulären Erkrankungen, es wurde jedoch eine signifikante Zunahme der Herzinfälle in der mit Vitamin E supplementierten Gruppe gefunden (Lonn et al. 2005). Auch die VEAPS-Studie (Vitamin E Atherosclerosis Prevention Study, (Hodis et al. 2002) sowie das "Primary Prevention Project" (de Gaetano 2001) erbrachten nach Vitamin E – Supplementation keinen positiven Effekt auf kardiovaskuläre Endpunkte. Erwähnung finden soll auch eine Studie von Weinberg *et al.* an 10 Rauchern, die neben einer mit mehrfach ungesättigten Fetten angereicherten Diät auch mit 800 IE Vitamin E behandelt wurden. Mit der Zunahme von F_2 -Isoprostanen im Plasma, die von bei oxidativem Stress entstandenen freien Radikalen erzeugt werden, wurde hierbei ein pro-oxidativer Effekt von Vitamin E aufgezeigt (Weinberg et al. 2001). In der finnischen ATBC-Studie (Alpha-Tocopherol Beta-Carotene Studie) (Virtamo et al. 2003) wurde in männlichen Rauchern nach α -Tocopherol-Supplementation wiederum eine Senkung der Lungenkrebs- sowie colorektalen Krebsrate gefunden, jedoch auch eine Zunahme von Magenkrebs. Eine positive Wirkung auf kardiovaskuläre Erkrankungen wurde jedoch nicht nachgewiesen.

In einer der umfangreichsten Studien, der Women's Health Study, einer Studie an 40000 gesunden Frauen über 45 Jahren, wurde nach ca. 10 Jahren Supplementierung mit 600IU Vitamin E (an alternierenden Tagen) keine Abnahme der Häufigkeit kardiovaskulärer Erkrankungen sowie der Krebsrate festgestellt, weshalb keine Empfehlung für die Supplementierung mit Vitamin E, zumindest für gesunde Frauen, ausgesprochen werden konnte (Lee et al. 2005)

Wie diese Zusammenfassung verschiedener Humanstudien zeigt, gibt es wenig Hinweise für eine Rolle von Vitamin E als Antioxidanz in der Prävention

cardiovaskulärer Erkrankungen. Während epidemiologische Beobachtungen sowie einzelne Studien in kleineren Patientengruppen eine positive Wirkung von Vitamin E auf die Prävention cardiovaskulärer Erkrankungen und Krebs befürworten, konnten umfangreiche randomisierte und kontrollierte Interventionsstudien mit grossen Studiengruppen keinen positiven Zusammenhang zwischen der Supplementierung mit Vitamin E und der Häufigkeit cardiovaskulärer Erkrankungen sowie Krebs finden. Während hierüber jedoch nach wie vor kontrovers diskutiert wird, rückt ein neues Forschungsfeld mehr und mehr ins Blickfeld, das dazu geeignet erscheint, die bisherige Diskussion zu erweitern oder gar abzulösen (Pfluger et al. 2004).

1.3.2 Nicht-antioxidative Wirkungen von Vitamin E

Im Jahr 1991 wurde mit der Hemmung der Proliferation von glatten Muskelzellen durch eine Hemmung der Protein Kinase C erstmals eine Wirkung von α -Tocopherol beschrieben, die nicht durch antioxidative Eigenschaften erklärt werden konnte (Boscoboinik et al. 1991a; Boscoboinik et al. 1991b). Wie sich später herausstellte, beruhte diese Wirkung auf einer Dephosphorylierung der PKC- α durch eine α -Tocopherol-vermittelte Aktivierung der Proteinphosphatase 2A (Clement et al. 1997; Ricciarelli et al. 1998). β -Tocopherol hingegen hatte trotz des ähnlichen antioxidativen Potentials keinen Effekt. Eine Hemmung der PKC- α hat einen Einfluss auf viele Signalkaskaden. So war nach Hemmung der PKC durch α -Tocopherol auch die Phosphorylierung und Translokation von p47^{phox}, einer cytosolischen Untereinheit der NADPH-Oxidase, gehemmt. Hierdurch ist die Bildung des aktiven NADPH-Oxidase-Komplex verhindert, was letztendlich zu einer verminderten Produktion von Superoxidanionen führt (Cachia et al. 1998). In diesem Zusammenhang ist auch die verminderte Ausschüttung von Interleukin-1 β nach Inkubation von Monozyten mit α -Tocopherol durch eine Hemmung der 5-Lipoxygenase zu erwähnen (Devaraj and Jialal 1999). Weitere Effekte von α -Tocopherol auf die zelluläre Signaltransduktion wurden von Azzi *et al.* (Azzi 2007; Azzi et al. 2000; Azzi et al. 2004) zusammengefasst.

Neben einer posttranslationalen Wirkung von α -Tocopherol sind mittlerweile auch Effekte auf transkriptioneller Ebene bekannt. So wurde beispielsweise in glatten Muskelzellen eine erhöhte α -Tropomyosin-Expression nach Behandlung mit α -Tocopherol beobachtet (Aratri et al. 1999). Erneut hatte β -Tocopherol keinen Effekt. α -Tocopherol konnte zudem die Expression von Kollagenase in menschliche Hautzellen über eine Inaktivierung der PKC- α (Ricciarelli et al. 1999) vermindern sowie die Expression des Scavenger-Rezeptors CD 36 in glatten Muskelzellen und Makrophagen

senken, die zu einer verminderten Aufnahme von oxidierten LDL in die Zellen führte (Devaraj et al. 2001; Ricciarelli et al. 2000).

Neben den beschriebenen Effekten von α -Tocopherol wurden auch für andere Tocopherole und Tocotrienole spezifische Wirkungen gefunden. γ -Tocopherol beispielsweise senkte die Aktivität der Cyclooxygenase-2 (COX-2) und damit die Produktion des inflammatorisch wirksamen Prostaglandins PGE₂ in LPS-stimulierten Makrophagen sowie IL-1 - stimulierten Epithelzellen (Jiang et al. 2000). α -Tocotrienol senkte in TNF- α -stimulierten Endothelzellen die Expression der Adhäsionsproteine VCAM, ICAM und E-Selectin, was zu einer verringerten Adhärenz der Monozyten an Endothelzellen führte (Theriault et al. 2002). Die Inkubation der menschlichen Hepatozyten-Zelllinie HepG2 mit γ -Tocotrienol schließlich führte zu einer verstärkten Degradation von Apolipoprotein B-100, dem Hauptstrukturprotein der VLDL (Very Low Density Lipoproteine), wodurch die VLDL- Produktion und -Sekretion verringert wurde (Theriault et al. 1999). Ebenfalls in HepG2-Zellen wurde für α -, γ - und δ -Tocotrienol eine Hemmung der Aktivität der HMG-CoA-Reduktase, des geschwindigkeitsbestimmenden Enzymes der Cholesterinbiosynthese (Pearce et al. 1992), gezeigt. Sowohl eine Verringerung der HMG-CoA-Reduktase-Aktivität als auch der VLDL-Konzentration im Plasma führen unabhängig voneinander zu einer Abnahme der Cholesterolkonzentration im Blut.

Dieser hypocholesterolemische Effekt von Tocotrienol konnte tatsächlich im Tiermodell sowie in einigen Humanstudien bestätigt werden (Qureshi et al. 1986; Qureshi et al. 1991a; Qureshi et al. 1991b; Qureshi et al. 2002; Watkins et al. 1993; Williams et al. 1992). Für viele weitere *in vitro* Ergebnisse fehlt jedoch eine Bestätigung im *in vivo* Versuch. Um hierüber jedoch Aussagen treffen zu können, müssen zunächst wichtige Daten zur Bioverfügbarkeit bekannt sein. Das folgende Kapitel soll deshalb die wichtigsten Daten zur Bioverfügbarkeit und Biopotenz von Vitamin E zusammenfassen.

1.4 Die Bioverfügbarkeit von Vitamin E

1.4.1 Aufnahme und Resorption von Vitamin E

Mit der Nahrung gelangen die verschiedenen Vitamin E - Formen in den Gastrointestinaltrakt. Hier beginnt die Emulsifizierung von Vitamin E mit Gallensalzen, Phospholipiden, Fettsäuren etc. zu gemischten Mizellen. Diese Mizellen können nun durch passive Diffusion in die Enterozyten des Dünndarms aufgenommen werden. In

den Enterozyten wiederum erfolgt die Verpackung der Vitamin E - Formen in Chylomikronen, die in das lymphatische System sezerniert werden und über das Blutgefäßsystem zur Leber transportiert werden, wo sie als Chylomikronen-Remnants aufgenommen werden (Kayden and Traber 1993; Traber et al. 1986).

Schon die Bildung und Zusammensetzung dieser gemischten Mizellen ist von Bedeutung für die Aufnahme von Vitamin E. Je höher der Anteil an (gesättigten) Fetten ist, desto besser ist die intestinale Aufnahme von Vitamin E. Auch die Konzentration des mit der Nahrung aufgenommenen Vitamin E, die Verbleibdauer im Darm sowie die Art der Verabreichung spielen eine wichtige Rolle (Bjorneboe et al. 1990; Cohn 1997; Cohn et al. 1992; Drevon 1991; Kayden and Traber 1993). Die Höhe der Resorption variierte hierbei zwischen den einzelnen Studien. Nach einer Einzeldosis von 2 mg radioaktiv markiertem α -Tocopherylacetat per Schlundsonde in Ratten wurden nur 10% der Radioaktivität in den Fäces wiedergefunden, was auf eine Resorption von 90% schließen lässt. Im Menschen wurde von einer α -Tocopherolaufnahme von 70% berichtet (Traber et al. 1986) Von Ikeda *et al.* (Ikeda et al. 1996) wurde in Ratten nach Verabreichung von 10 mg α -Tocopherol eine lymphatische Wiederfindung von 24,5% bestimmt. Die Wiederfindung von γ - und δ -Tocotrienol war mit 23,8% und 21,9% in etwa gleich hoch, lediglich die Wiederfindung von α -Tocotrienol war mit 37,4% etwas höher, was auf eine bessere Membrangängigkeit zurückgeführt wurde.

Die Aufnahme ist also lediglich von den physikalisch-chemischen Eigenschaften von Vitamin E abhängig. Somit kann davon ausgegangen werden, dass bei gleicher Aufnahme verschiedener Vitamin E – Formen in etwa gleiche Mengen in Chylomikronen verpackt auch die Leber erreichen. Hier jedoch findet eine Diskriminierung zwischen den verschiedenen Vitamin E - Formen statt.

1.4.2 Verteilung von Vitamin E und die Rolle des α -Tocopherol-Transfer-Proteins

Die Leber hat im Körper die Aufgabe, das aufgenommene Vitamin E je nach Bedarf in die Zirkulation zu bringen oder aber aus dem Stoffwechsel zu entfernen. Hierbei wird zwischen dem natürlichen *RRR*- α -Tocopherol und allen anderen Vitamin E – Formen unterschieden. Die zentrale Rolle spielt hierbei das α -Tocopherol-Transfer-Protein (α -TTP). α -TTP wurde erstmals 1975 als zytosolisches Leberprotein beschrieben, das spezifisch α -Tocopherol binden kann (Catignani 1975). Neuere Messungen ergaben hierbei eine Spezifität von 100% für *RRR*- α -Tocopherol, 11% für *SRR*- α -Tocopherol, 38% für β -Tocopherol, 9% für γ -Tocopherol, 2% für δ -Tocopherol, 2% für α -

Tocopherylchinon bzw. α -Tocopherylacetat sowie 12% für α -Tocotrienol (Hosomi et al. 1997). In Patienten mit der Krankheit AVED (Ataxia with vitamin E deficiency), die durch eine autosomal rezessiv vererbte Mutation des α -TTP-Gens ausgelöst wird, wurden extrem niedrige Plasmaspiegel für α -Tocopherol gefunden (Gotoda et al. 1995; Ouahchi et al. 1995). Die Patienten litten unter cerebellären Ataxien und geistiger Retardierung, diese Symptome konnten aber nach täglicher Gabe hoher Dosen von *RRR*- α -Tocopherol (bis zu 40mg / kg Körpergewicht) gemindert werden (Schuelke et al. 1999). Tatsächlich wurde α -TTP auch in den die Purkinje-Zellen des Cerebellums umgebenden Bergmann-Gliazellen gefunden, wo es für eine optimale Vitamin E – Versorgung der Nervenzellen sorgen soll (Copp et al. 1999; Hosomi et al. 1998). Auch in den Trophoblasten der Plazenta konnte α -TTP nachgewiesen werden. Hier wird angenommen, dass α -TTP für den Transport von α -Tocopherol vom maternalen in den fötalen Blutkreislauf verantwortlich ist (Jishage et al. 2001; Kaempf-Rotzoll et al. 2003; Müller-Schmehl et al. 2004).

Gelangen die verschiedenen Vitamin E – Formen mit den Chylomikronen-Remnants in die Leber, so wird *RRR*- α -Tocopherol nach Endocytose in den späten Endosomen sowie Lysosomen spezifisch von α -TTP gebunden und über einen noch unklaren Mechanismus zur Plasmamembran transferiert, wo der Einbau in Lipoproteine stattfindet. Während man hierbei lange den Transfer zu den Very Low Density Lipoproteinen (VLDL) als Hauptwirkung von α -TTP betrachtete (Kayden and Traber 1993), berichten neuere Arbeiten von einem hauptsächlichen Einbau von *RRR*- α -Tocopherol in High Density Lipoproteine (HDL) (Minehira-Castelli et al. 2006)}, wobei dem Transporter ABCA1 eine wichtige Rolle in der Sekretion zugeschrieben wird (Qian et al. 2005).

Im Plasma liegt α -Tocopherol zu ca. 90% an Lipoproteine gebunden vor (Behrens et al. 1982) Zwischen den Lipoproteinen (v.a. zwischen HDL und LDL) wiederum besteht durch die Wirkung des Phospholipid Transferproteins, aber auch durch spontanen Austausch, die Möglichkeit des Transfers von Vitamin E (Kostner et al. 1995). Die Konzentration von α -Tocopherol im Plasma beträgt hierbei im Schnitt ca. 21 μ M (Behrens and Madere 1986). α -Tocopherolkonzentrationen unter 11,6 μ M gelten dabei als defizient (Horwitt et al. 1963), zwischen 11,6 μ M und 16,2 μ M spricht man von einem geringen Spiegel, Werte über 16,2 μ M werden als normal erachtet (zusammengefasst durch (Sauberlich et al. 1973)).

Die Plasmawerte für γ -Tocopherol sind trotz teilweise deutlich höherer Zufuhr, zumindest in der amerikanischen Ernährung, mit 2 μ M bis 7 μ M stets weitaus geringer (Behrens and Madere 1986). Andere Tocopherole und Tocotrienole spielen quantitativ

keine Rolle für den Vitamin E – Gehalt im Plasma. Sie gelangen zwar in gleichem Maße in die Leber wie α -Tocopherol, hier werden sie jedoch nicht auf Lipoproteine transferiert, sondern wahrscheinlich schnell ausgeschieden. Dass dennoch bis zu 7 μ M γ -Tocopherol sowie auch geringe Mengen anderer Vitamin E- Formen im Plasma gefunden werden, liegt an der Wirkung der Lipoprotein Lipase. Dieses ans Endothel gebundene Enzym hydrolysiert Triglyzeride und setzt dabei Fettsäuren aus den Chylomikronen frei, die vom Gewebe aufgenommen werden. Während dieses Prozesses wird auch Vitamin E freigesetzt. Dieses wird ebenfalls ins Gewebe aufgenommen oder aber in HDL transferiert. Eine Hauptrolle in der Aufnahme von Vitamin E in die peripheren Gewebe kommt dem HDL Rezeptor (Scavenger Rezeptor Klasse B Typ I (SR-BI)) zu. Wie in SR-BI defizienten Mäusen gezeigt werden konnte, war dort die Plasmakonzentration von α -Tocopherol erhöht und gleichzeitig die Konzentration in einigen Gewebe wie Gehirn, Ovarien, Testes und Lunge erniedrigt (Mardones et al. 2002). Der HDL Rezeptor ist auch wichtig für das Recycling von bereits in Zirkulation befindlichem *RRR*- α -Tocopherol, das an HDL gebunden aus der Peripherie zur Leber zurücktransportiert, über Endocytose internalisiert und vom α -TTP anschliessend in die Zirkulation zurücktransferiert wird (Traber et al. 1994).

1.4.3 Metabolismus und Ausscheidung von Vitamin E

Vitamin E wird in der Leber metabolisiert, um in wasserlöslicher Form mit dem Urin ausgeschieden werden zu können. Im Jahr 1956 wurden erstmals zwei Metabolite von α -Tocopherol entdeckt, α -Tocopheronsäure und α -Tocopheronolakton (Simon et al. 1956a; Simon et al. 1956b). Diese nach ihrem Entdecker als Simon-Metabolite bezeichneten Metabolite besitzen einen nach Oxidation geöffneten Chromanring sowie eine verkürzte Seitenkette in offener Form oder als Lakton (Abb.1.3).

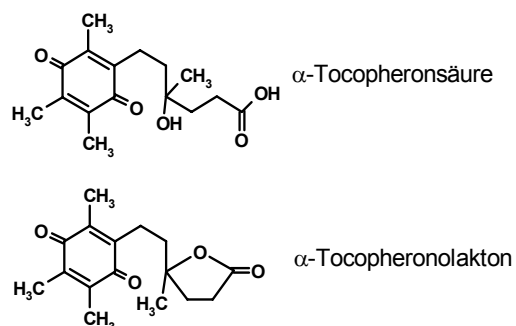


Abb. 1.3 Simon-Metabolite von α -Tocopherol

Der geöffnete Ring wurde lange als Beweis für die antioxidative Wirkung *in vivo* angeführt. Wie sich jedoch herausstellte, handelte es sich bei den Simon-Metaboliten zum größten Teil um Artefakte, die bei der Extraktion aus dem „richtigen“ Metaboliten entstanden waren. Dieser Metabolit, α -Carboxyethylhydroxychroman (α -CEHC), obschon bereits im Jahre 1965 als potentieller Metabolit postuliert (Schmandke 1965), wurde erst 1993 in menschlichem Urin beschrieben (Schönfeld et al. 1993) und 1995 näher charakterisiert (Schultz et al. 1995). Einige Jahre zuvor war bereits δ -CEHC als δ -Tocopherolmetabolit entdeckt worden (Chiku et al. 1984), im Jahr 1996 folgte der Nachweis des γ -Tocopherolmetaboliten γ -CEHC (Wechter et al. 1996). Alle CEHCs haben eine verkürzte Seitenkette, der Chromanring ist jedoch intakt, was darauf hinweist, dass α -Tocopherol zuvor nicht als Antioxidanz reagiert haben kann. Daraufhin wurde ein Abbauweg für die Tocopherole vorgeschlagen, der eine initiale, durch Cytochrom P450 Enzyme katalysierte ω -Hydroxylierung und mehrere β -Oxidationsschritte umfasst.

Der Nachweis zweier weiterer Metaboliten des α -Tocopherolabbaus, α -Carboxymethylbutylhydroxychroman (α -CMBHC) (Schuelke et al. 2000) sowie α -Carboxymethylhexylhydroxychroman (α -CMHHC) (Birringer et al. 2001) führte schließlich zur weitgehenden Bestätigung dieses Abbauweges, der in Abb. 1.4 für α -Tocopherol dargestellt ist. Die postulierten, bis zum Jahr 2002 aber nicht identifizierten Zwischenprodukte sind hierbei in eckige Klammern gesetzt, hydroxyliertes bzw. carboxyliertes α -Tocopherol wurde als α -Tocopherol-OH bzw. α -Tocopherol-COOH bezeichnet.

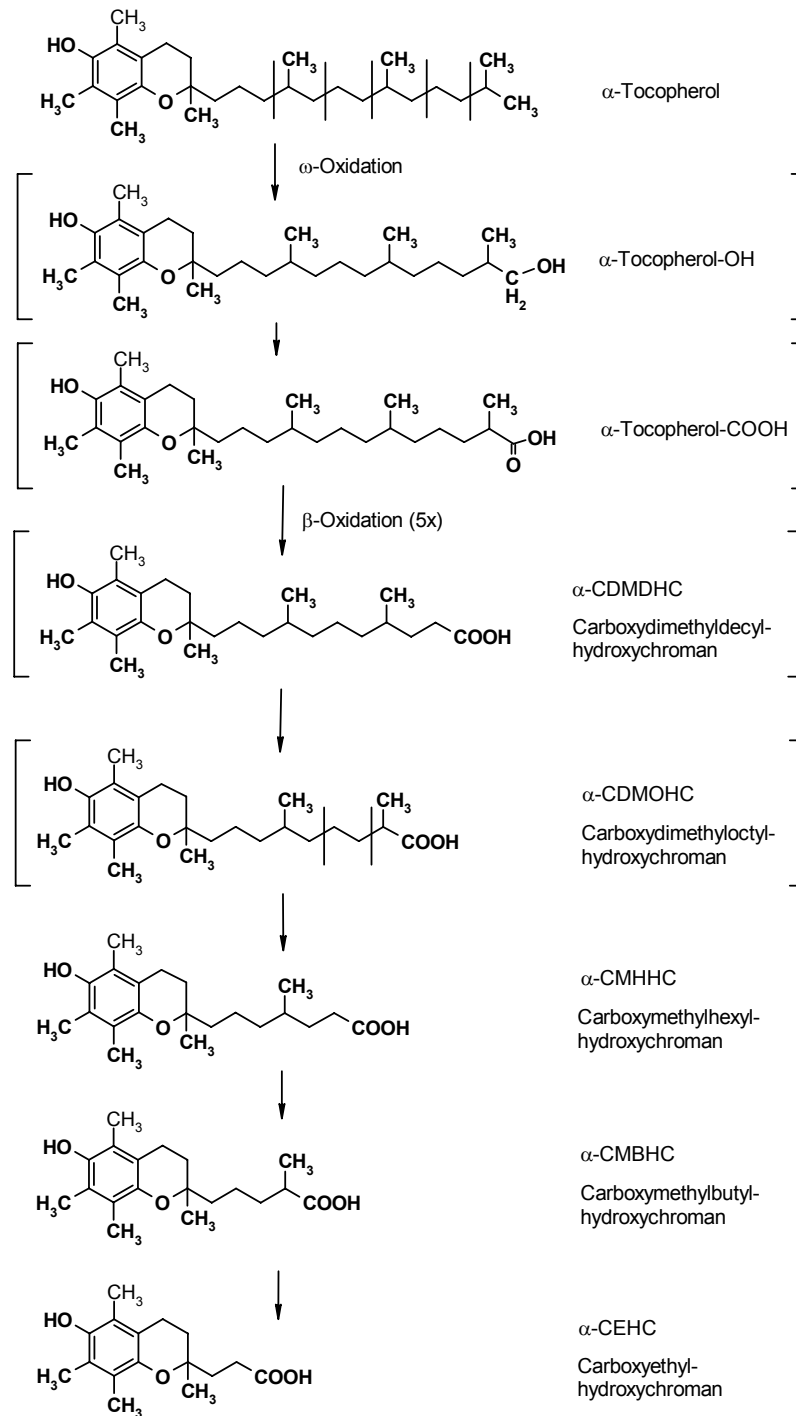


Abb. 1.4 Abbau von α -Tocopherol

α -Tocopherol wird nach einer initialen ω -Hydroxylierung durch 5 β -Oxidationsschritte zum finalen Metaboliten α -Carboxyethylhydroxychroman (α -CEHC) metabolisiert. Der Abbauweg der Seitenkettenverkürzung konnte durch den Nachweis der Zwischenprodukte α -CMHHC sowie α -CMBHC erbracht werden. Die weiteren, postulierten Zwischenprodukte konnten bisher nicht identifiziert werden und sind deshalb in eckige Klammern gesetzt. Die Zwischenprodukte stellen den Stand der Forschung im Jahr 2002 (Beginn dieser Doktorarbeit) dar.

Tocotrienolmetabolite wurden erst im Jahr 2001 in menschlichem Urin entdeckt (Lodge et al. 2001). Hierbei handelte es sich um α -CEHC aus α -Tocotrienol sowie γ -CEHC aus γ -Tocotrienol. Wie sich herausstellte, waren diese Metaboliten identisch mit den Metaboliten von α - und γ -Tocopherol, was einen gemeinsamen Abbauweg wahrscheinlich machte. Weitere Metabolite der Tocotrienole konnten bis dahin nicht identifiziert werden.

Die Quantifizierung der Vitamin E – Metaboliten erbrachte interessante Unterschiede im urinären Gehalt von CEHC. So konnten nach Verabreichung von deuteriertem *RRR*- α -Tocopherol nur 1-3% als α -CEHC wiedergefunden werden (Traber et al. 1998), während nach Aufnahme von γ -Tocopherol ca. 50% wieder als γ -CEHC über den Urin ausgeschieden wurden (Swanson et al. 1999). In AVED-Patienten mit einem Defekt im α -TTP-Gen wurden trotz geringer α -Tocopherol-Plasmakonzentrationen hohe α -CEHC-Konzentrationen im Urin nachgewiesen (Schuelke et al. 2000). Für die Tocotrienole existiert lediglich eine Studie, in der für α -Tocotrienol eine Wiederfindung von 3% als α -CEHC sowie für γ -Tocotrienol 8% in Form von γ -CEHC bestimmt wurde (Lodge et al. 2001). In keiner dieser Studien wurde der Gehalt an längerkettigen Metaboliten bestimmt. Zudem wurden verschieden hohe Dosen verarbeitet und die Resorptionsrate nicht berücksichtigt, wodurch es schwer ist, die verschiedenen Studien miteinander zu vergleichen. Aus diesem Grund wurde der Metabolismus der verschiedenen Tocopherole und Tocotrienole in dieser Arbeit näher betrachtet.

2 Ziele der Arbeit

Im Zentrum dieser Arbeit stand die Klärung der Frage, wie und in welchem Ausmaß der Metabolismus der verschiedenen Tocopherole und Tocotrienole verläuft und welchen Einfluss der Metabolismus auf die Bioverfügbarkeit der verschiedenen Vitamin E – Formen *in vivo* hat. Zudem sollte geklärt werden, ob die verschiedenen Tocopherole bzw. Tocotrienole eine cytotoxische Wirkung *in vitro* in HepG2 Zellen aufweisen.

- Die erstmalige Identifizierung intermediärer Metabolite von Tocopherolen und Tocotrienolen sollte zeigen, dass der Abbau von sowohl Tocopherolen als auch Tocotrienolen nach dem gleichen Mechanismus der Seitenkettenverkürzung durch β -Oxidation mit initialer ω -Hydroxylierung verläuft.
- Die Quantifizierung der Hauptmetabolite in HepG2 – Zellen sollte einen direkten Vergleich der Abbauraten der verschiedenen Tocopherole und Tocotrienole ermöglichen.
- Mit Hilfe von Mikrosomen aus Rattenlebern sollte die Kinetik der initialen ω -Hydroxylierung als mögliche Ursache für den unterschiedlichen Abbau der verschiedenen Tocopherole und Tocotrienole untersucht werden. In vielen Abbaureaktionen stellt diese Cytochrom P450 – katalysierte Reaktion den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt dar.
- Um die *in vitro* gefundenen Ergebnisse im Vitamin E – Metabolismus auf die *in vivo* Situation zu übertragen, wurde der Abbau von α -Tocopherol und γ -Tocotrienol in Mäusen gemessen. Zum einen sollte die Abhängigkeit des α -Tocopherol - Abbaus von Dauer und Höhe der α -Tocopherol-Supplementierung gezeigt werden. Zudem sollte die *in vitro* gefundene Diskriminierung im Abbau von α -Tocopherol gegenüber γ -Tocotrienol bestätigt sowie der Einfluss von γ -Tocotrienol auf den Abbau von α -Tocopherol untersucht werden.
- Mit dem Nachweis der γ -Tocotrienol - induzierten Apoptose in HepG2-Zellen sollte eine neue, spezifische Funktion einer individuellen Vitamin E - Form gezeigt werden, die nicht auf eine antioxidative Wirkung zurückgeführt werden kann.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien

β-Glucuronidase (G0751)	Sigma, Deisenhofen
Acetonitril Rotisolv® HPLC (8825.2)	Roth, Karlsruhe
Ameisensäure (ACS, 88%, 39,938-8)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Anti-aktive Caspase-3 Primärantikörper (rabbit, 67341)	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg
Antikörper-Verdünnungsmedium (S3022)	Dako Cytomation, Hamburg
Ascorbinsäure (127.0100)	Merck, Darmstadt
Avidin / Biotin Blockierungsreagenz (SP-2001)	Vektor, Burlingame, USA
BHT (B-1378)	Sigma, Deisenhofen
BSA (A9418)	Sigma, Deisenhofen
N,O-Bis-(trimethylsilyl)-acetamid (12,891-0)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
BSTFA (15243)	Fluka, Neu-Ulm
Coomassie brillant blue (G-250)	Bio-Rad, München
Corticosteron (C-2505)	Sigma, Deisenhofen
Diaminobenzidin (K3468)	Dako, Hamburg
Diethylether (1.00930.1000)	Roth, Karlsruhe
Dinatriumhydrogenphosphat (1.06575.1000)	Merck, Darmstadt
DTT	Promega, Mannheim
EDTA	Sigma, Deisenhofen
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Roth, Karlsruhe
FCS (553S)	Biochrom / Seromed
Glukose-6-Phosphat (G72501G)	Sigma, Deisenhofen
Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G7750)	Sigma, Deisenhofen
Glutamax (35050-038)	Gibco-BRL, Eggenstein
Glycerol	Roth, Karlsruhe
Hämatoxylin-Lösung	Merck, Darmstadt
Histomount	Shandon, Frankfurt/Main
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Lithiumacetat	Sigma, Deisenhofen
Methanol Rotisolv® HPLC Gradient Grade	Roth, Karlsruhe

MTT	Sigma, Deisenhofen
NADP ⁺	Biomol, Hamburg
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriummolybdat	Sigma, Deisenhofen
n-Hexan	Merck, Darmstadt
Penicillin-Streptomycin (15140-122)	Gibco-BRL, Eggenstein
Repel-Silane	Pharmacia, Freiburg
Sekundärantikörper Donkey anti rabbit (711-065-152)	Jackson-Immuno Research, West Grove, USA
StreptABComplex/HRP (K0377)	Dako Cytomation, Hamburg
Sucrose	Roth, Karlsruhe
TBME	Merck, Darmstadt
Testosteron	Sigma, Deisenhofen
TEAH (20% in H ₂ O)	Merck, Darmstadt
Trifluoressigsäure, pA.	Sigma, Deisenhofen
Tris-HCl	Roth, Karlsruhe
Triton X-100, 10% in H ₂ O	Roche, Mannheim

3.1.2 Vitamin E – Standards und Metaboliten

α -CEHC	Synthese durch LABORAT GmbH (Berlin)
α -CPHC	Synthese durch M. Birringer (Biringner et al. 2002)
α -CMBHC	Von D.P.R. Muller (University College London, London, Großbritannien) freundlicherweise zur Verfügung gestellt.
γ -CEHC (LLU α)	Von W. Wechter (Loma Linda University, Loma Linda, USA) freundlicherweise zur Verfügung gestellt.
γ -CMBHC	Synthese durch M. Birringer, Reinheit ca. 81%, unveröffentlicht
<i>All-rac</i> - α -Tocopherol	Merck, Darmstadt
<i>RRR</i> - α -Tocopherol	Sigma, Deisenhofen
α -Tocopherylacetat	Sigma, Deisenhofen (T3001)
δ -Tocopherol	Sigma, Deisenhofen
α -Tocotrienol	Von P. Hoppe (BASF AG, Ludwigshafen) freundlicherweise zur Verfügung gestellt.
γ -Tocotrienol	Von P. Hoppe (BASF AG, Ludwigshafen) freundlicherweise zur Verfügung gestellt.
Trolox	Sigma, Deisenhofen

3.1.3 Puffer und Lösungen

β-Glucuronidase-Lösung:

600 µl Reinstwasser, 1600 µl Natriumacetatpuffer (0,1 M; pH 4,5) und 800 µl Enzymlösung (8 mg β-Glucuronidase in 850 µl Natriumacetatpuffer)

Derivatisierungsreagenz:

250 µl N,O- Bistrimethylsilyltrifluoroacetamid (BSTFA), 40 µl N,O- Bistrimethylsilylacetamid, 10 µl Chlortrimethylsilan (CTMS) und 200 µl Hexan

Einfrierpuffer

100 mM KH_2PO_4 , pH 7,4

Homogenisierungspuffer

50 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, 250 mM Sucrose, pH 7,4

Komplettmedium für HepG2-Zellen:

RPMI 1640 Medium + 100 U/ml Penicillin-Streptomycin + 2 mM Glumatax + 10% FCS

Ladepuffer

Tetraethylammoniumhydroxid / Wasser / Acetonitril (25 : 540 : 1430) + 0,63 mmol/l EDTA + 440,8 mg/l BHT, pH 5,5

NADPH-regenerierendes-System

42,21 mg Glucose-6-Phosphat; 19,15 mg NADP und 0,46 mg Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase in 5,0 ml Phosphatpuffer

PBS (pH 7,4)

140 mM NaCl; 10 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$; 2,9 mM KH_2PO_4 in H_2O , pH 7,4

PBST

PBS + 0,2 % Tween 20

Phosphatpuffer, 50 mM nach Sørensen

40 mM Na_2HPO_4 , 10 mM KH_2PO_4 , 5 mM MgCl_2 , pH 7,4

TBME/BHT

1 ml BHT (10 mg/ml Ethanol) auf 1 L TBME, schütteln und im Ultraschall entgasen

TEDMG-Puffer

20 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 20 mM Natriummolybdat, 10% Glycerol, pH 7,5).

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkultur

Die Arbeiten wurden hauptsächlich an den humanen Leberkarzinomzellen HepG2 (ATCC HB 8065) durchgeführt, einem etablierten Modellsystem für Hepatozyten. HepG2 - Zellen werden häufig für die Untersuchung neuer, nicht-antioxidativer Funktionen sowie für die Messung des Abbaus von Vitamin E verwendet, da sie in der Lage sind, die verschiedenen Vitamin E – Formen aufzunehmen und bis zum Endprodukt CEHC zu verstoffwechseln (Birringer et al. 2001; Birringer et al. 2002).

3.2.2 Kultivierung der Zellen

Zur Kultivierung der Zellen wurde RPMI 1640 Medium, supplementiert mit 10% fötalem Kälberserum (FCS), 2 mmol/L Glutamax, 100 U/mL Penicillamin und 100 µg/mL Streptomycin, eingesetzt.

Die Kultivierung der Zellen erfolgte bei 37°C im Brutschrank in einer Atmosphäre von 5% CO₂. Die Passage der Zellen erfolgte im Wechsel von 3 und 4 Tagen. Zum Waschen und kurzfristigen Aufbewahren der Zellen wurde eine phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) mit einem pH-Wert von 7,4 verwendet.

3.2.3 Herstellung von Vitamin E – angereichertem Medium

Zur Herstellung von Komplettmedium mit einem Vitamin E – Gehalt von 50µM wurden 150 µl der jeweiligen Vitamin E - Form (17,17 µM in EtOH) tröpfchenweise zu 5 ml FCS zugegeben und bei 4°C über Nacht inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe des mit Vitamin E - angereicherten FCS zu 45 ml RPMI 1640 Medium.

Die exakten Konzentrationen der ethanolischen Vitamin E – Stammlösungen wurden durch Messung im Photometer mit Hilfe der jeweiligen Extinktionskoeffizienten bestimmt. Die Extinktionskoeffizienten, sofern nicht anders angegeben, entstammen früheren, laborinternen Messungen der in dieser Arbeit verwendeten Tocopherole und Tocotrienole. (α -Tocopherol: $\epsilon_{292\text{nm}} = 3058 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$, β - / γ -Tocopherol: $\epsilon_{298\text{nm}} = 3866 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$, δ -Tocopherol: $\epsilon_{298\text{nm}} = 3520 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$ (Podda et al. 1996), α -Tocotrienol: $\epsilon_{293\text{nm}} = 2481 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$, γ -Tocotrienol: $\epsilon_{293\text{nm}} = 2998 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$).

3.3 Tierhaltung

Mäuse des Stammes C57BL6 wurden nach den Vorgaben der Europäischen Labortier-Richtlinien in Standardkäfigen gehalten. Ihre Nahrung bestand aus einer Vitamin E – depletierten Diät, die ihrerseits auf dem Basisfutter basierte (Sniff, Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland). Der Diät wurden jeweils 2 mg/kg Futter, 20 mg/kg sowie 200 mg/kg *RRR*- α -Tocopherylacetat (Sigma T3001) beigemischt. Die Mäuse hatten freien Zugang zu Futter und Wasser.

Nach der Entwöhnung wurden je 12 männliche Tiere für 3 Monate mit der 2, 20 oder 200 mg α -Tocopherylacetat – Diät gefüttert. 7 Tage vor Terminierung des Versuchs erhielten je 6 Tiere einer Fütterungsgruppe zusätzlich 250 mg γ -Tocotrienol in 50 μ l Olivenöl durch Applikation mit einer Schlundsonde. Den anderen 6 Tieren einer Fütterungsgruppe wurde lediglich das Vehikel Olivenöl appliziert.

Einen Tag vor Versuchsende wurden jeweils 3 Mäuse jeder Versuchsgruppe (je 4 Mäuse der für 9 Monate supplementierten Mäuse) einzeln für 24 Stunden in metabolischen Käfigen gehalten und der Urin der Tiere aufgefangen und bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Vor Dekapitation der Tiere erfolgte die retroorbitale Blutentnahme, anschließend wurden die Organe gesammelt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Die für die Herstellung der Rattenleber-Mikrosomen verwendeten weiblichen Wistar-Ratten entstammten der Zucht des Tierhauses des Deutschen Institutes für Ernährungsforschung. Die Haltung und Fütterung der Tiere erfolgte gemäss den Vorgaben der Europäischen Labortier-Richtlinien.

3.4 Messung der Zytotoxizität verschiedener Vitamin E – Formen in HepG2-Zellen

3.4.1 MTT-Test

Der MTT-Test basiert auf der Reduktion des wasserlöslichen, schwach gelben Tetrazoliumsalses MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid, Sigma) zu einem tief blauen, alkohollöslichen Formazan. Die Blaufärbung wird hervorgerufen durch das Aufbrechen des Tetrazoliumrings von MTT durch NAD(P)H-abhängige Dehydrogenasen des endoplasmatischen Retikulums sowie durch mitochondriale Succinatdehydrogenasen und spiegelt direkt die Vitalität der Zellen wieder. Die Kultivierung und Inkubation der Zellen mit den zu testenden Substanzen sowie die nachfolgende Durchführung des MTT-Testes erfolgte in 96-Loch-Platten bei einer Dichte von 4000 Zellen / Loch in 200 µl Komplettmedium. Die Konzentration der eingesetzten Vitamin E – Formen betrug 10, 25, 50, 100, 200 und 500 µM. Die Herstellung des Vitamin E – angereicherten Mediums erfolgte wie unter Kapitel 3.2.3 beschrieben.

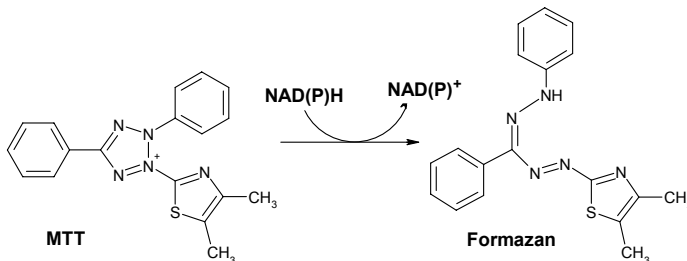


Abb. 3.1 Umsetzung von MTT zu Formazan zur Messung der Zellvitalität

Nach 48 h wurden je 20 µl MTT-Lösung (5 mg/ml in PBS) zu den Zellen gegeben. Nach 40-minütiger Inkubation im Brutschrank bei 37°C wurde das Medium entfernt und verworfen. Anschließend erfolgte die Zugabe von 100 µl eines Gemisches aus 95% Isopropanol und 5% Ameisensäure zum Lösen des ausgefallenen Formazans. Nach 10 min auf dem Schüttler wurde die Absorption bei einer Messwellenlänge von 550 nm gegen die Referenzwellenlänge 690 nm gemessen. Die Absorption der Kontrollzellen (Inkubation mit Vehikel EtOH) wurde als 100% Zellviabilität definiert.

3.4.2 Nachweis von Apoptose in mit α -Tocopherol- bzw. γ -Tocotrienol-behandelten HepG2 – Zellen

HepG2-Zellen wurden auf Objektträgern bei einer Dichte von 200000 Zellen / Objektträger in 6 ml Vitamin E-freiem Komplett-Medium ausgesät. Nach Kultivierung der Zellen für 96 h wurde ein Mediumwechsel von Vitamin E-freiem zu α -Tocopherol- bzw. γ -Tocotrienol-haltigem Komplettmedium durchgeführt. Die Endkonzentrationen betragen 5, 50 und 500 μ M für α -Tocopherol und 5, 25, 50, 100, 150 und 200 μ M für γ -Tocotrienol bei einer Ethanolkonzentration von 0,3%. Pro Tocol und Konzentration wurden je zwei Objektträger inkubiert, die nach 24 h bzw. 48 h geerntet wurden. Hierzu wurden die Objektträger kurz mit PBS gespült und die Zellen durch 5-minütige Inkubation in kaltem Methanol (-20°C) fixiert. Anschließend wurden die Objektträger kurz getrocknet und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

Nach 5-minütiger Rehydrierung der Zellen durch Zugabe von PBS wurden die Zellen zur Inaktivierung endogener Peroxidasen für 15 min mit 3% (v / v) Wasserstoffperoxid (H_2O_2) unter Schütteln inkubiert und anschließend in destilliertem Wasser gespült. Zur Blockierung des endogenen Biotins wurden die Zellen bei Raumtemperatur mit einem Avidin / Biotin Blockierungsreagenz nach Herstellerangaben inkubiert. Nach 2 kurzen Waschschritten mit PBST (PBS + 0,2% Tween 20) sowie PBS (1 mal) erfolgte die Inkubation der Zellen mit dem Anti-aktive Caspase-3 Primärantikörper in einer Verdünnung von 1 : 2500 in Antikörper-Verdünnungsmedium bei 4°C . Nach 20 Stunden wurde der Primärantikörper mit PBST (3 x 3 min) von den Zellen gewaschen. Nach nochmaligem kurzen Waschen in PBS wurde der biotinkoppelte Sekundärantikörper in einer Verdünnung von 1 : 800 in Antikörper-Verdünnungsmedium zu den Zellen gegeben. Nach 30 min Inkubation bei 37°C wurde der Sekundärantikörper durch Waschen mit PBST (3 x 3 min) sowie PBS (1 x 3 min) entfernt. Nun erfolgte die Inkubation mit dem POD-gekoppelten Streptavidin-Biotin-Komplex nach Herstellerangaben. Nach 4 weiteren Spülschritten wurde das Peroxidasesubstrat Diaminobenzidin für exakt 30 Sekunden zugegeben, durch Zugabe von H_2O wurde die Reaktion wieder gestoppt. Die Färbung der Zellkerne erfolgte durch Eintauchen der Objektträger für 30 Sekunden in eine Hämatoxylin-Lösung (Merck). Anschließend wurde 5 min in Leitungswasser gebläut, über eine aufsteigende Alkoholreihe dehydriert und in Histomount eingedeckt. Die alkoholische Reihe bestand aus folgenden Schritten: 90 Sekunden 70 % Ethanol, 120 Sekunden 96 % Ethanol, 120 Sekunden 100 % Ethanol, 150 Sekunden 100 % Ethanol, 150 Sekunden 100 % Toluol, 210 Sekunden 100 % Toluol.

Die mikroskopischen Untersuchungen und die Photodokumentation erfolgten mit dem Forschungsmikroskop Eclipse E 1000 (Nikon) in Kombination mit der Videokamera CCD-1300 CB (Vosskühler) und dem Echtfarbbildanalysesystem LUCIA G (Nikon).

3.5 Aufnahme von Vitamin E in Zellen

3.5.1 Kultivierung und Ernte der Zellen sowie Herstellung des Zelllysats

HepG2-Zellen wurden in 6-Loch-Platten bei einer Dichte von 250000 Zellen / Loch in 8 mL Komplettmedium ausgesät. Nach 4 Tagen Kultivierung der Zellen erfolgte mit dem Austausch des Vitamin E - freien Komplettmediums durch Vitamin E - haltiges Komplettmedium (Endkonzentration 50 μM) der Beginn der Inkubation. Die Inkubation wurde nach 72 Stunden durch die Abnahme des Mediums und die Ernte der Zellen beendet. Hierzu wurden die Zellen zwei Mal mit 500 μl PBS gewaschen, anschließend in 500 μl PBS abgeschabt und in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. Nach zweimaligem Nachspülen mit je 500 μl PBS erfolgte die Lyse der vereinten Zelllösung durch Behandlung mit dem Ultraschallstab (30 Durchgänge bei einer Frequenz von 80 Hz und Amplitude von 0,5 Sekunden), anschließend wurde das Lysat bei 4°C und 4000 g für 10 min zentrifugiert. Vom Überstand wurden 10 μl für die Proteinbestimmung abgenommen. Der Proteingehalt wurde hierbei nach der Methode von Bradford ermittelt (siehe Kapitel 3.5.4). Das restliche Zelllysate wurde mitsamt dem Zellpellet zur Messung der aufgenommenen Tocopherole und Tocotrienole bei -20°C gelagert.

3.5.2 Extraktion von Vitamin E aus Zelllysate

Zelllysate und Zellpellet wurden vereint und mit 40 μl des internen Standards δ -Tocopherol (108,24 μM in EtOH) versetzt. Nach Zugabe von 2 ml MeOH zum Zellextrakt erfolgte die Extraktion durch Ausschütteln mit 4 ml Hexan. Die organische Phase wurde gesammelt, die wässrige Phase erneut 2 mal mit 4 ml Hexan extrahiert. Die vereinte organische Phase wurde in der Vakuumzentrifuge bis zur Trockne eingedampft und in 200 μl Ethanol aufgenommen. Die fertigen Proben wurden bis zur Messung bei -20°C gelagert.

3.5.3 Messung von Vitamin E in Zelllysaten mittels HPLC

Die Messung der Tocopherole und Tocotrienole erfolgte mit einer HPLC von Merck/Hitachi mit UV-Detektion (Merck, Darmstadt, Deutschland). Als stationäre Phase diente eine LiChrosphere C18ec-Säule, 250 x 4 mm, mit zugehöriger Schutzsäule (Merck). Die isokratische Trennung erfolgte mit dem Laufmittelgemisch Methanol/Wasser (98 : 2). Die Flussrate betrug 0,95 mL/min bei einer Laufzeit von 30 min. Die Detektion erfolgte bei einer Wellenlänge von 294 nm. Die zu analysierenden Peaks wurden über die Retentionszeit identifiziert und über die Peakflächen des internen Standards quantifiziert. Die Tocopherole und Tocotrienole eluierten mit folgenden Zeiten: γ -Tocotrienol 7,35 min, α -Tocotrienol 8,37 min, δ -Tocopherol 10,02 min, γ -Tocopherol 11,86 min sowie α -Tocopherol 13,81 min.

$$\text{Stoffmenge Probe} = \frac{\text{Fläche Probe}}{\text{Fläche Standard}} \times \text{Stoffmenge Standard} \times \text{Responsefaktor}$$

Die errechnete Stoffmenge des Metaboliten wurde auf den Proteingehalt der Zellen bezogen. Die Responsefaktoren sind in Tabelle 3.1 aufgelistet.

Tabelle 3.1: Responsefaktoren der Tocopherole und Tocotrienole zum internen Standard δ -Tocopherol

	Responsefaktoren zu δ -Tocopherol			
	α -Tocopherol	γ -Tocopherol	α -Tocotrienol	γ -Tocotrienol
Mittelwert	1,4127	1,0460	1,3687	1,1464
<i>Stabwn</i>	0,062	0,068	0,070	0,028

3.5.4 Bestimmung der Proteinkonzentration der Zellen

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach der Methode von Bradford (Bradford 1976) mit dem Bradford-Farbstoff Coomassie brilliant blue G-250.

Die Durchführung der Proteinbestimmung erfolgte in 96-Loch-Platten in Dreifachbestimmung. Je 10 μ l Zelllysate bzw. BSA-Proteinstandard (20 μ g/ml bis 300 μ g/ml) wurden mit 200 μ l Bradford-Färbelösung versetzt, nach einer Inkubation von 15 min wurde anschließend die Absorption bei 595 nm im Photometer (DYNATECH MR5000, Denkendorf, Deutschland) gemessen. Durch Vergleich mit der Standardreihe konnte die Proteinkonzentration im Zelllysate berechnet werden.

3.6 Messung von Vitamin E - Metaboliten in Zellkulturmedien mittels HPLC

3.6.1 Oxidationsgeschützte Aufarbeitung von Metaboliten aus Zellkulturmedium

Die Kultivierung der Zellen sowie die Gewinnung von Zellkulturmedium und Zelllysat erfolgte wie unter Kapitel 3.5.1 beschrieben. Nach Ernte von Zellen und Medium wurde das Medium mit 100 µl Ascorbinsäure (40 mg/ml H₂O) als Oxidationsschutz und 20 µl des internen Standards α -CPHC (Birringer et al. 2002) (30 µM in EtOH) versetzt. Das Medium wurde im Anschluss entweder direkt aufgearbeitet oder bis zur späteren Aufarbeitung bei -20°C gelagert. Vor Aufarbeitung wurde das Medium durch Zugabe von 1,6 ml Natriumacetatpuffer (0,1 M, pH 4,5) angesäuert. Anschließend wurde das Medium mit 15 ml tert-Butylmethylether, dem 10 mg/L butyliertes Hydroxytoluol (BHT) als zusätzlicher Schutz vor Oxidation zugesetzt worden waren, durch Schütteln extrahiert. Die organische Phase wurde nach Zentrifugation (2 min, 4000 g, Raumtemperatur) gesammelt, die wässrige Phase zwei weitere Male mit 15 ml bzw. 10 ml tert-Butylmethylether (+ BHT) extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt, mit der Vakuumzentrifuge bis zur Trockne eingengt und in 200 µl Ladepuffer aufgenommen. Die fertigen Proben wurden bis zur Messung bei -20°C gelagert.

3.6.2 Analyse von Vitamin E- Metaboliten mittels HPLC

Die Trennung der Metabolite erfolgte in einem Summit-HPLC-System mit einem ED 50 elektrochemischen Detektor (Dionex, Idstein, Deutschland). Als stationäre Phase diente eine LiChrosphere C18ec-Säule, 250 x 4 mm, mit zugehöriger Schutzsäule (Merck). Die mobile Phase bestand aus den beiden Laufmitteln Acetonitril (ACN) sowie TEAH / Wasser / ACN (25 : 540 : 430) + 0,63 mmol/L EDTA. Der pH-Wert wurde auf 5,5 mit Essigsäure eingestellt. Die Flussrate betrug 0,6 mL/min mit dem folgenden Gradientenprogramm: 0% ACN: 0–34 min; 0–45% ACN: 34–52 min; 45–96% ACN: 52–55 min; 96% ACN: 55–65 min; 96–0% ACN: 65–68 min, und 0% ACN: 68–78 min. Für die coloumetrische Detektion betrug die Spannung der analytischen Zelle +0,55 V. Einige der Metaboliten konnten mit Hilfe von synthetischen Standards identifiziert werden, wobei sich folgende Retentionszeiten ergaben: γ -CEHC 7,25 min, α -CEHC 9,21 min, α -CPHC 12,28 min, γ -CMBHC 19,66 min sowie α -CMBHC 29,13 min. Unbekannte Peaks wurden mittels eines zeitgesteuerten Fraktionssammlers der Firma Gilson Abimed (Langenfeld, Deutschland) aufgefangen, aus dem HPLC Laufmittel extrahiert wie im vorigen Kapitel beschrieben und mittels GC/MS - Analyse identifiziert (siehe Kapitel 3.7.2).

Zur Quantifizierung der Vitamin E – Metaboliten wurden Responsefaktoren für α - und γ -CEHC sowie α -CMBHC zum internen Standard α -CPHC wie folgend bestimmt. Zu jeweils 8 mL Komplettmedium wurden eine konstante Konzentration des internen Standards α -CPHC sowie ansteigende Konzentrationen der vorhandenen synthetischen Standards α -CEHC, γ -CEHC sowie α -CMBHC zugegeben. Für γ -CMBHC war kein synthetischer Standard in Reinform erhältlich. Anschließend erfolgte die oxidationsgeschützte Aufarbeitung der Standards aus dem Zellkulturmedium wie beschrieben. Die Berechnung der Metabolitkonzentration erfolgte wie unter Kapitel 3.5.3 beschrieben. Die Responsefaktoren sind in Tabelle 4.1 aufgelistet. Die errechnete Stoffmenge der Metaboliten wurde auf den Proteingehalt der Zellen bezogen.

3.7 Messung von Carboxyethylhydroxychroman (CEHC) sowie Carboxymethylbutylhydroxychroman (CMBHC) in Mäuseurin mittels GC/MS

3.7.1 Extraktion von Vitamin E – Metaboliten aus Mäuseurin

Nach Trocknung des Urins in der Gefriertrocknung wurden 10 μ l des internen Standards Trolox (6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylsäure, 1 mg/ml in EtOH) zu 100 mg Urin gegeben. Im Anschluss erfolgte die dreimalige Extraktion mit je 5 ml Methanol. Die organische Phase wurde gesammelt und im Vakuumkonzentrator zur Trockne eingengt. Der Rückstand wurde mit wenig MeOH in ein Schliffreagenzglas überführt und unter N_2 erneut bis zur Trockne eingengt. Durch Zugabe von 600 μ l Reinstwasser, 1600 μ l Natriumacetatpuffer (0,1 M; pH 4,5) und 800 μ l Enzymlösung (enthielt 8 mg β -Glucuronidase in 850 μ l Natriumacetatpuffer) erfolgte die Dekonjugation der glucuronidierten und sulfatierten Metaboliten. Nach einer erneuten viermaligen Extraktion mit je 5 ml Diethylether wurde die organische Phase im Vakuumkonzentrator eingengt, der Rückstand mit 2 x 250 μ l EtOH in ein Derivatisierungsgefäß überführt und unter N_2 bis zur Trockne eingengt. Nun erfolgte die Derivatisierung durch Zugabe von 250 μ l BSTFA, 200 μ l Hexan, 40 μ l N,O-Bis(trimethylsilyl)acetamid und 10 μ l CTMS und Inkubation für 2 Stunden im Thermomixer bei 50°C. Die Proben wurden bis zur Messung bei -20°C gelagert. Jede Urinprobe wurde 2 mal extrahiert, von jeder Extraktion wiederum wurden je 2 GC/MS-

Messungen durchgeführt. Aufgrund des geringen Urinvolumens konnte von einigen Urinproben jedoch lediglich eine Extraktion durchgeführt werden.

3.7.2 GC/MS-Messung der urinären Metaboliten von Vitamin E

Die Analyse der Metabolite erfolgte mit einem SSQ 710 MAT Massenspektrometer (Finnigan MAT, Bremen, Deutschland) und einem Varian Gaschromatographen (Santa Clarita, USA) mit den folgenden Bedingungen: als stationäre Phase diente eine DB-5MS Kapillarsäule (30 m; 0,25 mm; 0,25 μ m; Fisher Scientific, Berlin), Trägergas war Helium. Ein Temperaturgradient wurde durchlaufen mit dem Beginn bei 180°C für 2 min und einem Anstieg von 10°C/min bis zur Endtemperatur von 280°C, die für 10 min beibehalten wurde. Die Temperatur des Injektors betrug 260°C, die der Transferleitung 300°C. Die Spannung der Elektronenquelle betrug -70 V bei einer Emmisionsstromstärke von 200 μ A, die Aufzeichnung der Massen erfolgte in einem Bereich von 50 bis 700 atomaren Masseneinheiten bei einer Scanzeit von 0,5 Sekunden. Die Quantifizierung der Metabolite erfolgte mit Hilfe der Masse des internen Standards Trolox im Vergleich zur Fläche von internem Standard und Metabolit und wurde mit dem jeweiligen Responsefaktor multipliziert. Dieser betrug für α -CEHC 0,985, für γ -CEHC 0,8437 sowie für α -CMBHC 2,4376. Für γ -CMBHC war kein synthetischer Standard in Reinform erhältlich. Da jedoch die physikalisch-chemischen Eigenschaften von α -CMBHC und γ -CMBHC sehr ähnlich sind, wurde zur Berechnung der Responsefaktor für α -CMBHC herangezogen. Die Masse der errechneten Metaboliten wurde in μ g Metabolit angegeben, die in 24 h mit dem Urin ausgeschieden wurde.

Die statistische Auswertung der urinären Extraktion erfolgte mit Hilfe der Software GraphPad Prism (Version 4.01). Die einzelnen Fütterungsgruppen wurden mit einer einfaktorischen ANOVA (Analysis of Variance) mit nachfolgendem Newman-Keuls Multiple Comparison Test auf signifikante Unterschiede getestet.

3.8 Messung der Hydroxylierungsrate von Vitamin E mit Hilfe von Rattenleber-Mikrosomen

3.8.1 Rattenleber-Mikrosomenpräparation

Zum Nachweis der ω -Hydroxylierung von α -, β -, γ - und δ -Tocopherol sowie α - und γ -Tocotrienol wurden Mikrosomen aus der Leber von weiblichen Wistar - Ratten mit einem Gewicht von 215 g bis 277 g präpariert. Nach Dekapitation der Ratten und Ausbluten wurde die Leber entnommen und kurz in 0,9% eiskalter Kochsalzlösung gewaschen. Anschließend wurde die Leber in kleine Stücke geschnitten und in 4 Teile (w : v) eiskalten Homogenisierungspuffer überführt (50 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, 250 mM Sucrose, pH 7,4). Nach Homogenisieren der Probe mittels eines Teflonpotters bei 4°C wurde das Homogenat bei 15000 g und 2°C für 20 min zentrifugiert (Zentrifuge und Rotor von Kontron, Deutschland: Centrikon T-1170, TFT 50.3). Das Pellet mit Kernen, Organellen und nicht aufgeschlossenem Gewebe wurde verworfen, der Überstand wurde erneut bei 100000 g und 2°C für 90 min zentrifugiert. Das Pellet mit den Mikrosomen wurde anschließend in wenig Homogenisierungspuffer gewaschen, in 1 ml Einfrierpuffer (100 mM KH_2PO_4 , pH 7,4) resuspendiert, in N_2 schockgefroren und bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

3.8.2 Bestimmung der Hydroxylierungsraten der verschiedenen Vitamin E - Formen mit Rattenleber - Mikrosomen

Je 205 μl Phosphatpuffer (50 mM nach Sørensen) wurden mit 5% BSA in Schliffglasröhrchen vorgelegt. Anschließend erfolgte die Zugabe von jeweils 5 μl der Standardlösungen (6 mM bis 40 mM in EtOH). Nach einer Vorinkubation von 1 h bei 4°C wurden Phosphatpuffer sowie 0,5 mg Mikrosomensuspension zugegeben. Nach einer 5-minütigen Vorinkubation bei 37°C im Wasserbad erfolgte der Reaktionsstart durch Zugabe von 100 μl eines NADPH-regenerierenden-Systems. Bei einem Endvolumen von 1 ml und 0,5 mg Mikrosomen pro Ansatz lag die Endkonzentration der eingesetzten Vitamin E - Formen zwischen 10 μM und 200 μM . Nach 60-minütiger Inkubation bei 37°C wurde die Reaktion durch Zugabe von 50 μl 5 N HCl gestoppt. Anschließend wurden die Reaktionsansätze mit 10 μl des internen Standards δ -Tocopherol (2 mM in EtOH) versetzt. Die Extraktion der hydroxylierten Metabolite erfolgte durch dreimaliges Ausschütteln der Reaktionsansätze mit jeweils 3 ml tert-Butylmethylether, dem zum Schutz vor Oxidation der Metabolite butyliertes Hydroxytoluol (Endkonzentration 10 mg/L) zugesetzt worden war. Die vereinigte

organische Phase wurde anschließend mit der Vakuumzentrifuge bis zur Trockne eingengt, in 200 µl 95% MeOH aufgenommen und bis zur Messung bei -20°C gelagert. Die Messung der Proben erfolgte mittels HPLC mit elektrochemischer Detektion mit der unter Kapitel 3.8.3 geschilderten Methode. Die Bestimmung der Michaeliskonstante K_M sowie der maximalen Geschwindigkeit der Reaktion V_{Max} erfolgte durch nichtlineare Regression mit Hilfe der Software GraphPad Prism (Version 4.01). Zur Verdeutlichung wurde die Hydroxylierungsrate zudem nach Eadie-Hofstee linearisiert. Hierzu wurde die Hydroxylierungsrate (V) gegen den Quotienten aus V gegen die Substratkonzentration $[S]$ aufgetragen. Der Y-Achsenabschnitt der Trendlinie entsprach der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit v_{max} und die Steigung der Michaelis-Konstanten K_m . Die Zugabe von je 10 µl der CYP450-spezifischen Inhibitoren erfolgte unmittelbar nach Zugabe des γ -Tocotrienols zur BSA-Lösung.

3.8.3 Analyse von hydroxyliertem sowie carboxyliertem Vitamin E mittels HPLC

Zum Nachweis der beiden ersten Metaboliten des Vitamin E – Abbaus wurde eine Summit – HPLC - Anlage mit einem ED 50 elektrochemischen Detektor (Dionex, Idstein, Deutschland) und als stationärer Phase einer LiChrosphere C18ec-Säule, 250 x 4 mm, mit zugehöriger Schutzsäule (Merck) bei einer Säulentemperatur von 30°C verwendet. Als mobile Phase dienten zwei Methanol-Wasser-Gemische mit den Mischverhältnissen 65 : 35 (v : v) sowie 95 : 5 (v : v), die im Folgenden als Laufmittel A (65 : 35) und Laufmittel B (95 : 5) abgekürzt werden. Beide waren mit 15,46 mM Lithiumacetat sowie 0,05% Trifluoressigsäure versetzt. Die Flussrate betrug 0,6 mL/min mit dem folgenden Gradientenprogramm: 0% Laufmittel B: 0 - 5 min; 0 - 100% Laufmittel B: 5 - 45 min; 100% Laufmittel B: 45 – 85 min; 100 - 0% Laufmittel B: 85 - 90 min und 0% Laufmittel B: 90 – 110 min. Die Spannung der analytischen Zelle betrug +0,85 V. Die zu analysierenden Peaks wurden anhand der Retentionszeit identifiziert, die Peakflächen wurden mit Hilfe des internen Standards bestimmt (siehe Kapitel 3.6.2). Da zur exakten Quantifizierung jedoch die Bestimmung von Responsefaktoren benötigt worden wäre, hierzu aber die nötigen synthetischen Standards fehlten, wurden die Metabolitkonzentrationen in nmol δ -Tocopheroläquivalente/ (mg*min) angegeben. Die carboxylierten bzw. hydroxylierten Verbindungen eluierten nach folgenden Retentionszeiten: 46,1 min γ -T3-COOH, 47,1 min γ -T3-OH, 47,9 min α -T3-COOH, 48,9 min α -T3-OH, 48,0 min δ -Toc-COOH, 50,4 min δ -Toc-OH, 50,3 min β -/ γ -Toc-COOH, 52,8 min β -/ γ -Toc-OH, 54,7 min α -Toc-OH.

3.8.4 Identifizierung der hydroxylierten sowie carboxylierten Vitamin E-Formen mittels LC/MS

Zur Identifizierung der hydroxylierten bzw. carboxylierten Metabolite wurde die HPLC-ECD-Methodik von Kapitel 3.8.3 auf die Bedingungen der LC-MS übertragen. Im konkreten Fall bedeutet dies, dass die beiden Laufmittel ohne den Zusatz von Lithiumacetat, welches u.a. der verbesserten Sensitivität der elektrochemischen Detektion diene, verwendet wurden. Zudem wurde das Ionenpaarreagenz Trifluoressigsäure durch Ameisensäure ersetzt, die weiteren HPLC-Parameter (Gradient, Fluss, Säule etc.) blieben unverändert. Trotz der gemachten Veränderung der Laufmittel wiesen die Metaboliten in den beiden Methoden HPLC-ECD und LC/MS die gleichen Retentionszeiten auf. Nach Identifizierung der Metabolite mittels LC/MS konnten also auch die Peaks der HPLC-ECD – Messungen zweifelsfrei zugeordnet werden.

Die Analysen wurden mit einem Quadrupol-Massenspektrometer VG Platform (Fisons Instruments, UK) durchgeführt, das über ein APCI-Interface mit einer HPLC-Anlage Waters 600E gekoppelt war. Neben der Aufzeichnung der Massenspektren erfolgte die Aufnahme von UV-Spektren von 200 nm bis 400 nm durch einen Waters 996 Photodiodenarray-Detektor. Die Trennung der Analyte erfolgte mit Hilfe einer LiChrosphere C18ec-Säule, 250 x 4 mm, mit zugehöriger Schutzsäule (Merck) bei einer Säulentemperatur von 30°C. Als mobile Phase dienten zwei Methanol-Wasser-Gemische mit den Mischverhältnissen 65 : 35 (v : v) sowie 95 : 5 (v : v). Anstelle von Lithiumacetat (1,02 g/L) und Trifluoressigsäure (0,1%) wurde Ameisensäure in einer Endkonzentration von 0,1% zu beiden Laufmitteln zugegeben. Gradientenprogramm und Flussrate wiederum waren identisch zur Analytik mit HPLC-ECD. Die Ionisation der Analyten erfolgte im positiven APCI – Modus mit folgenden Bedingungen: Corona 3,2 kV, Cone 25 eV, RF-Lens-Spannung 0,2 eV, Quellen-Temperatur 150°C, Proben-Temperatur 450°C.

4 Ergebnisse

4.1 Identifizierung neuer Metabolite im Abbau von Vitamin E

Der Metabolismus von Vitamin E wurde in Hepatozytenkarzinomzellen HepG2 untersucht. HepG2-Zellen sind seit vielen Jahren ein Standardmodellsystem in vielen Laboren weltweit. Sie haben sich viele Charakteristika von primären Leberzellen bewahrt, u.a. die Metabolisierung vieler verschiedener Xenobiotika. In HepG2-Zellen wurde zudem bereits von einem Abbau von α -Tocopherol und γ -Tocopherol berichtet (Birringer et al. 2001; Parker and Swanson 2000).

4.1.1 Toxizität der Tocopherole und Tocotrienole auf HepG2-Zellen

Da für alle Zellkulturversuche relativ hohe Vitamin E – Konzentrationen eingesetzt werden sollten, wurden alle Tocopherole und Tocotrienole auf eine mögliche Zytotoxizität getestet. Hierzu wurde mit HepG2-Zellen, die für 48h mit Vitamin E in ansteigender Konzentration inkubiert wurden, ein MTT-Test durchgeführt und die Viabilität der Zellen bestimmt.

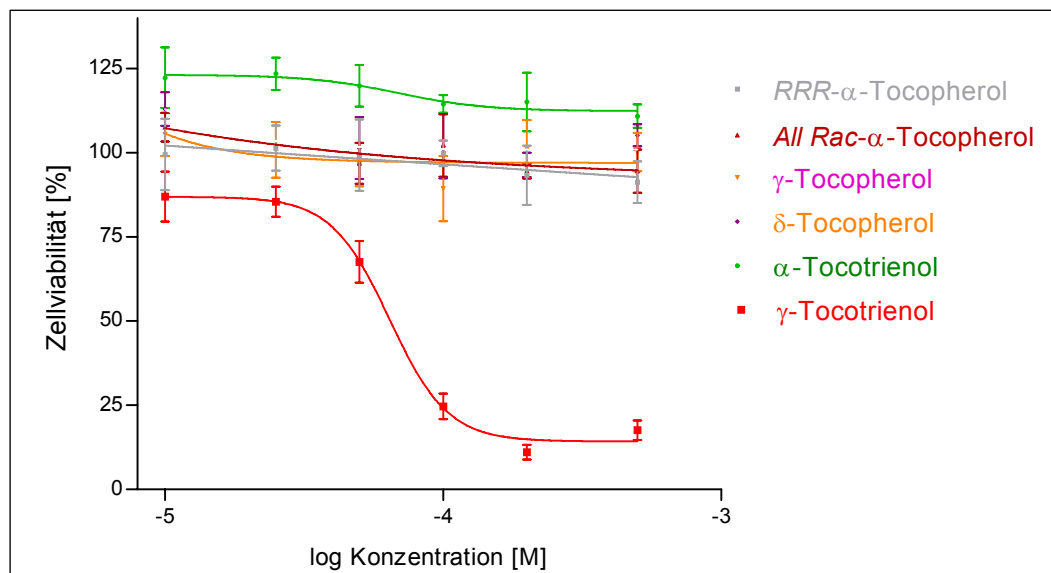


Abb. 4.1 MTT-Test zur Messung der Zellviabilität von Vitamin E auf HepG2-Zellen.

Nach 96h Vorinkubation von HepG2-Zellen bei einer Zelldichte von 4000 Zellen/Loch erfolgte die Zugabe von mit Tocopherol (Toc) bzw. Tocotrienol (T3) angereichertem Medium in einer Endkonzentration von 10, 25, 50, 100, 200 und 500 μ M. Nach 48 h wurde die Inkubation gestoppt und die Zellviabilität bestimmt wie in Kapitel 3.4.1 beschrieben.

Deutlich zu erkennen ist die starke Zytotoxizität von γ -Tocotrienol im Vergleich zu allen getesteten Tocopherolen sowie zum α -Tocotrienol. Diese sind selbst in der höchsten getesteten Konzentration von 500 μ M nicht toxisch für die Zellen. γ -Tocotrienol hingegen war selbst in geringer Konzentration toxisch, die mit Hilfe der Software GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, Kalifornien, USA) durchgeführte nichtlineare Regression ergab einen EC_{50} -Wert von $64,1 \pm 1,1 \mu$ M. Die Toxizität von γ -Tocotrienol hing jedoch von der Konfluenz der Zellen ab. Konfluente Zellen reagierten weniger sensitiv auf γ -Tocotrienol als subkonfluente Zellen, toxische Effekte von γ -Tocotrienol konnten bis zu einer Konzentration von 100 μ M nicht beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

Um nachzuweisen, dass auch in unserem Zellsystem die Zytotoxizität von γ -Tocotrienol durch die Induktion von Apoptose ausgelöst wird, wurde in auf Objektträgern inkubierten HepG2 – Zellen mittels Immunohistochemie die Induktion der Caspase 3 durch γ -Tocotrienol gezeigt. Wie die Aktivierung der Effektor-Caspase 3 zeigte, konnte diese toxische Wirkung auch in HepG2 - Zellen auf die Induktion von Apoptose zurückgeführt werden. Für Details zu Versuchsaufbau und Ergebnis wird auf den Appendix (Kapitel 6) verwiesen.

4.1.2 Nachweis von Intermediaten der β -Oxidation von α -Tocotrienol und γ -Tocotrienol

Mit Hilfe der zur Verfügung stehenden synthetischen Standards konnte ein HPLC-Gradientenprogramm etabliert werden, mit dessen Hilfe sich die Metaboliten CEHC sowie CMBHC chromatographisch trennen ließen (Details siehe Kapitel 3.6.2). HepG2-Zellen wurden für 72 h mit 50 μ M α -Tocotrienol bzw. γ -Tocotrienol inkubiert, das Medium extrahiert und die Metabolite in der HPLC mit elektrochemischer Detektion gemessen. Durch Vergleich der Retentionszeiten mit den zur Verfügung stehenden synthetischen Standards konnten α -CEHC, γ -CEHC, α -CMBHC und γ -CMBHC identifiziert werden. Peaks, für die kein Standard vorhanden war, wurden gesammelt und in der GC/MS identifiziert. Abbildung 4.1. zeigt das HPLC-Chromatogramm von 50 μ M α -Tocotrienol in HepG2-Zellen.

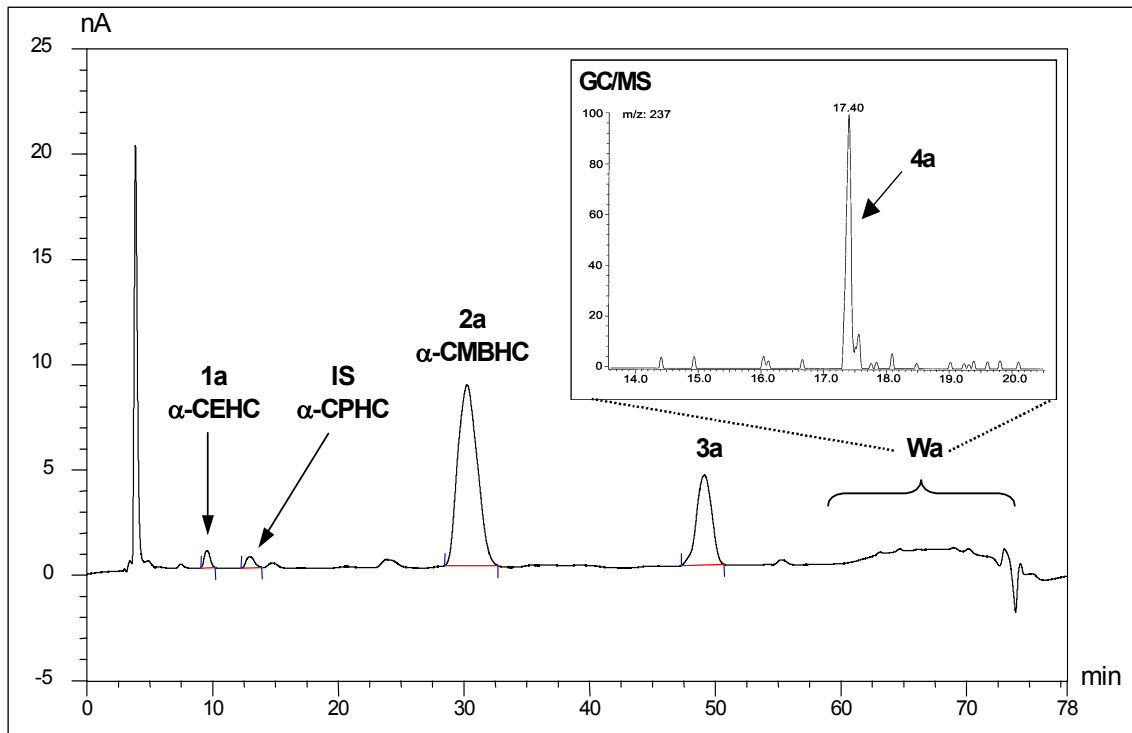


Abb. 4.2 HPLC - Chromatogramm von α -Tocotrienolmetaboliten in HepG2-Zellen

*HepG2-Zellen wurden für 96 h bei einer Zelldichte von 300000 Zellen/Loch kultiviert. Im Anschluss erfolgte die Inkubation mit 50 μ M α -Tocotrienol für 72 h. Die ins Zellkulturmedium sezernierten Intermediate wurden extrahiert und mittels HPLC gemessen. Die Metabolite α -CEHC (Peak **1a**) sowie α -CMBHC (Peak **2a**) konnten mit Hilfe von synthetischen Standards über die Laufzeit identifiziert werden. Peak **3a** wurde ebenso wie die Waschfraktion **Wa** gesammelt und in der GC/MS analysiert. Die eingeschobene Graphik in der rechten oberen Ecke (**GC/MS**) zeigt das zur Waschfraktion gehörende Chromatogramm der Massenspur $m/z = 237$ aus der GC/MS-Analyse. Diese Masse wurde gewählt, da sie ein charakteristisches Fragment des Chromanrings widerspiegelt und deshalb gut zur Identifizierung von α -Tocopherol- und α -Tocotrienolmetaboliten geeignet ist. In der Waschfraktion ist ein weiterer Metaboliten zu sehen, Peak **4a**. IS: Interner Standard α -CPHC.*

Mit Hilfe synthetischer Standards wurde α -CEHC (**1a**) bestätigt sowie ein weiterer Metabolit, α -CMBHC (**2a**), identifiziert. Peak **3a** sowie Peak **4a** konnten nicht zugeordnet werden, die Vermutung lag jedoch nahe, daß es sich um noch nicht identifizierte Metabolite handelt. Diese Peaks wurden gesammelt und anschließend in der GC/MS analysiert. Die dazugehörigen Massenspektren sind in Abb. 4.3 dargestellt.

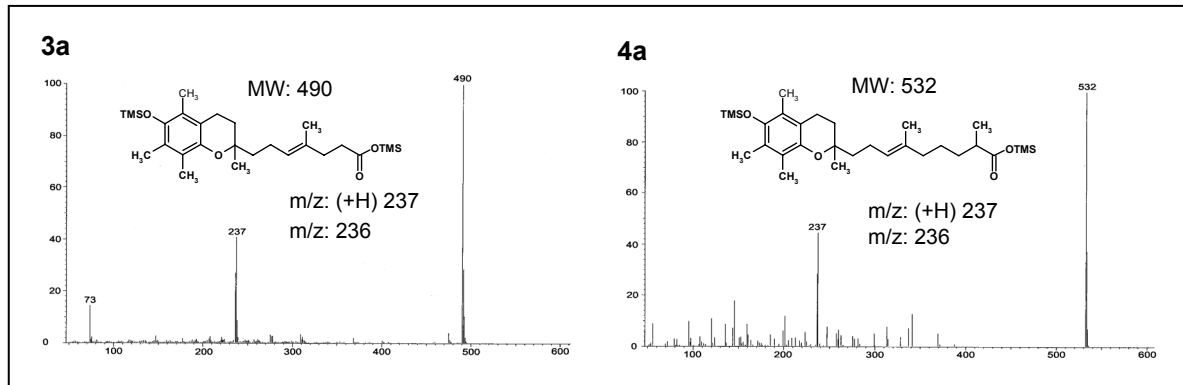


Abb. 4.3 Massenspektren der α -Tocotrienol-Metaboliten

Massenspektren der α -Tocotrienolmetabolite α -Carboxymethylhexenylhydroxychroman, α -CMH(en)HC (**3a**), sowie α -Carboxydimethyloctenylhydroxychroman, α -CDMO(en)HC (**4a**). Beide Spektren entstammen der GC/MS – Analyse des HPLC – Peaks 3a bzw. der Waschfraktion **Wa**. Das Ion mit der Masse m/z 73 entstammt dem abgespaltenen Trimethylsilylfragment (TMS), Fragment m/z 237 ist ein typisches Spaltprodukt des α -substituierten Chromanrings. Die Massen 490 sowie 532 entsprechen den molekularen Massen der derivatisierten α -CMH(en)HC sowie α -CDMO(en)HC. Weitere Details siehe Material & Methoden.

Die Massen der Spektren entsprachen den Metaboliten α -Carboxymethylhexenylhydroxychroman, α -CMH(en)HC (**3a**), sowie α -Carboxydimethyloctenylhydroxychroman, α -CDMO(en)HC (**4a**). Beide Metabolite enthielten das Fragment $m/z = 237$, welches typisch ist für den α -substituierten Chromanring. Das Ion mit der $m/z = 73$ resultierte aus der Abspaltung der Trimethylsilylgruppen (TMS). Die Identifizierung der Metaboliten war letztendlich durch Nachweis der kompletten, unfragmentierten Ionen mit der molekularen Masse m/z von 490 (**3a**) bzw. 532 (**4a**) möglich.

Auf gleiche Weise wurden neue Metabolite von γ -Tocotrienol identifiziert.

Abb. 4.4 zeigt das HPLC-Chromatogramm der Abbauprodukte von $50\mu\text{M}$ γ -Tocotrienol in HepG2-Zellen.

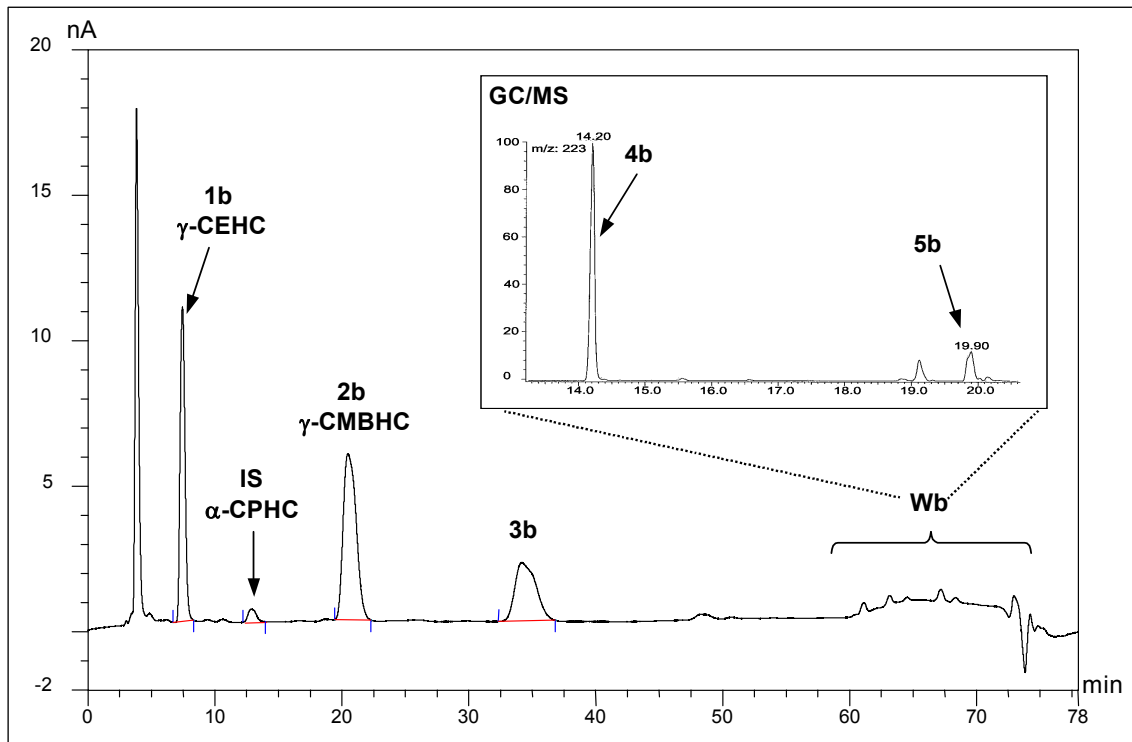


Abb. 4.4 HPLC - Chromatogramm von γ -Tocotrienolmetaboliten in HepG2-Zellen

Die ins Zellkulturmedium szernierten Intermediate wurden extrahiert und mittels HPLC gemessen. Die Metabolite γ -CEHC (Peak **1b**) sowie γ -CMBHC (Peak **2b**) konnten mit Hilfe von synthetischen Standards über die Laufzeit identifiziert werden. Peak **3b** wurde ebenso wie die Waschfraktion **Wb** gesammelt und in der GC/MS analysiert. Die eingeschobene Graphik in der rechten oberen Ecke (GC/MS) zeigt das zur Waschfraktion gehörende Chromatogramm der Massenspur $m/z = 223$ aus der GC/MS-Analyse. Diese Masse wurde gewählt, da sie ein charakteristisches Fragment des Chromanrings widerspiegelt und deshalb gut zur Identifizierung von γ -Tocopherol- und γ -Tocotrienolmetaboliten geeignet ist. In der Waschfraktion sind zwei weitere Metaboliten zu sehen, Peak **4b** und **5b**. IS: Interner Standard α -CPHC.

Wie bereits für α -Tocotrienol konnten auch für γ -Tocotrienol die entsprechenden Metaboliten γ -CEHC (**1b**) sowie γ -CMBHC (**2b**) mit Hilfe synthetischer Standards über die Laufzeit identifiziert werden. Ein weiterer Metabolit, Peak **3b**, wurde gesammelt und in der GC/MS analysiert. Mit der Waschfraktion **Wb** wurde genauso verfahren. Wie das GC/MS-Chromatogramm (GC/MS) in Abb. 4.4 zeigt, wurden mit der Waschfraktion zwei weitere Peaks eluiert, **4b** sowie **5b**. Diese sowie Peak **3b** konnten anhand der Massenspektren als Metabolite identifiziert werden (Abb. 4.5).

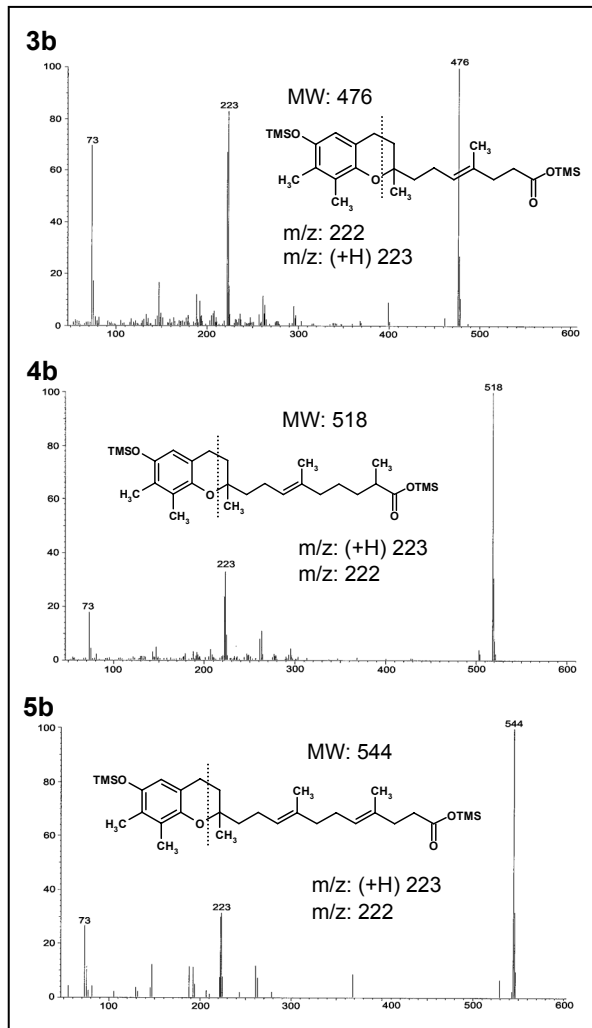


Abb. 4.5 Massenspektren der γ -Tocotrienol-Metaboliten

γ -Carboxymethylhexenylhydroxychroman, γ -CMH(en)HC (**3b**), γ -Carboxydimethyloctenylhydroxychroman, α -CDMO(en)HC (**4b**), γ -Carboxydimethyldecadienylhydroxychroman, γ -CDMD(en)₂HC (**5b**). Alle Spektren entstammen der GC/MS – Analyse der HPLC – Peaks 3b bzw. der Waschfraktion **Wb**. Das Ion mit der Masse m/z 73 resultiert aus dem abgespaltenen Trimethylsilylfragment (TMS), Fragment m/z 223 ist ein typisches Spaltprodukt des γ -substituierten Chromanrings (Spaltung an der gepunkteten Linie, siehe Strukturformel). Die Massen 476, 518 sowie 544 entsprechen den molekularen Massen von γ -CMH(en)HC, γ -CDMO(en)HC sowie γ -CDMD(en)₂HC.

Es handelt sich um die γ -Tocotrienolmetabolite γ -Carboxymethylhexenylhydroxychroman, γ -CMH(en)HC (**3b**), γ -Carboxydimethyloctenylhydroxychroman, α -CDMO(en)HC (**4b**), sowie γ -Carboxydimethyldecadienylhydroxychroman, γ -CDMD(en)₂HC (**5b**). Wie schon zuvor für die Metabolite von α -Tocotrienol trat auch für die γ -Tocotrienolmetabolite ein spezifisches Spaltprodukt mit einer m/z von 223 auf, wie es für γ -substituierte Chromanringe charakteristisch ist. Auch das Fragment mit der m/z 73 war vorhanden. Über die molekularen Massen 476 (**3b**), 518 (**4b**) sowie 544 (**5b**) konnten die Metabolite letztendlich zweifelsfrei identifiziert werden.

4.1.3 Bestätigung der initialen ω -Hydroxylierung durch die Identifizierung der hydroxylierten und carboxylierten Vitamin E – Formen

Ein Abbau der Seitenkette über eine β -Oxidation kann nur nach vorausgegangener Oxidation der Seitenkette zur Säure stattfinden. Dies kann durch eine Cytochrom P450 katalysierte initiale ω -Hydroxylierung geschehen. Die hieraus resultierenden Alkoholformen der Tocopherole und Tocotrienole konnten jedoch bisher weder in HepG2-Zellen noch *in vivo* nachgewiesen werden. Als Ursache hierfür kommen folgende Möglichkeiten in Betracht: 1. Die bisher bestehende Analytik war auf den Nachweis der kurzkettigen Metaboliten optimiert, langkettige Metaboliten konnten deshalb nicht von der HPLC- bzw. GC/MS-Säule eluiert werden. 2. Die entstandenen Alkohole wurden aufgrund kurzer Halbwertszeit sofort weiter verstoffwechselt werden. 3. Die entstandenen Alkohole werden weder von den Zellen ins Medium sezerniert noch *in vivo* aus den Hepatozyten in die Galle oder ins Blut abgegeben.

Um dennoch den direkten Nachweis der ω -Hydroxylierung zu erbringen, wurde die Reaktion extrazellulär mit Hilfe von Rattenleber-Mikrosomen durchgeführt, die v.a. aus dem endoplasmatischen Retikulum der Hepatozyten bestehen und deshalb einen hohen Gehalt an Cytochrom-P450-Monooxygenasen aufweisen. 5 mg mikrosomalen Proteins wurden mit je 200 μ M der verschiedenen Vitamin E - Formen für 60 min inkubiert, anschließend erfolgte die Extraktion der gebildeten Metaboliten mit Ether. Die Identifizierung der hydroxylierten bzw. carboxylierten Vitamin E – Formen wurde mit Hilfe einer neu entwickelten LC/MS – Methodik (mit paralleler UV-Detektion mittels Dioden-Array) erbracht. Zur Ionisierung der Metaboliten wurde die positive chemische Ionisation bei atmosphärischem Druck (Atmospheric Pressure Chemical Ionisation, APCI) gewählt, die sich in unserem Fall als am sensitivsten erwies. Die Identifizierung der Metabolite erfolgte anhand ihrer UV-Absorptionsspektren (nicht gezeigt) sowie v.a. anhand ihrer Massenspektren. Abb. 4.6 zeigt beispielhaft das LC-Chromatogramm für die aus α -Tocotrienol entstandenen Metabolite bei ihrem Absorptionsmaximum von 294 nm.

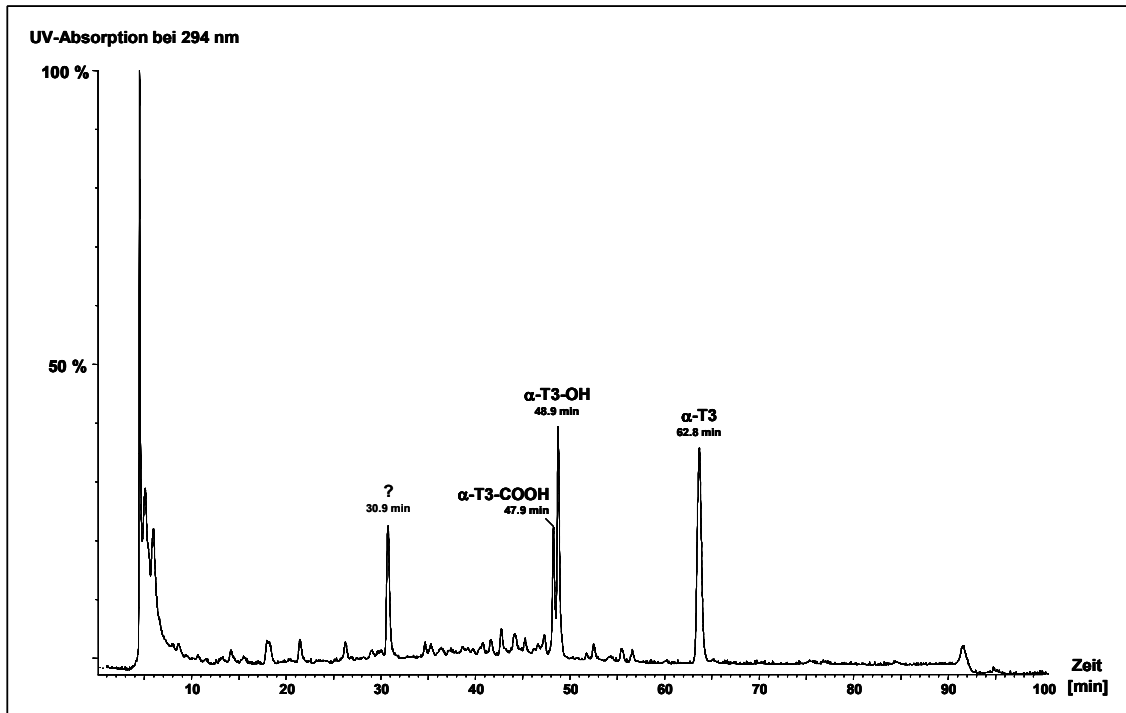
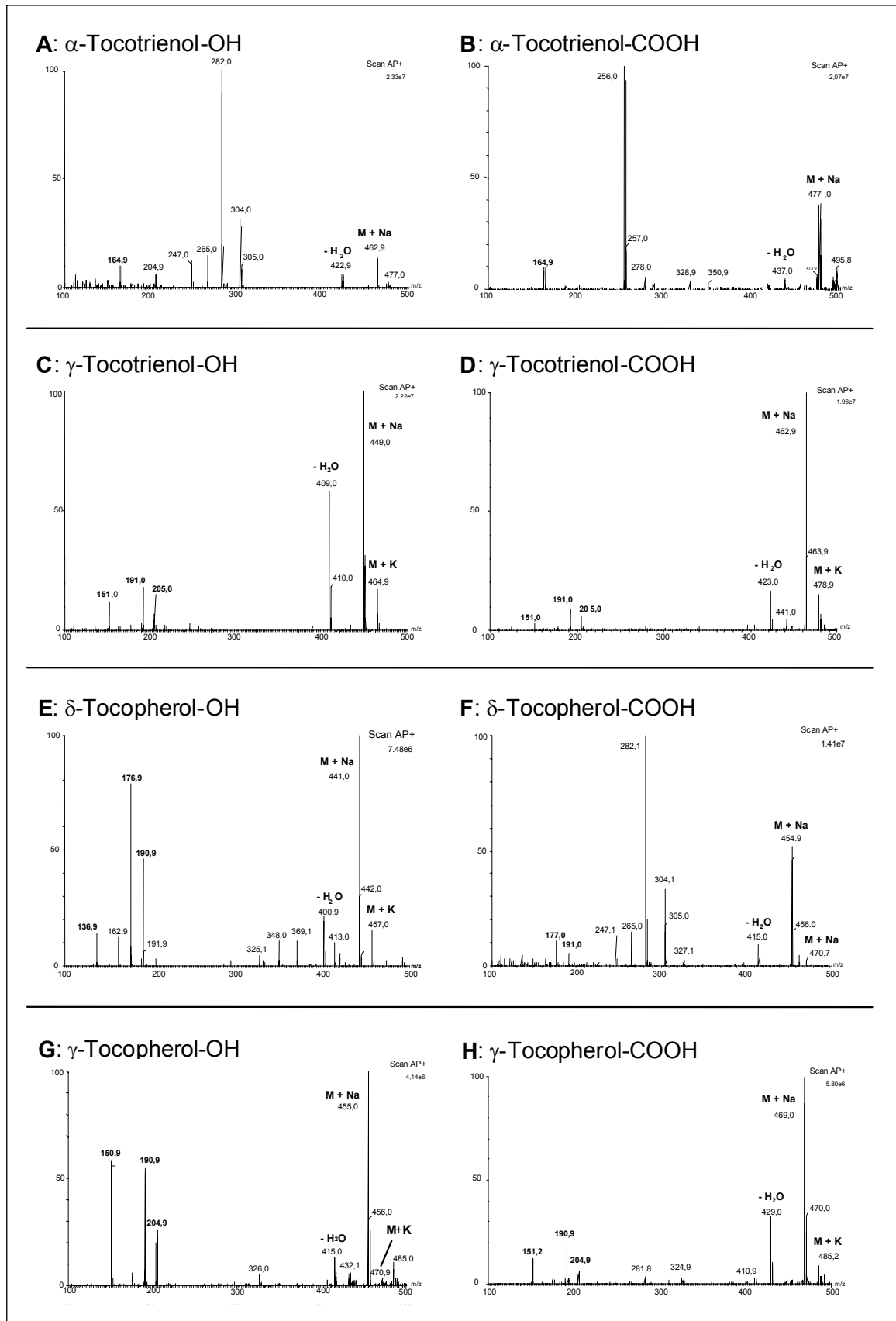


Abb. 4.6 LC – Chromatogramm der ω -Hydroxylierungsprodukte von α -Tocotrienol. Die Detektion der Metabolite erfolgte durch UV-Absorption bei 294 nm

α -Tocotrienol wurde in einer Konzentration von 200 μ M für 60 min mit 5 mg mikrosomalen Proteins inkubiert. Anschließend wurden die gebildeten Metaboliten mit Ether extrahiert und in der LC/MS mit gekoppelter UV-Detektion vermessen. Das Chromatogramm stellt die UV-Absorption des Substrats α -Tocotrienol (α -T3) und der in der ω -Hydroxylierungsreaktion entstandenen Produkte α -T3-OH (48.9 min), α -T3-COOH (47.9 min) sowie eines nicht identifizierten Peaks (30.9 min) bei einer Wellenlänge von 294 nm dar.

Neben dem Substrat α -Tocotrienol (α -T3; verifiziert durch Vergleich der Retentionszeit mit synthetischen Standards) ist deutlich die Bildung von 3 Produkten erkennbar. Während mit Hilfe der für den Chromanring charakteristischen UV-Spektren (nicht gezeigt) sowie der spezifischen Massenspektren die direkten Produkte der ω -Hydroxylierung, also hydroxyliertes α -T3 (α -T3-OH) sowie die daraus gebildete carboxylierte Form (α -T3-COOH) identifiziert wurden, konnte das 3. Produkt nicht identifiziert werden. Da dieses Produkt jedoch auch für die anderen Vitamin E – Formen sowie in der Negativkontrolle (ohne Vitamin E) gefunden wurde, ist anzunehmen, dass es sich um ein unspezifisches Produkt der Mikrosomen handelt. Die zweifelsfreie Identifizierung aller hydroxylierten und carboxylierten Vitamin E – Formen erfolgte jedoch letztendlich über die Bestimmung der charakteristischen Massen, die Spektren sind in Abb. 4.7 aufgezeigt.



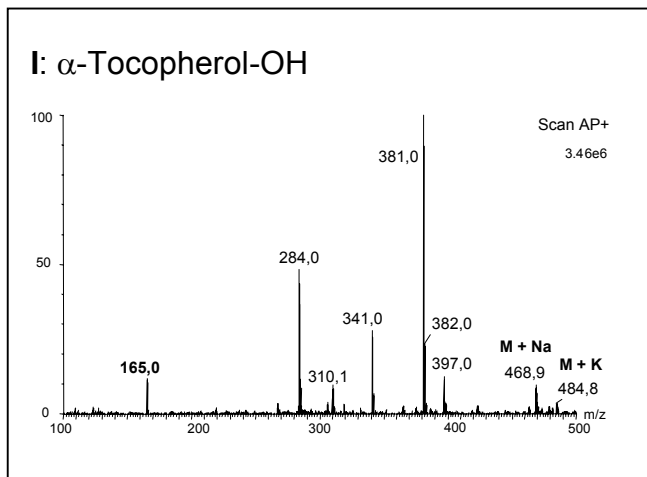


Abb. 4.7 Massenspektren der hydroxylierten bzw. carboxylierten Vitamin E - Formen nach LC/MS- Messung mit APCI +

Verschiedene Vitamin E - Formen wurden in einer Konzentration von je 200 μ M für 60 min mit 5 mg mikrosomalen Proteins inkubiert. Anschließend wurden die gebildeten Metaboliten mit Ether extrahiert und in der LC/MS vermessen. Die Ionisierung erfolgte durch APCI (Atmospheric Pressure Chemical Ionisation) im positiven Modus. Die Spektren zeigen die wichtigsten Addukte ($M + \text{Natrium}$, $M + \text{Kalium}$, Abspaltung von Wasser ($-\text{H}_2\text{O}$)) der hydroxylierten (**A,C,E,G,I**) bzw. carboxylierten (**B,D,F,H**) Vitamin E – Formen. Die jeweiligen Molekülonen konnten aufgrund der Art der Ionisation (APCI+) nicht detektiert werden.

Mit Hilfe der LC/MS mit APCI+ gelang die Identifizierung aller hydroxylierten und carboxylierten Tocopherole und Tocotrienole bis auf eine Ausnahme. α -Tocopherol-COOH konnte nicht nachgewiesen werden. Die wahrscheinlichste Ursache ist hierbei die zu geringe Konzentration. Schon die Konzentration von α -Tocopherol-OH war sehr gering, wie das zugehörige Chromatogramm (nicht gezeigt) sowie das Massenspektrum (Abb. 4.7, I) ergab. Hier wurde für die typischen Na- und K- Addukte bzw. Chromanring-Fragmente (m/z 165) nur eine kleine Intensität gefunden, während nicht zuordnungsbarer Matrixpeaks hohe Intensitäten aufwiesen.

Für alle anderen Metabolite konnten hauptsächlich Natriumaddukte ($M + \text{Na}$) nachgewiesen werden sowie zu einem geringeren Teil Kaliumaddukte ($M + \text{K}$), die reinen Molekülonen (M) konnten aufgrund der Art der Ionisation (APCI+) nicht detektiert werden. Auch über die Fragmentierung der Metabolite konnte die Identifizierung erfolgen. Hierbei wurden Fragmente des gespaltenen Chromanrings (m/z 165 für α -Toc- bzw. α -T3 – Metabolite, m/z 151 für γ -Toc- bzw. γ -T3 – Metabolite, m/z 137 für δ -Toc – Metabolite), des intakten Chromanrings mit abgespaltenen Seitenkette (m/z 191 und 205 für γ -Toc- bzw. γ -T3 – Metabolite, m/z 177 und 191 für δ -Toc – Metabolite) sowie das Molekülon mit abgespaltenem Wasser ($M + 18$ ($-\text{H}_2\text{O}$)) gefunden.

4.1.4 Der Abbau der Tocotrienole am Beispiel von γ -Tocotrienol

Durch die kombinierte Anwendung von GC/MS und LC/MS zur Analyse der von HepG2-Zellen und Rattenlebermikrosomen produzierten Verbindungen gelang der Nachweis aller Intermediate des γ -Tocotrienolabbaus. Auch für α -Tocotrienol konnten 3 der 4 Intermediate der β -Oxidation sowie die Intermediate der β -Hydroxylierung gefunden werden. Somit kann für die Tocotrienole ein Schema des Abbaus erstellt werden, Abb. 4.8 zeigt den Verlauf beispielhaft für γ -Tocotrienol. Die für den Nachweis der ω -Hydroxylierungsprodukte verwendete LC/MS – Methodik wurde in späteren Messungen auch verwendet, um in HepG2 – Zellen, die für 48h mit 50 μ M α - bzw. γ -Tocotrienol inkubiert worden waren, ins Medium sezernierte Metabolite nachzuweisen. Hierbei konnten alle Zwischenprodukte der β -Oxidation nachgewiesen und dadurch der Abbau verifiziert werden (Daten nicht gezeigt).

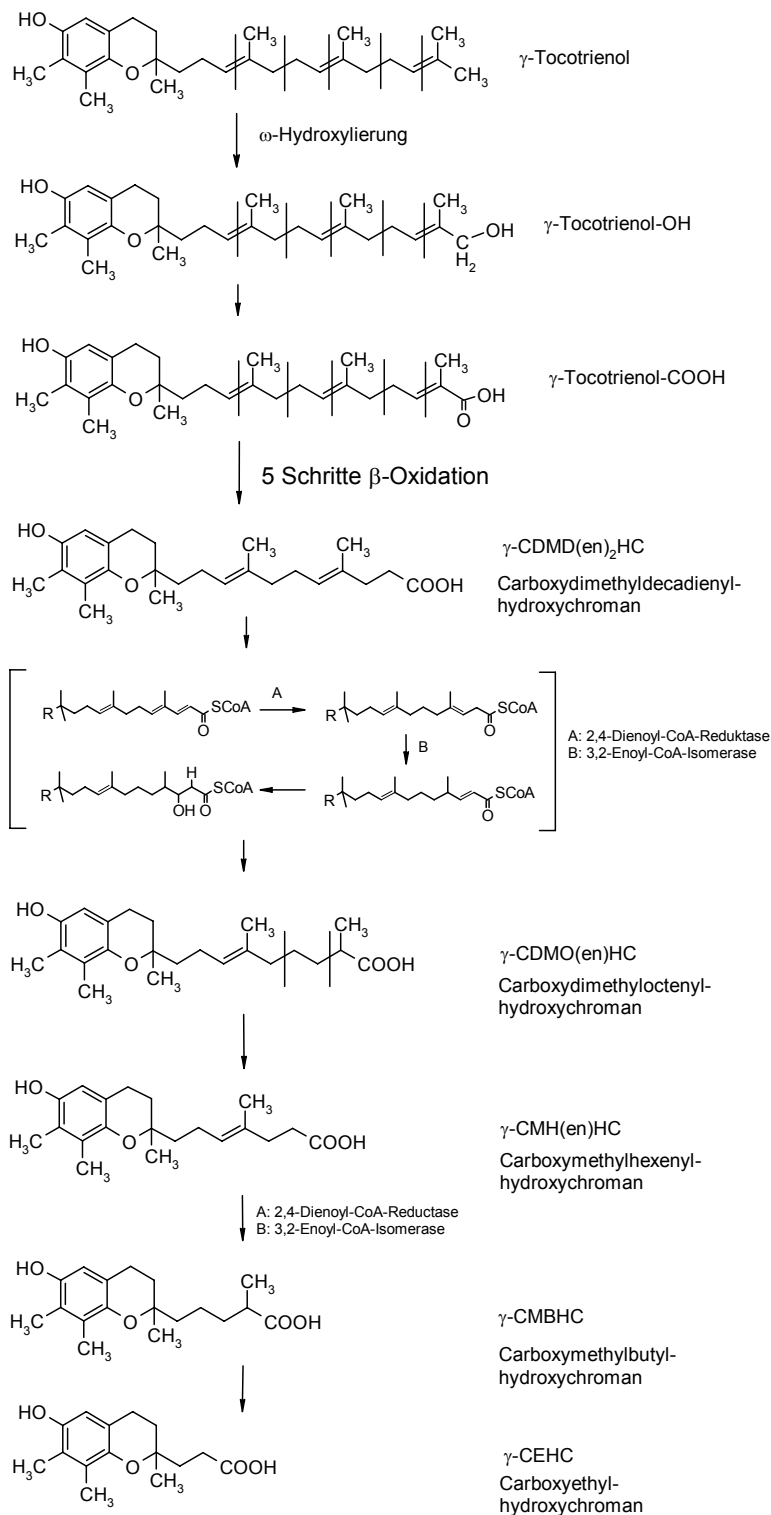


Abb. 4.8 Mechanismus der Seitenkettenverkürzung von Tocotrienolen am Beispiel von γ -Tocotrienol

Tocotrienole werden durch eine initiale ω -Hydroxylierung und 5 nachfolgende β -Oxidationsschritte abgebaut. Die Zwischenprodukte konnten durch von HepG2-Zellen ins Medium sezernierte Intermediate sowie von Rattenlebermikrosomen gebildete initiale Metabolite identifiziert werden. Aufgrund der ungesättigten Seitenkette der Tocotrienole sind im 2. sowie 4. Schritt der β -Oxidation zwei zusätzliche Enzyme nötig, 2,4-Dienoyl-CoA-Reduktase (A) und 3,2-Enoyl-CoA-Isomerase (B).

4.2 Quantitativer Nachweis von Vitamin E – Metaboliten *in vitro*

4.2.1 Aufnahme der verschiedenen Vitamin E - Formen in HepG2 - Zellen

Nach Aufklärung des Metabolismus wurde die Aufnahme der verschiedenen Vitamin E – Formen in die Zellen untersucht. Hierbei war insbesondere von Interesse, ob die Aufnahme in unterschiedlichem Ausmaß geschieht. Alle untersuchten Vitamin E – Formen wurden in einer Konzentration von 50 μM eingesetzt.

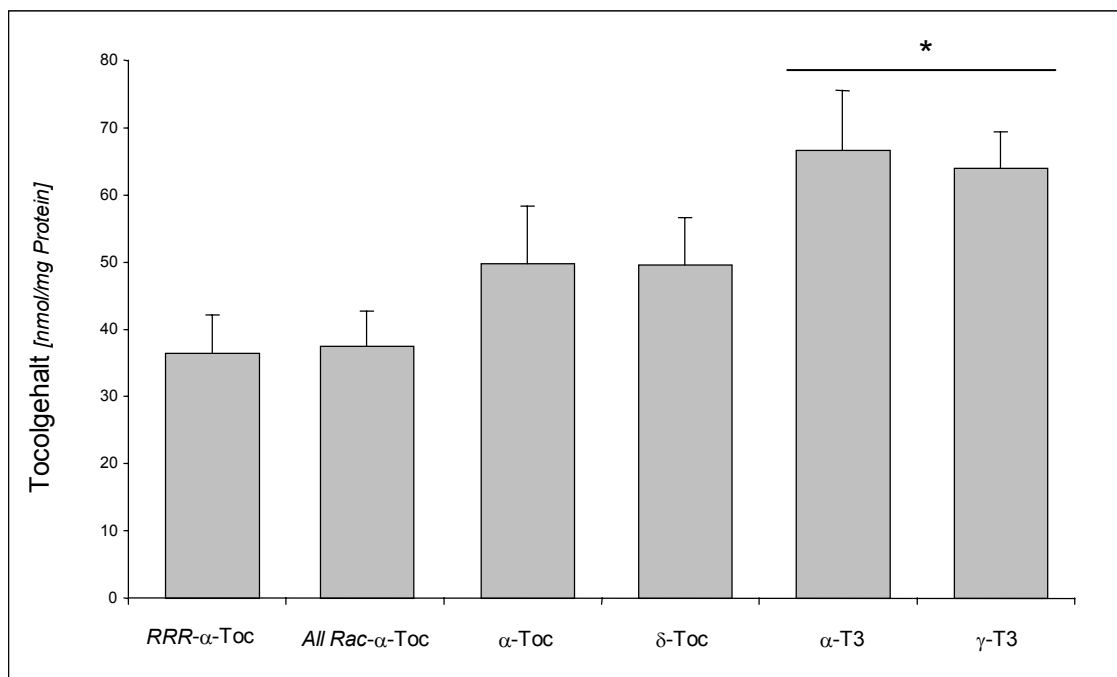


Abb. 4.9 Aufnahme von Vitamin E in HepG2-Zellen

HepG2-Zellen wurden für 96 h bei einer Zelldichte von 300000 Zellen / Loch kultiviert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit 50 μM der jeweiligen Vitamin E – Form für 72 h. Nach Ernte der Zellen und Extraktion erfolgte die Bestimmung der aufgenommenen Tocopherole und Tocotrienole mittels HPLC wie in Kapitel 3.5.3 beschrieben. Die Abbildung zeigt den Mittelwert \pm Standardabweichung für $n=3$. Die statistische Auswertung erfolgte durch ANOVA mit anschließendem Student-Newman-Keuls-Test. *: $p < 0,05$

Die zelluläre Konzentration der Tocotrienole war nach 72 h Inkubation ca. doppelt so hoch wie die des natürlichen oder synthetischen α -Tocopherols, die Konzentrationen von γ -Tocopherol und δ -Tocopherol lagen dazwischen. Ob die unterschiedlich hohen intrazellulären Vitamin E - Konzentrationen sich auch in der Abbaurate der verschiedenen Vitamin E – Formen widerspiegeln, sollte im nächsten Schritt geklärt werden.

4.2.2 Quantitativer Nachweis der Vitamin E - Metabolite α -CEHC, α -CMBHC, γ -CEHC und γ -CMBHC in HepG2-Zellen

Optimierung der HPLC-Bedingungen für die Quantifizierung von Vitamin E – Metaboliten

Die Bestimmung der Konzentration der Vitamin E – Metabolite erfolgte durch HPLC mit elektrochemischer Detektion. Bei der elektrochemischen Detektion ist es jedoch möglich, dass gleiche Konzentrationen unterschiedlicher Moleküle nicht die gleichen Flächen ergeben, da es zu einer Oxidation oder Reduktion der zu detektierenden Substanzen kommen muss, diese aber ein unterschiedliches Redox-Potential besitzen. Im Falle von Vitamin E handelt es sich dabei um eine Oxidation. Das Prinzip der elektrochemischen Detektion wird in Abb. 4.10 am Beispiel von α -Tocopherol näher erläutert.

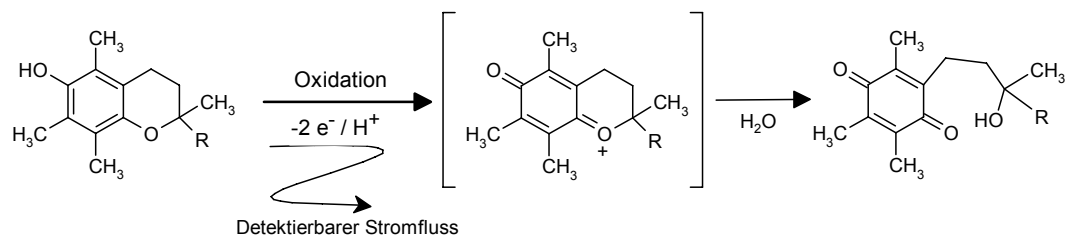


Abb. 4.10 Elektrochemische Detektion von α -Tocopherol

Durchläuft α -Tocopherol die Elektrode des elektrochemischen Detektors, so bewirkt die angelegte positive Spannung eine Oxidation des Hydroxychromanringes. Es kommt zur Freisetzung von 2 Elektronen, ein Strom fließt. Die Stromstärke steigt hierbei proportional zum Gehalt an α -Tocopherol in der Elektrode. Misst man nun die Spannung, die zur Aufrechterhaltung eines konstanten Widerstandes in der Elektrode benötigt wird, so kann man die Menge an α -Tocopherol über die bei der elektrochemischen Reaktion entstandene Stromstärke berechnen. Das instabile Zwischenprodukt reagiert im wässrigen Milieu des HPLC-Laufmittels rasch mit Wasser, wodurch es zu einer Öffnung des Chromanringes kommt.

Nur wenn die angelegte Spannung der elektrochemischen Zelle über dem Redoxpotential der zu detektierenden Substanz liegt, kommt es dabei zur Oxidation des Hydroxychromanringes und damit zur Detektion. Im Falle von Vitamin E, das ein sehr tiefes Redox-Potential aufweist, wird deshalb schon bei relativer niedriger Spannung der elektrochemischen Zelle ein Signal erzeugt, während Substanzen mit hohem Redoxpotential bei gleicher Spannung noch nicht detektiert werden können.

Ermittlung der optimalen Spannung der elektrochemischen Zelle durch Erstellen eines Voltagramms:

Um die optimale Spannung der elektrochemischen Zelle zu ermitteln, wurde in einem ersten Schritt ein Voltagramm erstellt. Hierbei wurde die gleiche Probe bei unterschiedlicher Spannung der Elektrode gemessen.

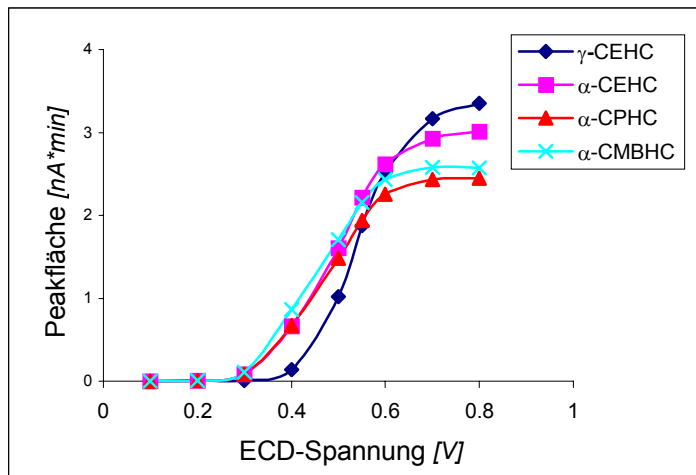


Abb. 4.11 Voltogramm der synthetischen Standards γ -CEHC, α -CEHC, α -CPHC sowie α -CMBHC

Ein Standardmix aus γ -CEHC, α -CEHC, α -CPHC sowie α -CMBHC (je $1\mu\text{M}$ in Acetonitril) wurde mehrere Male bei gleicher HPLC-Methodik, aber unterschiedlicher Spannung der Elektrode des elektrochemischen Detektors gemessen.

Ab einem Bereich von 0,3 - 0,4 V war die Messung der Metabolite prinzipiell möglich und erreichte ab 0,6 - 0,8 V ein Maximum an Sensitivität. Da im hohen Bereich jedoch viele weitere Substanzen ebenfalls oxidiert werden könnten, wurde für alle Messungen eine Spannung von 0,55 V gewählt, um größtmögliche Sensitivität bei hoher Selektivität zu gewährleisten.

Bestimmung der Responsefaktoren:

Zur Quantifizierung der Vitamin E – Metabolite CEHC und CMBHC mit elektrochemischer Detektion wurde der interne Standard α -CPHC verwendet. Dieser Standard ähnelt in seiner Struktur stark den zu messenden Metaboliten. Dennoch bleibt festzuhalten, dass auch die individuellen Vitamin E – Formen sowie ihre Metaboliten durch die unterschiedliche Methylierung des Chromanringes und die unterschiedliche Länge der Seitenketten ein verschiedenes Redoxpotential besitzen können. Aus diesem Grunde ist es unerlässlich, Responsefaktoren der unterschiedlichen Metabolite zu α -CPHC zu bestimmen. Hierzu wurde Zellkulturmedium mit ansteigenden Konzentrationen an α -CEHC, γ -CEHC sowie α -CMBHC bei einer gleichbleibenden Konzentration von α -CPHC versetzt, anschließend erfolgte die Extraktion und die Messung per HPLC mit elektrochemischer Detektion. Die (mit Hilfe des internen Standards) gemessenen Konzentrationen (Ist) wurden

anschließend mit den eingesetzten Konzentrationen (Soll) verglichen. Aus den Quotienten Soll/Ist ergaben sich die jeweiligen Responsefaktoren. Bei graphischer Auftragung entsprachen diese der Steigung der Tangenten.

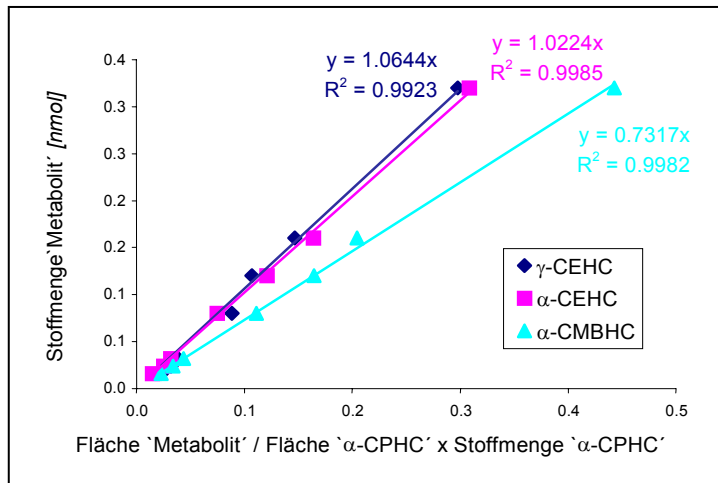


Abb. 4.12: Bestimmung der Responsefaktoren von α -CEHC, γ -CEHC sowie α -CMBHC im Vergleich zum internen Standard α -CPHC.

A) Nach Zugabe ansteigender Konzentrationen von γ -CEHC, α -CEHC und α -CMBHC bei einer konstanten Konzentration von α -CPHC zu 8 ml Zellkulturmedium erfolgte die Extraktion und Messung per HPLC wie in Kapitel 3.6 beschrieben. Die Responsefaktoren entsprechen der Steigung der Geraden nach linearer Regression. Die Abbildung zeigt das Ergebnis einer Bestimmung. **B)** Strukturformel des internen Standards α -CPHC.

Wie beispielhaft in Abb. 4.12 gezeigt bzw. in Tabelle 4.1 für 4 unabhängige Messungen zusammengefasst, waren die Responsefaktoren von α -CEHC sowie γ -CEHC im Vergleich zu α -CPHC aufgrund ihrer ähnlichen chemischen Struktur annähernd 1, für α -CMBHC jedoch nahm der Faktor auf ca. 0,7 ab. Da ein Standard für γ -CMBHC nicht zur Verfügung stand, wurde im folgenden aufgrund der ähnlichen Werte für α - und γ -CEHC der Responsefaktor von α -CMBHC auch für die Quantifizierung von γ -CMBHC verwendet.

Tabelle 4.1: Responsefaktoren von α -CEHC, γ -CEHC und α -CMBHC im Vergleich zu α -CPHC. Die Responsefaktoren wurden aus 4 unabhängigen Bestimmungen ermittelt.

	Responsefaktoren zu α -CPHC		
	γ -CEHC	α -CEHC	α -CMBHC
Mittelwert	0,96	0,93	0,76
Stabwn	0,07	0,08	0,06

Quantifizierung der Vitamin E – Metabolite in HepG2 – Zellen:

Nach der Identifizierung der Tocotrienolmetaboliten sowie der Optimierung der HPLC-Methodik war es nun möglich, in HepG2-Zellen die Produktion der Vitamin E – Metabolite CEHC und CMBHC zu quantifizieren.

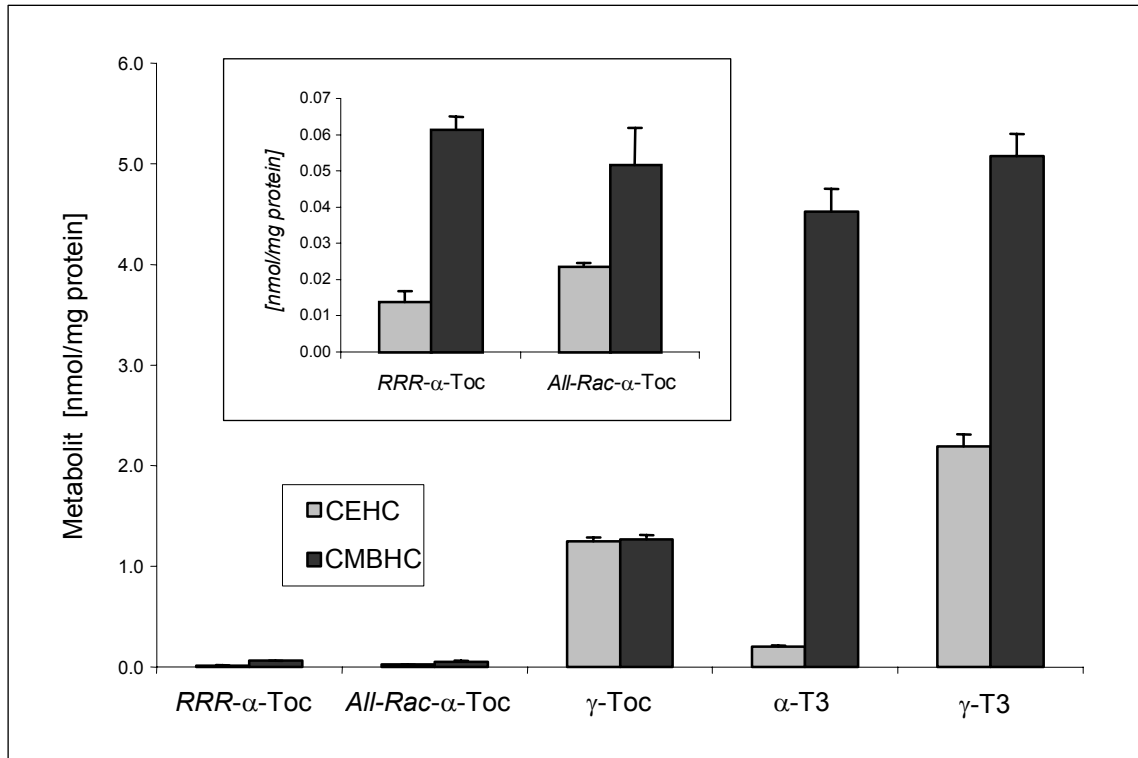


Abb. 4.13 Metabolismus von Tocopherolen (Toc) und Tocotrienolen (T3) in HepG2-Zellen.

HepG2-Zellen wurden für 96 h bei einer Zelldichte von 300000 Zellen/Loch kultiviert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit 50 μ M der jeweiligen Vitamin E – Form für 72 h. Nach Ernte der Zellen erfolgte die Extraktion des Zellkultumediums wie in Kapitel 3.6 beschrieben. Die Messung der Metaboliten CEHC sowie CMBHC erfolgte mittels HPLC mit elektrochemischer Detektion. Die Metaboliten des natürlichen (RRR) und synthetischen (all-Rac) α -Tocopherols sind in einem eigenen Fenster mit vergrößerter Skala zusätzlich abgebildet. Die Daten zeigen den Mittelwert \pm Standardabweichung aus 3 Experimenten.

Deutlich zu sehen ist dabei der hohe Unterschied im Metabolismus zwischen α -Tocopherol und den Tocotrienolen und γ -Tocopherol: sowohl das natürliche als auch das synthetische α -Tocopherol wurden um einen Faktor von ca. 100 schwächer abgebaut als γ -Tocotrienol, das die höchste Metabolismusrate zeigt. In allen Fällen war CMBHC der Hauptmetabolit. Auffallend war die geringe Konzentration von α -CEHC bei Inkubation mit α -Tocotrienol. Dem gegenüber war nach Inkubation mit γ -Tocopherol die Ausschüttung von γ -CEHC sowie γ -CMBHC ungefähr gleich.

4.2.3 ω -Hydroxylierung von Vitamin E mit Rattenleber-Mikrosomen

Die Quantifizierung der Vitamin E – Metabolite in HepG2 – Zellen erbrachte große Unterschiede im Abbau der verschiedenen Vitamin E – Formen. Die direkten Produkte der ω -Hydroxylierung Tocol-OH und Tocol-COOH konnten in HepG2 - Zellen jedoch nicht detektiert werden. Dennoch gilt die initiale Aktivierung einer Substanz durch Cytochrom P450 als einer der entscheidenden und geschwindigkeitsbestimmenden Schritte im Abbau vieler Xenobiotika. Im nächsten Schritt sollte deshalb geprüft werden, ob die Kinetik der ω -Hydroxylierung für die verschiedenen Vitamin E – Formen unterschiedlich verläuft und somit zu den in HepG2-Zellen gefundenen Unterschieden im Abbau der individuellen Vitamin E – Formen beitragen kann. Zum Einsatz kamen hierzu erneut Rattenlebermikrosomen, mit deren Hilfe die ersten Metabolite der ω -Hydroxylierung von Vitamin E mittels LC/MS bereits zweifelsfrei nachgewiesen, jedoch nicht quantifiziert werden konnten. Zur Quantifizierung wurde die LC/MS – Methodik deshalb auf die hoch sensitive Quantifizierung durch HPLC mit elektrochemischer Detektion übertragen. Des weiteren mussten optimale Reaktionsbedingungen für die ω -Hydroxylierung bestimmt werden, wie das nächste Kapitel näher erleutert. In einem letzten Schritt erfolgte am Beispiel von γ -Tocotrienol zudem der Beweis, dass die ω -Hydroxylierung von Vitamin E tatsächlich über eine Cytochrom P450-katalysierte Reaktion verläuft.

Testetablierung:

Um die ω -Hydroxylierungsrate der verschiedenen Vitamin E – Formen vergleichen zu können, wurden zuerst die optimalen Reaktionsbedingungen, d.h. die optimale mikrosomale Proteinkonzentration, Vitamin E – Konzentration sowie Inkubationsdauer, ermittelt. Hierzu erfolgte die Inkubation von 10 mg mikrosomalen Proteins mit 100 μ M γ -Tocotrienol bei einer Inkubationsdauer von 180 min, wobei je einer dieser Parameter verändert wurde.

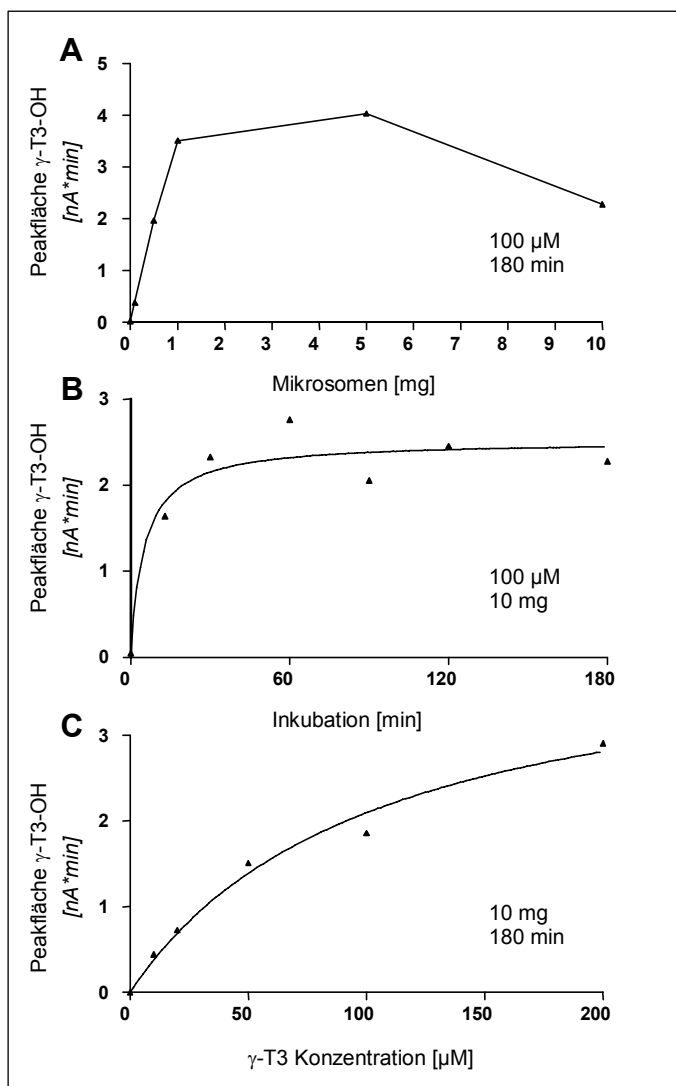


Abb. 4.14 Optimierung der ω -Hydroxylierung von γ -Tocotrienol durch Rattenleber-Mikrosomen

Mikrosomen von männlichen Rattenlebern wurden in Gegenwart eines NADPH-regenerierenden Systems bei verschiedenen Bedingungen mit γ -Tocotrienol inkubiert: In **A** erfolgte die Inkubation von 100 μ M γ -Tocotrienol für 180 min bei variabler Konzentration an Mikrosomenprotein. In **B** wurde die Inkubationsdauer bei konstantem Mikrosomenprotein (10 mg) und konstanter γ -Tocotrienolkonzentration (100 μ M) verändert. In **C** wurde bei einer Inkubationsdauer von 180 min und 10 mg Mikrosomenprotein die γ -T3-Konzentration erhöht. Die Messung der hydroxylierten Produkte erfolgte über HPLC mit elektrochemischer Detektion wie in Kapitel 3.8.3 beschrieben.

Eine Erhöhung der Konzentration mikrosomalen Proteins (und damit der Enzymkonzentration) führte zum Anstieg der Produktbildung von hydroxyliertem γ -Tocotrienol (γ -T3-OH), nach Erhöhung von 5 auf 10 mg mikrosomalen Proteins nahm die Reaktion jedoch wieder ab. Bei Veränderung der Inkubationszeit wurde schnell die maximale Reaktionsgeschwindigkeit erreicht, eine Erhöhung der γ -T3-Konzentration

erbrachte jedoch selbst beim höchsten gemessenen Wert von 200 μM noch immer einen leichten Anstieg der Produktbildung, die maximale Reaktionsgeschwindigkeit war hier noch nicht erreicht.

Für die weiteren Versuche wurde eine Inkubationsdauer von 60 min gewählt, da ab diesem Zeitpunkt kein weiterer Anstieg der ω -Hydroxylierungsrate beobachtet werden konnte. Die Inkubation erfolgte mit der maximal einsetzbaren Konzentration von 200 μM Vitamin E, höhere Konzentrationen konnten aufgrund des stark lipophilen Charakters der verschiedenen Vitamin E – Formen nicht eingesetzt werden. Schließlich wurden mit 0,5 mg mikrosomalen Proteins eine Konzentration gewählt, die zwar unter der maximalen Hydroxylierungsrate lag, hierdurch konnten jedoch alle weiteren Versuche mit der gleichen Mikrosomenpräparation durchgeführt und gleichzeitig die Anzahl der getöteten Ratten gesenkt werden.

ω -Hydroxylierungsrate der Tocopherole und Tocotrienole

Nach Optimierung der Reaktionsbedingungen erfolgte die Bestimmung der ω -Hydroxylierungsrate aller Tocopherole und Tocotrienole. Hierzu wurden je 0,5 mg Rattenleber-Mikrosomen für 60 min mit ansteigenden Konzentrationen der jeweiligen Vitamin E – Formen inkubiert. Die Affinität der mikrosomalen Enzyme für die einzelnen Vitamin E – Formen wurde über die Bestimmung der Michaelis-Konstante K_m ermittelt. Des Weiteren erfolgte die Bestimmung der Maximalgeschwindigkeit der Reaktion, V_{max} . Da aufgrund der fehlenden synthetischen Standards keine Responsefaktoren für die hydroxylierten Metabolite bestimmt werden konnte, wurden die Konzentrationen auf die Stoffmenge des internen Standards δ -Tocopherol bezogen und in δ -Tocopherol-Äquivalenten angegeben.

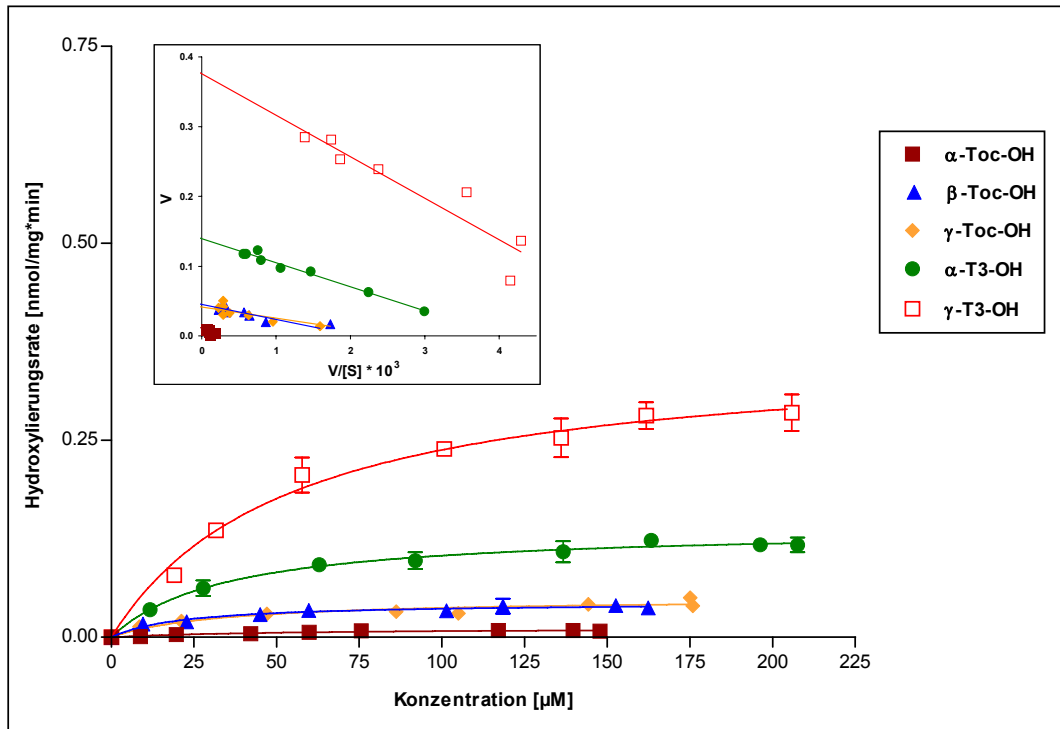


Abb. 4.15 ω -Hydroxylierung von Vitamin E durch Rattenleber-Mikrosomen

Mit Hilfe von Lebermikrosomen von weiblichen Wistar-Ratten wurde die ω -Hydroxylierung verschiedener Vitamin E – Formen bestimmt. Hierzu wurden in Gegenwart eines NADPH-regenerierenden Systems je 0,5 mg Mikrosomen bei einer Inkubationszeit von 60 min mit ansteigenden Konzentrationen an Vitamin E inkubiert. Anschließend erfolgte die Extraktion sowie Messung der hydroxylierten Vitamin E - Formen durch HPLC mit elektrochemischer Detektion. Das Ergebnis zeigt den Mittelwert mit Standardabweichung aus 3 unabhängigen Experimenten. Die Linearisierung der Hydroxylierungsrate nach Eadie-Hofstee (siehe eingeschobene Graphik) verdeutlicht die großen Unterschiede in der Hydroxylierungsrate (V_{max} = Schittpunkt der Tangente zur Y-Achse) bei ähnlicher Affinität (K_m = Steigung der Tangenten) der getesteten Vitamin E – Formen.

Die ω -Hydroxylierung der verschiedenen Vitamin E - Formen zeigte einen hohen Unterschied mit einem Maximum für γ -Tocotrienol und einem Minimum für α -Tocopherol. Dieser Unterschied beruhte jedoch nicht auf der Affinität für das hydroxylierende Cytochrom, wie die Bestimmung des K_m -Wertes für beide Vitamin E - Formen zeigte. Dieser war mit ca. 54 μ M annähernd gleich. Vielmehr war die Maximalgeschwindigkeit für γ -Tocotrienol mit 0,366 nmol δ -Toc-Äquivalente / mg*min um das 30fache höher als für α -Tocopherol. β - und γ -Tocopherol sowie α -Tocotrienol hatten leicht geringere K_m -Werte von 21,9 μ M, 33,9 μ M sowie 34,5 μ M, was für eine geringfügig höhere Affinität des entsprechenden Cytochroms spricht. Die Maximalgeschwindigkeit V_{max} lag für α -Tocotrienol, γ -Tocopherol und β -Tocopherol

zwischen γ -Tocotrienol und α -Tocopherol mit Werten von 0,044, 0,050 sowie 0,139 nmol δ -Toc-Äquivalenten / mg*min.

Neben der Bildung der hydroxylierten Metabolite konnte die Bildung der carboxylierten Metabolite nachgewiesen werden. Diese Bildung war jedoch abhängig von der Bildung der hydroxylierten Vitamin E – Formen, wie die konstant um einen Faktor von 2 – 3 niedrigere Rate der carboxylierten Form zeigte (Daten nicht gezeigt). Lediglich für α -Tocopherol wurde keine carboxylierte Form gefunden, was jedoch auf die zu geringe Konzentration zurückgeführt werden kann.

Tabelle 4.2: V_{\max} und K_m -Werte der ω -Hydroxylierung von Vitamin E durch Rattenleber-Mikrosomen. Die Werte für V_{\max} und K_m wurden durch nichtlineare Regression ermittelt und stellen den Mittelwert +/- Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten dar.

	α -Toc	β -Toc-OH	γ -Toc-OH	α -T3-OH	γ -T3-OH
V_{\max}	0,012 ± 0,0014	0,044 ± 0,0023	0,050 ± 0,0055	0,139 ± 0,0040	0,366 ± 0,0178
K_m	54,5 ± 16,4	21,9 ± 4,6	33,9 ± 13,6	34,5 ± 3,8	54,0 ± 7,6

Einheit V_{\max} : [nmol δ -Toc-Äquivalente/mg*min]; Einheit K_m : [μ M]

Hemmung der ω -Hydroxylierung von γ -Tocotrienol durch spezifische Cytochrom P450 - Inhibitoren

Durch Zugabe der Cytochrom P450 Hemmstoffe Metyrapon sowie Ketoconazol sollte geprüft werden, ob es sich bei der ω -Hydroxylierung der verschiedenen Vitamin E – Formen tatsächlich um eine Cytochrom P450 – katalysierte Reaktion handelt. Die Reaktion erfolgte durch Inkubation von 200 μ M γ -Tocotrienol für jeweils 60 min mit 0,5 mg Mikrosomen in Gegenwart der CYP450 - Inhibitoren Metyrapon (Endkonzentration: 10, 50, 100, 300, 600, 1000 μ M) bzw. Ketoconazol (Endkonzentration: 10, 25, 50, 100, 250, 500 μ M).

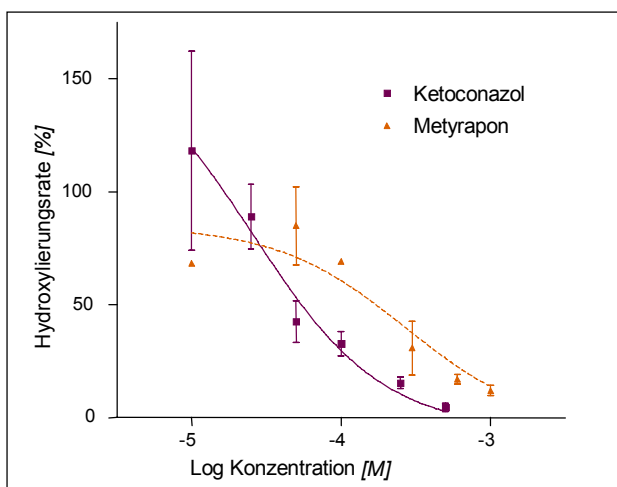


Abb. 4.16 Hemmung der ω -Hydroxylierung von γ -Tocotrienol durch Ketoconazol und Metyrapon

Die Durchführung der ω -Hydroxylierung von γ -Tocotrienol erfolgte wie in Kapitel 3.8.2 beschrieben. Zusätzlich wurden jedoch die Cytochrom P450 Inhibitoren Ketoconazol sowie Metyrapon in Konzentrationen von 10 μ M bis 1mM eingesetzt. Die ω -Hydroxylierungsrate der Kontrolle (ohne Inhibitor) wurde als 100% definiert. $n = 3$

Die Hemmung der ω -Hydroxylierung war für beide Inhibitoren dosisabhängig mit einem IC₅₀-Wert von 25,6 μ M für Ketoconazol sowie 270,6 μ M für Metyrapon.

4.3 Metabolismus von α -Tocopherol und γ -Tocotrienol *in vivo*

4.3.1 Versuchsaufbau

Das unterschiedliche Ausmaß des Abbaus, in dem verschiedene Vitamin E-Formen von kultivierten Zellen verstoffwechselt werden, legt die Frage nahe, ob es auch *in vivo* solche Unterschiede gibt. Um dies zu testen, wurde der Mausstamm C57BL6 als Model gewählt. Tabelle 4.3 gibt eine Übersicht der zur Verfügung stehenden Tiere mit den wichtigsten Informationen.

Tabelle 4.3: Übersicht zu den Fütterungsgruppen, der Fütterungsdauer, sowie der Anzahl der männlichen C57BL6 Tiere, bei denen Vitamin E – Metabolite im Urin durch GC/MS bestimmt wurden.

Fütterungsgruppe [mg <i>RRR</i> - α -Tocopherylacetat / kg Futter] + / - Schlündelung mit γ -Tocotrienol	Fütterungs- dauer [Monate]	Anzahl der Tiere pro Gruppe	Anzahl der Tiere, bei denen Leber- und Plasmawerte bestimmt wurden	Anzahl der Tiere, bei denen urinären Metabolite bestimmt wurden
2 mg/kg	3	3	3	3
2 mg/kg + γ -T3	3	3	3	3
20 mg/kg	3	6	6	3
20 mg/kg + γ -T3	3	6	6	3
200 mg/kg	3	6	6	3
200 mg/kg + γ -T3	3	6	6	2*
200 mg/kg	9	4	4	4

* Eine Maus (von 3) hatte nach 24 h keinen Urin abgegeben.

Nach Geburt und Entwöhnung wurden die verschiedenen Gruppen auf ihre jeweilige *RRR*- α -Tocopherylacetat-Diät gesetzt: 1 Gruppe erhielt eine Mangeldiät mit 2 mg α -Toc-Acetat/kg Futter, 1 Gruppe eine Normaldiät mit 20 mg/kg Futter, 1 Gruppe schließlich eine hochsupplementierte Diät mit 200 mg/kg Futter. Nach 11 Wochen Fütterung wurden je 3 Tiere einer Gruppe zusätzlich täglich 250 μ g γ -Tocotrienol (in Öl) bzw. das Vehikel Öl allein per Schlundsonde appliziert. Vor dem Tag der Probenahme wurden die Tiere in metabolische Käfige gesetzt und der Urin sowie die Fäces gesammelt. Anschließend erfolgte die Tötung der Tiere mit der Entnahme der wichtigsten Organe sowie des Blutes.

4.3.2 α -Tocopherol - und γ -Tocotrienol – Gehalte in Plasma und Leber

Der Nachweis der α -Tocopherol- und γ -Tocotrienolkonzentration in Plasma und Leber wurde durch HPLC mit elektrochemischer Detektion erbracht. Die hier vorliegenden Ergebnisse wurden in Kollaboration mit Nico Landes und Dirk Kluth (aus dieser Arbeitsgruppe) erarbeitet, weitere Einzelheiten sind der Arbeit von Kluth, Landes, Pfluger *et al.* zu entnehmen (Kluth *et al.* 2005).

Tabelle 4.4: α -Tocopherolgehalte in Plasma und Leber von C57BL6-Mäusen. γ -Tocotrienol (γ -T3) war sowohl in Plasma als auch Leber nicht oder nur in Spuren nachweisbar (Daten nicht gezeigt).

Fütterungsgruppe <i>mg α-Toc/kg Futter</i> <i>+/- γ-Tocotrienol</i>	Fütterungs- dauer <i>[Monate]</i>	Plasma α -Tocopherolgehalt <i>[μM]</i>	Leber α -Tocopherolgehalt <i>[nmol/g Leber]</i>
2	3	0,83 \pm 0,03	23,82 \pm 11,70
20	3	1,68 \pm 0,22	30,54 \pm 10,52
200	3	3,53 \pm 1,47 # ^a	141,20 \pm 61,16 # ^a
2 + γ -T3	3	0,97 \pm 0,05	15,45 \pm 1,13
20 + γ -T3	3	1,71 \pm 0,53	31,62 \pm 8,39
200 + γ -T3	3	3,29 \pm 0,47 # ^b	161,03 \pm 73,73 # ^b
200	9	9,49 \pm 1,49 # ^c	204,61 \pm 48,76

#^a $p < 0.05$ vs. 2 mg α -Toc/kg Futter

#^b $p < 0.05$ vs. 20 mg α -Toc/kg Futter

#^c $p < 0.05$ vs. 200mg α -Toc/kg Futter (3 Monate)

Die Fütterung mit α -Tocopherol führte zu einer Steigerung der α -Tocopherolkonzentration in Plasma und Leber. Die Applikation von γ -Tocotrienol hatte keinen Einfluss auf die α -Tocopherolwerte. γ -Tocotrienol selbst konnte lediglich in einigen Tieren in Spuren nachgewiesen werden. Im Vergleich zur hochsupplementierten Gruppe nach 3 Monaten war nach 9 Monaten der Plasmaspiegel um das 3-fache erhöht. Die Leberwerte zeigten ebenfalls einen tendenziell (jedoch nicht signifikant) erhöhten Gehalt an α -Tocopherol an.

4.3.3 Ausscheidung von α -Tocopherol- und γ -Tocotrienol-Metaboliten im Urin männlicher Mäuse:

Neben den Plasma- und Leberwerten von α -Tocopherol und γ -Tocotrienol wurden auch die Metabolite α -CEHC und α -CMBHC sowie γ -CEHC und γ -CMBHC gemessen. Abb. 4.17 zeigt die urinäre Ausscheidung der Metabolite nach 3 Monaten Supplementation. Nach weiteren, längerkettigen Metaboliten von α -Tocopherol und γ -Tocotrienol wurde zwar gesucht, diese konnten jedoch in keinem der Tiere nachgewiesen werden.

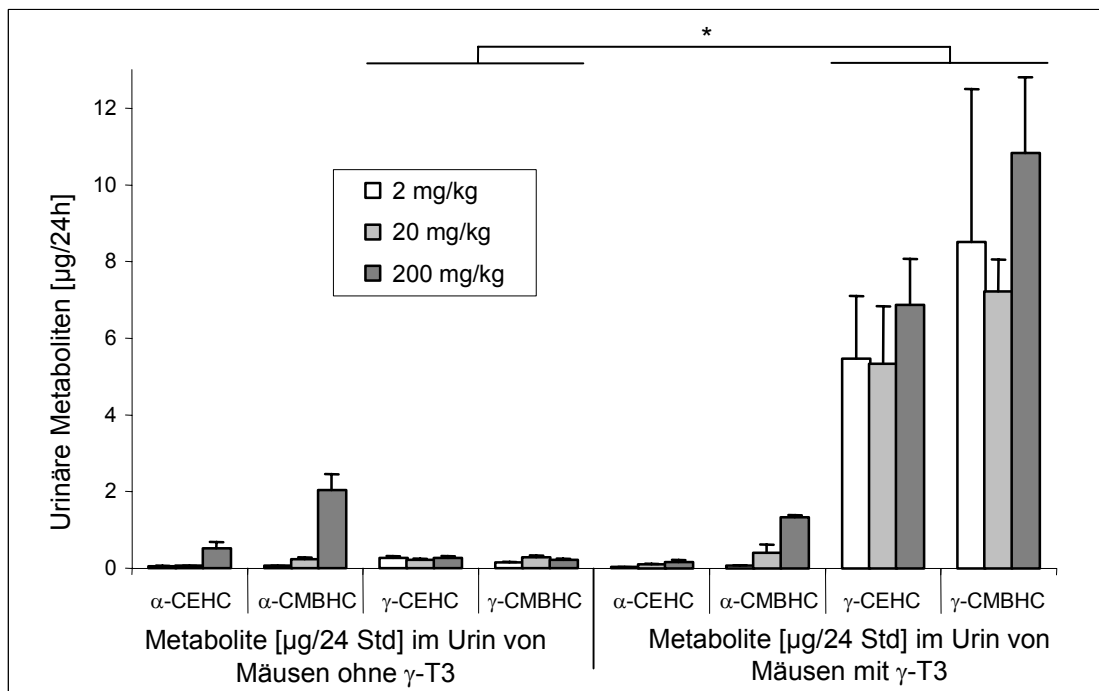


Abb. 4.17 Urinäre Ausscheidung von α -Tocopherol- und γ -Tocotrienolmetaboliten

Männliche C57BL6-Mäuse wurden für 3 Monate mit einer Diät von 2, 20 bzw. 200 mg α -Tocopherylacetat / kg Futter supplementiert. Zusätzlich zur Diät wurden für die letzten 7 Tage vor Tötung je 3 Tiere täglich mit 250 μ g γ -Tocotrienol bzw. mit dem Vehikel Öl per Schlundsonde appliziert. Einen Tag vor Tötung wurden die Mäuse für 24 h in Stoffwechselkäfige gesetzt und der Urin gesammelt. Die Ausscheidung der Metabolite von α -Tocopherol und γ -Tocotrienol wurde durch ANOVA mit anschließendem Student-Newman-Keuls-Test auf signifikante Unterschiede (*: $p < 0,05$) getestet.

α -CEHC und α -CMBHC waren in den mit der α -Tocopherol-Mangeldiät gefütterten Mäusen in nur sehr kleinen Konzentrationen vorhanden (Abb. 4.17 und Tabelle 4.6). Diese Konzentrationen stiegen durch Fütterung mit der adäquaten Diät sowie v.a. der hochdosierten Diät nur leicht an. Die ausgeschiedene Menge an γ -CEHC und γ -CMBHC war deutlich höher. Nach Verabreichung von 250 μ g γ -Tocotrienol lag die Menge bei 5,3 bis 6,8 μ g γ -CEHC/24h sowie 7,2 bis 10,8 μ g γ -CMBHC/24h, also um

ein Vielfaches über den Maximalwerten, die für α -CEHC bzw. α -CMBHC gemessen wurden. Auch in den Tieren, die kein γ -Tocotrienol enthielten, konnten γ -CEHC und γ -CMBHC nachgewiesen werden. Das in geringen Mengen im Futter enthaltene γ -Tocopherol wurde also vergleichsweise deutlich stärker abgebaut.

Tabelle 4.5: Urinäre Ausscheidung von α -Tocopherol- und γ -Tocotrienolmetaboliten in männlichen C57BL6-Mäusen nach einer 3-monatigen Diät von 2, 20 sowie 200 mg α -Tocopherylacetat/kg Futter. Zusätzlich zur Diät wurden für die letzten 7 Tage je 3 Tiere täglich mit Öl (Kontrolle) bzw. mit 200 μ g γ -Tocotrienol geschlündelt.

Fütterungsgruppe	Kontrollmäuse Metaboliten [μ g/24h]				Mäuse+ γ -Tocotrienol Metaboliten [μ g/24h]			
	α -CEHC	α -CMBHC	γ -CEHC	γ -CMBHC	α -CEHC	α -CMBHC	γ -CEHC	γ -CMBHC
2 mg/kg	0.051 ± 0.010	0.070 ± 0.006	0.262 ± 0.059	0.143 ± 0.025	0.035 ± 0.006	0.066 ± 0.021	5.470 ± 1.635	8.512 ± 3.978
20 mg/kg	0.062 ± 0.006	0.237 ± 0.051	0.214 ± 0.032	0.286 ± 0.046	0.094 ± 0.019	0.395 ± 0.232	5.326 ± 1.506	7.223 ± 0.823
200 mg/kg	0.521 ± 0.156	2.033 ± 0.420	0.272 ± 0.042	0.219 ± 0.024	0.164 ± 0.059	1.339 ± 0.040	6.872 ± 1.207	10.833 ± 1.961

Auch *in vivo* wird α -Tocopherol nur in sehr geringem Ausmaß abgebaut. Der Abbau von γ -Tocotrienol lag wie in HepG2-Zellen um ein Vielfaches über dem Abbau von α -Tocopherol. Der α -Tocopherolstatus hatte keinen Einfluß auf die Ausscheidung von γ -CEHC und γ -CMBHC. Auch die Verabreichung von γ -Tocotrienol hatte keinen signifikanten Unterschied in der Ausscheidung von α -CEHC bzw. α -CMBHC zur Folge.

4.3.4 α -CEHC- und α -CMBHC-Ausscheidung in Abhängigkeit zur Dauer der Fütterung

Neben der Bestimmung der urinären Ausscheidung nach 3 Monaten wurde für zwei Fütterungsgruppen ein zeitlicher Verlauf der Metabolitenproduktion bestimmt. Die Mäuse der Mangeldiät-Gruppe wurden hierzu nach 3, 7 sowie 12 Wochen in einen Stoffwechsellkäfig gesetzt und der Urin für 24 h gesammelt. Der Urin der hochsupplementierten Mäuse wurde nach 7 und 12 Wochen sowie 36 Wochen gesammelt.

Zu allen Zeitpunkten zeigte sich hierbei ein weit höherer Gehalt an α -CEHC und α -CMBHC als in der Mangelgruppe. Auffallend ist der dramatische Anstieg der α -CEHC-Ausscheidung vom 3. (12 Wochen) zum 9. Monat (36 Wochen). Dies gilt jedoch nur für α -CEHC, die Ausscheidung des längerkettigen Metaboliten α -CMBHC hingegen sank leicht. Während nach 3 Monaten die hochsupplementierten Mäuse 0,52 μg α -CEHC / 24h sowie 2,03 μg α -CMBHC / 24h ausschieden, stieg die Exkretion von α -CEHC nach 9 Monaten um das 5,5-fache an, während die α -CMBHC-Exkretion leicht sank.

Tabelle 4.6: α -CEHC und α -CMBHC im Urin von männlichen C57BL6-Mäusen nach 3, 7, 12 sowie 36 Wochen Fütterung mit 2 bzw. 200 mg α -Tocopherylacetat. Die statistische Auswertung erfolgte durch ANOVA mit Student-Newman-Keuls-Test. Signifikant unterschiedliche Werte der einzelnen Metaboliten bei verschiedenen Zeitpunkten sind mit jeweils mit einem Buchstabenpaar (a,b) gekennzeichnet.

Dauer der Fütterung	2 mg/kg α -Toc-Acetat		200 mg/kg α -Toc-Acetat	
	α -CEHC	α -CMBHC	α -CEHC	α -CMBHC
	[$\mu\text{g}/24\text{h}$]		[$\mu\text{g}/24\text{h}$]	
3 Wochen	0.039 ± 0.018	0.049 ± 0.019	-	-
7 Wochen	0.030 ± 0.013	0.054 ± 0.022	0.226 ^a ± 0.079	2.215 ± 0.759
12 Wochen	0.051 ± 0.010	0.070 ± 0.006	0.521 ^b ± 0.156	2.033 ± 0.420
36 Wochen	-	-	2.876 ^{a,b} ± 0.586	1.566 ± 0.421

5 Diskussion

Vitamin E wird von Pflanzen sowie Cyanobakterien häufig als Gemisch verschiedener Tocopherole sowie Tocotrienole synthetisiert. Je nach regionalen bzw. individuellen Essgewohnheiten variiert deshalb die Aufnahme der verschiedenen Vitamin E – Formen sehr stark, wobei α -Tocopherol in den meisten Ländern Europas dominiert, γ -Tocopherol als Hauptbestandteil von Maiskeimöl v.a. in Nordamerika die Hauptform des aufgenommenen Vitamin E darstellt, und Tocotrienole in vielen Ländern der zweiten und dritten Welt mit hohem Palmfett- und Kokosölverbrauch verstärkt aufgenommen werden. Dennoch wurde schon kurz nach der Entdeckung von Vitamin E mit Hilfe von Ratten-Gestationsresorptionstests gezeigt, dass *RRR*- α -Tocopherol im Vergleich zu allen anderen Vitamin E – Formen die bei weitem höchste Bioaktivität aufweist. Als Hauptgrund wurde ein unterschiedlicher Metabolismus und damit eine verschiedene Bioverfügbarkeit der einzelnen Vitamin E – Formen vermutet. Während zu Beginn dieser Arbeit schon zahlreiche Hinweise zur Bestätigung dieser Hypothese zumindest für α -Tocopherol sowie γ -Tocopherol vorlagen, war die Datenlage für die weiteren Vitamin E – Formen, insbesondere die Tocotrienole, noch sehr lückenhaft. Mit dieser Arbeit sollte deshalb versucht werden, wichtige Grundlagen zum Mechanismus sowie zum Ausmaß des Metabolismus der verschiedenen Tocopherole und v.a. Tocotrienole zu erarbeiten. Zudem sollte gezeigt werden, welchen Einfluss der Metabolismus auf die Bioverfügbarkeit der verschiedenen Vitamin E – Formen *in vivo* ausübt.

5.1 Seitenkettenverkürzung von Vitamin E

In dieser Arbeit wurde nachgewiesen, dass der Mechanismus der Seitenkettenverkürzung von α - und γ -Tocotrienol über eine initiale ω -Hydroxlierung mit 5 nachfolgenden β -Oxidationsschritten verläuft und schließlich zur Bildung des finalen Metaboliten CEHC führt. Für α - bzw. γ -Tocotrienol wurden hierbei alle bekannten Zwischenprodukte der β -Oxidation im Medium von HepG2-Zellen gefunden. Die Bildung der hydroxylierten bzw. carboxylierten Vitamin E - Formen durch eine initiale ω -Hydroxylierung wurde mit Hilfe von Rattenleber-Mikrosomen untersucht. Nach Inkubation der individuellen Vitamin E - Formen wurden hierbei primär die hydroxylierten Formen gefunden, ebenfalls nachgewiesen wurden aber auch die carboxylierten Tocopherole bzw. Tocotrienole, welche aus den hydroxylierten Formen

durch die Wirkung von Alkohol- sowie Aldehyddehydrogenasen entstehen. Die hydroxylierten und carboxylierten Tocotrienole waren zudem im Medium von HepG2-Zellen nachweisbar.

Weitere Ergebnisse dieser Arbeit wie die Identifizierung der Zwischenprodukte des 2. sowie 4. β -Oxidationsschrittes belegen, dass der Abbau der Tocotrienole in Analogie zum Abbau ungesättigter Fettsäuren erfolgt. Den Metaboliten CDMOenHC sowie CMBHC fehlten hierbei die Doppelbindungen am β -Kohlenstoffatom der vorherigen Zwischenprodukte CDMD(en)₂HC sowie CMHenHC. Dies ist auf die Bildung einer α,β -ungesättigten Fettsäure durch das Enzym Acyl-CoA-Dehydrogenase zurückzuführen, wobei das hierbei entstehende Zwischenprodukt mit zwei konjugierten Doppelbindungen nicht als Substrat der Acyl-CoA-Hydratase dienen kann. Erst durch die Wirkung der Hilfsenzyme 2,4-Dienoyl-CoA-Reduktase sowie 3,2-Enoyl-CoA-Isomerase, durch die die erforderliche α,β -Doppelbindung entsteht, kann die Acyl-CoA-Hydratase schließlich das β -Hydroxy-Acyl-CoA bilden, welches wieder in den β -Oxidationszyklus einmünden kann. Somit erfolgt der Abbau der Seitenkette identisch zu dem der ungesättigten Fettsäuren.

Der hier beschriebene Abbau der Tocotrienole verläuft demnach analog zum Abbau der Tocopherole. Dieser wurde von Sontag und Parker (Sontag and Parker 2002) zumindest für γ -Tocopherol vollständig aufgeklärt. Für α -Tocopherol konnten lediglich neben den bekannten Metaboliten α -CEHC (Schultz et al. 1995), α -CMBHC (Schuelke et al. 2000) sowie α -CMHHC (Birringer et al. 2001) und die beiden ersten Metabolite, α -Tocopherol-OH sowie α -Tocopherol-COOH, identifiziert werden (eigene Ergebnisse und (Mustacich et al. 2006; Sontag and Parker 2002)). Weitere Zwischenprodukte von α -Tocopherol konnten bisher nicht identifiziert werden, was auf dessen geringe Abbaurate *in vitro* und *in vivo* zurückgeführt werden kann. Neben den Metaboliten mit intaktem Chromanring wurde von Pope *et al.* (Pope et al. 2000) erneut über den Nachweis von geringen Mengen des Simon-Metaboliten α -Tocopheronolakton (mit einem durch Oxidation geöffneten Ring) in menschlichem Urin berichtet. Bisher nahm man an, dass die Simon-Metabolite zum größten Teil als Artefakte durch die Oxidation von α -CEHC während der Extraktion der Proben entstehen. Pope *et al.* (Pope et al. 2000) konnten jedoch überzeugend darlegen, dass das Verhältnis des im Urin nachgewiesenen α -Tocopheronolakton zu α -CEHC eher auf eine physiologische Entstehung des Laktons hindeutet. Ein verlässlicher Nachweis dieses Metaboliten, der im Körper durch eine antioxidative Wirkung von Vitamin E entstanden sein muss, könnte ein nützliches Werkzeug zur Messung von oxidativem Stress darstellen.

Tatsächlich konnte in atherosklerotischen Läsionen bereits die Oxidation von α -Tocopherol zu α -Tocopherylchinon *in vivo* nachgewiesen werden, wenn auch in sehr geringen Mengen (Terentis et al. 2002). Eine Seitenkettenverkürzung von α -Tocopherylchinon wiederum würde zur Ausscheidung von α -Tocopheronsäure bzw. α -Tocopheronolakton führen.

5.2 Quantitative Aspekte im Vitamin E – Metabolismus *in vitro* und *in vivo*

Nach der Identifizierung der Zwischenprodukte des Abbaus wurde im nächsten Schritt versucht, das Ausmaß des Metabolismus der verschiedenen Tocopherole und v.a. Tocotrienole zu bestimmen. Zu diesem Zweck wurde in dieser Arbeit die Metabolisierung von Vitamin E in Mäusen untersucht, die mit 2, 20 sowie 200 mg *RRR*- α -Tocopherylacetat / kg Futter eine Mangeldiät, Normaldiät bzw. hoch supplementierte Diät erhielten. Je 3 Tiere jeder Gruppe erhielten zusätzlich für die letzten 7 Tage vor Sammeln des Urins täglich 250 mg γ -Tocotrienol. Zur Untersuchung der *in vitro* - Abbauraten kamen HepG2-Zellen zum Einsatz.

5.2.1 CEHC und CMBHC bilden die Hauptmetaboliten von Vitamin E *in vitro* und *in vivo*

Im Medium von HepG2-Zellen wurden in dieser Arbeit neben CEHC und CMBHC auch weitere Metabolite wie z.B. CMHHC bzw. CMHenHC detektiert. Für diese waren jedoch keine synthetischen Standards vorhanden, so dass eine Quantifizierung nicht möglich war. Da bei der elektrochemischen Detektion jedoch der 6-Hydroxychromanring die entscheidende Rolle spielt und dadurch auch die Responsefaktoren von CEHC sowie CMBHC zum internen Standard α -CPHC ähnlich waren, konnte man annehmen, dass die Peakflächen in der HPLC durchaus Rückschlüsse auf die Konzentrationen der längerkettigen Metaboliten zulassen. Mit dieser Einschränkung lässt sich deshalb sagen, dass CMBHC mit hoher Wahrscheinlichkeit den Hauptmetaboliten in HepG2-Zellen darstellte, während längerkettige Metabolite nur in geringer Konzentration ins Medium sezerniert werden. Auffallend war der hohe Unterschied im CEHC / CMBHC-Verhältnis zwischen α -Tocotrienol mit weit mehr CEHC als CMBHC gegenüber γ -Tocopherol sowie γ -Tocotrienol. Dies könnte auf eine unterschiedliche Bildungsrate des letzten Metaboliten

rückschließen lassen. You *et al.* (You *et al.* 2005) berichten beispielsweise von CMBHC als Hauptmetabolit der Tocopherole und Tocotrienole in HepG2 - Zellen. In der Lungenepithelzelllinie A549 bildeten jedoch CDMOHC bzw. CDMO(en)HC die Hauptmetabolite. Offensichtlich ist in diesen Zellen bereits die Umsetzung der länger-kettigen Metabolite durch einen noch unbekanntem Mechanismus gehemmt.

Im Mäuseurin bildeten ebenfalls CEHC und v.a. CMBHC die Hauptmetabolite, länger-kettige Metabolite konnten nicht identifiziert werden. Auffällig war die unterschiedliche Ausscheidung von α -CEHC und α -CMBHC in der hochsupplementierten Gruppe. Hier war das Verhältnis α -CEHC / α -CMBHC abhängig von der längeren Dauer der Fütterung, die zu einer Angleichung des anfangs niedrigen α -CEHC - Spiegels zum konstanten α -CMBHC - Spiegel führte. In menschlichem Urin wurden α -CMBHC (Schuelke *et al.* 2000) bzw. γ -CMBHC (Parker *et al.* 2000) ebenfalls detektiert, erreichten jedoch nur ca. 5% des jeweiligen CEHC-Wertes.

Die unterschiedliche Ausscheidung von CEHC und CMBHC macht deutlich, dass bei der Untersuchung des Vitamin E – Metabolismus alle Abbauprodukte und Abbauege (renal und bilär) miteinbezogen werden müssen. Neben CEHC und CMBHC konnten jedoch länger-kettige Metabolite *in vivo* bisher nicht im Urin detektiert werden. Es ist daher anzunehmen, dass länger-kettige Metabolite aufgrund der höheren Lipophilität entweder nicht über den Urin eliminiert werden können und daher in der Leber bis zu CMBHC oder CEHC abgebaut werden, oder aber über die Galle ausgeschieden werden. In unverändertem Zustand wurden α -Tocopherol (Bjorneboe *et al.* 1987; Mustacich *et al.* 2006) sowie γ -Tocopherol (Traber and Kayden 1989) bereits in Galle nachgewiesen. Wie die Injektion von mit [3 H]- α -Tocopherol-angereicherten Chylomikronen in die Jugularvene von Ratten zeigte, konnten 13.3 % der eingesetzten Radioaktivität in der Galle von Ratten wiedergefunden werden (Lee-Kim *et al.* 1988). Nur 3,2 % dieser biliären Radioaktivität wurde jedoch als α -Tocopherol identifiziert, der Rest (>95 %) wurde per HPLC in einer polarereren Fraktion nachgewiesen. Ob es sich bei dieser polarereren Fraktion um Sulfat- oder Glucuronidkonjugate von α -Tocopherol oder aber um kürzer-kettige Metabolite handelte, ist jedoch nicht bekannt. Tatsächlich konnte γ -CEHC bereits in der Galle gefunden werden, wenn auch in geringerer Konzentration als im Urin (Hattori *et al.* 2000a). Ein Nachweis von länger-kettigen Metaboliten in der Galle könnte hier endgültige Klärung bringen und maßgeblich zur Bilanzierung des Vitamin E – Metabolismus beitragen. Es bleibt dennoch festzuhalten, dass anhand der bisherigen Erkenntnisse die urinaire Ausscheidung als der Hauptweg der Exkretion von Vitamin E – Metaboliten gelten darf. In diesem Zusammenhang konnten Swanson *et al.* (Swanson *et al.* 1999) beispielsweise zeigen, dass ein Großteil

des aufgenommenen γ -Tocopherol als γ -CEHC über den Urin wieder ausgeschieden wurde. Ob dies jedoch auch für die anderen Vertreter der Vitamin E – Familie gilt, ist zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht endgültig klärbar.

Interessanterweise wurde vor einigen Jahren entdeckt, dass die aus dem Urin von Ratten isolierte Substanz LLU- α , die zuvor aufgrund ihrer selektiven diuretischen und natriuretischen Wirkung auf den Organismus identifiziert wurde, mit γ -CEHC identisch ist (Hattori et al. 2000b; Murray et al. 1995; Tanabe et al. 2004; Wechter et al. 1996). Andere CEHCs sowie längerkettige Metabolite haben keine natriuretische Wirkung. Neben der natriuretischen Wirkung von γ -CEHC wurden zudem anti-inflammatorische Wirkungen einiger Metabolite entdeckt. γ -CEHC bzw. α -CEHC beispielsweise hemmen in Makrophagen und Epithelzellen die Cyclooxygenase 2 und die Ausschüttung von Prostaglandin E₂ (Grammas et al. 2004; Jiang et al. 2000). Der Abbau von Vitamin E ist somit nicht nur im Hinblick auf die (verbleibende) Konzentration der Ausgangsstoffe interessant, auch die Konzentration der Endprodukte des Metabolismus, v.a. von γ -CEHC, muss berücksichtigt werden, da diese ebenfalls eine biologische Wirkung, etwa Natriurese oder Entzündungshemmung, entfalten können.

5.2.2 α -Tocopherol wird *in vitro* und *in vivo* in weit schwächerem Maße metabolisiert als die anderen Vitamin E – Formen

In dieser Arbeit wurden in HepG2-Zellen sehr große Unterschiede im Metabolismus der individuellen Vitamin E – Formen festgestellt. Während α -CEHC nur in sehr geringen Mengen detektiert wurde, wurden die übrigen Vitamin E - Formen in hohem Maße metabolisiert. Die Aufnahme der verschiedenen Vitamin E – Formen in die Zellen war jedoch sehr ähnlich, wobei α - und γ -Tocotrienol, möglicherweise aufgrund ihrer etwas höheren Membrangängigkeit (Ikeda et al. 1996), etwa zweifach stärker aufgenommen wurden als α -Tocopherol. Eine leicht erhöhte Aufnahme der Tocotrienole im Vergleich zu Tocopherolen wurde auch für die intestinale Epithelzelllinie Caco-2 berichtet (Tsuzuki et al. 2007). Die erhöhte Aufnahme in dieser Arbeit korrelierte jedoch nicht mit der Abbaurate, die von α -Toc zu γ -Toc, α -T3 und γ -T3 um ein Vielfaches zunahm. Ein unterschiedlich starker Abbau der einzelnen Vitamin E - Formen konnte auch von You et al. (You et al. 2005) für HepG2 – Zellen bestätigt werden, und wurde zudem auch für andere Zelllinien wie LNCaP Prostata-Zellen (Conte et al. 2004) und A549 Lungenepithelzellen (You et al. 2005) beschrieben.

Vergleicht man in HepG2 - Zellen den Abbau von natürlichem *RRR*- α -Tocopherol mit dem von synthetischen *all-rac*- α -Tocopherol, so findet man für natürliches α -Tocopherol eine um den Faktor 1,64 geringere α -CEHC-Konzentration als für synthetisches α -Tocopherol. In früheren Untersuchungen in HepG2-Zellen wurde lediglich α -CEHC nach Inkubation mit *all-rac*- α -Tocopherol, nicht jedoch nach Inkubation mit *RRR*- α -Tocopherol nachgewiesen (Birringer et al. 2001). Durch die verbesserte Sensitivität der HPLC-Analytik war dies in dieser Arbeit jedoch nunmehr möglich. Zudem wurde erstmals auch α -CMBHC in die Gesamtbilanz miteinbezogen. Betrachtet man hierbei die Gesamtmenge an α -CEHC und α -CMBHC, so zeigt sich, dass HepG2-Zellen nicht zwischen natürlichem und synthetischem α -Tocopherol diskriminieren. HepG2-Zellen weichen in diesem wichtigen Punkt also von der *in vivo* Situation ab. IN diesem Zusammenhang wurde z.B. von Traber *et al.* (Traber et al. 1998) berichtet, dass nach einer äquimolaren Gabe von d_3 -*RRR*- α -Tocopherylacetat und d_6 -*all-rac*- α -Tocopherylacetat 2,7 mal mehr d_6 - α -CEHC als d_3 - α -CEHC im Urin zu finden war. Dies wurde auf die Wirkung des α -Tocopherol Transfer Proteins zurückgeführt, dass selektiv das natürliche *RRR*- α -Tocopherol vor dem Abbau schützt, während das synthetische α -Tocopherol dem Abbau zugeführt wird. In HepG2 – Zellen wurde jedoch nur eine verschwindend geringe Konzentration von α -TTP nachgewiesen (eigene unveröffentlichte Daten sowie (Qian et al. 2005)), wodurch in diesen Zellen offensichtlich nicht zwischen natürlichem und synthetischem α -Tocopherol unterschieden wird.

Für (*natürliches*) α -Toc und γ -T3 konnte der im *in vitro* System gefundene hohe Unterschied in dieser Arbeit bestätigt werden, wie die hohe Exkretion von γ -CEHC und γ -CMBHC sowie die geringe Exkretion von α -CEHC und α -CMBHC zeigte. Der Abbau von α -Tocopherol war nach 3 Monaten Fütterung selbst bei den hochsupplementierten Mäusen um ein vielfaches kleiner als der Abbau von γ -Tocotrienol. In der Mangelgruppe lagen die Konzentration an α -CEHC und α -CMBHC nur knapp über der Nachweisgrenze und stiegen in den Mäusen mit Normaldiät leicht an. Die Exkretion der α -Tocopherolmetaboliten war dabei jedoch stark von der Dauer der Fütterung abhängig, wie die starke Ausscheidung von α -CEHC nach 9 Monaten zeigte. Offensichtlich hatten sich die Mäuse an die ständige Zufuhr von hohen Dosen α -Tocopherol adaptiert, indem sie überschüssiges α -Tocopherol in höherem Maße verstoffwechselten.

Vergleichsdaten zum Vitamin E - Metabolismus in Mäusen bestehen kaum. So wurde die urinaire Ausscheidung in Mäusen bisher kaum untersucht. Traber *et al.* wiesen jedoch γ -CEHC in Lebergewebe nach hoher Supplementation mit γ -Tocopherol nach, α -CEHC wurde nicht gefunden (Traber *et al.* 2005). Auch für Ratten ist die Datenlage gering. Nach täglicher subcutaner Injektion hoher pharmakologischer Dosen von α - und γ -Tocopherol konnten Leonard *et al.* (Leonard *et al.* 2005) α - sowie γ -CEHC in Leber und Plasma männlicher Ratten nachweisen. Die Leber- und Plasmakonzentration von α -CEHC korrelierten hierbei mit dem Gehalt an Leber- und Plasma- α -Tocopherol, während Leber- γ -CEHC lediglich mit Leber- γ -Tocopherol assoziiert war, nicht jedoch mit der Plasma γ -Tocopherol- bzw. γ -CEHC-Konzentration. Von Ikeda *et al.* wurde nach Fütterung von α -Tocopherol bzw. γ -Tocotrienol (50 mg/kg Diät) nur eine ca. 3-fach höhere urinaire Ausscheidung von γ -CEHC gegenüber α -CEHC gefunden (Ikeda *et al.* 2003). Die Ausscheidung von α -CEHC aus α -Tocotrienol war vergleichbar mit der Ausscheidung von α -CEHC aus α -Tocopherol. Dagegen war die Bildung von γ -CEHC aus γ -Tocopherol lediglich um das 2-fache gesteigert (Ikeda *et al.* 2002; Ikeda *et al.* 2003).

Für Menschen ist bekannt, dass α -Tocopherol in weit schwächerem Maße abgebaut wird als γ -Tocopherol, α -Tocotrienol sowie γ -Tocotrienol (Lodge *et al.* 2001; Swanson *et al.* 1999). Weshalb sich der Metabolismus der verschiedenen Vitamin E - Formen bei Ratten zwar tendenziell, jedoch nicht in gleichem Ausmaß wie etwa bei Mäusen und Menschen unterscheidet, ist zum gegenwärtigen Zeitpunkt aber noch unklar. Die Unterschiede zwischen verschiedenen Spezies könnten z.B. durch eine unterschiedliche Lokalisation des Abbaus hervorgerufen werden. Während die β -Oxidation von langkettigen Fettsäuren v.a. in den Mitochondrien stattfindet, werden sehr langkettige Fettsäuren, aber auch ein breites Spektrum anderer Substanzen wie z.B. Eicosanoide, in den Peroxisomen verstoffwechselt. Möglicherweise findet auch der Vitamin E - Abbau in den Peroxisomen statt. Nach oraler Gabe des Peroxisomenproliferators Nafenopin konnte hierbei in Ratten eine Abnahme der hepatischen Vitamin E Konzentration um 50% beobachtet werden (Lake *et al.* 1989). In (humanen) HepG2 - Zellen hatte die Inkubation mit dem Peroxisomenproliferator Clofibrat keinen Effekt auf den α -Tocopherol - Metabolismus (Birringer *et al.* 2001). Wahrscheinlichere Ursachen sind deshalb speziesspezifische Unterschiede in der Affinität des α -TTP zu den verschiedenen Vitamin E - Formen sowie Unterschiede in der Affinität bzw. Aktivität der am Abbau beteiligten Cytochrome. Ein Speziesvergleich zur Klärung dieser Fragen wurde bisher jedoch nicht durchgeführt.

5.2.3 α -Tocopherol Transfer Protein schützt α -Tocopherol selektiv vor dem Abbau

In dieser Arbeit konnten hohe Unterschiede im Metabolismus von α -Tocopherol und γ -Tocotrienol sowohl *in vitro* als auch *in vivo* gefunden werden. Eine Ursache hierfür könnte in der Wirkung des hepatischen α -Tocopherol Transfer Proteins liegen: α -Tocopherol wird in den Hepatozyten durch seine hohe Affinität zum α -TTP direkt nach der Aufnahme zu den VLDL bzw. HDL transferiert und mit diesen ins Plasma sezerniert. Dadurch kommt α -Tocopherol nicht in Kontakt zum metabolisierenden System der Hepatozyten und wird somit kaum abgebaut. γ -Tocopherol mit nur 9% sowie α -Tocotrienol mit 12% Affinität weisen jedoch im Vergleich zu *RRR*- α -Tocopherol nur eine geringe Affinität zu α -TTP auf (Hosomi et al. 1997). Sie werden also nur zu einem kleinen Teil von α -TTP zu den VLDL / HDL transferiert sowie ins Plasma sezerniert. Für γ -Tocotrienol wiederum ist die Affinität zum α -TTP nicht bekannt. Es ist also durchaus möglich, dass die Affinität des γ -Tocotrienols zum α -TTP nochmals schwächer ist und daher γ -Tocotrienol vollständig dem metabolisierenden System zugeführt werden kann. Diese Annahme wird gestärkt durch die hier durchgeführte Messung der Plasma- sowie Leberkonzentrationen von γ -Tocotrienol in den Wildtypmäusen. γ -Tocotrienol konnte dabei selbst nach täglicher Applikation von 250 μ g nur in Spuren nachgewiesen werden, während die urinäre Ausscheidung von γ -CEHC sowie γ -CMBHC sehr hoch war, was wiederum beweist, dass γ -Tocotrienol aufgenommen wurde.

Schülke *et al.* (Schuelke et al. 1999) zeigten in einer Fallstudie, dass ein AVED-Patient mit einem Defekt im α -TTP-Gen bei normaler Ernährung nur eine sehr niedrige α -Tocopherolkonzentration von 0,6 μ M im Plasma aufwies. Bei täglicher Supplementation von bis zu 40 mg α -Tocopherol/ kg Körpergewicht konnte der α -Tocopherolgehalt jedoch normalisiert und dadurch die klinischen Symptome weitgehend beseitigt werden. Bei der Untersuchung weiterer AVED-Patienten wurde beobachtet, dass die hohe Supplementation mit α -Tocopherol auch eine sehr hohe Ausscheidung an α -CEHC bewirkte (Schuelke et al. 2000). Wurde die Supplementation bei diesen Patienten vorübergehend unterbrochen, so sank zwar die Plasmakonzentration von α -Tocopherol, die Ausscheidung von α -CEHC lag jedoch weiterhin weit über der von nicht supplementierten gesunden Probanden. In diesen wurde erst nach Erreichen eines Plasma-Schwellenwertes von 30-40 μ M α -Tocopherol geringe Mengen an α -CEHC im Urin entdeckt, die bei weiterer Supplementation anstiegen.

Wie die tägliche subcutane Injektion von 10mg α -Tocopherol / 100g Körpergewicht in männlichen Ratten ergab, blieb der α -TTP – Proteingehalt trotz stark ansteigender α -Tocopherol-Plasmawerte konstant (Mustacich et al. 2006). Dies bedeutet wiederum, dass bei stark erhöhter Supplementation von Vitamin E die Transferkapazität von α -TTP begrenzt ist. Dies zeigte sich z.B. auch in der hochsupplementierten Mäusegruppe nach 9 Monaten Fütterung mit einer stark erhöhten urinären Ausscheidung von α -CEHC. Für alle weiteren Vitamin E – Formen ist die Affinität für α -TTP so gering, dass nur ein kleiner Teil direkt nach Aufnahme in die Hepatozyten auf die Lipoproteine weitertransferiert wird, während der grösste Teil eliminiert wird.

5.2.4 Die ω -Hydroxylierung durch Cytochrom P450 reguliert die Höhe des Abbaus der verschiedenen Vitamin E – Formen

Die initiale ω -Hydroxylierung von Vitamin E wird höchstwahrscheinlich durch Cytochrom P450 (CYP) katalysiert. Die Reaktion einer Substanz mit Cytochrom P450 ist oft der bestimmende Schritt für Geschwindigkeit und Ausmaß des Abbaus, was möglicherweise auch für Vitamin E gilt. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit untersucht, ob die initiale, Cytochrom P450-katalysierte ω -Hydroxylierung auch für den unterschiedlichen Abbau der einzelnen Vitamin E – Formen verantwortlich sein könnte. Tatsächlich konnte eine unterschiedliche ω -Hydroxylierung der verschiedenen Tocpherole und Tocotrienole gefunden werden, wobei das Ausmass der Hydroxylierung von γ -T3 zu α -T3, δ -Toc, γ -Toc und α -Toc stark abnahm. Die ω -Hydroxylierung der verschiedenen Vitamin E - Formen durch Lebermikrosomen korrelierte somit sowohl mit dem Metabolismus *in vitro* in HepG2 – Zellen, als auch *in vivo* in Mäusen. Die im folgenden aufgeführten, möglicherweise für die Hydroxylierung von Vitamin E verantwortlichen Cytochrom P450 Enzyme sind je nach der Spezies, für die eine Wirkung bzw. Hemmung beschrieben wurde, in Kleinbuchstaben (Cyp, Wirkung beschrieben in Nagern) oder Grossbuchstaben (CYP, Wirkung beschrieben im Menschen) aufgeführt.

Bei der Biotransformation der verschiedenen Vitamin E – Formen durch Cytochrom P450 ist es möglich, dass lediglich ein spezifisches Cytochrom alle verschiedenen Vitamin E - Formen abbaut. Durch Sontag und Parker (Sontag and Parker 2002) wurde CYP4F2 als möglicher Kandidat identifiziert. Nach Transfektion von Insektenzellen mit einer Auswahl rekombinanter humaner CYPs wurde lediglich für CYP4F2-angereicherte Mikrosomen eine hohe Hydroxylierung von γ -Tocopherol sowie eine

vergleichsweise geringe Hydroxylierung von α -Tocopherol gefunden, während andere Cytochrome keinen Umsatz bewirkten. Die Relevanz von CYP4F2 in der Hydroxylierung der verschiedenen Vitamin E – Formen konnte in jüngster Zeit erneut bestätigt werden, wobei in menschlichen Mikrosomen eine um ca. 20-fach höhere (maximale) Enzymaktivität v_{\max} für die Hydroxylierung von γ -Tocotrienol gegenüber α -Tocopherol gefunden wurde (Sontag and Parker 2007). Dies korreliert weitgehend mit der in dieser Arbeit in Rattenleber-Mikrosomen gefundenen 33-fach erhöhten Enzymaktivität v_{\max} für die Hydroxylierung von γ -Tocotrienol gegenüber α -Tocopherol.

Es ist jedoch auch möglich, dass unterschiedliche Cytochrom P450 Enzyme für den Abbau der verschiedenen Vitamin E – Formen verantwortlich sind. Das für seine Induktion von humanem CYP3A4 bekannte Rifampicin verstärkte beispielsweise in HepG2 – Zellen den Abbau von α -Tocopherol, der Abbau von γ -Tocopherol wurde jedoch nicht beeinflusst (Birringer et al. 2001). Für eine Beteiligung von CYP3A4 am Vitamin E – Metabolismus spricht zudem, dass der Abbau von α -, aber auch von γ - sowie δ -Tocopherol durch die CYP3A-spezifischen Inhibitoren Sesamin und Ketoconazol gehemmt wurde (Ikeda et al. 2002; Parker et al. 2000). *In vivo* konnte Ketoconazol in Ratten zwar den Abbau von γ -Tocopherol sowie einer Tocotrienol-Mischung hemmen, es hatte jedoch keinen Einfluss auf den Abbau von α -Tocopherol (Abe et al. 2007). Neuere Berichte lassen allerdings Zweifel an der Spezifität der CYP3A-Inhibitoren Sesamin und Ketoconazol aufkommen: diese waren *in vitro* auch in der Lage, humanes CYP4F2 zu hemmen (Parker et al. 2004; Sontag and Parker 2004). Eine Beteiligung von CYP4F2 am Abbau von Vitamin E ist auch aufgrund der Wirkung der in dieser Arbeit eingesetzten Inhibitoren Ketoconazol und Metyrapon wahrscheinlich, deren Spezifität sich lediglich in der Hemmung von CYP4F2 überlappt. Metyrapon ist für seine Hemmung der ω -Hydroxylierung von ungesättigten Fettsäuren und Leukotrien B4 bekannt (Yamane and Abe 2000). Beide Reaktionen werden von Cytochrom 4F2 katalysiert. Daneben wurde für Metyrapon auch die Inhibition von CYP11B1 (Givner et al. 1964), Cyp2B5 sowie Cyp2B1/2 (Rodrigues et al. 1988) beschrieben. Für den als CYP3A4-spezifisch bekannten Hemmstoff Ketoconazol wurde zusätzlich die Inhibition von Cyp1A1, Cyp1B1, Cyp2B6, Cyp2C8, Cyp2C9, Cyp2C19, Cyp4F2, and Cyp4F12 gezeigt (Stresser et al. 2004).

Bisher kann aber noch nicht abschliessend gesagt werden, ob die ω -Hydroxylierung der verschiedenen Vitamin E – Formen von nur einem oder mehreren CYPs bewerkstelligt wird. Zudem wurde von der großen Zahl der verschiedenen CYPs bisher

nur eine kleine Auswahl getestet. Einiges spricht zwar für CYP4F2 als Hauptenzym, die Beteiligung z.B. von CYP3A, kann aber nach wie vor nicht ausgeschlossen werden. Die potentielle Rolle der einzelnen CYPs im Vitamin E - Metabolismus ist hierbei wiederum von einer Reihe von Faktoren abhängig: der Affinität der jeweiligen Vitamin E - Formen zum Cytochrom, der Geschwindigkeit der Reaktion sowie der Konzentration des Cytochroms im Gewebe.

Speziell die Höhe der Expression des bzw. der Cyps ist im Falle von Vitamin E möglicherweise von besonderer Bedeutung, wie die Untersuchung von Cyp3a11 in der Leber der in dieser Arbeit verwendeten Wildtypmäuse zeigte (Kluth et al. 2005). Die Mangeldiät (2 mg/kg) hatte nach 3 Monaten eine sehr geringe Cyp3a11 - Expression zur Folge, mit der Normal- (20 mg/kg) bzw. hochsupplementierten (200 mg/kg) Diät konnten die Expressionslevel jedoch „normalisiert“ werden. Die 9-monatige Supplementierung mit 200 mg/kg führte nochmals zu einer Steigerung der Expression. Die Expression der Cyp3a11 mRNA war hierbei assoziiert mit der hepatischen α -Tocopherolkonzentration sowie der urinären Exkretion von α -CEHC und α -CMBHC. Traber *et al.* (2005) konnten nach Supplementation von Mäusen mit α -Tocopherol ebenfalls eine Hochregulation von Cyp3a finden, während γ -Tocopherol keinen Einfluss auf den Cyp3a Spiegel hatte. Die Cyp4f-Proteinexpression blieb nach Fütterung mit α -Tocopherol bzw. γ -Tocopherol unverändert (Mustacich et al. 2006; Traber et al. 2005).

Während die mit der α -Tocopherolsupplementation korrelierte erhöhte Ausscheidung von α -CEHC also durchaus die Beteiligung von Cyp3a11 am Abbau von α -Tocopherol als möglich erscheinen lässt, ist eine Beteiligung von Cyp3a11 am Metabolismus von γ -Tocotrienol nur wenig wahrscheinlich. So war in dieser Arbeit die Exkretion von γ -CEHC und γ -CMBHC in Wildtypmäusen nach 3 Monaten nicht abhängig vom Expressionslevel von Cyp3a11 (und damit auch der Supplementierung mit α -Tocopherol). Auch in Ratten konnte gezeigt werden, dass eine α -Tocopheroldiät keinen Einfluss auf die Ausscheidung von urinären γ -Tocotrienolmetaboliten hatte (Ikeda et al. 2003). Entgegengesetzt betrachtet, führte die zusätzliche Applikation mit γ -Tocotrienol in der hier verwendeten hochsupplementierten Mäusegruppe jedoch zu einer Abnahme der α -CEHC- bzw. α -CMBHC-Konzentration. Dieser Effekt, wenn auch aufgrund der geringen Zahl an Versuchstieren statistisch nicht signifikant, könnte auf eine Konkurrenz beider Vitamin E – Formen am gleichen Cytochrom P450 mit einer klaren Präferenz im Abbau von γ -Tocotrienol vor α -Tocopherol hindeuten. Eine

Kompetition wäre allerdings auch für nachfolgende Enzyme innerhalb der β -Oxidation möglich.

Festzuhalten bleibt, dass die ω -Hydroxylierung deutlich zwischen α -Tocopherol und den übrigen Vitamin E – Formen unterscheidet. Die in dieser Arbeit gezeigte, niedrige Affinität von α -Tocopherol zum Cytochrom P450 bietet neben der bereits bekannten, hohen Affinität für α -TTP also eine doppelte Absicherung vor dem Verlust von α -Tocopherol durch Metabolismus und Ausscheidung. Möglicherweise dient dieser doppelte Schutzmechanismus auch dem Schutz vor Akkumulation der von α -Tocopherol verschiedenen Vitamin E – Formen in der Leber. Für andere fettlösliche Vitamine, beispielsweise Vitamin A, wurde eine solche hepatotoxische Wirkung nach Supplementation hoher Dosen und Anreicherung in der Leber bereits beschrieben (Bauernfeind 1980; Bendich and Langseth 1989; Kowalski et al. 1994). In jedem Falle sind die beiden voneinander unabhängigen Mechanismen des α -Tocopherol Transfers durch α -TTP sowie der ω -Hydroxylierung durch Cytochrom P450 jedoch von enormer Bedeutung im Hinblick auf die biologische Wirksamkeit der individuellen Vitamin E – Formen.

5.3 Die Rolle des Vitamin E – Metabolismus im Hinblick auf Bioverfügbarkeit und biologische Wirkung

5.3.1 Vitamin E und der Arzneimittelstoffwechsel

Für die verschiedenen Tocopherole und Tocotrienole wurden in den letzten Jahren eine Vielzahl von neuen, nicht-antioxidativen Wirkungen beschrieben. So gelang es beispielsweise unserer Gruppe, eine direkte Regulation der Genexpression durch individuelle Vitamin E - Formen nachzuweisen. Nach Inkubation von HepG2-Zellen mit 50 μ M α - und γ -Tocotrienol konnte eine Induktion der Cytochrom 3A4 Genexpression beobachtet werden (Landes et al. 2003). Mit Hilfe eines Reporter-gen-Assays wurde nachgewiesen, dass diese Induktion durch eine Aktivierung des hepatischen Pregnan X Rezeptors (PXR) bewirkt wird. Die Tocotrienole hatten hierbei die höchste Aktivität, gefolgt von δ -Tocopherol, α -Tocopherol und γ -Tocopherol.

Durch den hohen Metabolismus der Tocotrienole ist es *in vivo* jedoch unwahrscheinlich, dass Konzentrationen erreicht werden, die zur Aktivierung des PXR führen. Tatsächlich hatte die Supplementation mit γ -Tocotrienol keinen Einfluss auf die Expression von Cyp3a11, dem murinen Homolog zum humanen CYP3A4 (Kluth et al. 2005). Das in hoher Konzentration in der Leber vorhandene α -Tocopherol konnte die Cyp3A Expression allerdings deutlich erhöhen (Kluth *et al.* 2005; Mustacich *et al.* 2006; Traber *et al.* 2005). Ob dieser Effekt jedoch auf einer direkten Bindung von α -Tocopherol an den murinen PXR beruht, muss noch geklärt werden. Bisher ist nicht bekannt, ob α -Tocopherol auch an den murinen PXR bindet, der große Unterschiede in seiner Ligandenspezifität zum humanen PXR aufweist (Lehmann et al. 1998). Für den humanen PXR wurde lediglich für Tocotrienole, nicht aber Tocopherole, eine spezifische Bindung gezeigt (Zhou et al. 2004).

Eine andere Erklärung für die erhöhte Expression von Cyp3a11 liefern Ding und Staudinger (Ding and Staudinger 2005). Eine Aktivierung der Proteinkinase C - α hemmte die Aktivität des PXR und verhinderte dadurch die Induktion der CYP3A Genexpression. Die PKC- α wiederum wird in ihrer Aktivität durch α -Tocopherol, nicht jedoch durch andere Vitamin E – Formen, über eine Aktivierung der Phosphatase 2A gehemmt (Ricciarelli et al. 1998). Ob jedoch eine hohe hepatische α -Tocopherolkonzentration und damit verbundene Hemmung der PKC- α auch zu einer Erhöhung der konstitutiven PXR-Aktivität führt und hierdurch die erhöhte Expression von Cyp3a11 verursacht, muss in weiteren Versuchen geklärt werden.

Ein Anstieg der CYP3A Aktivität ist v.a. im Hinblick auf eine mögliche Beeinflussung des Arzneimittelabbaus beim Menschen von großer Bedeutung. CYP3A4 ist beim Menschen für den Abbau von bis zu 60 % aller Pharmaka verantwortlich (Cholerton et al. 1992). Eine Induktion von CYP3A durch hohe Dosen von α -Tocopherol über einen längeren Zeitraum könnte also den verstärkten Abbau vieler Arzneimittel bewirken. Eine ähnliche Wirkung wurde z.B. für Hyperforin, einen Bestandteil des Johanniskrauts und Aktivator des PXR, beschrieben (Moore et al. 2000; Wentworth et al. 2000). Die unkontrollierte Einnahme hoher Dosen von Hyperforin wurde dabei mit dem verstärkten Abbau des Immunosuppressivums Cyclosporin, des Protease-Inhibitors Indinavir, oralen Kontrazeptiva und Koagulationshemmern in Verbindung gebracht (Ioannides 2002). Umgekehrt betrachtet, könnte ein α -Tocopherol – Mangel beim Menschen Folgen für die Detoxifizierung von exogenen Substanzen wie Xenobiotika und Pharmaka, aber auch für den Abbau von endogenen Substanzen wie z.B. Testosteron, Estradiol sowie Vitamin D haben (Gupta et al. 2004; Waxman et al. 1988; Yu et al. 2005).

Beispielsweise wurden in Vitamin E - defizienten Ratten erniedrigte Cyp3A (und Cyp2B) Werte gefunden, die zu einer Erniedrigung der genotoxischen Wirkung von Aflatoxin B1 führten. Nach täglicher subcutaner Injektion von supraphysiologischen Dosen α -Tocopherol in Ratten wurde zusätzlich zum Anstieg von Cyp3A2 eine Induktion von Cyp2B sowie Cyp2C11 gezeigt. Interessanterweise stieg nach 9 bzw. 15 Tagen Injektion die Konzentration des Multidrug Resistance Transporters MDR1 stark an, während die hepatische α -Tocopherolkonzentration wieder abnahm (Mustacich et al. 2006). Während Mitglieder der CYP3A-, CYP2B- sowie CYP2C - Familie für den Abbau des Hauptteils aller verschriebenen Pharmaka verantwortlich sind sowie zahlreiche körpereigene Stoffe, beispielsweise Östrogene, abbauen, ist MDR1 wichtig für die biliäre Exkretion zahlreicher Pharmaka. Eine Modulation des α -Tocopherolspiegels kann deshalb möglicherweise nicht nur schwerwiegende Folgen auf den eigenen Abbau von α -Tocopherol bzw. anderen Vitamin E – Formen haben, sondern auch die Wirksamkeit einer pharmakologischen Behandlung stark beeinflussen.

5.3.2 Die apoptotische Wirkung von γ -Tocotrienol

In dieser Arbeit wurde die Induktion von Apoptose durch eine Aktivierung der Effektor-Caspase 3 nach Inkubation von HepG2 Zellen mit γ -Tocotrienol nachgewiesen. Ein apoptotischer sowie antiproliferativer Effekt von verschiedenen Vitamin E – Formen wurde auch schon für primäre normale Brustepithelzellen (McIntyre et al. 2000b) sowie präneoplastische, neoplastische und maligne Brustepithel-Zelllinien (McIntyre et al. 2000a; Shah et al. 2003) der Maus beschrieben, wobei Tocotrienole die höchste Potenz besaßen. Wie Shah *et al.* (Shah et al. 2003) hierbei zeigten, wurde nach Inkubation von hochmalignen +SA-Zellen mit γ -Tocotrienol die Initiator-Caspase 8 aktiviert, die wiederum eine Aktivierung der Effektor-Caspase 3 nach sich zog. Dies deutet auf einen Rezeptor-vermittelten Signalweg hin. Shah und Sylvester (Shah and Sylvester 2004; Shah and Sylvester 2005) wiesen nach, dass die Initiator Caspase 9 nicht aktiviert wurde, wie es nach einer Streß-induzierten Apoptose über die Mitochondrien der Fall gewesen wäre. Rickmann et al. (Rickmann et al. 2007) jedoch wiesen nach, dass in Pankreassternzellen γ -Tocotrienol über eine Depolarisierung des mitochondrialen Membranpotentials zur Apoptose führte.

Als mögliche Ursache der Rezeptor-induzierten Apoptose durch γ -Tocotrienol kommt die Aktivierung des Fas-Rezeptor-Signalweg über einen noch ungeklärten

Mechanismus in Betracht, wie Studien mit humanen Brustkrebs- sowie Prostata-Zellen nach Inkubation mit den ebenfalls apoptotisch wirksamen Vitamin E – Derivaten α -Tocopheryl-Succinat und α -Tocopherylacetat sowie mit δ -Tocotrienol ergaben (Israel et al. 2000; Shun et al. 2004; Yu et al. 1999). Die antiproliferative Wirkung wurde mit einer Reduktion der Aktivität der Protein Kinase C- α in Verbindung gebracht, die zu einer verringerten Bildung des epidermalem Wachstumsfaktors EGF (Epidermal Growth Factor) führte (Sylvester et al. 2001). Neuere Ergebnisse von Shah *et al.* legen jedoch nahe, dass die γ -Tocotrienol-induzierte Apoptose nicht über eine Death Rezeptor - Aktivierung verlief, sondern vielmehr auf einer Suppression des mitogenen PI3K/PDK-1/Akt Signalweges basierte. Diese führte u.a. zur nachfolgenden Herunterregulation von FLIP (FLICE-inhibitory protein), einem endogenen Inhibitor der Caspase 8 Aktivierung (Shah and Sylvester 2004; Shah and Sylvester 2005). Zudem wurde über eine Hemmung des NF-kappaB Signalweges durch γ -Tocotrienol berichtet, die zur verminderten Expression von antiapoptotischen Genen wie IAP1, IAP2, Bcl-xL, Bcl-2, cFLIP, XIAP, Bfl-1/A1, TRAF1, und Survivin führte (Ahn et al. 2007).

Während die apoptotische Wirkung von γ -Tocotrienol *in vitro* eindeutig u.a. in dieser Arbeit gezeigt wurde, fehlen bisher Studien, die eine ähnliche Wirkung auch *in vivo* aufzeigen. Durch eine antiproliferative sowie apoptotische Wirkung auf maligne Zellen könnte γ -Tocotrienol ein vielversprechendes Werkzeug im Kampf gegen Krebs darstellen. Betrachtet man jedoch die in dieser Arbeit gezeigte hohe Ausscheidungsrate und somit geringe Bioverfügbarkeit, so kommen starke Zweifel am tatsächlichen Nutzen von γ -Tocotrienol in der Therapie von Krebs auf. Tatsächlich wurden in dieser Arbeit selbst nach einwöchiger hoher Supplementation nur Spuren von γ -Tocotrienol in Leber und Plasma von Mäusen gefunden. Auch Ikeda *et al.* (Ikeda et al. 2002; Ikeda et al. 2003) gelang es nicht, γ -Tocotrienol selbst nach Supplementation von 50 mg / kg Körpergewicht in Leber, Plasma und Gehirn von Ratten nachzuweisen. Auch in Muskel, Niere, Herz und Lunge konnten nur Spuren nachgewiesen werden. Lediglich in der Haut sowie im Fettgewebe wurde eine Akkumulation von γ -Tocotrienol gefunden, die Konzentrationen blieben jedoch unter denjenigen von α -Tocopherol. Auch Kawakami et al. (Kawakami et al. 2007) konnten selbst nach hoher dreiwöchiger Supplementation einer Tocotrienol-Mischung nur Spuren von γ -Tocotrienol in Plasma und Geweben finden, lediglich im Fettgewebe war die Konzentration etwas erhöht. Eine mögliche Ursache für die Akkumulation in diesen Geweben ist in der Lipoprotein-Lipase zu suchen, die verstärkt im Fettgewebe exprimiert wird und γ -Tocotrienol bereits aus den Chylomikronen freisetzen kann. Eine

Akkumulation in anderen Organen oder aber in Tumoren erscheint deshalb als nicht sehr wahrscheinlich. Bedacht werden muss zudem, dass v.a. maligne Zellen oftmals auch in der Lage sind, cytotoxische Substanzen z.B. durch verstärkte Exkretion mit Hilfe des P-Glycoproteins (MDR1), oder aber durch Abbau zu neutralisieren. So wurde z.B. beschrieben, dass die Prostatakrebs-Zelllinien LNCaP und PC3 Tocopherole und Tocotrienole bis zum CEHC metabolisieren (Conte et al. 2004). Zudem wurde beschrieben, dass MDR1 zu den Zielgenen des PXR zählt (Geick *et al.* 2001; Synold *et al.* 2001) und durch Tocotrienole induziert werden kann (Zhou et al. 2004). Es scheint deshalb unwahrscheinlich, dass es in Tumorzellen eines Organismus tatsächlich zur Akkumulation von γ -Tocotrienol zu einer Konzentration kommen kann, die letztendlich zu einer antiproliferativen bzw. apoptotischen Wirkung führt.

5.4 Synopsis: Die biologische Bedeutung des Vitamin E – Metabolismus

Sowohl die hohe Affinität des α -TTP als auch die geringe ω -Hydroxylierungsrate von α -Tocopherol lassen darauf schließen, dass der Körper besondere Sorgfalt auf eine Aufrechterhaltung des *RRR*- α -Tocopherol-Status verwendet. α -TTP sorgt hierbei nicht nur für den Einbau von neu aufgenommenem *RRR*- α -Tocopherol in Lipoproteine, sondern auch für das Recycling von bereits in Zirkulation befindlichem *RRR*- α -Tocopherol. Die niedrige ω -Hydroxylierungsrate für α -Tocopherol wiederum sorgt zusätzlich dafür, das α -Tocopherol nicht rapide verstoffwechselt wird.

Bei geringer Aufnahme von natürlichem α -Tocopherol stellen beide Mechanismen also einen effizienten Schutz des Körpers vor einer Ausscheidung des „wertvollen“ Vitamin E dar. Ein anderes Bild ergibt sich aus der Aufnahme von sehr hohen Dosen *RRR*- α -Tocopherol über einen längeren Zeitraum. Wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, nimmt die Ausscheidung an α -CEHC bzw. α -CMBHC stark zu. Gleichzeitig lässt sich eine Sättigung der Plasmakonzentration von *RRR*- α -Tocopherol beobachten. Offensichtlich ist in diesem Fall die Kapazität von α -TTP erschöpft, *RRR*- α -Tocopherol auf Lipoproteine zu transferieren. Neu aufgenommenes α -Tocopherol tritt zudem in Konkurrenz zu dem aus der Peripherie über HDL zur Leber zurücktransportiertem α -Tocopherol. Hierdurch käme es zu einer starken Akkumulation von α -Tocopherol in der Leber, der der Körper durch eine gesteigerte Ausscheidung von α -CEHC sowie α -CMBHC entgegenwirkt.

Diese Ausscheidung erreicht jedoch selbst bei einer hohen Konzentration von α -Tocopherol / g Leber nicht die Ausscheidung von γ -CEHC sowie γ -CMBHC nach Supplementation mit hohen Dosen an γ -Tocotrienol. Ob eine erhöhte Ausscheidung von überschüssigem α -Tocopherol und seiner Metabolite auch über die Galle und den Fäces stattfindet, bedarf jedoch weiterer Klärung.

Andere Vitamin E – Formen weisen sowohl in ihrer Affinität zum α -TTP als auch in ihrer ω -Hydroxylierungsrate hohe Unterschiede untereinander und insbesondere zum *RRR*- α -Tocopherol auf. Dementsprechend hoch sind die Ausscheidungsraten der Metabolite bei einem gleichzeitig geringen Plasma- und Lebergehalt. γ -Tocotrienol zeigt hierbei die höchste Ausscheidungsrate von γ -CEHC sowie γ -CMBHC und ist gleichzeitig in Plasma und Leber nicht nachweisbar. Offensichtlich wird γ -Tocotrienol also vom Körper als Fremdstoff erkannt, der rasch ausgeschieden werden muss. Über

mögliche toxische Wirkungen von γ -Tocotrienol ist jedoch *in vivo* nichts bekannt, möglicherweise, weil toxikologisch relevante Konzentrationen *in vivo* nicht erreichen werden.

Dieser Umstand trifft wiederum in gleichem Maße auch auf die Übertragbarkeit von weiteren *in vitro* Effekten zu, die z.B. für die Tocotrienole erzielt wurden. Bei normaler Ernährung ist es sehr unwahrscheinlich, dass sich *in vivo* die Konzentrationen erreichen lassen, die *in vitro* zu einem Effekt führen. Ob jedoch die künstliche Zufuhr sehr hoher Mengen zu einem solchen Anstieg der Konzentration direkt in den jeweiligen Zielorganen führen kann, bedarf weiterer Klärung. Hierbei müssen insbesondere mögliche toxische Wirkungen (z.B. von γ -Tocotrienol auf Hepatozyten) sowie die mögliche Beeinflussung des Arzneimittelstoffwechsels, z.B. über eine Aktivierung des Pregnan X Rezeptors, berücksichtigt werden.

6 Appendix

Induktion von Caspase 3 durch γ -Tocotrienol in HepG2 Zellen

γ -Tocotrienol, nicht aber andere Vitamin E – Formen, bewirkte in HepG2-Zellen eine hohe Zytotoxizität (Abb. 4.1). Um zu überprüfen, ob die Zytotoxizität auf einer Induktion von Apoptose beruht, wurden HepG2-Zellen auf Objektträgern herangezogen und für 24 bzw. 48 Stunden mit γ -Tocotrienol inkubiert. Anschließend erfolgte der Nachweis der Effektor-Caspase 3 mittels Immunhistochemie.

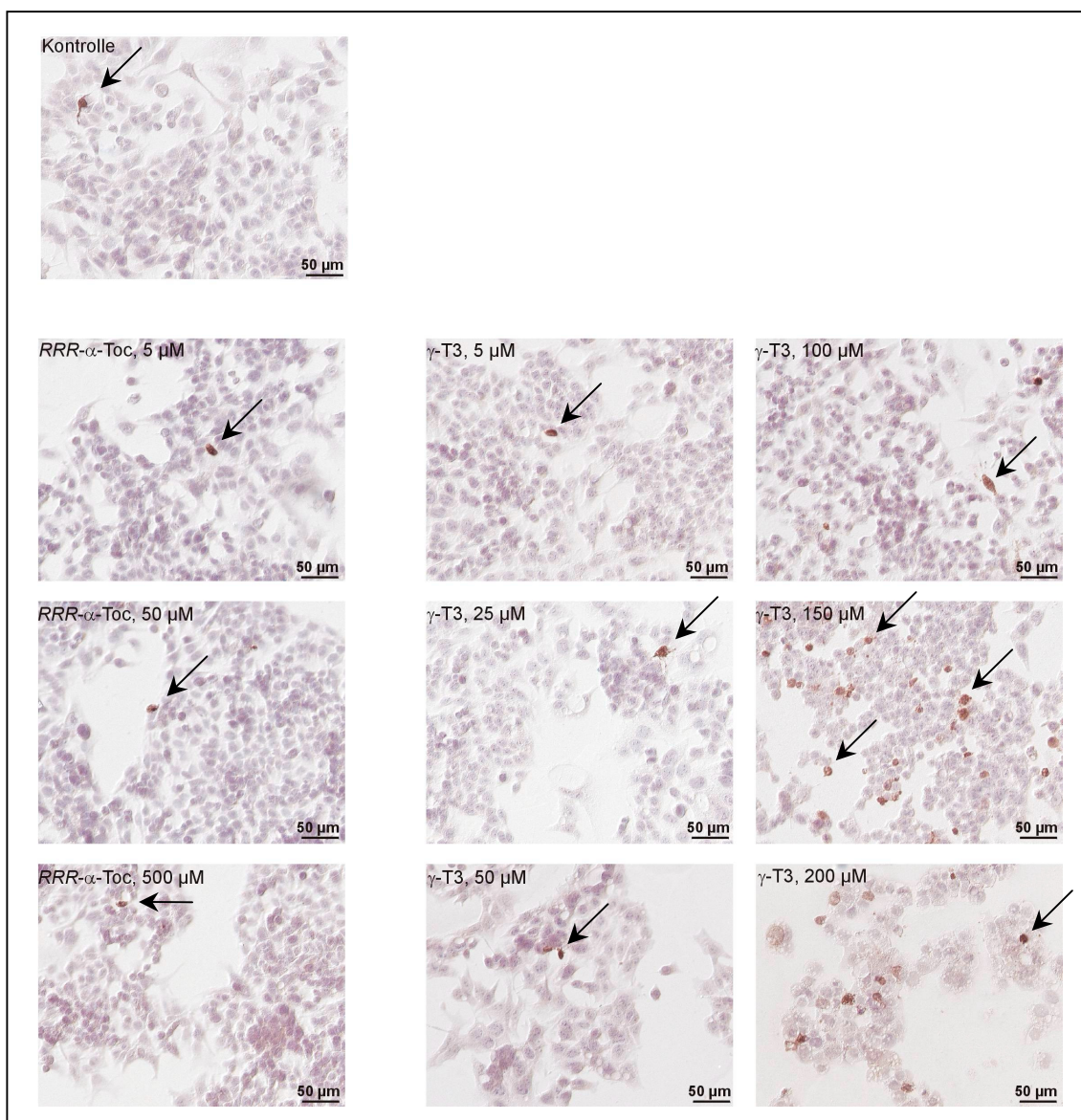


Abb. 6.1 Immunhistochemischer Nachweis von Caspase 3 in HepG2-Zellen nach 24 h Inkubation mit α -Tocopherol bzw. γ -Tocotrienol

HepG2-Zellen wurden in einer Dichte von 200000 Zellen/Objektträger ausgesät. Nach 96 h Vorinkubation erfolgte die Inkubation der Zellen mit der Lösungsmittelkontrolle sowie ansteigenden Konzentrationen von RRR- α -Tocopherol und γ -Tocotrienol. Nach Fixieren der Zellen nach 24 h in Methanol wurde aktive Caspase 3 mit Hilfe eines Caspase-3 Primärantikörper markiert. Über einen biotinylierten Sekundär-Antikörper und einen POD-gekoppelten Streptavidin-Biotin-Komplex erfolgte die Braunfärbung der markierten Caspase 3 durch Zugabe des Peroxidasesubstrats Diaminobenzidin. Einige Caspase 3 – positive Zellen sind mit Pfeilen markiert. Die Blau-Färbung der Zellkerne erfolgte durch Hämatoxylin. Weitere Details siehe Kapitel 3.4.2.

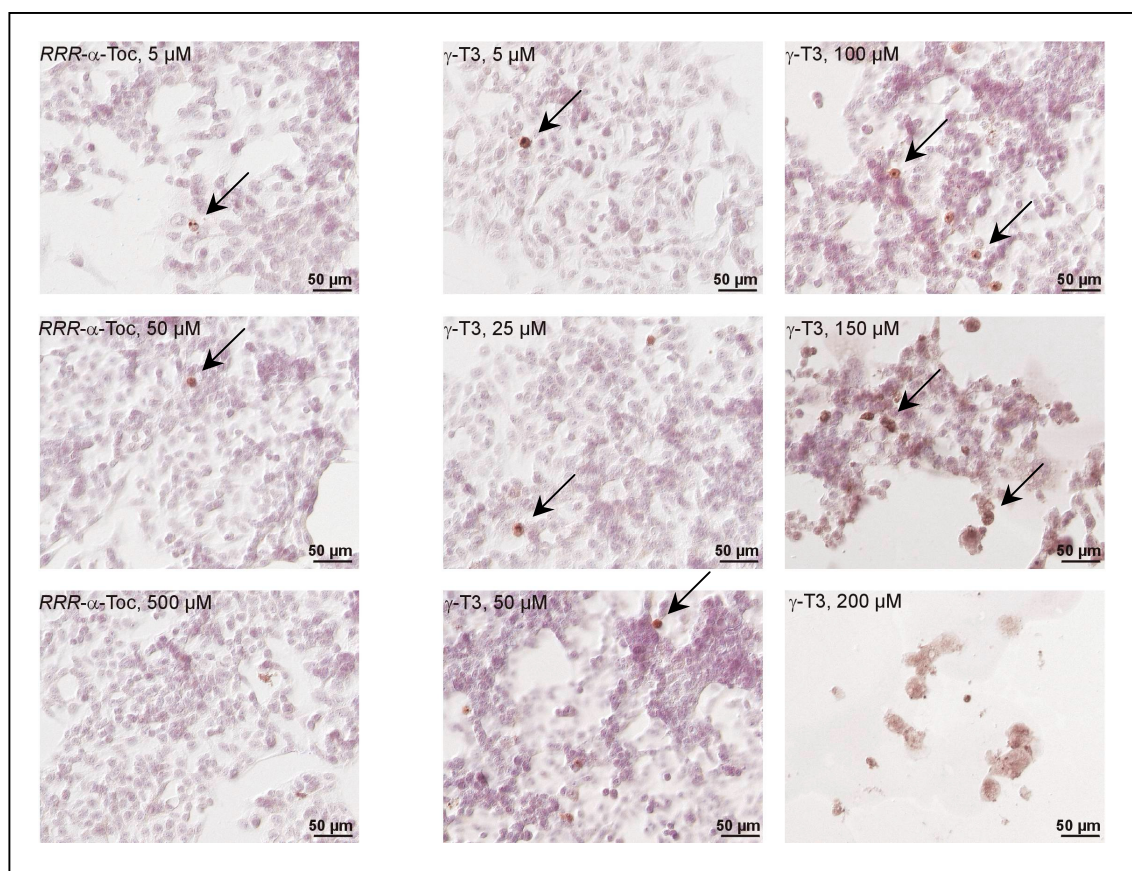


Abb. 6.2 Immunhistochemischer Nachweis von Caspase 3 in HepG2-Zellen nach 48 h Inkubation mit RRR- α -Tocopherol bzw. γ -Tocotrienol

HepG2-Zellen wurden in einer Dichte von 200000 Zellen/Objektträger ausgesät. Nach 96 h Vorinkubation erfolgte die Inkubation der Zellen mit der Lösungsmittelkontrolle (nicht gezeigt) sowie ansteigenden Konzentrationen von α -Tocopherol und γ -Tocotrienol für 48 h.

In den Zellen, die mit α -Tocopherol inkubiert wurden, sind selbst bei der höchsten Konzentration von 500 μ M weder nach 24 noch 48 Stunden braun gefärbte, Caspase 3 – positive Zellen zu erkennen. Auch die Morphologie und Dichte der Zellen unterschied sich nicht von der Lösungsmittelkontrolle. In den mit γ -Tocotrienol behandelten Zellen

sieht man jedoch deutlich eine dosis- und zeitabhängige Zunahme der apoptotischen Zellen. Bis zu einer Konzentration von 50 μM hat die Inkubation mit γ -Tocotrienol weder für 24 h noch für 48 h eine Zunahme an Apoptose zur Folge. Nach 24 h steigt die Zahl der gefärbten Zellen ab einer γ -Tocotrienolkonzentration von 100 μM an, bei 200 μM γ -Tocotrienol sind Zellverluste merklich erkennbar. Noch deutlicher wird dieser Effekt nach 48 h Inkubation mit γ -Tocotrienol. Nach Inkubation mit 150 μM und v.a. 200 μM sind große Zellverluste erkennbar, die wenigen verbliebenen Zellen sind fast alle apoptotisch.

7 Literaturverzeichnis

- Abe C, Uchida T, Ohta M, Ichikawa T, Yamashita K, Ikeda S (2007) Cytochrome P450-Dependent Metabolism of Vitamin E Isoforms is a Critical Determinant of Their Tissue Concentrations in Rats. *Lipids* 42:637-45
- Ahn KS, Sethi G, Krishnan K, Aggarwal BB (2007) Gamma-tocotrienol inhibits nuclear factor-kappaB signaling pathway through inhibition of receptor-interacting protein and TAK1 leading to suppression of antiapoptotic gene products and potentiation of apoptosis. *J Biol Chem* 282:809-20
- Aratri E, Spycher SE, Breyer I, Azzi A (1999) Modulation of alpha-tropomyosin expression by alpha-tocopherol in rat vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett* 447:91-4
- Azzi A (2007) Molecular mechanism of alpha-tocopherol action. *Free Radic Biol Med* 43:16-21
- Azzi A, Breyer I, Feher M, Pastori M, Ricciarelli R, Spycher S, Staffieri M, Stocker A, Zimmer S, Zingg JM (2000) Specific cellular responses to alpha-tocopherol. *J Nutr* 130:1649-52.
- Azzi A, Gysin R, Kempna P, Munteanu A, Negis Y, Villacorta L, Visarius T, Zingg JM (2004) Vitamin E mediates cell signaling and regulation of gene expression. *Ann N Y Acad Sci* 1031:86-95
- Bauernfeind J (1980) The safe use of vitamin A. A report of the international vitamin A consultative group. Washington Nutrition Foundation. Washington Nutrition Foundation
- Behrens WA, Madere R (1986) Alpha- and gamma tocopherol concentrations in human serum. *J Am Coll Nutr* 5:91-6
- Behrens WA, Thompson JN, Madere R (1982) Distribution of alpha-tocopherol in human plasma lipoproteins. *Am J Clin Nutr* 35:691-6
- Bendich A, Langseth L (1989) Safety of vitamin A. *Am J Clin Nutr* 49:358-71
- Birringer M, Drohan D, Brigelius-Flohe R (2001) Tocopherols are metabolized in HepG2 cells by side chain omega-oxidation and consecutive beta-oxidation. *Free Radic Biol Med* 31:226-232.
- Birringer M, Pfluger P, Kluth D, Landes N, Brigelius-Flohe R (2002) Identities and Differences in the Metabolism of Tocotrienols and Tocopherols in HepG2 Cells. *J Nutr* 132:3113-8.
- Bjorneboe A, Bjorneboe GE, Drevon CA (1987) Serum half-life, distribution, hepatic uptake and biliary excretion of alpha-tocopherol in rats. *Biochim Biophys Acta* 921:175-81
- Bjorneboe A, Bjorneboe GE, Drevon CA (1990) Absorption, transport and distribution of vitamin E. *J Nutr* 120:233-42.
- Boaz M, Smetana S, Weinstein T, Matas Z, Gafer U, Iaina A, Knecht A, Weissgarten Y, Brunner D, Fainaru M, Green MS (2000) Secondary prevention with antioxidants of cardiovascular disease in endstage renal disease (SPACE): randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 356:1213-8

- Boscoboinik D, Szewczyk A, Azzi A (1991a) Alpha-tocopherol (vitamin E) regulates vascular smooth muscle cell proliferation and protein kinase C activity. *Arch Biochem Biophys* 286:264-9
- Boscoboinik D, Szewczyk A, Hensey C, Azzi A (1991b) Inhibition of cell proliferation by alpha-tocopherol. Role of protein kinase C. *J Biol Chem* 266:6188-94
- Bradford MM (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
- Burton GW, Ingold KU (1989) Vitamin E as an in vitro and in vivo antioxidant. *Ann N Y Acad Sci* 570:7-22
- Cachia O, Benna JE, Pedruzzi E, Descomps B, Gougerot-Pocidallo MA, Leger CL (1998) alpha-tocopherol inhibits the respiratory burst in human monocytes. Attenuation of p47(phox) membrane translocation and phosphorylation. *J Biol Chem* 273:32801-5.
- Catignani GL (1975) An alpha-tocopherol binding protein in rat liver cytoplasm. *Biochem Biophys Res Commun* 67:66-72
- Chiku S, Hamamura K, Nakamura T (1984) Novel urinary metabolite of delta-tocopherol in rats. *J Lipid Res* 25:40-8
- Cholerton S, Daly AK, Idle JR (1992) The role of individual human cytochromes P450 in drug metabolism and clinical response. *Trends Pharmacol Sci* 13:434-9
- Chow CK (1985) Vitamin E and blood. *World Rev Nutr Diet* 45:133-66
- Clement S, Tasinato A, Boscoboinik D, Azzi A (1997) The effect of alpha-tocopherol on the synthesis, phosphorylation and activity of protein kinase C in smooth muscle cells after phorbol 12-myristate 13-acetate down-regulation. *Eur J Biochem* 246:745-9
- Cohn W (1997) Bioavailability of vitamin E. *Eur J Clin Nutr* 51 Suppl 1:S80-5
- Cohn W, Gross P, Grun H, Loechleiter F, Muller DP, Zulauf M (1992) Tocopherol transport and absorption. *Proc Nutr Soc* 51:179-88
- Conte C, Floridi A, Aisa C, Piroddi M, Floridi A, Galli F (2004) Gamma-tocotrienol metabolism and antiproliferative effect in prostate cancer cells. *Ann N Y Acad Sci* 1031:391-4
- Copp RP, Wisniewski T, Hentati F, Larnaout A, Ben Hamida M, Kayden HJ (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* 822:80-7
- de Gaetano G (2001) Low-dose aspirin and vitamin E in people at cardiovascular risk: a randomised trial in general practice. Collaborative Group of the Primary Prevention Project. *Lancet* 357:89-95
- Deutsche Gesellschaft für Ernährung (2000) Referenzwerte für die Nährstoffzufuhr, 1. Auflage, 1 edn. Umschau/Braus Verlagsgesellschaft, Frankfurt/Main, pp 87
- Devaraj S, Hugou I, Jialal I (2001) Alpha-tocopherol decreases CD36 expression in human monocyte-derived macrophages. *J Lipid Res* 42:521-7.
- Devaraj S, Jialal I (1999) Alpha-tocopherol decreases interleukin-1 beta release from activated human monocytes by inhibition of 5-lipoxygenase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19:1125-33

- Ding X, Staudinger JL (2005) Repression of PXR-mediated induction of hepatic CYP3A gene expression by protein kinase C. *Biochem Pharmacol* 69:867-73
- Drevon CA (1991) Absorption, transport and metabolism of vitamin E. *Free Radic Res Commun* 14:229-46
- Evans HM, Bishop KS (1922) On the existence of a hitherto unrecognized dietary factor essential for reproduction. *Science* 56:650-651
- Evans HM, Emerson OH, Emerson GA (1936) The isolation from wheat germ oil of an alcohol, α -tocopherol, having the properties of vitamin E. *J Biol Chem* 113:319-332
- Fernholz E (1938) On the constitution of α -tocopherol. *J Am Chem Soc* 60:700-705
- Givner ML, Kraml M, Dvornik D, Gaudry R (1964) An Inhibitor Of Adrenal Steroid 11 Beta-Hydroxylase. *Nature* 203:317
- Gotoda T, Arita M, Arai H, Inoue K, Yokota T, Fukuo Y, Yazaki Y, Yamada N (1995) Adult-onset spinocerebellar dysfunction caused by a mutation in the gene for the alpha-tocopherol-transfer protein [see comments]. *N Engl J Med* 333:1313-8
- Grammas P, Hamdheydari L, Benaksas EJ, Mou S, Pye QN, Wechter WJ, Floyd RA, Stewart C, Hensley K (2004) Anti-inflammatory effects of tocopherol metabolites. *Biochem Biophys Res Commun* 319:1047-52
- Gupta RP, Hollis BW, Patel SB, Patrick KS, Bell NH (2004) CYP3A4 is a human microsomal vitamin D 25-hydroxylase. *J Bone Miner Res* 19:680-8
- Hattori A, Fukushima T, Imai K (2000a) Occurrence and determination of a natriuretic hormone, 2,7,8-trimethyl-2-(beta-carboxyethyl)-6-hydroxy chroman, in rat plasma, urine, and bile. *Anal Biochem* 281:209-15
- Hattori A, Fukushima T, Yoshimura H, Abe K, Ima K (2000b) Production of LLU-alpha following an oral administration of gamma-tocotrienol or gamma-tocopherol to rats. *Biol Pharm Bull* 23:1395-7
- Heart Protection Study Collaborative Group (2002) MRC/BHF Heart Protection Study of antioxidant vitamin supplementation in 20,536 high-risk individuals: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 360:23-33.
- Hodis HN, Mack WJ, LaBree L, Mahrer PR, Sevanian A, Liu CR, Liu CH, Hwang J, Selzer RH, Azen SP (2002) Alpha-tocopherol supplementation in healthy individuals reduces low-density lipoprotein oxidation but not atherosclerosis: the Vitamin E Atherosclerosis Prevention Study (VEAPS). *Circulation* 106:1453-9
- Horwitt MK, Century B, Zeman AA (1963) Erythrocyte survival time and reticulocyte levels after tocopherol depletion in man. *Am J Clin Nutr* 12:99-106
- Hosomi A, Arita M, Sato Y, Kiyose C, Ueda T, Igarashi O, Arai H, Inoue K (1997) Affinity for alpha-tocopherol transfer protein as a determinant of the biological activities of vitamin E analogs. *FEBS Lett* 409:105-108
- Hosomi A, Goto K, Kondo H, Iwatsubo T, Yokota T, Ogawa M, Arita M, Aoki J, Arai H, Inoue K (1998) Localization of alpha-tocopherol transfer protein in rat brain. *Neurosci Lett* 256:159-62
- Ikedo I, Imasato Y, Sasaki E, Sugano M (1996) Lymphatic transport of alpha-, gamma- and delta-tocotrienols and alpha-tocopherol in rats. *Int J Vitam Nutr Res* 66:217-21.

- Ikeda S, Tohyama T, 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* 132:961-6.
- Ikeda S, Tohyama T, Yoshimura H, Hamamura K, Abe K, Yamashita K (2003) Dietary alpha-tocopherol decreases alpha-tocotrienol but not gamma-tocotrienol concentration in rats. *J Nutr* 133:428-34.
- Ioannides C (2002) Pharmacokinetic interactions between herbal remedies and medicinal drugs. *Xenobiotica* 32:451-78.
- Israel K, Yu W, Sanders BG, Kline K (2000) Vitamin E succinate induces apoptosis in human prostate cancer cells: role for Fas in vitamin E succinate-triggered apoptosis. *Nutr Cancer* 36:90-100
- Jiang Q, Elson-Schwab I, Courtemanche C, Ames BN (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* 97:11494-9.
- Jishage K, Arita M, Igarashi K, Iwata T, Watanabe M, Ogawa M, Ueda O, Kamada N, Inoue K, Arai H, Suzuki H (2001) Alpha-tocopherol transfer protein is important for the normal development of placental labyrinthine trophoblasts in mice. *J Biol Chem* 276:1669-1672.
- Kaempf-Rotzoll DE, Horiguchi M, Hashiguchi K, Aoki J, Tamai H, Linderkamp O, Arai H (2003) Human Placental Trophoblast Cells Express alpha-Tocopherol Transfer Protein. *Placenta* 24:439-44.
- Karrer P, Fritzsche H, Ringier BH, Salomon H (1938) a-Tocopherol. *Helv Chim Acta* 21:520-525
- Kawakami Y, Tsuzuki T, Nakagawa K, Miyazawa T (2007) Distribution of tocotrienols in rats fed a rice bran tocotrienol concentrate. *Biosci Biotechnol Biochem* 71:464-71
- Kayden HJ, Traber MG (1993) Absorption, lipoprotein transport, and regulation of plasma concentrations of vitamin E in humans. *J Lipid Res* 34:343-58.
- Kluth D, Landes N, Pfluger P, Muller-Schmehl K, Weiss K, Bumke-Vogt C, Ristow M, Brigelius-Flohe R (2005) Modulation of Cyp3a11 mRNA expression by alpha-tocopherol but not gamma-tocotrienol in mice. *Free Radic Biol Med* 38:507-14
- Kostner GM, Oettl K, Jauhiainen M, Ehnholm C, Esterbauer H, Dieplinger H (1995) Human plasma phospholipid transfer protein accelerates exchange/transfer of alpha-tocopherol between lipoproteins and cells. *Biochem J* 305:659-67.
- Kowalski TE, Falestiny M, Furth E, Malet PF (1994) Vitamin A hepatotoxicity: a cautionary note regarding 25,000 IU supplements. *Am J Med* 97:523-8
- Lake BG, Gray TJ, Korosi SA, Walters DG (1989) Nafenopin, a peroxisome proliferator, depletes hepatic vitamin E content and elevates plasma oxidised glutathione levels in rats. *Toxicol Lett* 45:221-9.
- Landes N, Pfluger P, Kluth D, Birringer M, Ruhl R, Bol GF, Glatt H, Brigelius-Flohe R (2003) Vitamin E activates gene expression via the pregnane X receptor. *Biochem Pharmacol* 65:269-73.
- Lee-Kim YC, Meydani M, Kassajian Z, Blumberg JB, Russell RM (1988) Enterohepatic circulation of newly administered alpha-tocopherol in the rat. *Int J Vitam Nutr Res* 58:284-91

- Lee IM, Cook NR, Gaziano JM, Gordon D, Ridker PM, Manson JE, Hennekens CH, Buring JE (2005) Vitamin E in the primary prevention of cardiovascular disease and cancer: the Women's Health Study: a randomized controlled trial. *JAMA* 294:56-65
- Lehmann JM, McKee DD, Watson MA, Willson TM, Moore JT, Kliewer SA (1998) The human orphan nuclear receptor PXR is activated by compounds that regulate CYP3A4 gene expression and cause drug interactions. *J Clin Invest* 102:1016-23.
- Leonard SW, Gumpricht E, Devereaux MW, Sokol RJ, Traber MG (2005) Quantitation of rat liver vitamin E metabolites by LC-MS during high-dose vitamin E administration. *J Lipid Res* 46:1068-75
- Lodge JK, Ridlington J, Leonard S, Vaule H, Traber MG (2001) Alpha- and gamma-tocotrienols are metabolized to carboxyethyl-hydroxychroman derivatives and excreted in human urine. *Lipids* 36:43-8.
- Lonn E, Bosch J, Yusuf S, Sheridan P, Pogue J, Arnold JM, Ross C, Arnold A, Sleight P, Probstfield J, Dagenais GR (2005) Effects of long-term vitamin E supplementation on cardiovascular events and cancer: a randomized controlled trial. *JAMA* 293:1338-47
- Mardones P, Strobel P, Miranda S, Leighton F, Quinones V, Amigo L, Rozowski J, Krieger M, Rigotti A (2002) Alpha-tocopherol metabolism is abnormal in scavenger receptor class B type I (SR-BI)-deficient mice. *J Nutr* 132:443-9.
- McIntyre BS, Briski KP, Gapor A, Sylvester PW (2000a) Antiproliferative and apoptotic effects of tocopherols and tocotrienols on preneoplastic and neoplastic mouse mammary epithelial cells. *Proc Soc Exp Biol Med* 224:292-301
- McIntyre BS, Briski KP, Tirmenstein MA, Fariss MW, Gapor A, Sylvester PW (2000b) Antiproliferative and apoptotic effects of tocopherols and tocotrienols on normal mouse mammary epithelial cells. *Lipids* 35:171-80
- Minehira-Castelli K, Leonard SW, Walker QM, Traber MG, Young SG (2006) Absence of VLDL secretion does not affect alpha-tocopherol content in peripheral tissues. *J Lipid Res* 47:1733-8
- Moore LB, Goodwin B, Jones SA, Wisely GB, Serabjit-Singh CJ, Willson TM, Collins JL, Kliewer SA (2000) St. John's wort induces hepatic drug metabolism through activation of the pregnane X receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:7500-2.
- Müller-Schmehl K, Beninde J, Finckh B, Florian S, Dudenhausen JW, Brigelius-Flohe R, Schuelke M (2004) Localization of alpha-tocopherol transfer protein in trophoblast, fetal capillaries' endothelium and amnion epithelium of human term placenta. *Free Radic Res* 38:413-20
- Murray ED, Jr., Kantoci D, DeWind SA, Bigornia AE, D'Amico DC, King JG, Jr., Pham T, Levine BH, Jung ME, Wechter WJ (1995) Endogenous natriuretic factors 3: isolation and characterization of human natriuretic factors LLU-alpha, LLU-beta 1, and LLU-gamma. *Life Sci* 57:2145-61
- Mustacich DJ, Leonard SW, Devereaux MW, Sokol RJ, Traber MG (2006) alpha-Tocopherol regulation of hepatic cytochrome P450s and ABC transporters in rats. *Free Radic Biol Med* 41:1069-78
- Olcott HS, Emerson OH (1937) Antioxidants and the autoxidation of fats. IX. The antioxidant properties of the tocopherols. *J Am Chem Soc* 59:1008-1009
- Ouahchi K, Arita M, Kayden H, Hentati F, Ben Hamida M, Sokol R, Arai H, Inoue K, Mandel JL, Koenig M (1995) Ataxia with isolated vitamin E deficiency is caused by mutations in the alpha-tocopherol transfer protein. *Nat Genet* 9:141-5

- Özer NK, Azzi A (2000) Effect of vitamin E on the development of atherosclerosis. *Toxicology* 148:179-85.
- Parker RS, Sontag TJ, Swanson JE (2000) Cytochrome P4503A-dependent metabolism of tocopherols and inhibition by sesamin. *Biochem Biophys Res Commun* 277:531-4
- Parker RS, Sontag TJ, Swanson JE, McCormick CC (2004) Discovery, characterization, and significance of the cytochrome P450 omega-hydroxylase pathway of vitamin E catabolism. *Ann N Y Acad Sci* 1031:13-21
- Parker RS, Swanson JE (2000) A novel 5'-carboxychroman metabolite of gamma-tocopherol secreted by HepG2 cells and excreted in human urine. *Biochem Biophys Res Commun* 269:580-3
- Pearce BC, Parker RA, Deason ME, Qureshi AA, Wright JJ (1992) Hypocholesterolemic activity of synthetic and natural tocotrienols. *J Med Chem* 35:3595-606
- Pfluger P, Kluth D, Landes N, Bumke-Vogt C, Brigelius-Flohe R (2004) Vitamin E: underestimated as an antioxidant. *Redox Rep* 9:249-54
- Podda M, Weber C, Traber MG, Packer L (1996) Simultaneous determination of tissue tocopherols, tocotrienols, ubiquinol, and ubiquinone. *J Lipid Res* 37:893-901
- Pope SA, Clayton PT, Muller DP (2000) A new method for the analysis of urinary vitamin E metabolites and the tentative identification of a novel group of compounds. *Arch Biochem Biophys* 381:8-15.
- Qian J, Morley S, Wilson K, Nava P, Atkinson J, Manor D (2005) Intracellular trafficking of vitamin E in hepatocytes: the role of tocopherol transfer protein. *J Lipid Res* 46:2072-82
- Qureshi AA, Burger WC, Peterson DM, Elson CE (1986) The structure of an inhibitor of cholesterol biosynthesis isolated from barley. *J Biol Chem* 261:10544-50
- Qureshi AA, Qureshi N, Hasler-Rapacz JO, Weber FE, Chaudhary V, Crenshaw TD, Gapor A, Ong AS, Chong YH, Peterson D (1991a) Dietary tocotrienols reduce concentrations of plasma cholesterol, apolipoprotein B, thromboxane B2, and platelet factor 4 in pigs with inherited hyperlipidemias. *Am J Clin Nutr* 53:1042S-1046S
- Qureshi AA, Qureshi N, Wright JJ, Shen Z, Kramer G, Gapor A, Chong YH, DeWitt G, Ong A, Peterson DM (1991b) Lowering of serum cholesterol in hypercholesterolemic humans by tocotrienols (palmvitee). *Am J Clin Nutr* 53:1021S-1026S
- Qureshi AA, Sami SA, Salser WA, Khan FA (2002) Dose-dependent suppression of serum cholesterol by tocotrienol-rich fraction (TRF25) of rice bran in hypercholesterolemic humans. *Atherosclerosis* 161:199-207
- Ribeiro Jorge PA, Neyra LC, Ozaki RM, de Almeida E (1998) Improvement in the endothelium-dependent relaxation in hypercholesterolemic rabbits treated with vitamin E. *Atherosclerosis* 140:333-9
- Ricciarelli R, Maroni P, Ozer N, Zingg JM, Azzi A (1999) Age-dependent increase of collagenase expression can be reduced by alpha-tocopherol via protein kinase C inhibition. *Free Radic Biol Med* 27:729-37
- Ricciarelli R, Tasinato A, Clement S, Ozer NK, Boscoboinik D, Azzi A (1998) alpha-Tocopherol specifically inactivates cellular protein kinase C alpha by changing its phosphorylation state. *Biochem J* 334:243-9

- Ricciarelli R, Zingg JM, Azzi A (2000) Vitamin E reduces the uptake of oxidized LDL by inhibiting CD36 scavenger receptor expression in cultured aortic smooth muscle cells [In Process Citation]. *Circulation* 102:82-7
- Rickmann M, Vaquero EC, Malagelada JR, Molero X (2007) Tocotrienols induce apoptosis and autophagy in rat pancreatic stellate cells through the mitochondrial death pathway. *Gastroenterology* 132:2518-32
- Rimm EB, Stampfer MJ, Ascherio A, Giovannucci E, Colditz GA, Willett WC (1993) Vitamin E consumption and the risk of coronary heart disease in men. *N Engl J Med* 328:1450-6
- Rodrigues AD, Waddell PR, Ah-Sing E, Morris BA, Wolf CR, Ioannides C (1988) Induction of the rat hepatic microsomal mixed-function oxidases by 3 imidazole-containing antifungal agents: selectivity for the cytochrome P-450IIB and P-450III families of cytochromes P-450. *Toxicology* 50:283-301
- Sauberlich HE, Dowdy RP, Skala JH (1973) Laboratory tests for the assessment of nutritional status. *CRC Crit Rev Clin Lab Sci* 4:215-340
- Schmandke H (1965) Zur Umwandlung von α -Tocopherol und 2.5.7.8-Tetramethyl-2-(β -carboxyäthyl)-6-acetoxychroman in Tocopheronolacton im Normal- und Tocopherolmangel. *Int Z Vitaminforsch* 35:346-52
- Schönfeld A, Schultz M, Petrizka M, and Gassmann B (1993) A novel metabolite of RRR-alpha-tocopherol in human urine. *Die Nahrung* 37:498-500
- Schuelke M, Elsner A, Finckh B, Kohlschütter A, Hübner C, Brigelius-Flohé R (2000) Urinary alpha-tocopherol metabolites in alpha-tocopherol transfer protein-deficient patients. *J Lipid Res* 41:1543-51
- Schuelke M, Mayatepek E, Inter M, Becker M, Pfeiffer E, Speer A, Hübner C, Finckh B (1999) Treatment of ataxia in isolated vitamin E deficiency caused by alpha-tocopherol transfer protein deficiency. *J Pediatr* 134:240-4
- Schultz M, Leist M, Petrizka M, Gassmann B, 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
- Shah S, Gapor A, Sylvester PW (2003) Role of caspase-8 activation in mediating vitamin E-induced apoptosis in murine mammary cancer cells. *Nutr Cancer* 45:236-46
- Shah S, Sylvester PW (2004) Tocotrienol-induced caspase-8 activation is unrelated to death receptor apoptotic signaling in neoplastic mammary epithelial cells. *Exp Biol Med (Maywood)* 229:745-55
- Shah S, Sylvester PW (2005) Tocotrienol-induced cytotoxicity is unrelated to mitochondrial stress apoptotic signaling in neoplastic mammary epithelial cells. *Biochem Cell Biol* 83:86-95
- Shun MC, Yu W, Gapor A, Parsons R, Atkinson J, Sanders BG, Kline K (2004) Pro-apoptotic mechanisms of action of a novel vitamin E analog (alpha-TEA) and a naturally occurring form of vitamin E (delta-Tocotrienol) in MDA-MB-435 human breast cancer cells. *Nutr Cancer* 48:95-105
- Simon EJ, Eisengart A, Sundheim L, Milhorat AT (1956a) The metabolism of vitamin E II. Purification and characterization of urinary metabolites of alpha-tocopherol. *J Biol Chem* 221:807-817
- Simon EJ, Gross CS, and Milhorat AT (1956b) The metabolism of vitamin E I. The absorption and excretion of d-alpha-tocopheryl-5-methyl-C14-succinate. *J Biol Chem* 221:797-805

- Sontag TJ, Parker RS (2002) Cytochrome P450 omega-hydroxylase pathway of tocopherol catabolism. Novel mechanism of regulation of vitamin E status. *J Biol Chem* 277:25290-6
- Sontag TJ, Parker RS (2004) Vitamin E exhibits concentration- and vitamer-dependent impairment of microsomal enzyme activities. *Ann N Y Acad Sci* 1031:376-7
- Sontag TJ, Parker RS (2007) Influence of major structural features of tocopherols and tocotrienols on their omega-oxidation by tocopherol-omega-hydroxylase. *J Lipid Res* 48:1090-8
- Stampfer MJ, Hennekens CH, Manson JE, Colditz GA, Rosner B, Willett WC (1993) Vitamin E consumption and the risk of coronary disease in women. *N Engl J Med* 328:1444-9
- Stephens NG, Parsons A, Schofield PM, Kelly F, Cheeseman K, Mitchinson MJ (1996) Randomised controlled trial of vitamin E in patients with coronary disease: Cambridge Heart Antioxidant Study (CHAOS). *Lancet* 347:781-6
- Stresser DM, Broudy MI, Ho T, Cargill CE, Blanchard AP, Sharma R, Dandeneau AA, Goodwin JJ, Turner SD, Erve JC, Patten CJ, Dehal SS, Crespi CL (2004) Highly selective inhibition of human CYP3Aa in vitro by azamulin and evidence that inhibition is irreversible. *Drug Metab Dispos* 32:105-12
- Sure B (1924) Dietary requirements for reproduction. II. The existence of a specific vitamin for reproduction. *J Biol Chem* 58:693-709
- Swanson JE, Ben RN, Burton GW, Parker RS (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
- Sylvester PW, McIntyre BS, Gapor A, Briski KP (2001) Vitamin E inhibition of normal mammary epithelial cell growth is associated with a reduction in protein kinase C(alpha) activation. *Cell Prolif* 34:347-57.
- Tanabe M, Fukushima T, Usui N, Aoyama N, Tsunoda M, Imai K (2004) Intravenous administration of 2,7,8-trimethyl-2-(beta-carboxyethyl)-6-hydroxy chroman (gamma-CEHC) to rats and determination of its plasma concentration and urinary sodium excretion. *Biomed Chromatogr* 18:727-34
- Terasawa Y, Ladha Z, Leonard SW, Morrow JD, Newland D, Sanan D, Packer L, Traber MG, Farese RV, Jr. (2000) Increased atherosclerosis in hyperlipidemic mice deficient in alpha-tocopherol transfer protein and vitamin E. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:13830-4.
- Terentis AC, Thomas SR, Burr JA, Liebler DC, Stocker R (2002) Vitamin E oxidation in human atherosclerotic lesions. *Circ Res* 90:333-9
- Theriault A, Chao JT, 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.
- Theriault A, Wang Q, Gapor A, Adeli K (1999) Effects of gamma-tocotrienol on ApoB synthesis, degradation, and secretion in HepG2 cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19:704-12.
- Traber MG, Elsner A, Brigelius-Flohe 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* 437:145-8
- Traber MG, Kayden HJ (1989) Preferential incorporation of alpha-tocopherol vs gamma-tocopherol in human lipoproteins. *Am J Clin Nutr* 49:517-26

- Traber MG, Kayden HJ, Green JB, Green MH (1986) Absorption of water-miscible forms of vitamin E in a patient with cholestasis and in thoracic duct-cannulated rats. *Am J Clin Nutr* 44:914-23
- Traber MG, Ramakrishnan R, Kayden HJ (1994) Human plasma vitamin E kinetics demonstrate rapid recycling of plasma RRR-alpha-tocopherol. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:10005-8
- Traber MG, Siddens LK, Leonard SW, Schock B, Gohil K, Krueger SK, Cross CE, Williams DE (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* 38:773-85
- Tsuzuki W, Yunoki R, Yoshimura H (2007) Intestinal epithelial cells absorb gamma-tocotrienol faster than alpha-tocopherol. *Lipids* 42:163-70
- Virtamo J, Pietinen P, Huttunen JK, Korhonen P, Malila N, Virtanen MJ, Albanes D, Taylor PR, Albert P (2003) Incidence of cancer and mortality following alpha-tocopherol and beta-carotene supplementation: a postintervention follow-up. *JAMA* 290:476-85
- Watkins T, Lenz P, Gapor A, Struck M, Tomeo A, Bierenbaum M (1993) gamma-Tocotrienol as a hypocholesterolemic and antioxidant agent in rats fed atherogenic diets. *Lipids* 28:1113-8
- Waxman DJ, Attisano C, Guengerich FP, Lapenson DP (1988) Human liver microsomal steroid metabolism: identification of the major microsomal steroid hormone 6 beta-hydroxylase cytochrome P-450 enzyme. *Arch Biochem Biophys* 263:424-36
- Wechter WJ, Kantoci D, Murray ED, Jr., D'Amico DC, Jung ME, Wang WH (1996) A new endogenous natriuretic factor: LLU-alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:6002-7
- Weinberg RB, VanderWerken BS, Anderson RA, Stegner JE, Thomas MJ (2001) Pro-oxidant effect of vitamin E in cigarette smokers consuming a high polyunsaturated fat diet. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21:1029-33
- Wentworth JM, Agostini M, Love J, Schwabe JW, Chatterjee VK (2000) St John's wort, a herbal antidepressant, activates the steroid X receptor. *J Endocrinol* 166:R11-6.
- Williams RJ, Motteram JM, Sharp CH, Gallagher PJ (1992) Dietary vitamin E and the attenuation of early lesion development in modified Watanabe rabbits. *Atherosclerosis* 94:153-9
- Yamane M, Abe A (2000) omega-hydroxylation activity toward leukotriene B(4) and polyunsaturated fatty acids in the human hepatoblastoma cell line, HepG2, and human lung adenocarcinoma cell line, A549. *J Biochem (Tokyo)* 128:827-35.
- You CS, Sontag TJ, Swanson JE, Parker RS (2005) Long-chain carboxychromanols are the major metabolites of tocopherols and tocotrienols in A549 lung epithelial cells but not HepG2 cells. *J Nutr* 135:227-32
- Yu AM, Fukamachi K, Krausz KW, Cheung C, Gonzalez FJ (2005) Potential Role for Human Cytochrome P450 3A4 in Estradiol Homeostasis. *Endocrinology* 146:2911-9
- Yu W, Simmons-Menchaca M, Gapor A, Sanders BG, Kline K (1999) Induction of apoptosis in human breast cancer cells by tocopherols and tocotrienols. *Nutr Cancer* 33:26-32
- Yusuf S, Sleight P, Pogue J, Bosch J, Davies R, Dagenais G (2000) Effects of an angiotensin-converting-enzyme inhibitor, ramipril, on cardiovascular events in high-risk patients. The Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med* 342:145-53

Zhou C, Tabb MM, Sadatrafiei A, Grun F, Blumberg B (2004) Tocotrienols activate the steroid and xenobiotic receptor, SXR, and selectively regulate expression of its target genes. *Drug Metab Dispos* 32:1075-82