

**EINFLUSS KURZKETTIGER FETTSÄUREN UND
SEKUNDÄRER PFLANZENSTOFFE AUF DEN
GLUTATHION S-TRANSFERASEN - STATUS IM KOLON**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von

Dipl. troph. Miriam Ebert
geboren am 14.05.1974 in Leipzig

1. Gutachter: Frau Prof. Dr. Beatrice L. Pool-Zobel
 2. Gutachter: Herr Prof. Dr. Hans Bergmann
 3. Gutachter: Herr Prof. Dr. P. Steinberg, Universität Potsdam
- Tag der öffentlichen Disputation: 24.11.03

INHALTSVERZEICHNIS

<i>Abbildungsverzeichnis</i>	<i>IV</i>
<i>Tabellenverzeichnis</i>	<i>VI</i>
<i>Abkürzungsverzeichnis</i>	<i>VII</i>
1 Einleitung	1
1.1 Ernährung und Krebs	1
1.1.1 Hintergrund	1
1.1.2 Kolonkarzinogenese	2
1.1.2.1 Mechanismen der Entstehung.....	2
1.1.2.2 Risikofaktoren.....	4
1.1.2.3 Protektive Ernährungsfaktoren und Mechanismen antikarzinogener Substanzen	5
1.2 Kurzkettige Fettsäuren (Acetat, Propionat und Butyrat)	9
1.3 Sekundäre Pflanzenstoffe	12
1.3.1 Grüner Tee und Epigallocatechingallat	13
1.3.2 Phenethylisothiocyanat.....	14
1.3.3 β -Carotin	14
1.3.4 Enterodiol.....	15
1.4 Glutathion S-Transferasen	16
1.4.1 Vorkommen, Einteilung und Nomenklatur der Glutathion S-Transferasen	16
1.4.2 Gewebsspezifische Expression der Glutathion S-Transferasen.....	18
1.4.3 Biotransformationsreaktionen durch Glutathion S-Transferasen.....	18
1.4.3.1 Biologische Funktion der GST	18
1.4.3.2 Struktur der GST und enzymatischer Mechanismus der Glutathionkonjugation.....	19
1.4.3.3 Entgiftungsreaktionen der GST	20
1.4.3.4 Giftungsreaktionen der GST	23
1.4.4 Polymorphismen der Glutathion S-Transferasen und ihre Bedeutung	23
1.4.5 Induzierbarkeit der Glutathion S-Transferasen.....	24
1.4.6 Regulation der Glutathion S-Transferasen - Expression.....	26
2 Problemstellung und Ziele der Arbeit	28
3 Material und Methoden	30
3.1 Materialien	30
3.1.1 Humane Kolonzellen.....	30
3.1.1.1 Zelllinien.....	30
3.1.1.2 Kolongewebe	30

3.1.2	Testsubstanzen	31
3.1.3	Sonstiges	31
3.2	Methoden	32
3.2.1	Arbeiten mit Kolontumorzelllinien und humanem Kolongewebe.....	33
3.2.1.1	Kultivierung der Zelllinien	33
3.2.1.2	Aufarbeitung des Kolongewebes	33
3.2.1.3	Inkubation der Zellen und Gewebeproben mit Substanzen zur GST Induktion.....	34
3.2.1.4	Ernte der Zellen	35
3.2.1.4.1	Zelllinien	35
3.2.1.4.2	Gewinnung von Einzelzellen aus Kolongewebe	35
3.2.1.5	Bestimmung der Zellzahl und Vitalität	35
3.2.1.6	Cytosolextraktion.....	36
3.2.2	Biochemische und immunologische Techniken	36
3.2.2.1	Proteinbestimmung nach BRADFORD.....	36
3.2.2.2	GST-Gesamtaktivität nach HABIG	37
3.2.2.3	Enzymimmunoassay der GSTP1	38
3.2.2.4	Western Blot der GST-Isoenzyme	39
3.2.2.4.1	SDS-Page	39
3.2.2.4.2	Membrantransfer (Semi-Dry-Blotting)	41
3.2.2.4.3	Immunodetektion	41
3.2.3	DNA und RNA Standardtechniken	42
3.2.3.1	Genotypisierung zum Nachweis der GSTM1- und GSTT1-Nullpolymorphismen.....	42
3.2.3.1.1	DNA-Isolierung	42
3.2.3.1.2	DNA-Konzentrationsbestimmung.....	43
3.2.3.1.3	Multiplex-PCR für GSTM1, GSTT1 und β -Globin.....	43
3.2.3.1.4	DNA-Agarose-Gelelektrophorese, DNA-Färbung und Auswertung	44
3.2.3.2	Semi-quantitative RT-PCR zur Bestimmung der <i>GSTM2</i> mRNA Expression	45
3.2.3.2.1	RNA-Isolierung.....	45
3.2.3.2.2	RNA-Konzentrationsbestimmung.....	45
3.2.3.2.3	Denaturierende RNA-Agarose-Gelelektrophorese.....	45
3.2.3.2.4	Reverse Transkription (cDNA-Synthese)	46
3.2.3.2.5	RT-PCR für GSTM2 und GAPDH	47
3.2.3.2.6	Gelelektrophorese, Färbung und semi-quantitative Auswertung der RT-PCR	48
3.2.4	Genotoxizitätstest	49
3.2.4.1	Einzelzellmikrogelelektrophorese (Comet-Assay)	49
3.2.5	Statistik.....	50
4	Ergebnisse und Diskussion	51
4.1	Glutathion S-Transferasen Status in Kolontumorzelllinien und humanen Kolonzellen	51
4.1.1	Cytosolischer Proteingehalt.....	51
4.1.2	Gesamtaktivität der Glutathion S-Transferasen.....	52

4.1.3	Proteinexpression der Glutathion <i>S</i> -Transferasen Isoenzyme	52
4.1.3.1	Variabilität der Glutathion <i>S</i> -Transferasen-Expression in primären Kolonzellen.....	55
4.1.3.1.1	GSTM1 und GSTT1 Nullpolymorphismen.....	55
4.1.3.1.2	Interindividuelle Variation der Proteinexpression der GST-Isoenzyme	56
4.1.3.1.3	Korrelationen zwischen GST-Isoenzym-Expression und GST-Aktivität.....	59
4.1.4	Diskussion	62
4.1.4.1	GST-Expression in transformierten und normalen Kolonzellen.....	63
4.1.4.2	Interindividuelle Variabilität der GST-Isoenzyme im normalen Kolongewebe	67
4.2	Induzierbarkeit der Glutathion <i>S</i>-Transferasen	70
4.2.1	Induzierbarkeit der Gesamtaktivität der Glutathion <i>S</i> -Transferasen	70
4.2.1.1	Einfluss kurzkettiger Fettsäuren auf Glutathion <i>S</i> -Transferasen-Gesamtaktivität	70
4.2.1.2	Einfluss sekundärer Pflanzenstoffe und von Oltipraz auf die GST-Aktivität	72
4.2.1.3	Auswirkungen der Testsubstanzen auf den cytosolischen Proteingehalt	74
4.2.2	Induzierbarkeit der Proteinexpression der Glutathion <i>S</i> -Transferasen	75
4.2.2.1	Induktion der GST Isoenzyme in Kolontumorzelllinien.....	75
4.2.2.1.1	Butyrat.....	75
4.2.2.1.2	Acetat und Propionat.....	82
4.2.2.1.3	Grüntee und Epigallocatechingallat	83
4.2.2.2	Untersuchungen an primären Kolonzellen.....	86
4.2.2.3	Untersuchungen an Kolonfibroblastenkulturen	89
4.2.3	Induzierbarkeit der Glutathion <i>S</i> -Transferase GSTM2 auf mRNA-Ebene.....	93
4.2.3.1	Kalibrierung der PCR Zyklusanzahl für semi-quantitative RT-PCR.....	93
4.2.3.2	Einfluss von Butyrat auf die GSTM2 mRNA in HT29 und HT29 Klon 19A.....	94
4.2.4	Diskussion	97
4.2.4.1	Butyrat	97
4.2.4.2	Acetat und Propionat	102
4.2.4.3	Grüner Tee und Epigallocatechingallat.....	103
4.2.4.4	Weitere Testsubstanzen	105
4.3	Einfluss der GST Induktion auf die Genotoxizität.....	107
4.3.1	Auswirkungen auf die Genotoxizität von CDNB.....	107
4.3.2	Auswirkungen auf die Genotoxizität von HNE.....	109
4.3.3	Diskussion	112
5	<i>Schlussfolgerungen und Ausblick.....</i>	119
6	<i>Zusammenfassung.....</i>	121
	<i>Literaturverzeichnis.....</i>	125
	<i>Anhang.....</i>	139
	Anhang I: Material.....	139
	Anhang II: Tabellen und Abbildungen	147

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

<i>Abbildung 1: Sterbefälle als prozentuale Anteile der häufigsten Krebsformen an der Gesamtzahl der Krebserkrankungen von 1998 in Deutschland.....</i>	<i>2</i>
<i>Abbildung 2: Genetisches Modell der Kolonkarzinogenese [FEARON & VOGELSTEIN 1990]</i>	<i>3</i>
<i>Abbildung 3: Effekte kurzkettiger Fettsäuren auf Kolonepithelzellen in den verschiedenen Stadien der Adenom-Karzinom-Sequenz (nach [SCHEPPACH et al. 1995]).....</i>	<i>11</i>
<i>Abbildung 4: Strukturformeln der untersuchten sekundären Pflanzenstoffe</i>	<i>12</i>
<i>Abbildung 5: Strukturformel von reduziertem Glutathion</i>	<i>19</i>
<i>Abbildung 6: Detoxifizierung von Karzinogenen durch die GST katalysiert: (1) Aflatoxin B₁-8,9-Epoxid; (2) Benzo[a]pyren-7,8-diol-9,10-oxid.....</i>	<i>21</i>
<i>Abbildung 7: GST vermittelte Entgiftung von 4-Hydroxy-2-nonenal</i>	<i>21</i>
<i>Abbildung 8: Beteiligung der GST in der Mercaptursäuresynthese</i>	<i>22</i>
<i>Abbildung 9: Zusammenfassende Darstellung der angewendeten Methoden.....</i>	<i>32</i>
<i>Abbildung 10: GST vermittelte Glutathion-Konjugation von 1-Chlor-2,4-dinitrobenzol zu S-2,4-dinitrophenylglutathion.....</i>	<i>37</i>
<i>Abbildung 11: Formel zur Berechnung der Enzymaktivität</i>	<i>38</i>
<i>Abbildung 12: Absolute Konzentration (links) und prozentuale Verteilung (rechts) der quantifizierten GST Isoenzyme in humanen Kolonzellen</i>	<i>54</i>
<i>Abbildung 13: Beispielgel für PCR-Analyse zum Nachweis der Gene GSTM1 und GSTT1.....</i>	<i>55</i>
<i>Abbildung 14: Individuelle Expression der GST-Isoenzyme in primären Kolonzellen.....</i>	<i>56</i>
<i>Abbildung 15: Individuelle Konzentration und Zusammensetzung des detektierten GST-Proteins in primären Kolonzellen</i>	<i>57</i>
<i>Abbildung 16: Spektrum der GST-Isoenzym-Expression in primären Kolonzellen</i>	<i>58</i>
<i>Abbildung 17: Interindividuelle Variation der GST-Isoenzyme in primären Kolonzellen.....</i>	<i>59</i>
<i>Abbildung 18: Korrelationen zwischen der Expression der GST-Proteine und der GST-Aktivität</i>	<i>60</i>
<i>Abbildung 19: Induktion der GST-Aktivität auf der Basis der Zellzahl in HT29 (links) und HT29 Klon 19A (rechts) in Abhängigkeit von der Inkubationszeit mit Butyrat (24-72 h).....</i>	<i>70</i>
<i>Abbildung 20: Induktion der GST-Aktivität auf der Basis des cytosolischen Proteingehalts in HT29 (links) und HT29 Klon 19A (rechts) in Abhängigkeit von der Inkubationszeit mit Butyrat (24-72 h)</i>	<i>71</i>
<i>Abbildung 21: Modulation der GST-Aktivität nach 72 h Inkubation mit Acetat und Propionat in HT29 (links) und HT29 Klon 19A (rechts).....</i>	<i>72</i>
<i>Abbildung 22: GST-Aktivität nach 72 h Behandlung mit Grüntee bzw. EGCG in HT29 (rechts oben) und HT29 Klon 19A (links oben) sowie nach 72 h Inkubation mit PEITC, Enterodiol, β-Carotin und Oltipraz in HT29 (untere Graphik).....</i>	<i>73</i>
<i>Abbildung 23: Induktion des cytosolischen Proteingehalts durch Inkubation mit Butyrat (24-72 h) in HT29 (rechts) bzw. mit Acetat und Propionat (72 h) in HT29 Klon 19A (links).....</i>	<i>74</i>
<i>Abbildung 24: Repräsentative Blots mit je 3 Versuchen für die Expression der GST-Isoenzyme nach 72 h Butyratbehandlung in HT29 und HT29 Klon 19A</i>	<i>76</i>
<i>Abbildung 25: Zeitabhängige Induktion der GST A1/2 und M2 in HT29 nach Butyratbehandlung.....</i>	<i>77</i>
<i>Abbildung 26: Zeitabhängige Induktion der GST P1 und T1 in HT29 nach Butyratbehandlung.....</i>	<i>78</i>

<i>Abbildung 27: Korrelation zwischen GSTP1-Protein und GST-Aktivität in HT29 (links) und HT29 Klon 19A (rechts) nach 48-72 h bzw. 72 h Butyratinkubation.....</i>	<i>81</i>
<i>Abbildung 28: Induktion der GSTA1/2 nach 72 h Behandlung mit Grünteeextrakt (GT) und Epigallocatechingallat (EGCG) in HT29 (links) und HT29 Klon 19A (rechts).....</i>	<i>85</i>
<i>Abbildung 29: Einfluss von 4 mM Butyrat (24 h) auf GST Isoenzyme in Primärzellen.....</i>	<i>86</i>
<i>Abbildung 30: Beispielblots für die Expression der GST-Isoenzyme mit entsprechenden Standardproteinen in primären Kolonzellen nach 24 h Butyratbehandlung.....</i>	<i>87</i>
<i>Abbildung 31: Einfluss von 10 und 20 mM Butyrat (24 h) auf GST Isoenzyme in Primärzellen.....</i>	<i>87</i>
<i>Abbildung 32: GST-Aktivität nach 24 h Butyratbehandlung in primären Kolonzellen.....</i>	<i>88</i>
<i>Abbildung 33: Modulation der Proteinexpression der GST in primären Kolonfibroblastenkulturen auf der Basis des Proteingehalts durch 72 h Inkubation mit 4 mM Butyrat.....</i>	<i>89</i>
<i>Abbildung 34: Beispielblots für die Expression der GST-Isoenzyme mit entsprechenden Standards in primären Kolonfibroblastenkulturen nach 72 h Butyratbehandlung.....</i>	<i>90</i>
<i>Abbildung 35: Induktion des cytosolischen Proteingehalts (links) u. der GST-Aktivität (rechts) in Bezug auf die Zellzahl in Kolonfibroblastenkulturen nach 72 h Butyratbehandlung.....</i>	<i>90</i>
<i>Abbildung 36: Induktion des GSTM1- und GSTM2-Proteins auf der Basis der Zellzahl in Kolonfibroblastenkulturen nach 72 h Butyratbehandlung.....</i>	<i>91</i>
<i>Abbildung 37: Kalibrierung der Anzahl der PCR-Zyklen für GAPDH (repräsentatives Gel).....</i>	<i>93</i>
<i>Abbildung 38: Expression der GSTM2 mRNA in Bezug auf GAPDH mRNA in HT29 und HT29 Klon 19A nach 24 h und 72 h Butyratbehandlung.....</i>	<i>94</i>
<i>Abbildung 39: Repräsentatives PCR-Gel für die mRNA-Expression von GSTM2 und GAPDH nach 24 und 72 h Butyratbehandlung in HT29.....</i>	<i>95</i>
<i>Abbildung 40: Durch 1-Chlor-2,4-dinitrobenzol (CDNB) induzierte DNA-Strangbrüche in HT29 nach 72 h Butyratinkubation im Vergleich zur Kontrolle.....</i>	<i>108</i>
<i>Abbildung 41: Prozentualer Anteil der HT29-Zellen mit durch CDNB geschädigter DNA nach 72 h Butyratinkubation im Vergleich zur Kontrolle.....</i>	<i>109</i>
<i>Abbildung 42: Durch 4-Hydroxy-2-nonenal (HNE) induzierte DNA-Strangbrüche in HT29 (A) und HT29 Klon 19A (B) nach 72 h Butyratinkubation im Vergleich zur Kontrolle.....</i>	<i>111</i>
<i>Abbildung 43: GST-Aktivität auf Basis der ZZ nach 72 h Inkubation mit GT, EGCG, PEITC, Enterodiol, β-Carotin u. Oltipraz in HT29 bzw. HT29 Klon 19A (MW \pm SD, n=3-7).....</i>	<i>148</i>
<i>Abbildung 44: Zeitabhängige GST-Induktion in HT29 Klon 19A nach Butyratbehandlung.....</i>	<i>148</i>

TABELLENVERZEICHNIS

<i>Tabelle 1:</i>	<i>Klassifizierung, Nomenklatur und gewebsspezifische Expression cytosolischer GST im Menschen.....</i>	<i>17</i>
<i>Tabelle 2:</i>	<i>Durch humane Glutathion S-Transferasen metabolisierte Fremdstoffe.....</i>	<i>22</i>
<i>Tabelle 3:</i>	<i>Patientendaten der untersuchten Kolongewebeproben.....</i>	<i>31</i>
<i>Tabelle 4:</i>	<i>Stammlösungen der Testsubstanzen.....</i>	<i>31</i>
<i>Tabelle 5:</i>	<i>Inkubationen zur GST Induktion - Testsubstanzen und Konzentrationen.....</i>	<i>34</i>
<i>Tabelle 6:</i>	<i>Parameter der Cytosolextraktion.....</i>	<i>36</i>
<i>Tabelle 7:</i>	<i>Molekulargewicht der GST-Standards.....</i>	<i>40</i>
<i>Tabelle 8:</i>	<i>Konzentration und Auftragsvolumen der GST-Standardlösungen.....</i>	<i>40</i>
<i>Tabelle 9:</i>	<i>Aufgetragene Proteinmengen zum Nachweis der GST-Isoenzyme.....</i>	<i>40</i>
<i>Tabelle 10:</i>	<i>Spezifität der verwendeten Antikörper gegen humane GST.....</i>	<i>42</i>
<i>Tabelle 11:</i>	<i>Primersequenzen (GSTM1, GSTT1 und β-Globin).....</i>	<i>43</i>
<i>Tabelle 12:</i>	<i>Mastermix und PCR-Bedingungen für Multiplex-PCR.....</i>	<i>44</i>
<i>Tabelle 13:</i>	<i>Primersequenzen für GSTM2 und GAPDH.....</i>	<i>47</i>
<i>Tabelle 14:</i>	<i>Reaktionsansätze der PCR für GSTM2 und GAPDH.....</i>	<i>47</i>
<i>Tabelle 15:</i>	<i>PCR-Bedingungen für GSTM2 und GAPDH.....</i>	<i>48</i>
<i>Tabelle 16:</i>	<i>Inkubationsbedingungen der Testsubstanzen im Comet-Assay.....</i>	<i>49</i>
<i>Tabelle 17:</i>	<i>GST-Aktivität und cytosolischer Proteingehalt in humanen Kolonzellen.....</i>	<i>52</i>
<i>Tabelle 18:</i>	<i>Proteinexpression der GST Isoenzyme in humanen Kolonzellen.....</i>	<i>53</i>
<i>Tabelle 19:</i>	<i>Humanstudien zur GSTM1- bzw. GSTT1-Nulldeletion und Kolonkrebs.....</i>	<i>69</i>
<i>Tabelle 20:</i>	<i>GST-Expression nach 72 h Butyratbehandlung in HT29 und HT29 Klon 19A.....</i>	<i>75</i>
<i>Tabelle 21:</i>	<i>ELISA-Ergebnisse für GSTP1 nach 72 h Butyratinkubation.....</i>	<i>81</i>
<i>Tabelle 22:</i>	<i>Expression der GST-Isoenzyme nach 72 h Inkubation mit Acetat bzw. Propionat in HT29 und HT29 Klon 19A.....</i>	<i>83</i>
<i>Tabelle 23:</i>	<i>Expression der GST-Isoenzyme nach 72 h Inkubation mit Grünteeextrakt bzw. Epigallocatechingallat (EGCG) in HT29 und HT29 Klon 19A.....</i>	<i>84</i>
<i>Tabelle 24:</i>	<i>Induktionsfaktoren der GST in den Kolonzellen nach Behandlung mit den Testsubstanzen auf der Basis der Zellzahl.....</i>	<i>92</i>
<i>Tabelle 25:</i>	<i>Aktivitäten humaner GSTs gegenüber CDNB und HNE.....</i>	<i>114</i>
<i>Tabelle 26:</i>	<i>GST-Expression und GST-Aktivität der Kolongewebeproben - Einzeldaten.....</i>	<i>147</i>
<i>Tabelle 27:</i>	<i>Proteinexpression und Aktivität der GST (auf der Basis der Zellzahl) nach Butyratbehandlung in HT29, HT29 Klon 19A, primären Kolonzellen und Kolonfibroblasten.....</i>	<i>149</i>

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	Ampere	LMA	Low-Melting Agarose
ACF	aberrant crypt foci	M	molar (mol/l)
AK	Antikörper	max.	maximal
AP-1	Aktivator Protein 1	mGST	GST (Maus)
APC	adenomatous polyposis coli	MOPS	4-Morpholinpropansulfonsäure
bidest	zweifach destilliert	MTP	96-well-Mikrotiterplatte
bp	Basenpaar(e)	MW	Mittelwert
BSA	Rinder Serumalbumin	NMA	Normal-Melting Agarose
CDNB	1-Chlor-2,4-dinitrobenzol	OT	Objektträger
CYP	Cytochrom P450	p53	Tumorsuppressorprotein
DAB	Diaminobenzidin	Page	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
DCC	deleted in colon cancer	PBS	Phosphat-gepufferte Saline
DMPC	Dimethylpyrocarbonat	PCR	Polymerase-Kettenreaktion
DMSO	Dimethylsulfoxid	PEITC	Phenethylisothiocyanat
DNA	Desoxyribonukleinsäure	PhIP	2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo-(4,5-b)pyridin
DNAse	Desoxyribonuklease	r	Korrelationskoeffizient (Pearson)
dNTP	Desoxyribonukleotid	rev.	revers
DTT	Dithiothreitol	rGST	GST (Ratte)
EC ₅₀	Halbmaximale Wirkstoffkonzentration (50 % Wachstum)	RNA	Ribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	RNAse	Ribonuklease
EGCG	Epigallocatechingallat	ROS	reaktive Sauerstoffspezies
ELISA	Enzym-gekoppelter Immunoassay	RT	Raumtemperatur
ERK 1/2	Extrazellulär regulierte Proteinkinase 1/2	RT-PCR	Reverse Transkriptions – PCR
forw.	forward	SCFA	Kurzkettige Fettsäuren
g	G-Zahl (Einheit der Relativen Zentrifugationsbeschleunigung)	SD	Standardabweichung
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase	SDS	Natriumdodecylsulfat
GSH	Glutathion	TBS	Tris-gepufferte Saline
GST	Glutathion S-Transferase(n)	TBST	TBS + Tween
GT	Grünteextrakt	TEMED	Tetramethylethylendiamin
HBSS	Hank's Salzlösung	TI	Tail Intensity
hGST	humane GST	Tris	2-Amino-2-hydroxymethylpropan-1,3-diol
HNE	4-Hydroxy-2-nonenal	U	Einheit der Aktivität (Units)
HRP	Meerrettichperoxidase	v/v	Volumen pro Volumen
IB	Immunoblotting	VF	Verdünnungsfaktor
kD	Kilodalton	Vol.	Volumen
		w/v	Gewicht pro Volumen
		ZZ	Zellzahl

1 EINLEITUNG

1.1 Ernährung und Krebs

1.1.1 Hintergrund

In Deutschland sterben jährlich mehr als 210.000 Menschen an den Folgen von malignen Tumoren [STATISTISCHES BUNDESAMT 2001]. Damit ist Krebs, wie in vielen anderen westlichen Ländern, nach den Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems die zweithäufigste Todesursache. Bei den Männern sind Prostatakrebs und Lungenkrebs (19 % bzw. 17 % aller Neuerkrankungen) die am häufigsten auftretenden Krebserkrankungen, während es bei den Frauen Brustkrebs und Darmkrebs (26 % und 17 % aller Neuerkrankungen) sind. Bei beiden Geschlechtern steht jedoch das kolorektale Karzinom, welches in Deutschland eine der höchsten Inzidenzen im europäischen Vergleich aufweist, bei den Krebstodesfällen an zweiter Stelle (Abbildung 1) und zählt weltweit zur vierthäufigsten Krebsart [ARBEITSGEMEINSCHAFT BEVÖLKERUNGSBEZOGENER KREBSREGISTER 2002; WCRF & AICR 1997].

Schätzungen zufolge sollen etwa 5 % aller Krebserkrankungen durch genetische Disposition bedingt sein, während der überwiegende Teil durch exogene Faktoren ausgelöst wird [BECKER & WAHRENDORF 1998]. Im Hinblick auf die - in Abhängigkeit vom Stadium - begrenzte Therapierbarkeit vieler Krebserkrankungen und der damit verbundenen z. T. sehr hohen Mortalität – so liegt die relative 5-Jahres-Überlebensrate für das kolorektale Karzinom bei ca. 50 % [ARBEITSGEMEINSCHAFT BEVÖLKERUNGSBEZOGENER KREBSREGISTER 2002] - gewinnt die frühzeitige Prävention der Karzinogenese zunehmend an Bedeutung. Dabei wird der Ernährung eine zentrale Rolle zugeschrieben.

Die Vermutung ist alt, die Entstehung von Krebs könnte mit der Ernährung und dem Lebensstil zusammenhängen, was bedeuten würde, dass Krebs eine - zumindest teilweise - verhütbare Erkrankung ist. Für den Tabakkonsum ist es zweifelsfrei erwiesen, dass er als bedeutendster Einzelrisikofaktor an der Entstehung vieler Krebsarten, insbesondere dem Lungenkarzinom, beteiligt ist [BOYLE et al. 1995]. Den weitaus komplexeren Zusammenhang zwischen Ernährung und Krebs untersuchten erstmals DOLL UND PETO anhand epidemiologischer Daten und kamen zur Erkenntnis, dass etwa 35 % aller Krebserkrankungen eine auf falsche Ernährung zurückzuführen sind [DOLL & PETO 1981]. Nach heutigem Erkenntnisstand wird angenommen, dass mindestens ein Drittel aller Krebserkrankungen und beim kolorektalen Karzinom sogar 66 - 75 % der Fälle durch gezielte Ernährung vermeidbar wären [WCRF & AICR 1997].

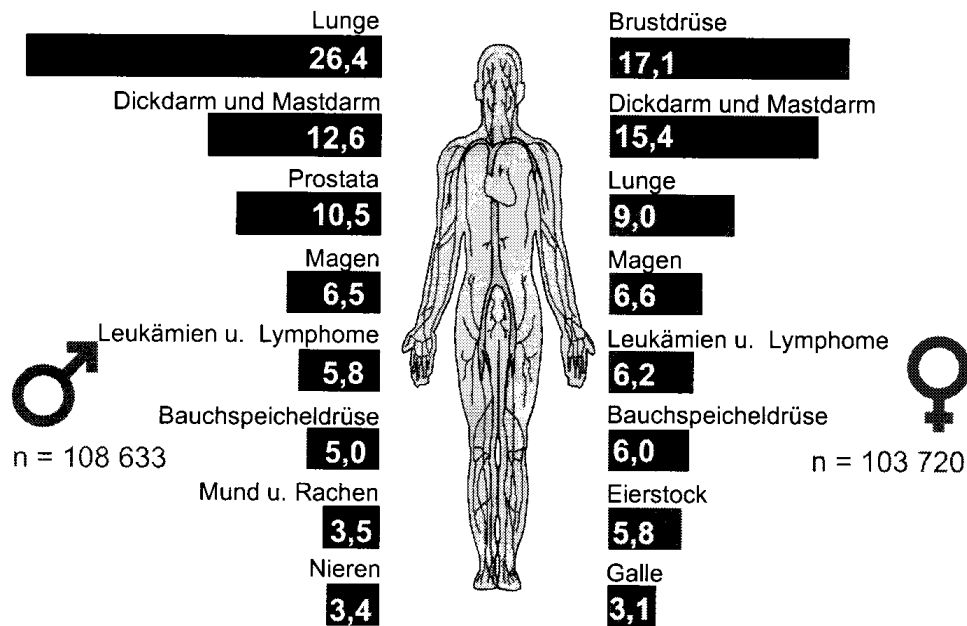


Abbildung 1: Sterbefälle als prozentuale Anteile der häufigsten Krebsformen an der Gesamtzahl der Krebserkrankungen von 1998 in Deutschland

(aus [ARBEITSGEMEINSCHAFT BEVÖLKERUNGSBEZOGENER KREBSREGISTER 2002])

1.1.2 Kolonkarzinogenese

1.1.2.1 Mechanismen der Entstehung

Krebs ist eine mehrstufige, multifaktoriell bedingte Erkrankung, die sich meist über einen Zeitraum von vielen Jahren entwickelt und in deren Verlauf es zur Akkumulation von Mutationen an zellwachstumsregulatorischen Genen kommt. Der Prozess der Karzinogenese wird in die Stadien Initiation, Promotion und Progression unterteilt. Er kann durch exogene Faktoren (z. B. Pro-/Kanzergene, Röntgenstrahlung, onkogene Viren) als auch endogene Faktoren (z. B. reaktive Sauerstoffspezies, Mutationen in der DNA-mismatch-Reparatur) ausgelöst werden.

Die Kolonkarzinogenese verläuft über mehrere histopathologische Stadien ausgehend vom normalen Epithel über hyperproliferierendes Epithel zu einzelnen Kryptenläsionen (aberrant crypt foci), die sich erst zu Adenomen (adenomatöse Polypen) und später zu malignen Tumoren (Karzinom) mit infiltrierendem Wachstum und Metastasierung entwickeln können. Die häufigsten genetischen Veränderungen dieser sogenannten Adenom-Karzinom-Sequenz wurden von FEARON UND VOGELSTEIN in einem Modell der kolorektalen Karzinogenese (Abbildung 2) zusammengefasst [FEARON & VOGELSTEIN 1990]. Während dieses Prozesses kommt es zur Inaktivierung der Tumorsuppressorgene auf den Chromosomen 5q, 17p und 18q sowie zur

Aktivierung der ras-Onkogene (u. a. K-ras). Als frühes Ereignis der kolorektalen Tumorgenese gilt die Mutation im *APC* (adenomatous polyposis coli) Gen, das u. a. Funktionen bei der Zelladhäsion in den Krypten, der Apoptose sowie der Teilung der Chromosomensätze während der Mitose hat [FODDE et al. 2001; KINZLER & VOGELSTEIN 1996]. *APC*-Mutationen werden schon in den „aberrant crypt foci“ (ACF), den allerersten Stadien der Adenom-Karzinom-Sequenz, gefunden. Der Verlust bzw. die somatische Mutation des *APC*-Gens, welcher in den meisten sporadischen kolorektalen Tumoren auftritt, fördert nicht nur die Initiation durch Imbalance zwischen Zellteilung und Zelltod sondern auch die Promotion durch erhöhte Mutationsraten aufgrund chromosomaler Instabilität. Deshalb wird *APC* als das Schlüssel-Gen in der Kolonkarzinogenese bewertet [FODDE et al. 2001].

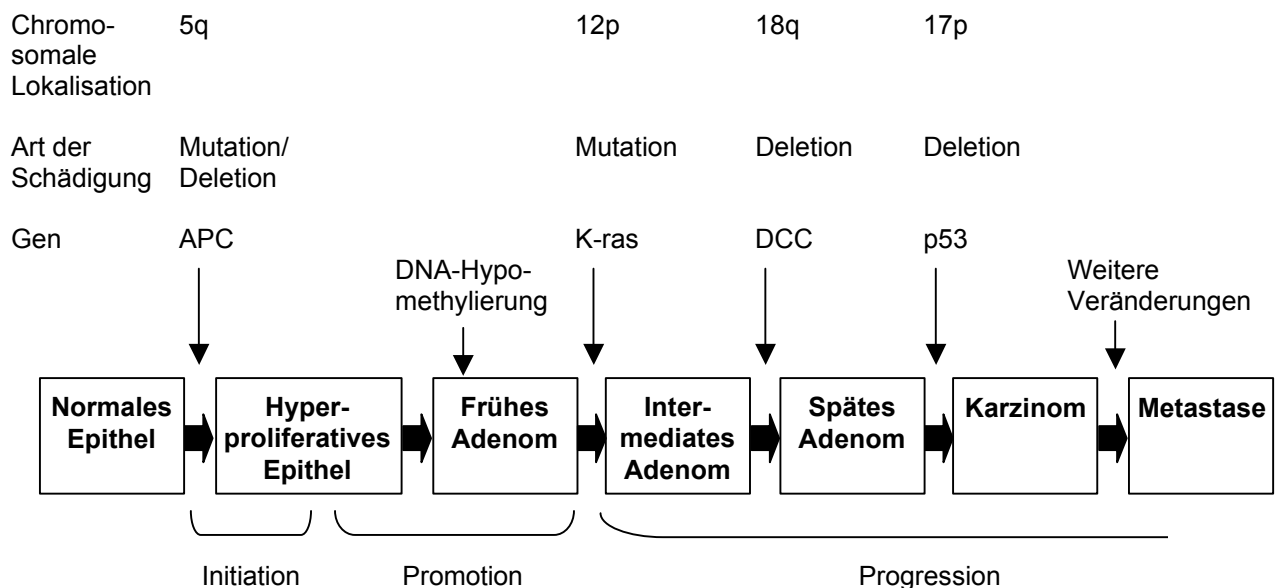


Abbildung 2: Genetisches Modell der Kolonkarzinogenese [FEARON & VOGELSTEIN 1990]

Die Aktivierung der ras-Proteine durch Mutationen, die zur unkontrolliert gesteigerten Zellproliferation führen (Promotion), treten in 50 % aller sporadischen Tumore auf [KINZLER & VOGELSTEIN 1996]. Die Deletion der Tumorsuppressorgene *DCC* (deleted in colon cancer) und *p53* sind vor allem in den späten Stadien der Karzinogenese (Progression) zu finden. In 85 % aller kolorektalen Karzinome fehlt ein funktionsfähiges *p53*-Protein, was aufgrund fehlender DNA-Reparatur bzw. nicht eingeleiteter Apoptose zur Akkumulation von Mutationen in nachfolgenden Zellgenerationen führt [KINZLER & VOGELSTEIN 1998].

Außerdem werden bei ca. 15 % der sporadischen kolorektalen Karzinome Mikrosatelliteninstabilitäten, welche als Folge von Mutationen in DNA-mismatch-Reparaturgenen auftreten können, als initiale Ereignisse diskutiert [FODDE et al. 2001].

1.1.2.2 Risikofaktoren

Nur etwa 1 – 5 % aller kolorektalen Tumore werden Schätzungen aus verschiedenen Ländern zufolge durch hereditäre Formen verursacht, während die Mehrzahl der Tumore, die sogenannte sporadische Form des kolorektalen Karzinoms, unter dem Einfluss exogener Faktoren entsteht [BECKER & WAHRENDORF 1998].

Zu den erblichen Risikofaktoren zählen die sehr seltene familiäre adenomatöse Polyposis (FAP), deren Ursache im Fehlen eines funktionsfähigen APC-Proteins liegt, sowie vererbare nichtpolypöse kolorektale Tumoren („Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer“, HNPCC), die auf Mutationen in verschiedenen DNA-mismatch-Reparaturgenen beruhen [KINZLER & VOGELSTEIN 1996]. Genetische Polymorphismen bestimmter Phase-I- (Cytochrom P450) bzw. Phase-II-Enzyme (Glutathion *S*-Transferasen), welche maßgeblich an der Biotransformation vieler Xenobiotika beteiligt sind, werden ebenfalls im Zusammenhang mit einem erhöhten Krebsrisiko diskutiert (s. Tabelle 19) [COTTON et al. 2000; SACHSE et al. 2002].

Chronisch entzündliche Darmerkrankungen, wie die Colitis ulcerosa, erhöhen ebenfalls das Risiko für kolorektale Karzinome [MELLEMKJAER et al. 1995]. Des Weiteren wurde ein erhöhtes Krebsrisiko für Patienten mit Diabetes mellitus Typ II festgestellt, welches mit der damit assoziierten Insulinresistenz (s. weiter unten) erklärt wird [BRUCE et al. 2000; HU et al. 1999a].

Einen der wichtigsten Risikofaktoren für die Entstehung von Darmkrebs stellt die Ernährung dar, da diese neben systemischen Effekten aufgrund der anatomisch bedingten lokalen Interaktion zwischen Darmepithel und Nahrungsinhaltsstoffen direkten Einfluss auf die Karzinogenese hat. Im Hinblick auf das durchschnittliche Erkrankungsalter, welches beim kolorektalen Karzinom mit 67 Jahren bei den Männern bzw. 72 Jahren bei den Frauen relativ hoch ist, gewinnen Ernährungsfaktoren aufgrund ihrer lebenslangen Einwirkzeit in der Prävention dieser Krebserkrankung zunehmend an Bedeutung [ARBEITSGEMEINSCHAFT BEVÖLKERUNGSBEZOGENER KREBSREGISTER 2002].

Zu den **ernährungsrelevanten Risikofaktoren** zählt die „Western style diet“, welche reich an Fleisch, tierischen Fetten und raffinierten Kohlenhydraten (Zucker und Stärke) und arm an Obst und Gemüse sowie Ballaststoffen ist [SLATTERY 2000]. Speziell der häufige Verzehr von **rotem Fleisch** (Rind, Schwein, Lamm) wird mit einem erhöhten Risiko assoziiert. Als zu Grunde liegender Mechanismus wird der erhöhte Gehalt an Eisen im Fäzes angesehen, welches über die Katalyse von Hydroxylradikalen (Fenton-Reaktion) verstärkt zu oxidativen DNA-Schäden führt [GIOVANNUCCI & WILLET 1994; NELSON 2001]. Des Weiteren enthält

stark gebräuntes bzw. erhitztes Fleisch karzinogene heterozyklische Amine. Im Hinblick auf eine **hohe Gesamtfettaufnahme** und Dickdarmkrebs zeigen epidemiologische Studien teilweise einen positiven Zusammenhang [SLATTERY 2000], wobei vor allem ein hoher Verzehr an tierischen Fetten das Risiko erhöht [WILLETT et al. 1990]. Die Fett-Dickdarmkrebs-Hypothese stützt sich auf die durch Nahrungsfette erhöhte Synthese von Gallensäuren, welche im Darm durch die intestinale Mikroflora in tumorpromovierend wirkende sekundäre Gallensäuren umgesetzt werden [KIM & MASON 1996]. Des Weiteren spielen Lipidperoxidationsprodukte bei der Krebsentstehung eine wichtige Rolle [ESTERBAUER et al. 1990]. Der **zu niedrige Verzehr von Gemüse, Obst und Vollkornprodukten** (s. 1.1.2.3) gilt ebenfalls als krebserisikoe erhöhend, da es dadurch u. a. zur Unterversorgung mit Ballaststoffen und wichtigen antikarzinogenen Mikronährstoffen, wie z. B. Folsäure, kommt. Insbesondere steigt das Risiko in Verbindung mit einer fett- und fleischreichen Ernährung, wie RIEGER ET AL. anhand von Fäzeswasser mit signifikant erhöhtem genotoxischen Potential nach einer solchen Diät nachwies [RIEGER et al. 1999]. Des Weiteren führt **Folsäuremangel** zur abberanten DNA-Methylierung, wodurch es zum Regulationsverlust bei der Expression von Protooncogenen und zur Inaktivierung der Expression von Tumorsuppressorgenen kommen kann [AMES & WAKIMOTO 2002]. **Alkohol** scheint als Folsäureantagonist über ähnliche Mechanismen zu einem erhöhten Krebsrisiko beizutragen [GIOVANNUCCI & WILLETT 1994]. Ergebnisse epidemiologischer Studien zeigen ebenfalls einen Zusammenhang zwischen zu hoher Zufuhr an einfachen Kohlenhydraten, v. a. an **Saccharose**, und erhöhtem Dickdarmkrebsrisiko auf [BOSTICK et al. 1994; SLATTERY et al. 1997a]. Als möglicher Mechanismus und Folge einer saccharosereichen Ernährung werden erhöhte Plasmainsulinspiegel angesehen, welche sich v. a. bei übermäßiger Energiezufuhr zur Insulinresistenz entwickeln und dadurch die Proliferation des Kolonepithels dauerhaft stimulieren können [BRUCE et al. 2000]. Als weiterer wichtiger Risikofaktor wurde anhand epidemiologischer Daten **Übergewicht** in Verbindung mit **physischer Inaktivität** nachgewiesen [GIOVANNUCCI & WILLETT 1994].

1.1.2.3 Protektive Ernährungsfaktoren und Mechanismen antikarzinogener Substanzen

Als Schutzfaktoren werden eine hohe Aufnahme von Gemüse, Obst und Ballaststoffen sowie Kalzium und Vitamin D angesehen [KIM & MASON 1996]. Für **Kalzium** werden als protektive Wirkungsmechanismen die Bindung freier Gallensäuren und Fettsäuren zu unlöslichen Seifen, die Suppression des Wachstums von Kolontumorzellen sowie die Inhibierung der Zellproliferation des Kolonepithels, auf welche **Vitamin D**, als Regulator der Kalziumhomöostase, ebenfalls inhibierenden Einfluss hat, angenommen [KIM & MASON

1996; KRISHNAN et al. 2000]. Die epidemiologischen Daten dazu sind jedoch nicht konklusiv [AMES & WAKIMOTO 2002; SLATTERY 2000]. Des Weiteren werden die im Fischöl vorkommenden *Omega-3-Fettsäuren* und das Spurenelement *Selen* – beide hemmen die Proliferation des Kolonepithels und das Tumorwachstum im Tierversuch – als protektive Faktoren in der kolorektalen Karzinogenese diskutiert [BATRAM & KASPER 1995; KIM & MASON 1996].

Die Rolle von *Ballaststoffen* in der Prävention von kolorektalem Krebs wird in der Fülle der dazu existierenden Literatur kontrovers diskutiert. Die Ergebnisse von Populationsstudien sind im Hinblick auf protektive Effekte nicht konsistent [CASSIDY et al. 1994; FUCHS et al. 1999; GAARD et al. 1996; HOWE et al. 1992; JACOBS et al. 1998]. Zwei kürzlich veröffentlichte groß angelegte Studien unterstützen jedoch die Wirkung der Ballaststoffe in der Prävention der Kolonkarzinogenese. So zeigen sowohl die prospektive Studie von BINGHAM ET AL. mit mehr als 500.000 Probanden als auch die Fall-Kontroll-Studie von PETERS ET AL. (> 40.000 Probanden) eine inverse Beziehung zwischen Ballaststoffaufnahme und dem Risiko für kolorektalen Krebs bzw. Adenome auf, wobei die Individuen der höchsten Quintile bzgl. der Ballaststoffaufnahme im Vergleich zur niedrigsten Quintile eine 25 % bzw. 27 % niedrigere Krebsrisiko hatten [BINGHAM et al. 2003; PETERS et al. 2003]. Aus den Ergebnissen der verschiedenen Studien schlussfolgernd wird angenommen, dass zum einen die hohe Gesamtaufnahme zum anderen die Art der zugeführten Ballaststoffe für die Krebsprävention von Bedeutung zu sein scheint. So unterstützen humane Interventionsstudien und eine Vielzahl experimenteller Daten mit Ratten die Hypothese, dass eine hohe Aufnahme bestimmter Ballaststoffe (z. B. Weizenkleie, Fruktooligosaccharide) und resistenter Stärke im Rahmen einer gesunden Ernährung protektiven Einfluss auf die kolorektale Karzinogenese hat [COMPHER et al. 1999; HYLLA et al. 1998; KRITCHEVSKY 1997; LE LEU et al. 2002; MCINTOSH et al. 2001; PERRIN et al. 2001; POOL-ZOBEL et al. 2002].

Unter dem Begriff „Ballaststoffe“ wird eine große Anzahl strukturell sehr heterogener Kohlenhydrate, zu denen Nicht-Stärke-Polysaccharide, Oligosaccharide und Lignin gehören, zusammengefasst, welche ebenso wie resistente Stärken im Dünndarm nicht enzymatisch abgebaut werden können [JACOBASCH & DONGOWSKI 2000]. Quellen für Ballaststoffe sind vor allem Getreide und Vollkornprodukte, Gemüse und Obst und zunehmend auch Functional Foods. Zu den möglichen protektiv wirksamen Mechanismen von Ballaststoffen zählen die Verdünnung karzinogen wirksamer Substanzen im Fäzes und die Verkürzung der Transitzeit im Kolon durch Zunahme des Stuhlvolumens sowie die Bindung von Gallensäuren und anderen potentiell toxischen Stoffen, wodurch die Exposition der Kolonmukosa mit Kanzerogenen vermindert wird [KIM & MASON 1996]. Sie haben des Weiteren Einfluss auf

die intestinale Bakterienflora im Kolon [POOL-ZOBEL et al. 2002], von welcher sie zu kurzkettigen Fettsäuren (s. 1.2) fermentiert werden und darüber eine Absenkung des pH-Wertes im Kolon bewirken können. Nach aktuellem Stand der Forschung wird der Bildung der kurzkettigen Fettsäure *Butyrat*, für welche verschiedene antikarzinogene Wirkungen nachgewiesen wurden (s. 1.2), die größte Bedeutung in der Prävention von kolorektalem Krebs durch Ballaststoffe beigemessen.

Den wohl wichtigsten und bisher am besten bewiesenen Schutzfaktor stellt ein hoher Verzehr von *Gemüse* dar. So zeigen die Mehrzahl der epidemiologischen Studien eine inverse Beziehung zwischen Gemüseverzehr und kolorektalem Krebs, wobei eine gemüserreiche im Vergleich zu einer gemüsearmen Ernährung das kolorektale Krebsrisiko durchschnittlich um 30 – 40 % senkt [BLOCK et al. 1992; SLATTERY et al. 1997b; SLATTERY 2000; STEINMETZ & POTTER 1991]. Insbesondere Gemüse von Kreuzblütlern und Karotten wirkten protektiv [KIM & MASON 1996; STEINMETZ & POTTER 1991]. Dem hohen Verzehr von *Obst* wird ebenfalls eine krebsprotektive Wirkung zugesprochen. Allerdings sind die epidemiologischen Daten bezüglich kolorektalem Krebs weniger konklusiv [SLATTERY 2000; STEINMETZ & POTTER 1991]. Neben Ballaststoffen und den antioxidativen Vitaminen A, C und E werden vor allem nicht nutritive Inhaltsstoffe, die sogenannten *sekundären Pflanzenstoffe* (z. B. Carotinoide, Isothiocyanate, Polyphenole) (s. 1.3) für die antikarzinogene Wirkung von Gemüse und Obst verantwortlich gemacht. Hinsichtlich der Aufklärung der Wirkmechanismen dieser Vielzahl von unterschiedlichen Substanzen besteht noch ein großer Forschungsbedarf.

In Verbindung zu den Stadien der Karzinogenese wurden die antikarzinogenen Substanzen aus Lebensmitteln durch WATTENBERG nach dem Zeitpunkt, bei welchem sie auf den Prozess der Karzinogenese inhibierend wirken, folgendermaßen klassifiziert [WATTENBERG 1983; WATTENBERG 1992]:

- Substanzen, die die Bildung von Karzinogenen aus inaktiven Prokarzinogenen verhindern (z. B. Carotinoide, Tocopherole, Ascorbinsäure und Polyphenole).
- Substanzen, die karzinogene Verbindungen daran hindern, die Targetzellen /-gewebe zu erreichen und mit ihnen zu reagieren, werden auch als „blocking agents“ bezeichnet (z. B. Butylhydroxyanisol, Benzylisothiocyanat).
- „Suppressing agents“ sind Verbindungen, die erst nach biologisch irreversibler Schädigung der Zellen durch Kanzerogene wirksam werden, indem sie die Expression der Neoplasie und damit das Fortschreiten der Tumorentwicklung effektiv unterdrücken (z. B. Retinoide, Proteaseinhibitoren, Phenethylisothiocyanat).

Die Hemmung der Bildung von Karzinogenen durch Antioxidantien sowie die Aktivität der „blocking agents“ verhindern die Initiation, während die „suppressing agents“ den Prozess der Promotion inhibieren, indem sie die Signaltransduktion beeinflussen und dadurch u. a. Apoptose in präneoplastischen Zellen induzieren. Dabei können einzelne Substanzen auch an mehreren Stellen der Karzinogenese wirksam werden [WATTENBERG 1992].

Die chemopräventiven Strategien der „blocking agents“ beinhalten (1.) Schutz vor oxidativem Stress durch Abfangen reaktiver Sauerstoffspezies und (2.) Schutz vor endogenen Metaboliten bzw. Xenobiotika mit genotoxischem Potential durch Hemmung der karzinogenen Bioaktivierung und Induktion von Detoxifizierungssystemen. Der zuletzt genannte Mechanismus umfasst die enzymatische Biotransformation endogener und exogener Substanzen, welche in zwei Phasen unterteilt wird. In Phase I (Funktionalisierungsreaktion) werden über Oxidation, Reduktion oder Hydrolyse apolare, lipophile Stoffe in polare Stoffe umgewandelt. Diese Metabolite weisen häufig ein karzinogenes Potential auf (Bioaktivierung). Wichtige Phase-I-Enzyme sind das Cytochrom-P450-System (CYP), Dehydrogenasen und Epoxidhydrolasen. In Phase II (Konjugationsreaktion) werden polare Substrate (Fremdstoffe oder Phase-I-Metabolite) mit endogenen Molekülen (Glutathion, Sulfat, Aminosäuren u. a.) konjugiert. Dabei entstehen in der Regel inaktive, hydrophile und damit leichter ausscheidbare Metabolite (Entgiftung). Die Glutathion *S*-Transferasen, Glucuronosyltransferasen und Sulfotransferasen stellen wichtige Phase-II-Enzyme dar [MARQUARDT & SCHÄFER 1997].

„Blocking agents“ führen sowohl zur Inhibierung von Phase-I-Enzymen (z. B. CYP durch Flavonoide) als auch zur Induktion von Phase-II-Enzymen (z. B. Quinonreduktase durch Flavonoide, Glutathion *S*-Transferasen s. 1.4.4), welches beides in einer verminderten Exposition mit Karzinogenen resultiert [HAYES & PULFORD 1995; YANNAI et al. 1998; ZHAI et al. 1998]. Im Hinblick darauf, dass das individuelle Krebsrisiko wesentlich von der Balance zwischen überwiegend giftenden Phase-I-Enzymen und vorwiegend entgiftenden Phase-II-Enzymen beeinflusst wird, stellt die Verbesserung der Entgiftungskapazität der Targetzellen durch die Induktion von Glutathion *S*-Transferasen einen wichtigen Mechanismus in der Krebsprävention dar. Aufgrund der Komplexität unserer Ernährung, welche in der Prävention und nicht in der Therapie von Krebs eine bedeutende Rolle spielt, gibt es noch großen Forschungsbedarf bezüglich des Einflusses von Nahrungsinhaltsstoffen auf den Glutathion *S*-Transferasen – Status, um letztlich gezieltere Ernährungsempfehlungen für eine natürliche Chemoprotektion geben zu können.

1.2 Kurzkettige Fettsäuren (Acetat, Propionat und Butyrat)

Die kurzkettigen Fettsäuren (short chain fatty acids, SCFA), welche sich aus Acetat, Propionat, Butyrat und verzweigten Fettsäuren zusammensetzen, stellen wichtige Fermentationsprodukte der intestinalen Mikroflora dar. Bei einer täglichen Aufnahme von 15 - 60 g nicht verdaulichen Kohlenhydraten werden 150 - 600 mmol SCFA fermentiert. Im Mittel beträgt die durchschnittliche intraluminale SCFA-Konzentration im Zökum ungefähr 120 mM und nimmt zum distalen Kolon hin auf etwa 80 mM ab [SCHEPPACH 1995]. Dabei liegen die molaren Anteile für Acetat : Propionat : Butyrat im Durchschnitt bei 60 : 25 : 10. Dieses Verhältnis ist jedoch stark von der Menge und der Art der verfügbaren Substrate abhängig. Bei ballaststoffarmer Ernährung verschiebt sich der Quotient zugunsten von Acetat, während bei hoher Ballaststoffaufnahme, insbesondere von butyrogenen Substraten, sich der Butyratanteil auf bis zu 20 mM erhöhen kann [SMITH et al. 1998; WÄCHTERSHÄUSER & STEIN 2000]. Vor allem die Fermentation von resistenter Stärke, aber auch von Oligofruktosen, Sojabohnenballaststoffen und Weizenkleie führt zum Anstieg der intraluminalen Konzentration von Butyrat, an dessen Bildung die Phosphotransbutyrylase, Butyratkinase und die CoA-Transferase als Schlüsselenzyme beteiligt sind [JACOBASCH & DONGOWSKI 2000]. Als Butyratbildner der intestinalen Mikroflora wurden u. a. Spezies der Gattungen *Eu-* und *Fusobacterium*, *Chlostridium* und *Butyrivibrio* identifiziert, deren Anzahl in Abhängigkeit von der Substratzufuhr beeinflussbar ist [JACOBASCH & DONGOWSKI 2000].

Ca. 95 % der SCFA werden entweder aktiv über SCFA-Bikarbonat-Anionenaustausch oder passiv über nichtionische SCFA-Diffusion aus dem Darmlumen resorbiert, während nur ein kleiner Teil (5-10 mmol) mit dem Fäzes ausgeschieden wird [SCHEPPACH 1995]. Neben den Wirkungen auf Elektrolyt- und Wasserhaushalt stellen die SCFA die wichtigste Energiequelle des Kolonepithels dar. Bevorzugtes Substrat ist Butyrat, welches bis zu 90 % von den Kolonozyten verstoffwechselt wird, während Propionat nur teilweise und Acetat geringfügig zur Energieversorgung des Kolonepithels in Form von ATP beitragen [WÄCHTERSHÄUSER & STEIN 2000]. Propionat wird überwiegend von Hepatozyten und Acetat in der peripheren Muskulatur verstoffwechselt. Aufgrund der stimulierenden Wirkung der SCFA auf die Proliferation an der Kryptenbasis und der trophischen Effekte von Butyrat und Propionat sind die SCFA für die Aufrechterhaltung der Integrität der Kolonmukosa direkt erforderlich, welche bei Unterversorgung mit diesen, v. a. mit Butyrat, andernfalls atrophiert [JACOBASCH & DONGOWSKI 2000].

Hinsichtlich des Einflusses der SCFA auf die Kolonkarzinogenese kommt der antikarzinogenen **Wirkung von Butyrat** die größte Bedeutung zu. So zeigen eine Reihe experimenteller Studien mit Ratten, dass die Hochregulierung der intraluminalen Butyratkonzentration - infolge einer ballaststoffangereicherten Diät - mit einer signifikant verringerten Inzidenz von azoxymethan-induzierten ACF und Kolontumoren assoziiert ist [COMPHER et al. 1999; FEMIA et al. 2002; MCINTOSH et al. 2001; PERRIN et al. 2001].

Butyrat greift über verschiedene Mechanismen protektiv in die unterschiedlichen Stadien der Adenom-Karzinom-Sequenz ein (s. Abbildung 3). Wie *in vitro*-Daten mit humanen Biopsien und *in vivo*-Daten an Tieren zeigen, stimuliert Butyrat die physiologische Zellproliferation an der Basis der Krypten [LUPTON 1995]. Dagegen wird die Hyperproliferation prämaligener Epithelien gehemmt, indem es die Proliferation in den apikalen Kryptenabschnitten und damit die Ausweitung der Zellteilungszone inhibiert [SCHEPPACH et al. 1995]. Weiterhin führt die Co-Inkubation mit Butyrat zur Unterdrückung der durch Desoxycholsäure - einer co-karzinogenen sekundären Gallensäure - ausgelösten Hyperproliferation [VELAZQUEZ et al. 1996]. Butyrat induziert in Adenom- und Karzinomzelllinien Apoptose, während es normale Epithelzellen humaner Kolonbiopsien (*in vitro*) als „survival factor“ vor Apoptose schützt [HAGUE et al. 1993; HAGUE et al. 1997; HAGUE & PARASKEVA 1995]. Des Weiteren inhibiert Butyrat (1-5 mM) in Kolontumorzelllinien die Proliferation - durch Arrest der Tumorzellen in der G1-Phase des Zellzyklus und Hemmung der DNA-Replikation - und führt zur verstärkten Expression von Differenzierungsmarkern, wie z. B. der alkalischen Phosphatase [BARNARD & WARWICK 1993].

Die paradoxen Effekte von Butyrat auf normale und neoplastische Kolonozyten deuten auf eine spezifische Rolle als „suppressing agent“ in der sekundären Krebsprävention hin, deren spezifische Mechanismen jedoch noch nicht vollständig aufgeklärt sind. Zu den butyratvermittelten Mechanismen gehören u. a. die Hyperacetylierung von Histonen durch Inhibierung der Histon-Deacetylase, welche zu einer erhöhten Transkriptionsaktivität führt, die Beeinflussung des Zellzyklus über die Inhibierung der Genexpression verschiedener Onkogene sowie die Verminderung der Urokinaseaktivität zur Hemmung invasiven Tumorwachstums [RAGIONE et al. 2001; SCHEPPACH et al. 1995; VELAZQUEZ et al. 1996].

Neben den beschriebenen Effekten von Butyrat als „suppressing agent“ sind seine Aktivitäten als „blocking agent“ zur Reduktion genotoxischer Risikofaktoren für die Chemoprotektion des Kolons von gleicher Wichtigkeit. Butyrat schützt *in vitro* vor der genotoxischen Wirkung von Wasserstoffperoxid [POOL-ZOBEL et al. 1996]. Darüber hinaus ist Butyrat in der Lage die

metabolische Balance in Kolonkarzinomzelllinien sowie (nach Applikation von resistenter Stärke) im Rattenkolon über die Induktion von Entgiftungsenzymen, wie der Glutathion *S*-Transferasen, zu verändern [KIRLIN et al. 1999; STEIN et al. 1996; TREPTOW-VAN LISHAUT et al. 1999].

Die protektive **Wirkung von Acetat und Propionat** auf die Kolonkarzinogenese ist im Vergleich zu Butyrat weit weniger ausgeprägt. Propionat (2 - 10 mM) [SCHEPPACH et al. 1995] und in höheren Konzentrationen auch Acetat (25 - 45 mM) [BEYER-SEHLMAYER et al., unveröffentlichte Ergebnisse] hemmen ebenfalls das Wachstum von Tumorzelllinien. Propionat - jedoch nicht Acetat – führt in geringerem Ausmaß als Butyrat in Kolonkarzinomzellen zur Histonhyperacetylierung und Differenzierung sowie zur Induktion von Glutathion *S*-Transferasen und inhibiert, wie auch Acetat, invasives Tumorwachstum [EMENAKER et al. 2001; HINNEBUSCH et al. 2002; STEIN et al. 1996]. Acetat schützt effektiv vor der Genotoxizität von Wasserstoffperoxid, während Propionat keinen protektiven Effekt hat [ABRAHAMSE et al. 1999].

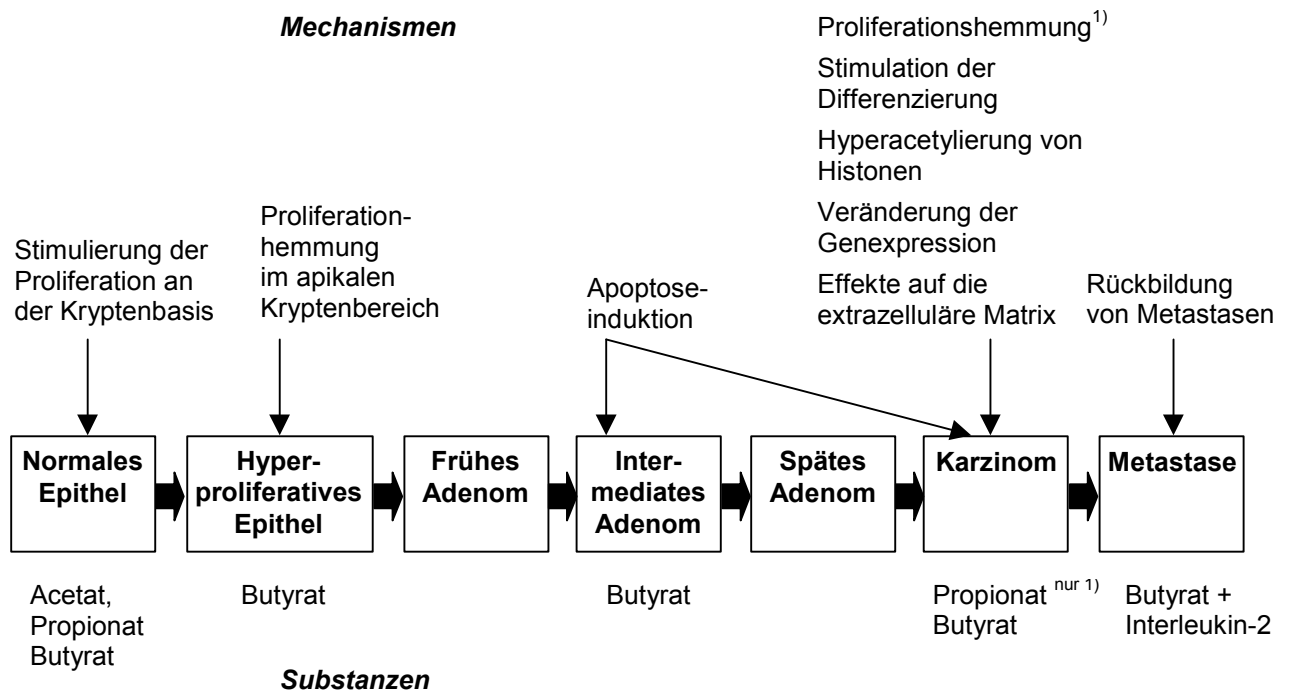


Abbildung 3: Effekte kurzkettiger Fettsäuren auf Kolonepithelzellen in den verschiedenen Stadien der Adenom-Karzinom-Sequenz (nach [SCHEPPACH et al. 1995])

1.3 Sekundäre Pflanzenstoffe

Während die primären Pflanzenstoffe als Nährstoffe vorwiegend am Energiestoffwechsel und am Aufbau der Pflanze beteiligt sind, dienen die im sekundären Stoffwechsel gebildeten Substanzen (sekundäre bzw. nicht nutritive Pflanzenstoffe) der Pflanze u. a. als Abwehrmittel gegen Schädlinge und Krankheiten, als Wachstumsregulatoren und als Farbstoffe. Sekundäre Pflanzenstoffe kommen nur in geringen Mengen vor und üben in der Regel eine pharmakologische Wirkung aus, weshalb sie auch als „Phytochemicals“ bzw. „Phytoprotectants“ bezeichnet werden. Insbesondere wegen ihrer protektiven Effekte auf die Entstehung von Krebs sind diese Substanzen verstärkt ins Interesse der Forschung gerückt. Zu den antikarzinogenen Mechanismen zählen antioxidative und immunstimulierende Wirkungen, Hemmung von Hormonwirkungen, Inhibierung der Aktivierung von Prokarzinogenen (Inhibierung von Phase-I-Enzymen) und Induktion von Phase-II-Entgiftungsenzymen [CRAIG 1999]. Man geht gegenwärtig von einer Anzahl von 60.000 – 100.000 verschiedenen Stoffen aus, wobei die chemisch sehr unterschiedlichen Verbindungen nach ihrer chemischen Struktur und ihren funktionellen Eigenschaften in verschiedene Gruppen (Carotinoide, Saponine, Glucosinolate, Polyphenole, Phytoöstrogene, Proteaseinhibitoren u. a.) unterteilt werden [WATZL & LEITZMANN 1999]. Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Substanzen (s. Abbildung 4) werden im Folgenden hinsichtlich ihres antikanzerogenen Potentials vorgestellt.

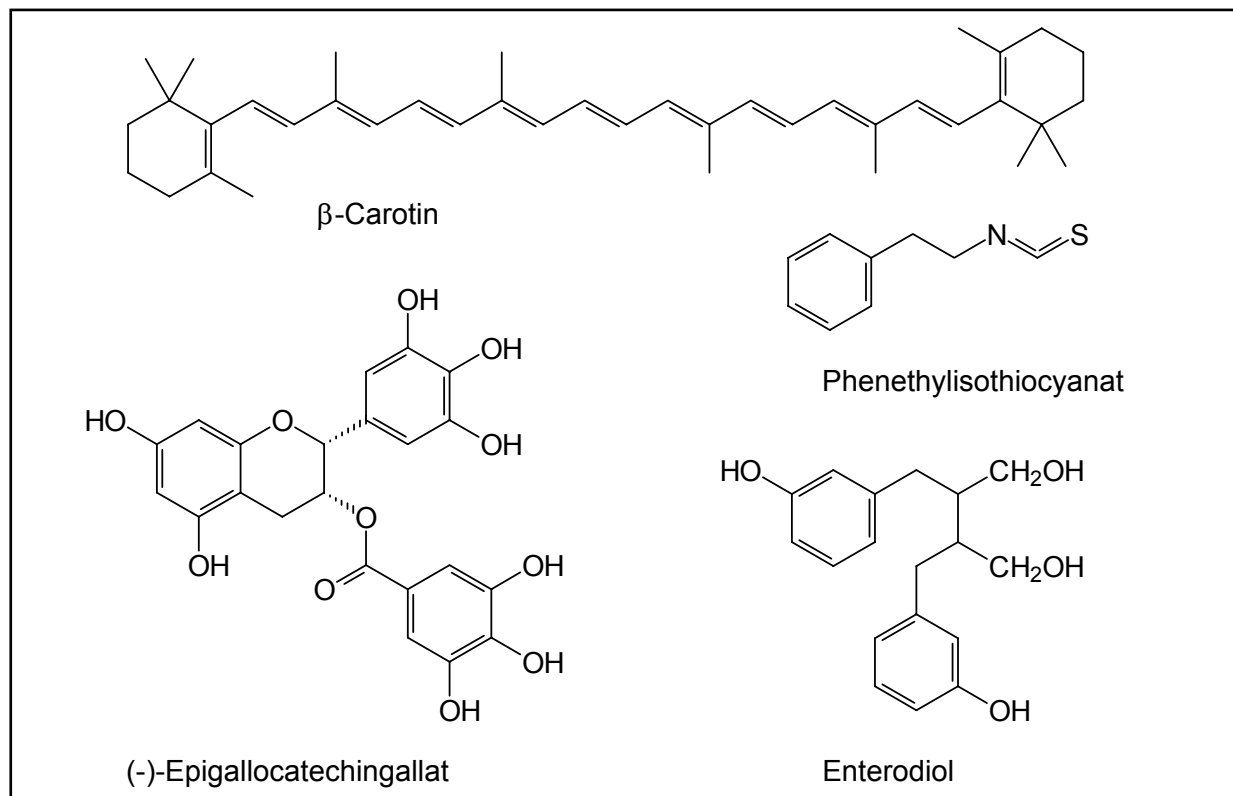


Abbildung 4: Strukturformeln der untersuchten sekundären Pflanzenstoffe

1.3.1 *Grüner Tee und Epigallocatechingallat*

Tee (*Camellia sinensis*) ist das am weitesten verbreitete Getränk auf der Welt. Grüner Tee unterscheidet sich von den beiden anderen hauptsächlich konsumierten Teearten – Schwarztee und Oolongtee – dadurch, dass seine Blätter nicht fermentiert sind. Als Getränk wird er vorwiegend in Asien sowie in Teilen Nordafrikas konsumiert [KATIYAR & MUKHTAR 1997]. Grüner Tee enthält bis zu 30 % Polyphenole, welche Substanzen sind, deren Struktur auf der des Phenols basiert. Dabei stellen die Catechine mit Epigallocatechingallat (Formel s. Abbildung 4) als wichtigstem Vertreter die Hauptfraktion im Grünen Tee dar. Neben Epigallocatechingallat (EGCG) sind weitere wichtige Polyphenole des Grünen Tees Catechin, Epicatechin, Epicatechingallat, Epigallocatechin und Gallussäure, welche in dem in der vorliegenden Arbeit untersuchten Grünteepulver in folgenden Konzentrationen vorhanden waren: 98,1 mg (EGCG); 19 mg; 37 mg; 39,6 mg; 70,2 mg und 9,1 mg je g Grüntee.

Grüner Tee ist sowohl antioxidativ, antiinflammatorisch als auch antimutagen und antikanzerogen wirksam. Verschiedene Untersuchungen an Tiermodellen zeigen, dass die Aufnahme von Grüntee vor karzinogen-induziertem Krebs in verschiedenen Organen, u. a. in Lunge, Leber, Ösophagus, Haut und Darm, schützt [KATIYAR & MUKHTAR 1997; QIN et al. 2000]. In Bezug auf die Kolonkarzinogenese zeigten Versuche mit Ratten, dass durch Fütterung von Grüntee polyphenolen nach Karzinogenbehandlung mit Azoxymethan die Bildung von ACF inhibiert wurde [METZ et al. 2000; YAMANE et al. 1991]. Dagegen führte die Verabreichung von Grüntee in einer Studie von HIROSE ET AL. nach Initiation mit Dimethylhydrazin zwar zur verminderten Adenombildung jedoch gleichzeitig zur erhöhten Karzinomanzahl [HIROSE et al. 2001]. Gegenüber der Vielzahl an Tierexperimenten ist die Anzahl epidemiologischer Daten vergleichsweise gering. Einen protektiven Effekt von Grüntee auf die Entstehung von Speiseröhrenkrebs zeigt eine Fall-Kontroll-Studie in Shanghai, während Magenkrebs in einer in Nordjapan durchgeführten Studie nicht mit Grüntee vorgebeugt werden konnte [FUJIKI et al. 2002; GAO et al. 1994]. Ergebnis einer anderen japanischen Populationsstudie war, dass im Falle einer Krebserkrankung Menschen mit hohem Grüntee Konsum deutlich später erkrankten als solche mit geringem Konsum [FUJIKI et al. 1998].

Grüntee und sein wirksamstes Catechin EGCG können über verschiedene Mechanismen die Karzinogenese in der Initiations- und Promotionsphase hemmen. Eine wichtige Rolle spielt hierbei die Induktion von Phase-II-Enzymen. In verschiedenen Studien *in vivo* (in der Rattenleber) und *in vitro* (in humanen Lungentumorzellen) induzierten Grüntee und EGCG die Aktivität der GST, der Quinonreduktase und der UDP-Glucuronosyltransferase, wobei die Studien hinsichtlich der Induzierbarkeit der Enzyme zu unterschiedlichen Ergebnissen kamen

(s. 4.2.4.3) [CHOU et al. 2000; MALIAKAL et al. 2001; SOHN et al. 1994; STEELE et al. 2000]. Gallussäure schützte im Tierversuch über die Verhinderung der Cytochrom P450-abhängigen Aktivierung von Aflatoxin B1 vor Leberkrebs [WATZL & LEITZMANN 1999]. Des Weiteren hemmte Grüntee *in vitro* die Bildung von Benzo[a]pyren-DNA-Addukten [STEELE et al. 2000]. Im Amestest inhibierte v. a. EGCG aufgrund seines antioxidativen Potentials die Mutagenität von 2-Amino-3-methylimidazo[4,5-*f*]quinolin (IQ) [HERNAEZ et al. 1998]. Weitere bisher untersuchte antikanzerogene Mechanismen der Grüntecatechine sind die Inhibierung der Aktivität der Ornithindecarboxylase [STEELE et al. 2000] [BACHRACH & WANG 2002], die Proliferationshemmung und Apoptoseinduktion in humanen Tumorzelllinien (u. a. HT29) [UESATO et al. 2001; YANG et al. 1998] sowie die Inhibierung der Laminin-anheftung muriner Melanomzellen im Metastasierungsprozess [SUZUKI & ISEMURA 2001].

1.3.2 Phenethylisothiocyanat

Phenethylisothiocyanat (PEITC; Formel s. Abbildung 4) gehört zur Gruppe der Isothiocyanate. Es wird aus dem Glucosinolat Gluconasturtiin, welches in bestimmten Kreuzblütengewächsen (z. B. Rosenkohl, Brunnenkresse, Meerrettich) vorkommt, durch enzymatischen Abbau gebildet. Der Abbau mittels des pflanzeigenen Enzyms Myrosinase wird durch die mechanische Beschädigung des Pflanzengewebes ausgelöst. PEITC, welches als Substrat für Glutathion *S*-Transferasen dient, wird als N-Acetylcysteinikonjugat im Urin ausgeschieden [WATZL & LEITZMANN 1999]. Die Isothiocyanate beeinflussen durch kompetitive Hemmung von Phase-I-Enzymen und Induktion von Phase-II-Enzymen die Krebsentstehung während der Initiationsphase. PEITC führte *in vitro* an *E. coli* und *in vivo* in Experimenten mit Mäusen zur effektiven Reduktion der Genotoxizität von Nitrosaminen, indem es die Cytochrom P450 vermittelte α -Hydroxylierung und damit die metabolische Aktivierung dieser Präkanzerogene hemmte [KNASMÜLLER et al. 1992; KNASMÜLLER et al. 1996]. Weiterhin induzierte es im Rattenkolon die GST-Aktivität sowie das GSTP1-Protein [VAN LIESHOUT et al. 1996]. Bei der Induktion von Phase-II-Enzymen scheint die intrazelluläre Akkumulation der Isothiocyanate eine wichtige Rolle zu spielen [YE & ZHANG 2001].

1.3.3 β -Carotin

β -Carotin (Formel s. Abbildung 4), der bekannteste Vertreter aus der Gruppe der Carotinoide, kommt in gelb-orangefarbenen Gemüse und Obst sowie in grünblättrigem Gemüse vor. Zahlreiche epidemiologische Studien zeigen, dass eine regelmäßige hohe β -Carotin-Zufuhr über Gemüse und Obst mit einem niedrigeren Krebsrisiko verbunden ist [WATZL & LEITZMANN 1999]. In Bezug auf Kolonkrebs zeigten verschiedene Fall-Kontroll-Studien ebenfalls eine

Risikoverminderung, jedoch hatte β -Carotin in einer Studie von SLATTERY ET AL. sowie als Supplement in der Interventionsstudie von GREENBERG ET AL. keinen protektiven Effekt [KRISHNAN et al. 2000; SLATTERY et al. 1997b]. β -Carotin wirkt in erster Linie als effektives Antioxidanz und schützt so die DNA sowie die Zellmembranen vor oxidativen Schäden. Eine Interventionsstudie mit Carotinoiden zeigte, dass der tägliche Konsum von Karottensaft ($\approx 22,3$ mg β -Carotin) zu einer signifikanten Abnahme oxidativer und anderer DNA-Schäden in peripheren Lymphozyten führte [POOL-ZOBEL et al. 1997]. Ähnliche Ergebnisse ergab in einer anderen Studie die kombinierte Supplementierung von β -Carotin, Vitamin C und E [DUTHIE et al. 1996]. Weiterhin zeigte die Karottensaftstudie von POOL-ZOBEL ET AL. bei einem Teil der Probanden eine Induktion der GSTP1 sowie von DNA-Reparatur-Proteinen, welche als weitere mögliche Mechanismen für die reduzierten DNA-Schäden diskutiert werden [POOL-ZOBEL et al. 1998]. Während *in vitro* β -Carotin ebenfalls eine Verminderung bleomycin-induzierter DNA-Schäden in peripheren Lymphozyten bewirkte, konnten die Effekte auf die GST und DNA-Reparatur nicht bestätigt werden [GLEI et al. 2002]. Außerdem stimuliert β -Carotin die Immunantwort, erhöht durch seine Wirkung als Provitamin A die interzelluläre Kommunikation über „gap-junctions“ und schützt somit vor unkontrolliertem Zellwachstum [KRISHNAN et al. 2000; WATZL & LEITZMANN 1999].

1.3.4 Enterodiol

Enterodiol (Formel s. Abbildung 4) gehört zu den Lignanen, welche chemisch betrachtet zu den Polyphenolen zählen. Es entsteht aus dem pflanzlichen Lignan Secoisolariciresinol durch bakterielle Umwandlung im Darm und wird nach seiner Resorption in der Leber mit Glucuronsäure konjugiert [WATZL & LEITZMANN 1999]. Lignane sind im Pflanzenreich weit verbreitet, wobei sie überwiegend in der Aleuronschicht von Getreide lokalisiert sind. Quellen für Secoisolariciresinol sind v. a. Flachssaat, Vollkornprodukte aber auch Gemüse, Obst und Tee [MAZUR et al. 1998; POOL-ZOBEL 1999]. Die Lignane und Isoflavonoide werden auch als Phytoöstrogene bezeichnet, da sie wie die steroidalen Östrogene an deren Rezeptoren binden. In Abhängigkeit von der endogenen Östrogenkonzentration können sie aufgrund ihrer viel schwächeren Östrogenwirkung (etwa 0,1 %) sowohl antiöstrogen als auch östrogen wirken. Epidemiologische Studien weisen insbesondere bei hormonbezogenen Krebsarten wie z. B. Brustkrebs aber auch bei Dickdarmkrebs auf eine protektive Wirkung der Lignane hin [WATZL & LEITZMANN 1999]. *In vitro* hemmt Enterodiol die Proliferation von Kolontumorzellen und schützt vor oxidativen DNA-Schäden [POOL-ZOBEL 1999]. Als weiterer protektiver Mechanismus der Lignane wird die Induktion von Phase-II-Enzymen diskutiert [WATZL & LEITZMANN 1999].

1.4 Glutathion *S*-Transferasen

1.4.1 Vorkommen, Einteilung und Nomenklatur der Glutathion *S*-Transferasen

Die Glutathion *S*-Transferasen (GST; EC 2.5.1.18), welche eine sogenannte Superfamilie von Isoenzymen bilden, sind in der Natur ubiquitär verbreitet. Neben ihrem Vorkommen im Menschen und in Säugetieren wurden sie sowohl in Bakterien, Hefen, Pilzen, Mollusken, Krustaceen u. ä. als auch in Fröschen, Insekten, Pflanzen, Fischen und Vögeln nachgewiesen [HAYES & PULFORD 1995]. Alle eukaryotischen Spezies besitzen verschiedene cytosolische sowie membrangebundene GST-Isoenzyme. Von den bisher untersuchten Organismen sind die Glutathion *S*-Transferasen in der Ratte und im Menschen am intensivsten erforscht worden.

Die Einteilung der Glutathion *S*-Transferasen erfolgt nach ihrer Lokalisation in der Zelle in cytosolische GSTs – auch als lösliche GSTs bezeichnet - und in zwei mikrosomale GSTs, welche membrangebunden vorliegen. Auf der Basis ihrer Primärstruktur sowie biochemischen Parametern wie dem isoelektrischen Punkt werden die cytosolischen Glutathion *S*-Transferasen speziesunabhängig in verschiedene Klassen unterteilt. Bisher wurden 8 cytosolische GST-Klassen (Alpha, Mü, Pi, Theta, Kappa, Omega, Sigma und Zeta), s. Tabelle 1, identifiziert [STRANGE et al. 2001]. Isoenzyme einer Klasse haben zu mindestens 40 % übereinstimmende Aminosäuresequenzen, während zwischen Isoenzymen unterschiedlicher GST-Klassen weniger als 30 % Sequenzhomologität besteht [WHALEN & BOYER 1998]. Die GST-Klassen unterscheiden sich weiterhin in der Struktur ihrer Gene und deren Lokalisation auf den Chromosomen (Tabelle 1) [HAYES & PULFORD 1995]. Für die Klassen α und μ wurden bisher 4 bzw. 5 verschiedene Gene identifiziert, während GST π durch ein einzelnes Gen kodiert wird [WHALEN & BOYER 1998].

In der vorliegenden Arbeit wurde für die Bezeichnung der GST-Isoenzyme die Nomenklatur nach MANNERVIK ET AL. verwendet [MANNERVIK et al. 1992]. Die Zugehörigkeit zu einer GST-Klasse wird durch Großbuchstaben gekennzeichnet. Die einzelnen GST-Untereinheiten werden in der Reihenfolge ihrer Entdeckung mit arabischen Ziffern benannt, wobei - aufgrund der dimeren Struktur der cytosolischen GST - der Enzymname jeweils die Zusammensetzung der beiden Untereinheiten als Homo- bzw. Heterodimer wiedergibt. Liegt das codierende Gen – mit kursivem Enzymnamen bezeichnet – auf verschiedenen Allelen vor, werden diese durch Kleinbuchstaben (a und b) voneinander unterschieden.

In den folgenden Punkten wird sich – wenn nicht anders bezeichnet – auf die cytosolischen Glutathion *S*-Transferasen des Menschen bezogen.

Tabelle 1: Klassifizierung, Nomenklatur und gewebsspezifische Expression cytosolischer GST im Menschen

<i>Klasse</i>		<i>Enzym</i>	<i>Gen</i>	<i>Chromosom</i>	<i>Vorrangige Expression im Gewebe³⁾</i>
Alpha	α	GSTA1-1	<i>GSTA1</i>	6p12	<i>A1</i> : Leber, Hoden >>> Niere, Nebenniere > Pankreas >> Lunge, Gehirn > Herz
		GSTA1-2 ²⁾			
		GSTA2-2	<i>GSTA2</i>	6p12	<i>A2</i> : Leber, Pankreas, Hoden > Niere > Nebenniere > Gehirn, Lunge, Herz
		GSTA3-3	<i>GSTA3</i>		<i>A3</i> : Plazenta
		GSTA4-4	<i>GSTA4</i>		<i>A4</i> : Dünndarm > Milz 4) Leber, Lunge, Gehirn, Muskel, Hoden, Pankreas, Blase
Mü	μ	GSTM1a-1a	<i>GSTM1</i>	1p13	<i>M1(+)</i> : Leber >> Hoden > Gehirn, Nebenniere, Niere, Pankreas > Lunge, Herz
		GSTM1a-1b ²⁾			
		GSTM1b-1b	<i>GSTM1</i>	1p13	
		GSTM1a-2 ²⁾			4) Lymphozyten, Muskel
		GSTM1b-2 ²⁾			
		GSTM2-2	<i>GSTM2</i>	1p13	<i>M2</i> : Gehirn > Hoden > Herz > Pankreas, Niere > Nebenniere > Lunge, Leber; 4) Muskel
		GSTM2-3 ²⁾			
		GSTM3-3	<i>GSTM3</i>	1p13	<i>M3</i> : Hoden >>>Gehirn, Milz >>andere 4) Haut, Lunge; 5) Niere, Leber
		GSTM4-4	<i>GSTM4</i>	1p13	<i>M4</i> : Leber, Muskel > Herz, Gehirn >> Pankreas >> Lunge, Niere, Plazenta
		GSTM5-5	<i>GSTM5</i>	1p13	<i>M5</i> : Gehirn, Hoden, Lunge
Pi	π	GSTP1-1 (3 Allelvarianten)	<i>GSTP1</i>	11q13	<i>P1</i> : Gehirn > Lunge, Herz, Hoden > Nebenniere, Niere, Pankreas > Leber 4) Kolon, Prostata, Haut, Milz, Muskel, Erythrozyten, Lymphozyten
Theta	θ	GSTT1-1	<i>GSTT1</i>	22q ¹⁾	<i>T1(+)</i> : Niere, Leber > Dünndarm > Gehirn, Milz, Prostata, Pankreas, Hoden > Herz, Lunge 4) Kolon, Muskel, Erythrozyten
		GSTT2-2	<i>GSTT2</i>	22q11.2	<i>T2</i> : Leber; 4) Lunge
Kappa	κ	GSTK1-1	<i>GSTK1</i>		<i>K1</i> : 4) Leber
Omega¹⁾	ω		<i>GSTO1¹⁾</i>	10q ¹⁾	
Sigma¹⁾	σ		<i>GSTSI¹⁾</i>	4q ¹⁾	
Zeta	ζ	GSTZ1-1	<i>GSTZ1</i>	14q24.3	<i>Z1</i> : 4) Gehirn, Leber, Muskel

modifiziert nach [WHALEN & BOYER 1998], ergänzt mit Angaben von 1) [STRANGE et al. 2001], 2) [BECKETT & HAYES 1993] 3) [EATON & BAMMLER 1999], 4) [KETTERER 1998], 5) [ROWE et al. 1997].

1.4.2 Gewebsspezifische Expression der Glutathion S-Transferasen

GST-Aktivität ist in allen Geweben des menschlichen Körpers vorhanden. Die Expression der GST-Isoenzyme ist jedoch organspezifisch, wobei verschiedene Zelltypen innerhalb eines Gewebes ebenfalls unterschiedliche GST-Expressionsmuster aufweisen können [WHALEN & BOYER 1998]. Besonders GST-reiche Organe sind die Leber und die Hoden [ROWE et al. 1997]. In Tabelle 1 (s. 1.4.1) ist die Expression der Isoenzyme im Gewebe – beginnend mit den jeweils höchsten Konzentrationen - mit aufgeführt. Im Kolon wurden die GST π , als die stärkste exprimierte GST, sowie Isoenzyme der GST-Klassen α , μ und θ nachgewiesen (s. auch Tabelle 18) [DE BRUIN et al. 1999; PETERS et al. 1992]. Hinsichtlich der GST-Expression existieren beim Menschen große interindividuelle Unterschiede, insbesondere für die GST α , μ und θ [HAYES & PULFORD 1995]. Während für die Variation der μ und θ vorwiegend Deletionspolymorphismen (s. 1.4.4) verantwortlich gemacht werden, stehen für die hohe Variabilität der GST α verschiedene Ursachen, u. a. Polymorphismen im GSTA1-Promotor [COLES et al. 2001b], zur Diskussion. Neben geschlechtsspezifischen Unterschieden ist der GST-Status auch vom Alter abhängig [SINGHAL et al. 1992]. So wird die GSTP1 in embryonalen Hepatozyten stark exprimiert in adulten Hepatozyten jedoch fast nicht mehr [WHALEN & BOYER 1998].

1.4.3 Biotransformationsreaktionen durch Glutathion S-Transferasen

1.4.3.1 Biologische Funktion der GST

Die bekannteste biologische Funktion der Glutathion S-Transferasen ist die Entgiftung von Xenobiotika, indem sie die **Konjugation** des Tripeptids γ -Glutamyl-Cysteinyl-Glycin (Glutathion, GSH) mit Elektrophilen katalysieren (s. 1.4.3.2). Bei diesen Konjugationsreaktionen, mit der allgemeinen Gleichung $\text{GSH} + \text{R-X} \rightarrow \text{GS-R} + \text{HX}$, liefert Glutathion die nukleophile Komponente (freie SH-Gruppe des Cysteinylrests), welche mit elektrophilen Kohlenstoff-, Stickstoff- oder Schwefel-Atomen in Xenobiotika Thioetherbindungen ausbildet (s. 1.4.3.3) [BECKETT & HAYES 1993]. Neben der Katalyse der Thioetherbildung weisen viele GSTs eine Glutathion-**Peroxidaseaktivität** auf, welche die **Reduktion** von organischen Hydroperoxiden (aus Fettsäuren, Phospholipiden u. DNA) zu ihren entsprechenden Alkoholen katalysiert. Hierbei reagiert Glutathion mit elektrophilem Sauerstoff [HAYES & PULFORD 1995]. Da diese Substrate infolge von Lipidperoxidation und oxidativer DNA-Schädigung entstehen, kommt der GST bei der Bekämpfung von oxidativem Stress eine wichtige Rolle zu. Einige GSTs besitzen außerdem eine **Isomeraseaktivität**, indem sie die Umwandlung von Maleylaceton zu Fumarylaceton sowie von Δ^5 -3-Ketosteroiden zu Δ^4 -3-Ketosteroiden

katalysieren, wobei die physiologische Bedeutung dieser Reaktionen unklar ist [HAYES & PULFORD 1995]. Weiterhin wirken die GSTs als **intrazelluläre Transportproteine** (Ligandin) von wasserunlöslichen Proteinen. So binden die GSTs nicht kovalent eine Reihe von lipophilen – nicht als Substrat dienenden - Substanzen (z. B. Häm, Bilirubin, Gallensäuren, Steroide), deren Bindung jedoch zur Hemmung der enzymatischen Aktivität führt [WHALEN & BOYER 1998]. Über diesen Mechanismus sind die GSTs auch in der Lage, reaktive Metabolite von Karzinogenen (z. B. *N,N*-Dimethyl-4-aminoazobenzen) kovalent zu binden und unschädlich zu machen (**nichtkatalytische Inaktivierung**) [HAYES & PULFORD 1995].

1.4.3.2 Struktur der GST und enzymatischer Mechanismus der Glutathionkonjugation

Die Glutathion *S*-Transferasen sind dimere Proteine mit einem katalytischen Zentrum in jeder Untereinheit. Die einzelnen Untereinheiten besitzen ein Molekulargewicht zwischen 23 - 29 kD und sind aus etwa 200 - 240 Aminosäuren aufgebaut [WHALEN & BOYER 1998]. Die GSTs sind typischerweise Homodimere. Zwischen nahverwandten Mitgliedern einer Klasse können auch Heterodimere gebildet werden, wie sie für die Klassen α und μ bekannt sind. Die Polypeptidkette jeder Untereinheit bildet zwei strukturell unterschiedliche Domänen, den N-Terminus (ca.80 Aminosäuren) bestehend aus einem β -Faltblatt und 3 α -Helices und den C-Terminus (übrige Aminosäuren) mit 5 oder 6 α -Helices. Im katalytischen Zentrum der Untereinheiten befindet sich jeweils eine hochspezifische Bindungsstelle für Glutathion (Formel s. Abbildung 5) und eine wenig spezifische hydrophobe Bindungsstelle für elektrophile Substrate, welche auch als G-Seite (überwiegend N-terminale Domäne) und H-Seite (C-terminale Domäne) bezeichnet werden [WHALEN & BOYER 1998]. Die fundamentale Basis der katalytischen Aktivität der GST ist das Vermögen, den pK_a -Wert der Thiol-Gruppe (SH) des reduzierten Glutathions von 9 auf etwa 6,5 bei dessen Bindung im katalytischen Zentrum abzusenken, so dass dieses als Thiolat-Anion (GS^-) vorliegt. Das im aktiven Zentrum gebundene Thiolat-Anion (G-Seite), welches im Vergleich zum neutralen Thiol über eine wesentlich größere nukleophile Potenz verfügt, reagiert spontan mit den in der Nähe gebundenen elektrophilen Xenobiotika (H-Seite) [HAYES & PULFORD 1995].

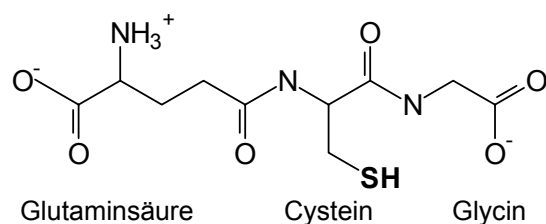


Abbildung 5: Strukturformel von reduziertem Glutathion

Die einzelnen GST-Isoenzyme besitzen überlappende Substratspezifitäten, welche durch eine relativ kleine Anzahl an Resten in der H-Seite bestimmt werden [HAYES & PULFORD 1995]. Das bedeutet, dass jedes Isoenzym bevorzugte Substrate hat, jedoch wegen der überlappenden Spezifitäten die meisten Substrate von mehr als einem Isoenzym umgesetzt werden können. Aufgrund von Unterschieden in der Affinität und damit in der Effizienz der katalytischen Umsetzung sind einzelne Isoenzyme allerdings nur bedingt ersetzbar. So wird das Lipidperoxidationsprodukt 4-Hydroxy-2-nonenal bevorzugt von der GSTA4-4 umgesetzt, deren spezifische Aktivität im Vergleich zu den anderen cytosolischen Isoformen durchschnittlich um den Faktor 50 - 100 höher ist (s. 1.4.3.3 und 4.3.3 Tabelle 25) [KETTERER 1998]. Deshalb können die Expressionslevel spezifischer GST-Isoformen für die Sensitivität der Zielzellen bzw. -organe gegenüber bestimmten toxischen Substanzen von entscheidender Bedeutung sein [EATON & BAMMLER 1999]. Die Reaktion von 1-Chlor-2,4-dinitrobenzol (CDNB) zu *S*-2,4-Dinitrophenylglutathion wird von fast allen GSTs – mit Ausnahme der GST θ – katalysiert (s. 4.3.3 Tabelle 25), weshalb CDNB als Modellsubstrat zur Bestimmung der gesamten katalytischen GST-Aktivität dient [HAYES & PULFORD 1995].

1.4.3.3 Entgiftungsreaktionen der GST

Bei den Konjugationsreaktionen resultiert aus der Bildung einer Thioetherbindung zwischen dem Cysteinrest des Glutathions und der elektrophilen funktionellen Gruppe des Substrats ein in der Regel weniger reaktives und hydrophileres Produkt, weshalb die GST-vermittelten Reaktionen im allgemeinen zur Entgiftung führen. Elektrophile funktionelle Gruppen, in Form von elektrophilen Kohlenstoff, Stickstoff oder Schwefel, welche Voraussetzung für die Konjugation sind, befinden sich in sehr vielen Xenobiotika bzw. deren Phase-I-Metaboliten (z. B. Arenoxide, aliphatische und aromatische Halide, α,β -ungesättigte Carbonylverbindungen, organische Nitratester und organische Thiocyanate) sowie in endogen gebildeten Produkten des oxidativen Stresses, so dass die GST-Reaktionen ein sehr weites Substratspektrum umfassen [HAYES & PULFORD 1995].

Zu den exogenen Risikofaktoren, die durch die GST entgiftet werden, zählen insbesondere polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe, wie das Benzo[a]pyren, heterozyklische Amine, z. B. 2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridin (PhIP), und das hepatokarzinogene Mykotoxin Aflatoxin B₁, welche als toxische Lebensmittelkontaminanten vom Organismus aufgenommen werden und deren Phase-I-Metabolite hochgradig kanzerogen wirken [HAYES & PULFORD 1995]. Abbildung 6 zeigt die GST-katalysierte Glutathionkonjugation der Epoxidgruppe der Cytochrom P450-aktivierten Metabolite von Aflatoxin B₁ und

Benzo[a]pyren. Neben Karzinogenen detoxifiziert die GST ein weites Spektrum anderer Xenobiotika, zu welchen u. a. Herbizide, Pestizide, Medikamente und Chemotherapeutika zählen.

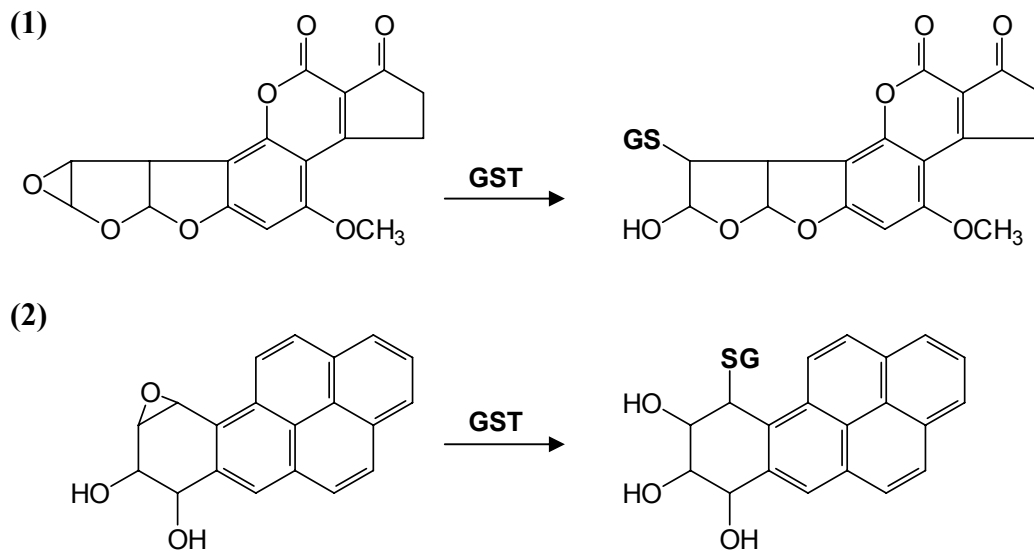


Abbildung 6: Detoxifizierung von Karzinogenen durch die GST katalysiert:

(1) Aflatoxin B₁-8,9-Epoxid; (2) Benzo[a]pyren-7,8-diol-9,10-oxid

aus [HAYES & PULFORD 1995]

Die GSTs schützen ebenfalls vor Lipid- und DNA-Peroxidationsprodukten, die durch Angriff freier Sauerstoffradikale während des oxidativen Stresses entstehen und endogene Risikofaktoren darstellen. Zu den Substraten gehören u. a. Aldehyde, Malondialdehyd, 2-Alkenale und 4-Hydroxyalkenale als Oxidationsprodukte der Membranlipide sowie Basenpropenale und 5-Hydroperoxymethyluracil als Produkte oxidierter DNA [BECKETT & HAYES 1993; KETTERER 1998]. Bekanntes Beispiel für die effiziente Entgiftung durch die GST ist das Lipidperoxidationsprodukt 4-Hydroxynonenal (Abbildung 7), welches aufgrund seines genotoxischen Potentials für die Karzinogenese von Relevanz ist [ESTERBAUER et al. 1990]. Weitere durch die GST entgiftete Substanzen sind in Tabelle 2 aufgeführt.

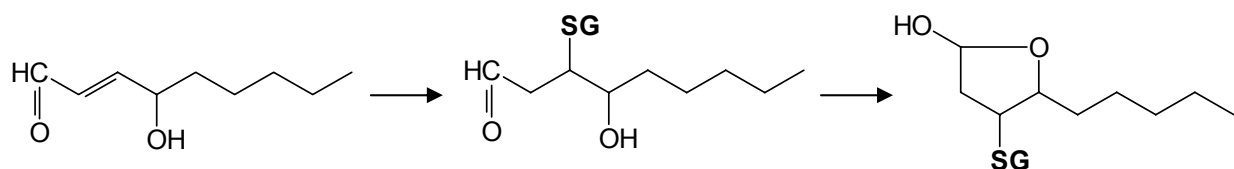


Abbildung 7: GST vermittelte Entgiftung von 4-Hydroxy-2-nonenal

aus [HAYES & PULFORD 1995]

Die Glutathionkonjugation der häufig erst durch Cytochrom P450 zu elektrophilen, genotoxischen Verbindungen aktivierten Substrate stellt den ersten Schritt in der Mercaptursäuresynthese dar [HABIG et al. 1974]. Nachdem die Konjugate über ATP-abhängige Glutathion-

konjugat-Exportpumpen aus der Zelle eliminiert wurden, werden sie in der Leber bzw. Niere über mehrere Zwischenstufen zu gut wasserlöslichen und damit über den Urin leicht ausscheidbaren *N*-Acetylcystein-Thioethern abgebaut (Abbildung 8) [BECKETT & HAYES 1993; KETTERER 1998]. Damit übernimmt die GST eine wichtige Aufgabe bei der Eliminierung von Kanzerogenen und Toxinen.

Tabelle 2: Durch humane Glutathion S-Transferasen metabolisierte Fremdstoffe

<i>Substanzen</i>	<i>GST</i>	<i>Substanzen</i>	<i>GST</i>
Karzinogene / Mutagene ¹⁾		Chemotherapeutika ¹⁾	
<i>N</i> -Acetoxy-PhIP	A1, T2	Chlorambucil	A1, A2
Aflatoxin B ₁ -8,9-Endoepoxid	M1	Cyclophosphamid	A1
Benzo[<i>a</i>]pyren-4,5-oxid	M1, P1	Ethacrynsäure	P1
Benzo[<i>a</i>]pyren-7,8-diol-9,10-oxid	M1, P1	1,3-Bis(2-chlorethyl)-1-nitrosoharnstoff	M3
4-Nitroquinolin 1-oxid	P1	Thiotepa	A1, M1
Toxische Chemikalien		Produkte des oxidativen Stresses ¹⁾	
Ethylenoxid	T1	Acrolein	P1
Methylbromid	T1	Adenin-, Cytosin-, Thymin- und Uracilpropenal	P1
Methylchlorid	T1	4-Hydroxynonenal	A4
Styrenoxid	M1	Linolsäurehydroperoxid	A4
<i>trans</i> -Stilbenoxid	M1		

1) werden entgiftet; aus [HAYES & PULFORD 1995]

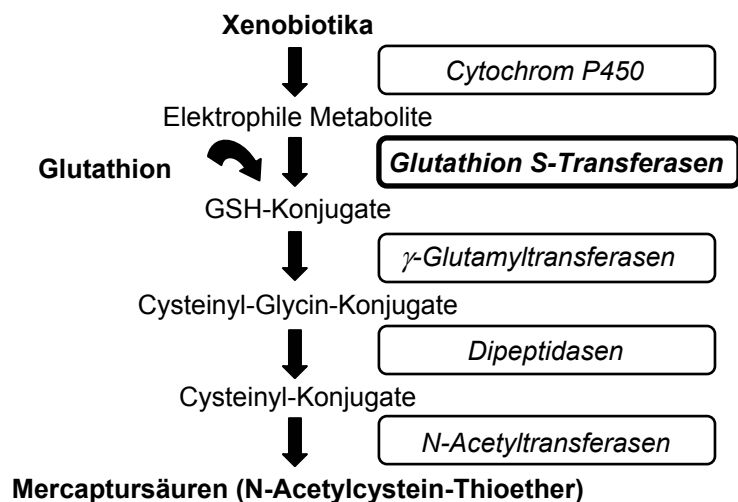


Abbildung 8: Beteiligung der GST in der Mercaptursäuresynthese

1.4.3.4 Giftungsreaktionen der GST

Eine kleine Anzahl von GST-Substraten wird durch die Glutathion-Konjugation nicht detoxifiziert bzw. sogar toxifiziert. So werden dihalogenierte Alkane (Dibromethan, Dichlormethan) durch die GST zu *S*-(2-Haloalkan)-Glutathionen direkt giftig. Diese Konjugate besitzen über die Bildung eines elektrophilen Episulfoniumions eine hohe Reaktivität und können über die Alkylierung der DNA Mutationen auslösen. Für die Konjugate von Dibrom- und Dichlorethan und die der Dihalomethane wurde im *Salmonella typhimurium*-Test Mutagenität nachgewiesen [HAYES & PULFORD 1995; THIER et al. 1993], wobei die Katalyse dieser Reaktionen bisher nur für die GSTT1-1 festgestellt wurde [SHERRATT et al. 1998]. Die GSTs bilden zum Teil auch Vorstufen toxischer Substanzen, wie die Konjugate verschiedener halogener Alkene und Alkine (z. B. Tetrachlorethen und Hexachlorbutadien), welche für ihre nephrotoxische und mutagene Wirkung erst der weiteren Metabolisierung durch die γ -Glutamyltranspeptidase und die Cystein-Konjugat- β -Lyase bedürfen [BECKETT & HAYES 1993]. Weiterhin ist die Konjugation bestimmter cytotoxischer Isothiocyanate durch die GST reversibel, d.h. die Konjugate sind nicht stabil und dienen eher dem Transport und der temporären Speicherung der Substanzen als deren Entgiftung [HAYES & PULFORD 1995].

1.4.4 Polymorphismen der Glutathion *S*-Transferasen und ihre Bedeutung

Die Gene der GSTM1, GSTM3, GSTT1 und GSTP1 treten in der Bevölkerung polymorph auf [EATON & BAMMLER 1999]. Dabei werden als Polymorphismen weniger häufig vorkommende Genotypen bezeichnet, welche jedoch bei mindestens einem Prozent der Bevölkerung vorhanden sind und die durch Mutationen im Gen verursacht werden.

Für **GSTM1** und **GSTT1** sind Deletionspolymorphismen bekannt, die eine fehlende Proteinexpression dieser Isoenzyme zur Folge haben. Die Häufigkeit des Nullgenotyps in Europa variiert für **GSTM1** zwischen 39 % - 62 % und für **GSTT1** zwischen 10 % - 21 % [COTTON et al. 2000]. Während die Deletion von GSTM1 mit einem erhöhten Risiko für Lungen- und Blasenkrebs assoziiert wird, scheint der GSTT1*0-Genotyp das Risiko für Hirntumore zu erhöhen [EATON & BAMMLER 1999]. Beide Deletionen werden ebenfalls im Zusammenhang mit dem kolorektalen Karzinom diskutiert (s. auch 4.1.4.2). Außer dem Null-Allel existieren für **GSTM1** noch die beiden aktiven Allelvarianten **GSTM1*A** und **GSTM1*B**, die sich nur in einer Base im Exon 7 unterscheiden, ohne Effekte auf die Aktivität des Enzymphänotyps zu haben [KETTERER 1998]. Für **GSTM3** wurde bei 16 % der Kaukasier ein Polymorphismus beschrieben, welcher auf einer 3-Basenpaar-Deletion im Intron 6 beruht. Er wird mit einem erhöhten Risiko für Basalzellkarzinome und Kehlkopfkrebs assoziiert [EATON

& BAMMLER 1999]. Für **GSTP1** wurden 4 verschiedene Allelvarianten (*GSTP1*A* – die häufigste Form, *GSTP1*B*, *GSTP1*C* und *GSTP1*D*) identifiziert. *GSTP1*B* resultiert aus einer Transitionsmutation im Codon 104, welche zum Einbau von Valin statt Isoleucin führt. *GSTP1*C* hat zusätzlich zu dieser Transitionsmutation eine weitere im Codon 113, die Alanin in Valin umwandelt. Letztere Mutation im Codon 113 kommt im *GSTP1*D* isoliert vor. Die Sequenzpolymorphismen scheinen funktionell zu sein. So ist die katalytische Effizienz (K_{cat}/K_m) der Enzymvarianten des B- und C-Allels gegenüber CDNB um das 3-4fache niedriger im Vergleich zum Wildtyp-Enzym (A-Allel). Dagegen zeigen beide Varianten gegenüber Benzo[*a*]pyren-7,8-diol-9,10-epoxid eine höhere Aktivität als der Wildtyp. Zusammenhänge zwischen den Allelvarianten und dem Risiko für Hoden-, Rachen- und Blasenkrebs wurden in verschiedenen epidemiologischen Studien berichtet [EATON & BAMMLER 1999].

Im Hinblick auf die Entgiftungsfunktion der GST können Polymorphismen über Deletionen sowie veränderte katalytische Aktivitäten einzelner Isoenzyme entscheidenden Einfluss auf die Chemosensitivität der Zellen gegenüber Karzinogenen haben [HAYES & PULFORD 1995].

1.4.5 Induzierbarkeit der Glutathion S-Transferasen

Bisherige Untersuchungen zur GST-Induktion, welche überwiegend an Ratten und Mäusen durchgeführt wurden, zeigen dass die GST durch eine Vielzahl verschiedener Substanzen – mindestens 100 verschiedene Chemikalien - induzierbar sind. Dabei umfassen die induzierenden Xenobiotika u. a. Lebensmittelkontaminanten wie Benzo[*a*]pyren, Zusatzstoffe von Lebensmitteln (z. B. Butylhydroxyanisol und Butylhydroxytoluol) sowie Pflanzenschutzmittel (z. B. Dichlordiphenyltrichlorethan und Diethyldithiocarbamat) [HAYES & PULFORD 1995].

Einige Medikamente haben ebenfalls stimulierenden Einfluss auf die GST-Expression, wie Experimente mit nicht-steroidalen Entzündungshemmern zeigen. So wirkt z. B. Acetylsalicylsäure sowohl im Gastrointestinaltrakt von Ratten als auch in der humanen Kolontumorzelllinie HT29 induzierend auf die GST [PATTEN & DELONG 1999; VAN LIESHOUT et al. 1997].

Ein weiterer GST-Induktor ist Oltipraz [5-(2-Pyrazinyl)-4-methyl-1,2-dithiol-3-thion], ein ursprünglich als Medikament gegen den Parasiten *Schistosoma mansoni* entwickeltes, substituiertes 1,2-Dithiol-3-thion. Oltipraz erwies sich in Versuchen mit Ratten als potenter GST-Induktor und effektiver Inhibitor von Aflatoxin B₁-induziertem Leberkrebs [BENSON 1993; PRIMIANO et al. 1995]. Aufgrund dieser Wirkung wurde es in einer Interventionsstudie in China als Chemopräventivum eingesetzt, in welcher Oltipraz über die Induktion der GST die Entgiftung des Aflatoxin B₁-8,9-Epoxid verbesserte (s. Abbildung 6) [WANG et al. 1999].

Neben den synthetischen GST-Induktoren gibt es eine Vielzahl natürlicher Substanzen, die ebenfalls eine induzierende Wirkung auf die GST ausüben. Nahrungsinhaltstoffe – insbesondere nicht nutritive Pflanzenstoffe – sowie Abbauprodukte von Nahrungsbestandteilen haben induzierende Wirkung auf die GST in Ratten. Die stärksten natürlich vorkommenden Induktoren sind α -Angelicalacton, Allylisothiocyanat, Allylmethylsulfid, Benzylisothiocyanat, *n*-Butylphthalid, Cafestol, β -Caryophyllen, Cumarin, Flavon, Indol-3-acetonitril, Kahweol, D-Limonen, Nomilin, Sedanolid und Valencen, wobei die Mehrheit dieser Substanzen die GST-Aktivität vor allem im Darm erhöht [HAYES & PULFORD 1995].

Vor allem Gemüse von Kreuzblütlern (z. B. Broccoli, Rosenkohl, Kresse) sind eine reiche Quelle an GST-Induktoren. ZHANG ET AL. zeigte das GST-induzierende Potential von Sulforaphan als wichtigstem Phase-II-Induktor in Broccoli in verschiedenen Mausegeweben [ZHANG et al. 1992]. Weitere Studien mit Ratten wiesen den induzierenden Einfluss von Quercetin [NIJHOFF et al. 1993], welches u. a. in Broccoli und Grünkohl enthalten ist, sowie von Phenethylisothiocyanat [NIJHOFF et al. 1993; VAN LIESHOUT et al. 1996], einem Abbauprodukt von Glucosinolaten des Rosenkohls u. a. Kruciferen, auf die GST-Aktivität im Kolon nach.

Im Vergleich zu der großen Anzahl an Untersuchungen mit Tiermodellen gibt es bisher nur wenige humane Interventionsstudien, die die Induzierbarkeit der GST im Menschen demonstrieren. Häufig ist die statistische Auswertbarkeit dieser Studien durch die geringe Probandenanzahl eingeschränkt, da die großen interindividuellen Unterschiede in der GST-Expression nicht berücksichtigt werden können. Das Gemüse von Kreuzblütlern wurde in verschiedenen Humanstudien in Bezug auf die GST-Induktion untersucht. In einer Studie von LAMPE ET AL. führte der hohe Verzehr an Brassicaceen-Gemüse (täglich ca. 450 g Gemüse bestehend aus Broccoli, Blumenkohl, frischen Radieschen und frischem Kohl) in Probanden mit GSTM1-Nullpolymorphismus nach 6 Tagen zum leichten Anstieg der GST α (26 %) im Serum [LAMPE et al. 2000]. NIJHOFF ET AL. zeigte, dass der tägliche Verzehr von 300 g gekochtem Rosenkohl über eine Woche zur Induktion der Proteinexpression der GST α und π im Rectum führte [NIJHOFF et al. 1995]. SREERAMA ET AL. fand erhöhte GST-Level im Speichel nach täglichem Verzehr großer Mengen Broccoli [SREERAMA et al. 1995]. Die induzierende Wirkung von Rosenkohl wurde in Studien von STEINKELLNER ET AL. bestätigt, welcher auch für Rotkohl jedoch nicht für Broccoli und Weißkohl eine induzierende Wirkung auf die GST im Blutserum feststellte [STEINKELLNER et al. 2001]. Eine 14tägige Supplementierung mit Broccoli-Tabletten (entsprechend 30 g frischem Broccoli täglich) hatte

in einer weiteren Studie mit Probanden mit erhöhtem kolorektalem Krebsrisiko ebenfalls keinen Effekt auf die GST-Aktivität im Kolon bzw. Blutserum [CLAPPER et al. 1997].

Die Induzierbarkeit der GST ist abhängig von der Spezies, wobei jede Art ihr eigenes GST-Expressionsmuster aufweist. Aufgrund der unterschiedlichen Induktionsantwort auf die gleiche Substanz in verschiedenen Tiermodellen und z. T. selbst Versuchstierlinien sind die Ergebnisse untereinander schwer vergleichbar [HAYES & PULFORD 1995]. Ergebnisse aus Tierversuchen sind deshalb nicht automatisch auf den Menschen übertragbar. Es hat sich weiterhin gezeigt, dass auch das Geschlecht – so ist die GST-Expression beim Menschen und bei Mäusen geschlechtsspezifisch unterschiedlich – und das Alter Einfluss auf die Induzierbarkeit haben [HAYES & PULFORD 1995; SINGHAL et al. 1992]. Ebenso scheint die genetische Disposition wie z. B. das Auftreten von Enzym polymorphismen mit für die großen interindividuellen Unterschiede bei der GST-Induktion verantwortlich zu sein [LAMPE et al. 2000; POOL-ZOBEL et al. 1998; SLATTERY et al. 2000]. Die Dosis, Art und Frequenz der Substanzverabreichung sind weitere wichtige Einflussfaktoren [HAYES & PULFORD 1995].

1.4.6 Regulation der Glutathion S-Transferasen - Expression

Die Regulation der GST-Expression ist komplex. Sie unterliegt entwicklungs-, geschlechts- und gewebsspezifischen Faktoren, ist durch eine große Anzahl von Xenobiotika, wie polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe, phenolische Antioxidantien, ROS, synthetische Glucocorticoide u. a., induzierbar und reagiert auf physiologischen Stress [HAYES & PULFORD 1995]. Die Regulationsmechanismen sind für die einzelnen GST-Gene verschieden, wobei es ebenfalls Unterschiede in der Regulation humaner GST im Vergleich zur GST der Ratten gibt.

Die regulatorischen Kontrollregionen wurden bei den humanen GST-Genen bisher für verschiedene Gene der α -Klasse und für *GSTP1* untersucht, während über die Regulation der μ - und θ -Klasse wenig bekannt ist. Für die Induktion der Transkription der *rGSTA2* durch Xenobiotika wurden in Ratten ein Glucocorticoid Response Element (GRE), ein Xenobiotika Response Element (XRE) und ein Antioxidatives Response Element (ARE) identifiziert [EATON & BAMMLER 1999]. Der Promotor der humanen *GSTA1* und *GSTA2* enthält dagegen in den ersten 1,3 kb der 5'-regulatorischen Region kein ARE und XRE, was auf eine andere Art der Regulation dieser Gene schließen lässt [WHALEN & BOYER 1998]. In der Promotorregion der *hGSTA1* wurden Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren AP-1, AP-2, GRE und den „hepatic nuclear factor-1“ (HNF-1) identifiziert [WHALEN & BOYER 1998]. Vor kurzem veröffentlichte Untersuchungen zur Regulation der *GSTA2*-Expression von KANG ET AL. zeigen anhand einer Rattenhepatozytenzelllinie, dass die Induktion der *GSTA2*

durch Oltipraz von der Phosphatidylinositol-3-kinase vermittelten Kerntranslokation und Bindung der β -Form des „CCAAT/enhancer binding protein“s (C/EBP β) an das C/EBP Response Element im GSTA2-Promotor abhängig ist [KANG et al. 2003]. Die Promotorsequenz der humanen *GSTA2* ist zwar sehr verschieden von der *rGSTA2* [WHALEN & BOYER 1998], jedoch wurde über Genbankrecherchen das C/EBP Response Element ebenfalls in der regulatorischen Region der GST α gefunden [KANG et al. 2003]. Für die Regulation der GSTP1, welche in vielen humanen Tumoren sowie in gegenüber Chemotherapeutika resistenten humanen Zelllinien überexprimiert ist, wurden in der 5'- regulatorischen Region des Gens funktionelle AP-1 und SP-1 Response Elemente identifiziert [MOFFAT et al. 1994; MOFFAT et al. 1996]. Weiterhin wurde die Induktion der GSTP1 durch oxidativen Stress über ein NF-*kappa* B Response Element vermittelt. Neben post-transkriptionalen Mechanismen wie der mRNA-Stabilität beeinflusst der Methylierungsstatus der CpG-Insel im Promotor von *GSTP1* ebenfalls dessen Proteinexpression [EATON & BAMMLER 1999].

2 PROBLEMSTELLUNG UND ZIELE DER ARBEIT

Der Zusammenhang zwischen den Ernährungsgewohnheiten und der hohen Inzidenz des kolorektalen Karzinoms in Westeuropa wird seit längerem diskutiert, wobei epidemiologische, klinische und zellbiologische Studien darauf hinweisen, dass eine Ernährung mit hohem Anteil an pflanzlichen Produkten eine protektive Wirkung auf die Kolonkarzinogenese haben kann. Ein möglicher Mechanismus in der Krebsprävention durch Ernährungsfaktoren ist die Expressionshöhe und Induzierbarkeit körpereigener Schutzsysteme, zu denen die Glutathion *S*-Transferasen (GST) als wichtige Phase-II-Enzyme gehören, wie bisherige Untersuchungen gezeigt haben. Für Rückschlüsse auf die Modulierbarkeit der humanen GST sind Versuche an Ratten jedoch nur bedingt geeignet, da die rGST aufgrund anderer Promotorsequenzen im Vergleich zum Menschen unterschiedlich exprimiert und induziert werden.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es:

1. die Basalexpression und die Variabilität der cytosolischen GST in humanen Kolonzellen zu erfassen,
 2. die Wirkung von kurzkettigen Fettsäuren und sekundären Pflanzenstoffen auf die Induzierbarkeit der GST in humanen Kolonzellen hin zu untersuchen und
 3. die Konsequenzen einer erhöhten GST-Expression auf die Chemosensitivität der Kolonzellen gegenüber relevanten genotoxischen Verbindungen unter Verwendung des effektivsten GST-Induktors zu eruieren.
1. Im ersten Teil der Arbeit wurde der GST-Status in humanen Kolonozyten und der als Zellmodelle verwendeten Kolontumorzelllinien und Kolonfibroblastenkulturen erfasst und miteinander verglichen, da aus Mangel an Primärkulturen differenzierter Kolonozyten die Untersuchungen an Zellkulturmodellen durchgeführt werden sollten.
- Als Parameter für den GST-Status sollten die GST-Aktivität gegenüber CDNB und die Proteinexpression der cytosolischen GST-Isoenzyme (GST A1/2, M1, M2, P1 und T1) bestimmt werden. Bei fehlender Proteinexpression für GSTM1 bzw. GSTT1 sollte die Nulldeletion durch Genotypisierung der DNA überprüft werden.
 - Für die Ermittlung des GST-Status in humanen Kolonozyten sollte eine repräsentative Anzahl von Kolongewebeproben verschiedener Patienten untersucht werden.
 - Als Zellmodelle sollten die humane Kolontumorzelllinie HT29 und zum Vergleich der Substanzwirkung in weniger transformierten Zellen sein differenzierter Klon

HT29 Klon 19A sowie zwei aus Kolongewebebeurproben isolierte Fibroblastenkulturen verwendet werden.

2. Im zweiten Teil der Arbeit sollte die Modulierbarkeit der GST durch kurzkettige Fettsäuren (Butyrat, Acetat, Propionat) und sekundäre Pflanzenstoffe (Polyphenole des Grünen Tees, EGCG, β -Carotin, Enterodiol, Phenethylisothiocyanat) auf Aktivitäts-, Protein- und mRNA-Ebene im Kolon charakterisiert werden. Dabei sollten GST-Protein und GST-Aktivität neben dem cytosolischen Proteingehalt auch auf die Zellzahl bezogen werden, um den Einfluss der Substanzen auf den Proteingehalt einbeziehen zu können.
 - Untersuchung des Einflusses der Testsubstanzen auf die GST-Aktivität der Zelllinien.
 - Untersuchung der Induktoren der GST-Aktivität hinsichtlich einer erhöhten Proteinexpression der Isoenzyme GST A1/2, M1, M2, P1 und T1 in den Zelllinien.
 - Überprüfung der Wirkung des effektivsten Induktors der GST-Aktivität und GST-Proteinexpression an nicht transformierten Kolonzellen (isolierte Kolonozyten aus Gewebebeurproben, Kolonfibroblastenkulturen).
 - Bestimmung der mRNA-Expression stark induzierter Isoenzyme, um festzustellen, ob die Induktion des Enzymproteins auf dem Anstieg des Transkripts basiert.
3. Im dritten und abschließenden Teil der Arbeit sollte der Einfluss eines erhöhten GST-Status auf die Chemosensitivität der Zellen gegenüber Karzinogenen untersucht werden, um die GST-Induktion hinsichtlich protektiver Wirkungen beurteilen zu können.
 - Induktion der GST unter Verwendung des stärksten Induktors in beiden Zelllinien mit anschließender Behandlung der Zellen mit genotoxischen Substanzen
 - Verwendung der genotoxischen Substanzen CDNB (Substrat für die Aktivitätsbestimmung) und HNE (relevantes Kolonkarzinogen), die Substrate für die GST darstellen.
 - Vergleich der DNA-Schäden (Anzahl der Strangbrüche) von Zellen mit induzierter GST mit Zellen ohne vorherige GST-Induktion.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Materialien

3.1.1 Humane Kolonzellen

3.1.1.1 Zelllinien

Für die Experimente wurden die humanen Kolontumorzelllinien HT29 [FOGH & TREMPE 1975] und sein differenzierter Klon 19A [AUGERON & LABOISSE 1984] sowie zwei Fibroblastenkulturen verwendet. Letztere wurden aus Kolongewebebeobungen von zwei verschiedenen Patienten isoliert (s. 3.1.1.2).

3.1.1.2 Kolongewebe

Die untersuchten Kolongewebebeobungen stammten von Patienten, die vorwiegend aufgrund von kolorektalen Tumoren in der chirurgischen Abteilung der Friedrich-Schiller-Universität Jena operiert wurden und nach entsprechender Information über die Studie ihr Einverständnis für die weitere Untersuchung der Gewebebeobungen gegeben hatten. Die Ethikkommission der Friedrich-Schiller-Universität genehmigte die Studie. Die Gewebebeobungen wurden freundlicherweise von Herrn Dr. W. Sendt und Herrn Dr. J. Scheele aus der chirurgischen Abteilung der Universitätsklinik Jena, zur Verfügung gestellt.

In der vorliegenden Arbeit wurden Gewebebeobungen von 15 Patienten sowie zwei Fibroblastenkulturen, welche aus Gewebebeobungen von 2 weiteren Patienten stammten, untersucht. Die Patientendaten sind in Tabelle 3 aufgelistet. Die Kolongewebebeobungen stammten von 5 Frauen und 10 Männern. Für 2 Patienten fehlte die Angabe des Geschlechts. Die Patienten waren zwischen 30 und 81 Jahren alt (durchschnittliches Alter 60 Jahre) und ca. 60 % der Patienten waren übergewichtig (Body Mass Index über 25). Die Untersuchungen wurden an makroskopisch gesundem Gewebe durchgeführt, welches bei den Dickdarmresektionen zur Risikominderung von Rezidiven im Umkreis des erkrankten Gewebes mit entnommen wurde. Für die Bestimmung der Basallevel der GST-Isoenzyme sowie der GST-Gesamtaktivität von primären Kolonzellen wurden die Gewebebeobungen der Patienten 1-15 verwendet, wobei 6 dieser Proben für die Untersuchungen zur GST-Induktion zusätzlich mit Butyrat inkubiert wurden. Die Fibroblasten wurden aus den Gewebebeobungen der Patienten 16 und 17, in der vorliegenden Arbeit als Fibroblastenkultur 1 und 2 bezeichnet, isoliert.

Tabelle 3: Patientendaten der untersuchten Kolongewebeproben

<i>Patient</i>	<i>Geschlecht</i>	<i>Body Mass Index</i>	<i>Alter</i>
1	w	29,3	60
2	m	23,1	30
3	w	37,6	43
4	m	22,9	59
5	m	24,7	68
6	keine Angabe	24,5	60
7	m	26,2	59
8	m	22,8	64
9	m	23,8	75
10	m	28,1	35
11	m	25,7	67
12	m	26,6	57
13	keine Angabe	28,7	62
14	m	28,4	66
15	w	32,2	74
16	w	26,9	61
17	w	24,2	81

m = männlich, w = weiblich

3.1.2 Testsubstanzen

Tabelle 4: Stammlösungen der Testsubstanzen

<i>Substanz</i> (Lagerung außer RT)	<i>Stammlösung</i>	
	<i>Konzentration</i>	<i>Herstellung</i>
Na-Butyrat	400 mM	44 mg + 975 µl Zellkulturmedium, frisch hergestellt
Na-Propionat	1 M	96 mg + 950 µl Zellkulturmedium, frisch hergestellt
Na-Acetat	1 M	82 mg + 960 µl Zellkulturmedium, frisch hergestellt
Grünteepulver ¹⁾ (-20°C)	21,4 mM (EGCG- Äquivalente)	0,2 g + 2 ml Zellkulturmedium, 4 min im Ultraschallbad lösen, Überstand 2 x 10 min bei RT mit 4000 g und 16000 g abzentrifugieren, steril filtrieren, frisch hergestellt
EGCG (4°C)	10,4 mM	5 mg + 1000 µl H ₂ O bidest steril, Lagerung: 4 °C (ca.7 d)
β-Carotin (4°C)	200 µM	43 µl + 8 ml Zellkulturmedium, frisch hergestellt
PEITC	400 mM	6 µl + 94 µl DMSO, frisch hergestellt
Enterodiol (4°C)	100 mM	5 mg + 165,3 µl DMSO, Lagerung: 4 °C
Oltipraz (4°C)	50 mM	11,3 mg + 1000 µl DMSO, Lagerung: -20 °C

1) Das Grünteepulver wurde freundlicherweise von der Firma VK-Mühlen zur Verfügung gestellt.

3.1.3 Sonstiges

Die verwendeten Geräte, Arbeitsmittel, Chemikalien und Reagenzien (einschließlich Proteinstandards und Antikörper) sowie die Rezepturen der verwendeten Lösungen und Puffer und die Mess- und Auswertungssoftware sind im Anhang aufgeführt.

3.2 Methoden

Einen Überblick über die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Ebenen in Bezug auf die Modulation der GST und die dabei angewendeten molekularbiologischen und biochemischen Methoden gibt Abbildung 9. Die Tumorzelllinien wurden mit den Testsubstanzen inkubiert, Zellzahl und Vitalität bestimmt und anschließend das Cytosol für die Bestimmung der GST-Isoenzyme, der GST-Aktivität gegenüber CDNB und des Gesamtproteins extrahiert sowie RNA für die Bestimmung der *GSTM2*mRNA-Expression isoliert. Des Weiteren wurde der Einfluss der GST-Induktion auf die Genotoxizität von CDNB und HNE im Comet-Assay getestet. Die Untersuchungen der Kolongewebeproben und Fibroblastenkulturen (gestrichelte Richtungspfeile) umfassten zusätzlich die Isolierung genomischer DNA zur Bestimmung der Null-Polymorphismen für *GSM1* und *GSTT1*.

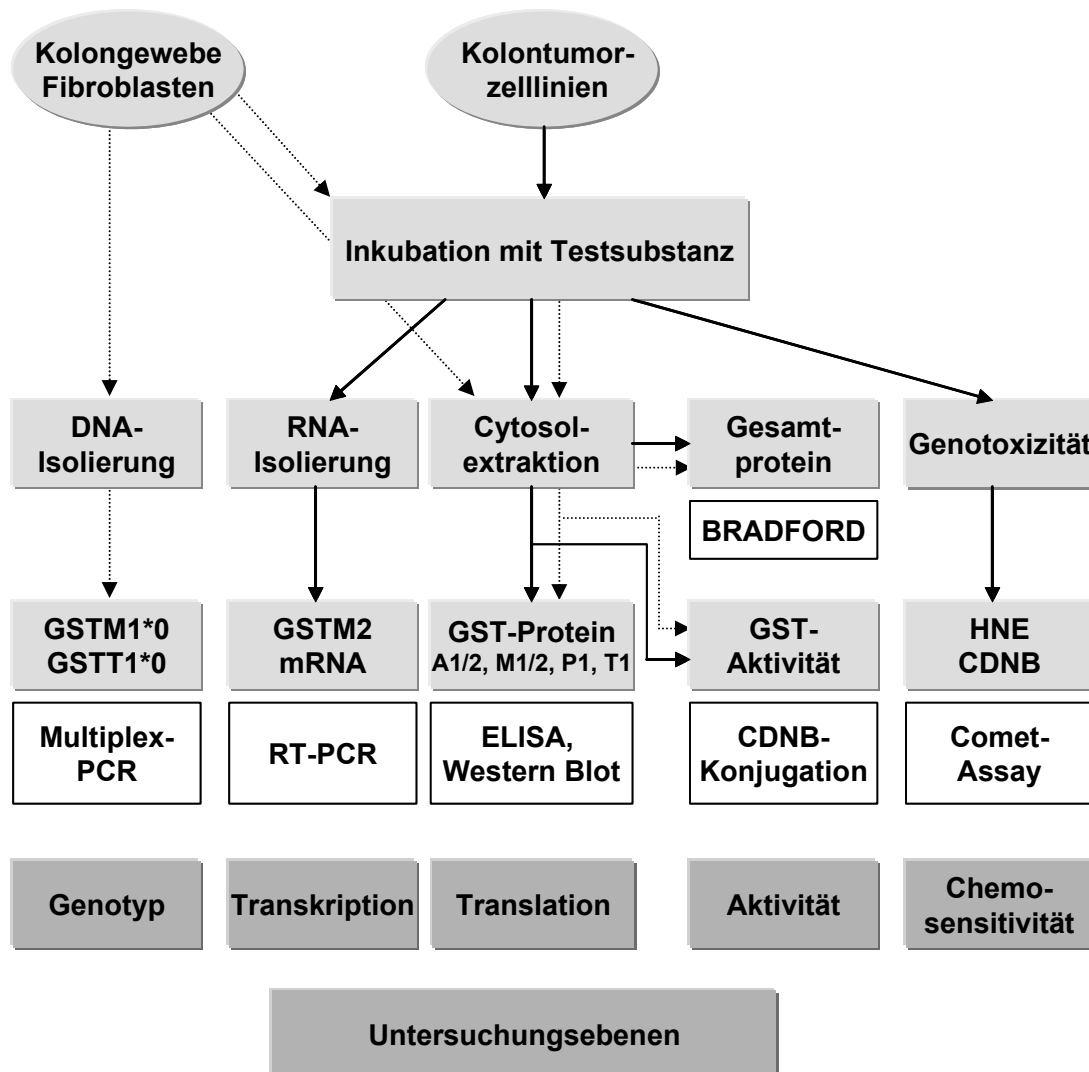


Abbildung 9: Zusammenfassende Darstellung der angewendeten Methoden

3.2.1 Arbeiten mit Kolontumorzelllinien und humanem Kolongewebe

3.2.1.1 Kultivierung der Zelllinien

Die Tumorzelllinien und Kolonfibroblasten wurden in T₂₅ und T₇₅ Flaschen mit Zellkulturmedium (Medium), bestehend aus Dulbecco's Modified Eagle Medium mit 10 % (v/v) fötalem Kälberserum und 1 % (v/v) Penicillin-Streptomycin-Lösung, kultiviert. Die Anzucht und Inkubation der Zellen erfolgte im Brutschrank bei 37°C, 95 % Luftfeuchte und 5 % CO₂-Gehalt. Um die Kulturen in der logarithmischen Phase zu erhalten, wurden die Zellen im subkonfluenten Stadium auf 1/5 – 1/10 ihres Volumens verdünnt (Tumorzelllinien: zweimal /Woche; Fibroblasten: einmal /2 Wochen). Zum Trypsinieren wurden die Zellen 2 - 4 min mit einer Trypsin-Versene-Lösung (1:10, v/v; 60-120 µl Lösung pro cm² Fläche) bei 37°C inkubiert, nach weiteren 4 min Inkubation, nach Entfernung der Lösung, in Medium resuspendiert und ein Teil der Suspension erneut kultiviert. Für die Experimente wurden die Passagen 17 – 50 der Zelllinien HT29 und HT29 Klon 19A sowie 6 – 10 der Fibroblastenkulturen verwendet.

3.2.1.2 Aufarbeitung des Kolongewebes

Das in HBSS aufbewahrte Gewebe wurde innerhalb von 1 – 3 h nach der operativen Entnahme auf Eis von der Klinik ins Institut transportiert und aufgearbeitet. Dazu wurden nach mehrmaligem Waschen des Gewebes in HBSS Gewebestreifen aus dessen Kolonepithel (ca. 0,3 - 0,5 cm²) herausgeschnitten. Die Isolierung der Epithelstreifen wurde erleichtert, indem HBSS unter die glatte Muskulatur des Darmgewebes gespritzt wurde, was eine Straffung des Kolonepithels zur Folge hatte [SCHÄFERHENRICH et al. 2002]. Die Epithelstreifen wurden entweder eingefroren oder direkt im Anschluss für die weiteren Untersuchungen verwendet.

Zum Einfrieren der Gewebeproben wurde Zellkulturmedium (s. 3.2.1.1) mit 20 % (v/v) fötalem Kälberserum und 10 % (v/v) DMSO verwendet. Jeweils 3 Epithelstreifen pro Eppendorfcap wurden in 1 ml Einfriermedium in einem Einfrierbehälter mit Isopropanol bei –80°C für 24 h eingefroren und anschließend bei –140°C gelagert.

Um das Gewebe aufzutauen, wurden die Eppendorfcaps bei 37°C im Wasserbad kurz inkubiert, zweimal in HBSS gewaschen und anschließend in HBSS auf Eis bis zur weiteren Verwendung gelagert.

3.2.1.3 Inkubation der Zellen und Gewebeproben mit Substanzen zur GST Induktion

48 h nach Aussaat der Zellen in Kulturgefäße (6-Well-Platten, T₂₅ und T₇₅ Flaschen) wurde das Medium gewechselt und die Zellen mit der im Medium gelösten Testsubstanz für 72 h (Butyrat 24 – 72 h) inkubiert. Als Kontrolle wurden Zellen mit Medium bzw. mit der jeweils höchsten eingesetzten Konzentration des Lösungsvermittlers mitgeführt. Die getesteten Konzentrationen basierten auf Angaben aus der Literatur für physiologisch relevante Werte sowie auf Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe zum Einfluss der Substanzen auf die Zellproliferation. Die EC₅₀ stellte die höchste der getesteten Konzentrationen dar. Einen Überblick über die eingesetzten Konzentrationen der untersuchten Substanzen und EC₅₀-Werte gibt Tabelle 5. Alle Versuche wurden mit einem Ansatz je Konzentration durchgeführt. Ausnahmen bildeten die Versuche mit den Tumorzelllinien zur Induktion der GST-Aktivität und GSTP1 (ELISA) mit 3 parallelen Ansätzen je Konzentration.

Tabelle 5: Inkubationen zur GST Induktion - Testsubstanzen und Konzentrationen

<i>Testsubstanz</i>	<i>Zelllinien / Kolongewebe</i>	<i>EC₅₀</i>	<i>Getestete Konzentrationen (Lösungsvermittler: max. Anteil)</i>
Butyrat	HT29	4 mM (48 h)	0,5, 1, 2, 4 mM
	HT29 Klon 19A	4 mM (48 h)	0,5, 1, 2, 4 mM
	Kolonfibroblasten		4 mM
	Primäre Kolonzellen		4, 10, 20 mM
Propionat	HT29	5 mM (72 h)	2,5, 5 mM
	HT29 Klon 19A	10 mM (72 h)	5, 10 mM
Acetat	HT29	30 mM (72 h)	15, 30 mM
	HT29 Klon 19A	60 mM (72 h)	30, 60 mM
Grüntee (von VK-Mühlen)	HT29		2, 20, 40 µM EGCG-Äquivalente
	HT29 Klon 19A	40µM (24 h)	2, 20, 40 µM EGCG-Äquivalente
EGCG	HT29		2, 40, 80 µM
	HT29 Klon 19A	80 µM (24 h)	2, 40, 80 µM
β-Carotin	HT29		2, 30 µM (Emulgator: 0,5 %)
PEITC	HT29	20 µM (72 h)	10, 20 µM (DMSO: 0,1 %)
	HT29 Klon 19A	20 µM (72 h)	10, 20 µM (DMSO: 0,1 %)
Enterodiol	HT29	80 µM (72 h)	60, 80 µM (DMSO: 0,16 %)
Oltipraz	HT29	500 µM (72 h)	50 - 300 µM (DMSO: 0,2 %)

Die Epithelstreifen der Kolongewebeproben wurden ohne Vorinkubation für 24 h inkubiert. Zur Verhinderung bakterieller Kontaminationen wurden die Epithelstreifen 2 min in Penicillin-Streptomycin gewaschen und dem Zellkulturmedium 2 % (v/v) Penicillin-Streptomycin-Lösung zusetzt.

3.2.1.4 Ernte der Zellen

3.2.1.4.1 Zelllinien

Nach erfolgter Inkubation wurden die Zellen 6 - 8 min mit Trypsin-Versene-Lösung (s. 3.2.1.1) bis zur Ablösung inkubiert. Durch Zugabe des dreifachen Volumens an PBS (Ca + Mg) mit 0,5 % BSA wurde der Trypsinverdau abgestoppt. Alle weiteren Schritte erfolgten auf Eis. Die Zellen wurden in Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml) überführt, 5 min mit 400 g bei 4 °C abzentrifugiert und in PBS (Ca + Mg) resuspendiert. Der Waschschrift zur Entfernung von Mediumrückständen und BSA wurde einmal wiederholt. Vor der letzten Zentrifugation wurden 20 µl Zellsuspension je Probe für die Bestimmung der Zellzahl und Vitalität entnommen. Die Zellpellets wurden mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C bis zur Cytosolextraktion gelagert bzw. direkt im Anschluss dafür verwendet.

3.2.1.4.2 Gewinnung von Einzelzellen aus Kolangewebe

Die Epithelstreifen wurden auf einem Uhrglas mit einer Schere möglichst klein geschnitten, in 3 ml HBSS mit gelöster Collagenase P (3 mg) in 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und bei 37 °C für 30 – 45 min im Schüttelwasserbad inkubiert [SCHÄFERHENRICH et al. 2002]. Zum Abstoppen des Collagenaseverdaus wurde die Suspension mit HBSS verdünnt und abzentrifugiert (400 g, 5 min, 4 °C). Das Zellpellet wurde in HBSS resuspendiert, 20 µl Zellsuspension je Probe für die Bestimmung der Zellzahl und Vitalität entnommen und die Zellen abschließend abzentrifugiert. Die Zellpellets wurden mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C bis zur Cytosolextraktion gelagert.

3.2.1.5 Bestimmung der Zellzahl und Vitalität

Zur Bestimmung der Vitalität wurde der Trypanblau-Ausschlusstest angewendet [SANDSTRÖM 1965], mit welchem gleichzeitig die Zellzahl erfasst werden kann. Dieser Test beruht darauf, dass der Farbstoff Trypanblau in Zellen, die ihre Membranintegrität verloren haben, eindringen kann. Diese Zellen erscheinen unter dem Lichtmikroskop betrachtet blau gefärbt, während Zellen mit intakter Membran ungefärbt bleiben. Für den Test wurden 20 µl Zellsuspension mit 20 µl Trypanblau vermischt und in einer Neubauer-Zählkammer vitale und tote (blau gefärbte) Zellen ausgezählt. Die Überprüfung der Vitalität wurde bei jeder Zellzahlbestimmung durchgeführt. Die Zellvitalität lag im Durchschnitt zwischen 80 – 95 % bei den Zelllinien, 60 – 90 % bei den frischen und 40 – 60 % bei den inkubierten Gewebeproben.

3.2.1.6 Cytosolextraktion

Für die Cytosolextraktion wurden die Zellpellets in Homogenisationspuffer mit Proteasehemmer (1 mM Pefabloc) resuspendiert und im Eisbad mittels Ultraschallhomogenisator mit 40 % der maximalen Leistung (30 W) mechanisch lysiert. Nach der anschließenden Zentrifugation zur Sedimentierung der Zelltrümmer wurden die Überstände (Cytosole) aliquotiert und bei -80°C bis zu ihrer weiteren Verwendung eingefroren. Die abzentrifugierten Pellets der Primärzellproben wurden für die spätere DNA-Isolierung bei -20°C eingefroren. Alle Schritte erfolgten unter Kühlung.

Die Herstellung der Cytosole zur Bestimmung der GST-Aktivität und des GSTP1 Proteins mittels ELISA unterschied sich in einigen Parametern von der Cytosolextraktion für die Immunodetektion der GST Isoenzyme mittels Western Blot (Tabelle 6).

Tabelle 6: Parameter der Cytosolextraktion

<i>Parameter</i>	<i>Cytosol für GST-Aktivität und ELISA</i>	<i>Cytosol für Western Blot</i>
Puffer	Homogenisationspuffer	Homogenisationspuffer (IB)
Zelldichte (Zellzahl /ml Puffer)	$1 - 4 \times 10^6$	$2 - 3 \times 10^7$ (HT29, HT29 Klon 19A) $4 - 40 \times 10^5$ (Fibroblasten) $1 - 10 \times 10^6$ (Primärzellen)
Homogenisation	1 min, 6 cycle, 40 %	1 min, 2 cycle, 40 %
Zentrifugation	128.000 g, 75 min, 4°C (Ultrazentrifuge: Beckmann)	16.000 g, 60 min, 4°C (Minizentrifuge: biofuge fresco)

3.2.2 Biochemische und immunologische Techniken

3.2.2.1 Proteinbestimmung nach BRADFORD

Die Bestimmung des Proteingehaltes in den Cytosolextrakten erfolgte nach der Methode von BRADFORD mit BSA als Standardprotein [BRADFORD 1976]. Der Nachweis beruht auf der spezifischen Bindung des Trimethylmethan-Farbstoffs Coomassie Brilliantblau G an Proteine. Der Farbstoff hat in saurer Lösung ein Absorptionsmaximum von 470 nm, welches sich bei der Bildung von Farbstoff-Protein-Komplexen aufgrund der Stabilisierung der anionischen Form des Farbstoffs auf 595 nm verschiebt [COMPTON & JONES 1985]. Bei dieser Wellenlänge wird die Zunahme der Absorption gegen den freien Farbstoff photometrisch gemessen.

Die Quantifizierung der Proteinkonzentrationen erfolgte anhand der Eichreihe mit BSA, welche aus einer einprozentigen Stammlösung für den Konzentrationsbereich 0 –150 µg /ml durch Verdünnen mit Homogenisationspuffer hergestellt wurde. Die Cytosole wurden mit Homogenisationspuffer so verdünnt (VF: 5-100), dass ihr Proteingehalt im linearen Bereich der Eichgeraden (10-150 µg BSA /ml) war. Von den Standards und verdünnten Cytosolen wurden jeweils 20 µl in MTPs aufgetragen, wobei die Eichreihe je zweimal und die Cytosole je dreimal pipettiert wurden. 10 – 30 min nach Zugabe von je 180 µl BRADFORD-Reagenz wurde die Absorption mit dem Programm X-FluorTM (Tecan AG, Crailsheim) im MTP-Fluoreszenz-Photometer gemessen. Abweichend von der Vorschrift wurde aufgrund der verfügbaren Filter die Messung bei 592 nm anstatt bei 595 nm durchgeführt. Die Proteinkonzentration der Cytosole wurden durch lineare Regression der Eichgeraden berechnet.

3.2.2.2 GST-Gesamtaktivität nach HABIG

Bei der Methode zur Bestimmung der GST-Gesamtaktivität von HABIG ET AL. wird die Bildung von S-2,4-dinitrophenylglutathion, des Produkts der GST- katalysierten Konjugation von 1-Chlor-2,4-dinitrobenzol (CDNB) mit Glutathion (Abbildung 10), quantifiziert [HABIG et al. 1974]. Die mit der Produktbildung einhergehende Gelbfärbung der Reaktionslösung führt zu einer Zunahme der Extinktion bei 340 nm, welche über die Zeit gemessen wird.

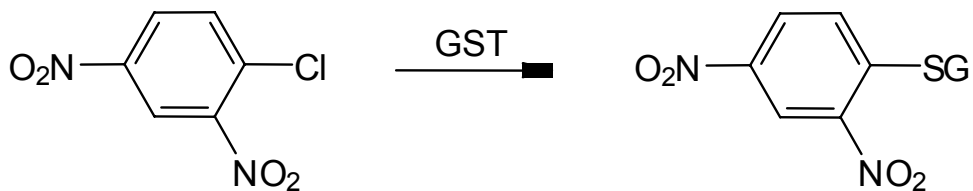


Abbildung 10: GST vermittelte Glutathion-Konjugation von 1-Chlor-2,4-dinitrobenzol zu S-2,4-dinitrophenylglutathion

Die Aktivitätsbestimmung erfolgte bei 30 °C in 0,1 M Phosphatpuffer (pH 6,5) mit 1 mM CDNB und 1 mM Glutathion als Substraten. CDNB wurde in Ethanol absolut gelöst und aus einer 20 mM Stammlösung zugegeben. Der Ethanolanteil im Reaktionsansatz betrug 5 %. Durch Zugabe des Cytosols wurde die Reaktion gestartet. Die Zunahme der Extinktion bei 340 nm wurde mit dem Messprogramm Kinetics (CaryWin UV Bio 2.0, Varian Deutschland GmbH, Darmstadt) über einen Zeitraum von 5 min gegen den Reaktionsansatz ohne Enzyme spektralphotometrisch gemessen. Der Anstieg im linearen Bereich der Enzymkinetik diente als Grundlage für die Berechnung der Aktivität nach der in Abbildung 11 dargestellten Formel. Die

resultierende Aktivität des Cytosols wurde auf die Zellzahl und den Proteingehalt bezogen. Letzteres stellt die spezifische Aktivität dar.

<p>Aktivität [nmol x min⁻¹ x ml⁻¹]</p> $= \frac{\Delta E / \text{min} * V}{\epsilon * d * v} * 1000$	<p>$\Delta E / \text{min}$ = Extinktionsänderung/min (Anstieg) V = Vol. Reaktionsansatz (1 ml) ϵ = Extinktionskoeffizient (9,6 mM⁻¹ cm⁻¹) d = Schichtdicke (1 cm) v = Vol. Cytosol (25-100 μl)</p>
--	---

Abbildung 11: Formel zur Berechnung der Enzymaktivität

3.2.2.3 Enzymimmunoassay der GSTP1

Die Quantifizierung des GSTP1 Proteins wurde mit dem Sandwich-ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) unter Verwendung des Kits HEPKITTM-Pi (Biotrin International GmbH, Sinsheim-Reihen) durchgeführt. Das Prinzip des Sandwich-ELISA besteht in der Bindung des Antigens an den in der MTP immobilisierten Fangantikörper sowie an einen zweiten Enzym-markierten Antikörper mit einer anderen Epitopspezifität. Die Quantifizierung der Menge des gebundenen Antigens erfolgt über die enzymatische Umsetzung eines farblosen Chromogens zu einem quantifizierbaren Farbstoff durch Messung der Extinktion.

Für die Bestimmung wurden die Cytosole 1: 10 mit Probenpuffer verdünnt und in der mit IgG gegen GST π beschichteten MTP inkubiert. Die nicht gebundenen Cytosolbestandteile wurden anschließend durch Waschen mit PBS/Tween 20 entfernt. Daran schloss sich die Inkubation mit dem zweiten Meerrettich-Peroxidase-konjugierten Antikörper. Nach erneutem Waschen wurde das Substrat Trimethylbenzidin zugegeben, dessen Umsetzung nach 15 min durch Zugabe von 1 N H₂SO₄ abgestoppt wurde. Die Extinktion der Gelbfärbung wurde bei 450 nm gegen die Referenzwellenlänge von 630 nm gemessen. Für Messung und Auswertung wurde das Programm EasyWin Curve Fitting V 4.0a (Tecan AG, Crailsheim) verwendet. Die Quantifizierung der GSTP1-Mengen erfolgte anhand der mitgeführten Eichreihe des GSTP1-Standardproteins nach einer polynomischen Gleichung zweiter Ordnung mittels Auswertungssoftware. Der cytosolische GSTP1-Gehalt wurde auf die Zellzahl und den Gesamtproteingehalt bezogen.

3.2.2.4 Western Blot der GST-Isoenzyme

Die Western Blot-Technik, die auch als Immunoblotting bezeichnet wird, umfasst den Transfer von Proteinen aus Polyacrylamidgelen auf Trägermembranen mit anschließender Immundetektion. Dazu werden die Proteingemische mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und über Kapillartransfer oder Elektrotransfer auf einer Membran immobilisiert, um abschließend die entsprechenden Zielproteine (Antigene) mit spezifischen Antikörpern immunologisch nachzuweisen. Mit dieser Methode wurden die Untereinheiten – in der vorliegenden Arbeit als Isoenzyme bezeichnet - der als Dimer vorkommenden cytosolischen GST-Isoenzyme A1/2, M1-1, M2-2, P1-1 und T1-1 semi-quantitativ nachgewiesen, wobei der Nachweis der GSTM2 mittels des GST μ -Antikörpers nicht völlig bewiesen ist, da kein GSTM2-spezifischer Antikörper und kein entsprechendes Standardprotein für dieses Isoenzym zur Verfügung standen. Die Annahme wird jedoch durch das sich von GSTM1 unterscheidende geringere Molekulargewicht (Tabelle 7) sowie durch weitere Untersuchungen auf DNA- und mRNA-Ebene gestützt (s. 3.2.3.1 und 3.2.3.2). Die GSTA1/2, bestehend aus A1-1, A1-2 und A2-2, wurde aufgrund des gleichen Molekulargewichts (Tabelle 7) und gleicher Antikörperspezifität (Tabelle 10) zusammen detektiert.

3.2.2.4.1 SDS-Page

Zur Auftrennung der Proteine der Cytosolextrakte wurde die SDS-Polyacrylamidgелеlektrophorese (SDS-Page), eine schnelle, effektive Methode zur Trennung von denaturierten Proteinen nach ihrem Molekulargewicht, angewendet. Natriumdodecylsulfat (SDS) ist ein anionisches Detergenz, welches sich bei der Denaturierung von Proteinen um die Polypeptidketten lagert und damit deren Eigenladung überdeckt. Die dabei entstehenden SDS-Protein-Mizellen haben eine konstante negative Ladung pro Masseinheit, so dass die Auftrennung der Proteine nur nach einem Parameter, dem Molekulargewicht, erfolgt.

In der vorliegenden Arbeit wurde die eindimensionale SDS-Page des diskontinuierlichen Typs nach LAEMMLI angewendet [LAEMMLI 1970]. Bei dieser Technik wurden die Proteine zuerst in einem großporigen Sammelgel (3 % Acrylamidanteil) aufkonzentriert und anschließend im darunter gelagerten kleinporigen Trenngel (12 % Acrylamidanteil) der Größe nach aufgetrennt. Die Acrylamidkonzentration des Trenngels richtete sich dabei nach dem Molekulargewicht der GST Isoenzyme, deren Untereinheiten im Bereich von 24 bis 29 kD liegen (Tabelle 7). Der Anteil wurde so gewählt, dass die Zielproteine im linearen Bereich (15 – 60 kD) der Beziehung zwischen dem \log_{10} des Molekulargewichts und der relativen Mobilität lagen.

Tabelle 7: Molekulargewicht der GST-Standards

<i>Standard</i>	<i>GSTA1</i>	<i>GSTM1</i>	<i>GSTP1</i>	<i>GSTT1</i>
Molekulargewicht	25,9 kD (GSTA2: 25,9 kD)	26,6 – 26,7 kD (GSTM2: 26 kD)	24,7 kD	25,3 kD*

Angaben aus [BECKETT & HAYES 1993]; *) Angabe aus [JURONEN et al. 1996b]

Zur Denaturierung der Proteine wurden die Cytosole und GST-Standards 1 : 1,5 mit Probenpuffer (SDS und DTT enthaltend) verdünnt und anschließend 10 min bei 65 °C im Thermomixer inkubiert. Zur Fehlerminimierung erfolgte die Verdünnung der GST-Standards für alle Experimente in einem Ansatz. Dazu wurden die Standardstammlösungen zuerst mit 20 mM Tris-Puffer und anschließend mit Probenpuffer verdünnt und aliquotiert, entsprechend der aufzutragenden Mengen, bei –80 °C eingefroren.

Tabelle 8: Konzentration und Auftragsvolumen der GST-Standardlösungen

<i>Standard</i>	<i>GSTA1</i>	<i>GSTM1</i>	<i>GSTP1</i>	<i>GSTT1</i>
Konzentration (ng/μl)	3,33	1,11	3,33	3,33
aufgetragene Menge (ng)	8	13	50	10

Auf jedes Gel wurden definierte Mengen der entsprechenden Standardproteine mindestens zweimal aufgetragen (Tabelle 8). Die aufgetragenen Proteinmengen der Cytosolextrakte (Tabelle 9) richteten sich zum einen nach der Konzentration des nachzuweisenden GST-Isoenzym in den untersuchten Zellen. Zum anderen wurde die auftragbare Proteinmenge bei den Primärzellen und Fibroblastenkulturen teilweise durch geringe Proteinkonzentrationen der Cytosolextrakte limitiert. Auf jedem Gel wurde ein Proteingrößenstandard (je 10 μl Rainbow-Marker) zur Kontrolle der Auftrennung mitgeführt. Die Elektrophorese wurde bei konstanter Stromstärke mit 20 - 25 mA im Sammelgel und 30 - 40 mA im Trenngel für jeweils 2 Gele mit einer Gesamtdauer von 1,5 – 2 h durchgeführt.

Tabelle 9: Aufgetragene Proteinmengen zum Nachweis der GST-Isoenzyme

<i>Zellen</i>	<i>Gesamtprotein (μg) für Detektion von</i>			
	<i>GSTA1/2</i>	<i>GSTM1/2</i>	<i>GSTP1</i>	<i>GSTT1</i>
HT29 / HT29 Klon 19A	60	60	5 - 8	5 - 10
Primärzellen	5 - 15	5 - 10	5 - 15	5 - 15
Fibroblasten	10 - 20	10 - 20	10 - 20	10 - 20

3.2.2.4.2 Membrantransfer (Semi-Dry-Blotting)

Für den Transfer der Proteine wurde das Verfahren des Semi-Dry-Blottings, bei dem ein Gel-Membran-Sandwich zwischen horizontalen Plattenelektroden angeordnet wird, angewandt [KYSE-ANDERSON 1984]. Eine Transfereinheit bestand aus jeweils 2 x 3 mit Transferpuffer durchtränkten Filterpapieren, die die ebenfalls im Transferpuffer äquilibrierte Membran und das Gel nach dem Sandwich-Prinzip umschlossen. Als Trägermembran wurde Nitrozellulose verwendet. Durch Anlegen des elektrischen Felds wurden die negativ geladenen SDS-Protein-Mizellen aus dem Gel auf die Membran in Richtung der Anode transferiert. Der Transfer wurde über 1 - 2 h – in Abhängigkeit von der aufgetragenen Proteinmenge – bei konstanter Stromstärke mit $0,8 \text{ mA/cm}^2$ Membranoberfläche durchgeführt. Zur Überprüfung des Proteintransfers wurden die Gele nach Beendigung des Blottens in einer Färbelösung mit Coomassie Brilliantblau 15 – 30 min gefärbt.

3.2.2.4.3 Immunodetektion

Der immunologische Nachweis erfolgte indirekt. Dazu wurde zunächst das an der Membran immobilisierte Antigen mit dem Antigen-spezifischen Antikörper (Primärantikörper) und anschließend mit einem zweiten, an den Primärantikörper bindenden, mit Meerrettichperoxidase konjugiertem Sekundärantikörper inkubiert. Der Nachweis erfolgte colorimetrisch über die Peroxidase-katalysierte Umsetzung des abschließend zugegebenen chromogenen Substrats Diaminobenzidin.

Die Immunodetektion erfolgte mittels monoklonaler Mausantikörper gegen die humanen GST (mouse anti hGST) der Klassen α , μ und π sowie gegen GST θ . Die Antikörper gegen die GST-Klasse α sowie gegen die GST-Klasse μ reagierten jeweils mit mehreren GST-Untereinheiten, während die für GST π und θ spezifischen Antikörper nur gegen ein Isoenzym gerichtet waren (Tabelle 10). Die Antikörper wurden in den Verdünnungen 1: 5000 (mouse anti hGST α , μ und π) bzw. 1: 1000 (mouse anti hGST θ) eingesetzt. Die Stammlösungen für GST α , μ und π wurden mit PBS 1: 5 vorverdünnt bei -80°C und die unverdünnte Stammlösung für GST θ bei -20°C als Aliquote ausreichend für jeweils einen Blot aufbewahrt. Als zweiter Antikörper wurde ein polyklonaler mit Meerrettichperoxidase konjugierter Antikörper, Kaninchen gegen Maus (rabbit anti mouse), in der Verdünnung 1: 800 verwendet. Für die Immunodetektion wurden die Antikörper in jeweils 10 ml Blockingpuffer pro Blot verdünnt. Die Lösung mit dem ersten Antikörper wurde je dreimal verwendet (Lagerung bei -20°C), während die Verdünnung des zweiten Antikörpers jeweils frisch angesetzt wurde.

Tabelle 10: Spezifität der verwendeten Antikörper gegen humane GST

<i>Reaktionen der monoklonalen Maus-Antikörper gegen humane GST der Klassen</i>			
α	μ	π	θ
GSTA1-1	GSTM1a-1a	GSTP1-1	GSTT1-1 (**)
GSTA1-2	GSTM1a-1b		
GSTA2-2	GSTM1b-1b		
	GSTM2-2 (*)		

Datenquelle: [GRUBBEN et al. 2000], (*) eigene Hypothese, (**) [JURONEN et al. 1996a]

Um unspezifische Bindungen der Antikörper zu verhindern, wurde die Membran vor der Inkubation mit den Antikörpern in TBST mit 5 % Milchpulver (Blockingpuffer) für 30 – 45 min unter leichtem Wippen bei RT blockiert. Daran schloss sich die Inkubation mit dem ersten Antikörper bei 4 °C über Nacht. Anschließend wurde die Membran zur Entfernung des nicht gebundenen Antikörpers dreimal in TBST gewaschen und für 1 h unter leichtem Wippen mit dem zweiten Antikörper bei RT inkubiert. Nach Wiederholung des Waschschritts erfolgte die Zugabe der Substratlösung mit Diaminobenzidin und Wasserstoffperoxid. Nach dem Sichtbarwerden der Banden wurde die Reaktion durch Abgießen der Substratlösung und mehrmaliges Spülen der Membran mit Leitungswasser abgestoppt. Die gefärbte Membran (Blot) wurde getrocknet und bei RT lichtgeschützt aufbewahrt.

Die Blots wurden mit dem BioRad-MultimanagerS mit Unterstützung des Programms Quantity One™ (BioRad Laboratories GmbH, München; Blende 5,6; Expositionszeit 0,3 s; Einstellung: colorimetric) fotografiert. Für die Quantifizierung der Banden wurde das „Band Analysis Tool“ der gleichen Software benutzt. Als Auswertungsparameter wurde die „Trace Quantity“ gewählt, welche die Intensität und den Umfang der Banden als Fläche unter der Kurve des Intensitätsprofils, abzüglich des Hintergrundes, quantifiziert. Der Mittelwert der Banden der Standards von jedem Blot diente als Referenz für die Quantifizierung des GST-Proteins der Proben. Die Proteinmenge der nachgewiesenen GST-Isoenzyme wurde jeweils auf die Zellzahl bzw. das Gesamtprotein der Proben bezogen.

3.2.3 DNA und RNA Standardtechniken

3.2.3.1 Genotypisierung zum Nachweis der GSTM1- und GSTT1-Nullpolymorphismen

3.2.3.1.1 DNA-Isolierung

Zur Isolierung der DNA wurde der QIAamp DNA Mini Kit 250 (QIAGEN GmbH, Hilden) verwendet. Dabei wurde die DNA in einer Säule an eine Membran adsorbiert. In mehreren nachfolgenden Waschschritten wurden die übrigen Zellbestandteile entfernt. Abschließend

wurde die DNA von der Säule eluiert. Das Eluat wurde bei -20°C eingefroren und konnte direkt für die PCR eingesetzt werden. Die Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Für die DNA-Isolierung aus Primärzellen wurden frische Epithelstreifen sowie Pellets der bei der Cytosolextraktion abzentrifugierten Zelltrümmer verwendet. Bei der Verwendung von frischen Epithelstreifen mussten diese vorher in einem Uhrglas mit einer Schere so weit wie möglich zerkleinert werden.

3.2.3.1.2 DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Quantifizierung der DNA erfolgte mit Hilfe eines UV-Spektrophotometers (BioPhotometer der Firma Eppendorf) durch Messung der Extinktion bei 260 nm und 280 nm. Dazu wurde die DNA-Lösung (Eluat) mit dem Elutionspuffer entsprechend verdünnt und Extinktion der Verdünnung gegen den Elutionspuffer gemessen. Die Berechnung der DNA-Konzentration erfolgte nach der aus dem LAMBERT-BEER'schen Gesetz abgeleiteten Formel:

$$\text{Konzentration doppelsträngiger DNA } [\mu\text{g/ml}] = A_{260\text{nm}} \times 50 \mu\text{g/ml} \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

Zur Bewertung des Reinheitsgrads der DNA diente der Quotient der Extinktion bei 260 nm und 280 nm. Für reine DNA-Lösungen sollte der Quotient bei 1,8 liegen. Kleinere Werte weisen auf eine Verunreinigung mit Proteinen, größere Werte auf das Vorhandensein von RNA hin.

3.2.3.1.3 Multiplex-PCR für GSTM1, GSTT1 und β -Globin

Der Nachweis der Nullpolymorphismen der Gene für GSTM1 und GSTT1 erfolgte mit der Multiplex-PCR, bei welcher mit Hilfe von drei spezifischen Primerpaaren die Amplikons für GSTM1 (215 bp), GSTT1 (480 bp) und β -Globin (268 bp) in einem PCR-Ansatz gleichzeitig generiert wurden [KATOHI et al. 1996]. Ein DNA-Abschnitt des β -Globin-Gens, welches als sogenanntes „house keeping gene“ in jeder Zelle vorhanden ist, wurde als interne Kontrolle in jedem PCR-Ansatz mitamplifiziert. Zur Amplifikation wurden die in Tabelle 11 aufgeführten Oligonukleotid-Sequenzen (Primer) verwendet.

Tabelle 11: Primersequenzen (GSTM1, GSTT1 und β -Globin)

<i>Primer forward</i>	T_H (°C)	<i>Sequenz [5'-...-3']</i>	<i>Primer revers</i>	T_H (°C)	<i>Sequenz [5'-...-3']</i>
GSTT1	60	ttc ctt act ggt cct cac act tc	GSTT1	60	tca ccg gat cat ggc cag ca
GSTM1	60	gaa ctc cct gaa aag cta aag c	GSTM1	60	gtt ggg ctc aaa tat acg gtg g
β -Globin	60	caa ctt cat cca cgt tca cc	β -Globin	60	gaa gag cca agg aca ggt ac

T_H = Hybridisierungstemperatur

Für die Durchführung der PCR wurde ein Mastermix, der alle Reagenzien bis auf die genomische DNA enthielt, unter Verwendung einer thermostabilen DNA-Polymerase (HotStar Taq-Polymerase) und der in H₂O bidest verdünnten Primer (10 pmol/μl) hergestellt. Der Mastermix wurde in Abhängigkeit von der Anzahl der Proben als x-facher Ansatz (Tabelle 12) auf Eis pipettiert und anschließend in PCR-Caps aliquotiert. Zu jeweils 29 μl Mastermix wurde 1 μl Proben-DNA bzw. 1 μl H₂O bidest (Negativkontrolle) pipettiert. Zur Überprüfung der GSTM1- und GSTT1-Primer wurde als Positivkontrolle ein Ansatz mit der beide Gene aufweisenden HT29-DNA mitgeführt [EBERT et al. 2001]. Die PCR-Ansätze wurden, um das Verdampfen der Proben zu verhindern, mit je 25 μl Mineralöl überschichtet. Im Anschluss erfolgte die PCR im Thermocycler unter den in Tabelle 12 dargestellten Bedingungen. Die PCR-Produkte wurden bis zur Durchführung der Gelelektrophorese bei 4 °C aufbewahrt.

Tabelle 12: Mastermix und PCR-Bedingungen für Multiplex-PCR

<i>Mastermix</i>		<i>PCR-Bedingungen</i>		
Reagenz	1 Ansatz	PCR-Schritte		
H ₂ O bidest	17,5 μl	Heizdeckeltemperatur	105 °C	
PCR-Puffer (10x)	3 μl	Einmalige Denaturierung	95 °C	15 min
dNTP-Mix (2,5 mM/dNTP)	3 μl	Denaturierung	94 °C	60 s
Primer GSTT1-forw./rev.	je 1 μl	Hybridisierung	60 °C	60 s
Primer GSTM1-forw./rev.	je 1 μl	Polymerisation	72 °C	60 s
Primer β-Globin forw./rev.	je 0,5 μl	Abschl. Polymerisation	72 °C	5 min
Taq-Polymerase [5 U/μl]	0,5 μl			
Gesamtvolumen	29 μl	Anzahl der Zyklen	30	

3.2.3.1.4 DNA-Agarose-Gelelektrophorese, DNA-Färbung und Auswertung

Die Auftrennung der amplifizierten DNA erfolgte nach der Fragmentlänge in zweiprozentigen (w/v) Agarosegelen. Für die Herstellung eines Gels wurde 1 g Normal Melting Agarose in 50 ml 1 x TAE-Puffer gelöst und bis zum vollständigen Lösen der Agarose in einer Mikrowelle gekocht. Die PCR-Produkte wurden mit 1/6 Volumen Auftragspuffer (jeweils 5 μl Produkt und 1 μl Puffer) vermischt, in die Geltaschen pipettiert und einer Gelelektrophorese bei 120 V für 30 – 40 min unterzogen. Für den Vergleich der Fragmentlängen wurde ein DNA-Längenstandard (100 bp, peQLab Biotechnologie GmbH, Erlangen) mitgeführt, welcher nach Verdünnung mit H₂O bidest (1 : 5) analog zu den Proben behandelt wurde.

Nach Abschluss der Elektrophorese wurde das Gel für 15 – 30 min in einer Ethidiumbromid-Lösung (0,5 μg/ml H₂O bidest) gefärbt und anschließend unter UV-Licht mit dem BioRad-MultimanagerS mit Unterstützung des Programms Quantity One™ (BioRad Laboratories

GmbH, München; Blende 5,6; Expositionszeit 45 s) fotografiert. Die Auswertung der Banden erfolgte durch Abschätzung der Größe der DNA-Fragmente anhand des Längenstandards.

3.2.3.2 Semi-quantitative RT-PCR zur Bestimmung der *GSTM2* mRNA Expression

3.2.3.2.1 RNA-Isolierung

Die zelluläre Gesamt-RNA wurde mit dem TRIzol®-Reagenz (Gibco BRL, München) isoliert. Die in T₂₅-Flaschen ausgesäten Zellen wurden in je 1 ml Trizol lysiert (mind. 5 min bei RT), in Eppendorfcaps überführt und mit 0,2 ml Chloroform geschüttelt, im Anschluss 3 min bei RT inkubiert und zur Phasentrennung abzentrifugiert (5 min, 16.000 g, RT). Die Chloroform-extraktion wurde mit der oberen wässrigen Phase, in welcher die RNA gelöst war, wiederholt und anschließend die RNA-Phase zur Ausfällung der RNA mit 0,5 ml Isopropanol gemischt und abzentrifugiert (20 min, 16.000 g, 4 °C). Das entstandene Pellet wurde mit 0,5 ml 75%igem Ethanol (in DMPC-Wasser) gewaschen, abzentrifugiert (5 min, 16.000 g, RT) und an der Luft getrocknet. Die getrocknete RNA wurde in 50 µl DMPC-Wasser resuspendiert und zur vollständigen Lösung 10 min bei 55 °C inkubiert. Die Aufbewahrung der RNA erfolgte bei -20 °C.

3.2.3.2.2 RNA-Konzentrationsbestimmung

Die RNA-Proben wurden mit H₂O bidest verdünnt und analog zur Bestimmung der DNA-Konzentration (s. 3.2.3.1.2) quantifiziert. Der Quotient A₂₆₀/A₂₈₀ sollte für reine RNA bei zwei liegen. Die Berechnung des RNA-Gehalts erfolgte nach der Formel:

Konzentration der RNA [µg/ml] = A_{260nm} x 40 µg/ml x Verdünnungsfaktor

3.2.3.2.3 Denaturierende RNA-Agarose-Gelelektrophorese

Die isolierte RNA wurde zur Überprüfung ihrer Integrität mittels denaturierender Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. Zur Herstellung eines Gels wurden 0,75 g Normal Melting Agarose in 47,5 ml 1x MOPS-Puffer gelöst und bis zum vollständigen Lösen der Agarose in einer Mikrowelle gekocht. Nach Abkühlung der Lösung auf ca. 50 °C wurden 2,5 ml 37%ige (w/v) Formaldehydlösung zugegeben und das Gel sofort gegossen. Für die Beladung des Gels wurden je 5 µl RNA-Lösung mit 5 µl RNA-Auftragspuffer vermischt und 20 min bei 70 °C denaturiert. Die Elektrophorese wurde in 1x MOPS-Puffer über Nacht bei 15 V durchgeführt und anschließend das Gel unter UV-Licht mit dem BioRad-MultimanagerS (Programm: Quantity One™; Blende 5,6; Expositionszeit 10 sec) fotografiert. Die Intaktheit der RNA wurde anhand der scharfen Banden der ribosomalen RNA (28S- und 18S-Bande) kontrolliert.

3.2.3.2.4 Reverse Transkription (cDNA-Synthese)

Eine sensitive Methode zur Untersuchung der Genexpression auf mRNA-Ebene stellt die RT-PCR dar, deren Prinzip auf der Amplifizierung der durch reverse Transkription in cDNA umgeschriebenen mRNA beruht.

Um eine mögliche Kontamination der eingesetzten RNA mit DNA auszuschließen, wurde vor der cDNA-Synthese ein Verdau der DNA unter Verwendung von DNase I, Amplification Grade (Kit von Invitrogen GmbH, Karlsruhe) durchgeführt.

Für den DNase I-Verdau wurden je Probe eingesetzt:

RNA.....	5 µg
10 x DNase I Reaktionspuffer	1 µl
DNase I (1 U/µl).....	2,5 µl
DMPC-H ₂ O	ad 10 µl

Zum Verdau wurden die Proben für 30 min bei 30 °C inkubiert. Die Inaktivierung der DNase erfolgte durch Zugabe von 1 µl EDTA (25 mM) je Ansatz mit anschließender Inkubation für 10 min bei 65 °C.

Zur Entfernung möglicher die PCR störenden Substanzen, wie z. B. EDTA, wurde eine Ethanol-fällung der RNA durchgeführt. Dazu wurden die Proben mit 1/10 Volumen 4 M LiCl-Lösung und dem 2,5fachen Volumen Ethanol (absolut) vermischt und für mindestens 30 min bei -20°C eingefroren. Anschließend wurde die gefällte RNA abzentrifugiert (30 min, 16.000 g, 4 °C), der Überstand sorgfältig abgenommen und das Pellet in der Vakuum-Zentrifuge getrocknet. Das Pellet wurde abschließend in 9 µl DMPC-H₂O resuspendiert, wovon 1 µl RNA-Lösung zur Kontrolle des DNase-Verdau für die PCR mit GAPDH (s. 3.2.3.2.5) eingesetzt wurde.

Die Umschreibung der RNA zu cDNA erfolgte unter Verwendung des Kits SuperScript™ First-Strand Synthesis System (Gibco BRL, München) mit Oligo(dT)₁₂₋₁₈ Primern entsprechend den Angaben des Herstellers. Zur Erststrangsynthese wurden für jeden Ansatz 4,5 µg Gesamt-RNA (8 µl), 1 µl dNTPs (10 mM), 0,5 µg Oligo(dT)₁₂₋₁₈, 40 U RNaseOUT, 50 U SuperScript II und 2 U RNase H sowie 10x RT-Puffer, 25 mM MgCl₂ und 0,1 M DTT eingesetzt. Die erhaltenen cDNAs wurden bis zu ihrer Verwendung in der PCR (s. 3.2.3.2.5) bei -20 °C eingefroren.

3.2.3.2.5 RT-PCR für GSTM2 und GAPDH

Die Expression der GSTM2 mRNA unter Butyratfluss wurde mit RT-PCR semiquantitativ bestimmt. Als Kontrolle wurde die Expression der Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), welche als „house keeping gene“ in HT29 und HT29 Klon 19A gut exprimiert wird und unter den hier gewählten Bedingungen als nicht induzierbar gilt, mitamplifiziert. Die Expression der GAPDH stellte die interne Bezugsgröße für die GSTM2-Expression dar. Zur Amplifikation wurden spezifische Intron-überspannende Primer verwendet (Tabelle 13). Die Primersequenzen basierten auf den mRNA Sequenzen der NCBI Nukleotidsequenz-Datenbank für GSTM2 (NM_000848) und GAPDH (J04038). Die amplifizierte Sequenz für GSTM2, welche von Exon 5 bis Exon 8 reichte, hatte eine Größe von 508 bp. Die Produktgröße der auf Exon 7 und Exon 8 liegenden GAPDH-Primer war 452 bp. Im Vergleich dazu wären die Amplikons der genomischen DNA für GSTM2 5478 bp und für GAPDH 555 bp lang.

Tabelle 13: Primersequenzen für GSTM2 und GAPDH

<i>Primer forward</i>	T_H (°C)	<i>Sequenz [5'-...-3']</i>	<i>Primer revers</i>	T_H (°C)	<i>Sequenz [5'-...-3']</i>
GSTM2	55	ggg aat cag aaa agg agc ag	GSTM2	55	cag gag aaa gga acg agg ag
GAPDH	55	acc aca gtc cat gcc atc ac	GAPDH	55	tcc acc acc cgt ttg ctg tag

T_H = Hybridisierungstemperatur

Zur Vermeidung von unterschiedlichen cDNA-Konzentrationen bei der Amplifizierung des Zielgens (GSTM2) und des Kontrollgens (GAPDH) einer Probe wurden die PCR-Ansätze für die quantitative PCR, wie in Tabelle 14 dargestellt, pipettiert.

Tabelle 14: Reaktionsansätze der PCR für GSTM2 und GAPDH

Kontroll-PCR	GAPDH	Quantitative PCR	GAPDH	GSTM2
	1 Ansatz		1 Ansatz	
H ₂ O bidest	16,8 µl	H ₂ O bidest	44,25 µl	
PCR-Puffer (10x)	2,5 µl	PCR-Puffer (10x)	7,5 µl	
dNTP-Mix (2,5 mM/dNTP)	2,5 µl	dNTP-Mix (2,5 mM/dNTP)	7,5 µl	
Taq-Polymerase [5 U/µl]	0,2 µl	Taq-Polymerase [5 U/µl]	0,75 µl	
GAPDH for./rev. (5 pmol/µl)	je 1 µl			
<i>Mastermix-Aliquote</i>	24 µl	<i>Mastermix-Aliquote</i>	60 µl	
RNA(DNAseVerdau)/c-DNA	1 µl	c-DNA	7,5 µl	
		<i>Aufteilung des Ansatzes</i>	45 µl	22,5 µl
		GAPDH for./rev. (5 pmol/µl)	je 2,5 µl	-
		GSTM2 for./rev. (10 pmol/µl)	-	je 1,25 µl
<i>Gesamtvolumen je Ansatz</i>	25 µl	<i>Gesamtvolumen je Ansatz</i>	50 µl	25 µl

Dazu wurde ein Mastermix ohne Primer hergestellt. Nach Zugabe der cDNA zum Mastermix wurde der Ansatz geteilt, die entsprechenden Primerpaare zugegeben und jedes Aliquot mit 25 µl Mineralöl überschichtet.

Die PCR wurde unter folgenden Bedingungen (Tabelle 15) durchgeführt, wobei die cDNA für GAPDH 28 Zyklen und für GSTM2 41 Zyklen amplifiziert wurde:

Tabelle 15: PCR-Bedingungen für GSTM2 und GAPDH

<i>PCR-Schritte</i>			<i>Anzahl der Zyklen</i>	
Heizdeckeltemperatur	105 °C		Kontroll-PCR (GAPDH)	41
Einmalige Denaturierung	95 °C	5 min	Quantitative RT-PCR (GAPDH)	28
Denaturierung	95 °C	15 s		
Hybridisierung	55 °C	30 s	Quantitative RT-PCR (GSTM2)	41
Polymerisation	72 °C	60 s		

Die Anzahl der PCR-Zyklen wurde so gewählt, dass die Amplifikation im exponentiellen Bereich stattfand. Die Kalibrierung der Zyklenanzahl wurde in Vorversuchen unter identischen Bedingungen für GAPDH (15-41 Zyklen) und GSTM2 (35-41 Zyklen) durchgeführt (s. Ergebnisse 4.2.3.1).

Zur Überprüfung des Erfolgs des DNase-Verdau und der reversen Transkription wurden jeweils Kontroll-PCRs mit GAPDH unter den in und Tabelle 15 aufgelisteten Bedingungen den Untersuchungen zur Quantifizierung der GSTM2 Expression vorangestellt.

3.2.3.2.6 Gelelektrophorese, Färbung und semi-quantitative Auswertung der RT-PCR

Die Agarose-Gelelektrophorese und Ethidiumbromid-Färbung der DNA sowie die fluoreszenzphotometrische Auswertung der Gele mit dem BioRad-Multimanagers wurden, wie bereits im Abschnitt 3.2.3.1.4 beschrieben, durchgeführt. Zur Auswertung der quantitativen RT-PCR wurde für jede Probe der Quotient aus der GSTM2-Bande (nach 41 Zyklen) und der dazugehörigen GAPDH-Bande (nach 28 Zyklen) gebildet sowie für die Berechnung des Induktionsfaktors der Quotient der Kontrolle auf 100 % festgelegt und mit der Behandlung ins Verhältnis gesetzt. Für die Vermessung der Banden wurde das „Band Analysis Tool“ des Programms Quantity OneTM benutzt. Als Auswertungsparameter wurde die „Trace Quantity“ gewählt (s. 3.2.2.4.3).

3.2.4 Genotoxizitätstest

3.2.4.1 Einzelzellmikrogelelektrophorese (Comet-Assay)

Der Einfluss des GST-Status auf die Genotoxizität von CDNB und HNE wurde mit der Einzelzellmikrogelelektrophorese unter alkalischen Bedingungen nach SINGH ET AL. untersucht [SINGH et al. 1988]. Mit dieser Methode ist es möglich, sowohl Einzel- und Doppelstrangbrüche als auch alkalilabile Stellen, Cross Links und Excisions-Reparatur-Stellen in der DNA einzelner Zellen nachzuweisen. Das Prinzip beruht auf der Migration der im elektrischen Feld schneller wandernden geschädigten DNA aus der Kern-DNA, welche nach Anfärbung als Cometenschweif sichtbar wird.

Nach der Zellernte und Zellzahlbestimmung wurden die Zellen im Zellkulturmedium bzw. RPMI resuspendiert und mit den in absolutem Ethanol gelösten Testsubstanzen bei 37 °C unter leichtem Schütteln und vor Licht geschützt inkubiert (s. Tabelle 16). Für jede Testkonzentration sowie für das jeweilige Inkubationsmedium und die höchste Ethanolkonzentration (für CDNB 1 % und für HNE 3,1 % (v/v) Ethanol) als Kontrollen wurde jeweils 1 Aliquot mit 0,5 - 1 x 10⁶ Zellen angesetzt.

Tabelle 16: Inkubationsbedingungen der Testsubstanzen im Comet-Assay

<i>Substanz</i>	<i>Stammlösung</i>	<i>Testkonzentrationen</i>	<i>Inkubations-Medium</i>	<i>Inkubationszeit</i>
CDNB	20 mM	25, 37,5, 50, 62,5 µM	Zellkulturmedium	15 min
HNE	6,4 mM	100, 150, 200 µM	RPMI	30 min

Nach Beendigung der Inkubation wurden die Zellen abzentrifugiert (5 min, 400 g, RT), in PBS gewaschen und 20 µl Suspension für die Vitalitätsbestimmung entnommen. Nach erneutem Abzentrifugieren der Zellen wurden diese in 0,7 prozentiger Low-Melting-Agarose (LMA; 37 °C) aufgenommen, auf zweifach mit Normal-Melting-Agarose vorbeschichteten Objektträgern (OT) je Probe dreifach aufgetragen und durch eine vierte abschließende LMA-Schicht vollständig in Agarose eingebettet, wobei nach jeder Agaroseschicht die OT mit Deckglas versehen auf Eis gekühlt wurden. Nach Verfestigung der Agarose wurden die OT ohne Deckglas für mindestens 1 h in einer alkalischen Lyselösung (pH > 13) bei 4 °C aufbewahrt. Für das „alkaline unwinding“ der DNA und die Umwandlung alkalilabiler Stellen in Einzelstrangbrüche wurden die OT nach der Lyse 20 min im Elektrophoresepuffer (pH 13) inkubiert und anschließend zur Migration der DNA einer Elektrophorese bei 25 V und 300 mA für 20 min unterzogen. Danach wurden die OT mit Neutralisationspuffer behandelt, abschließend mit Ethidiumbromid angefärbt und bis zu ihrer Vermessung (1-5 Tage nach dem

Versuch) bei 4°C feucht gelagert. Die fluoreszenzmikroskopische Auswertung der DNA-Schäden erfolgte mit Unterstützung des Bildauswertesystems COMET ASSAY II 1.03 (Perceptive Instruments), wobei für jede Konzentration die DNA von 150 Zellen (je OT 50 Zellen als Dreifachbestimmung) vermessen und die Messwerte gemittelt wurden. Als Auswertungsparameter wurde die „Tail Intensity“ (TI) gewählt, welche den prozentualen Anteil der Fluoreszenz im Kometenschweif darstellt. Kern-DNA mit einer TI > 6 wurde als geschädigt bewertet.

3.2.5 Statistik

Für die statistische Auswertung der Daten wurde die Graph Pad Prism Software (Version 2.01, San Diego, USA) verwendet. Die Ergebnisse der Inkubationsversuche sind als Mittelwert \pm Standardabweichung (MW \pm SD) von mindestens 3 unabhängigen Versuchen angegeben. Darüber hinaus wurden für die Bestimmungen der GST-Aktivität in den Kolontumorzelllinien und für die Untersuchungen mittels Comet-Assay in jedem Versuch 3 parallele Ansätze durchgeführt, deren Mittelwert die Grundlage für die einzelnen Versuche bildete. Die statistische Analyse erfolgte mittels zweiseitigem ungepaarten bzw. gepaarten *t*-Test sowie one-way ANOVA mit Posttests von Dunnet bzw. von Tukey (Vergleich der Messwerte der Behandlung mit denen der Kontrolle bzw. Vergleich aller Werte untereinander). Die Berechnung der Variationskoeffizienten wurde mit der deskriptiven Statistik (Column statistics) durchgeführt. Die verwendeten Analysemethoden sind im Ergebnis der jeweiligen Untersuchung angegeben. Als statistisch signifikant wurden Analysen mit $p < 0,05$ bewertet.

4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

4.1 Glutathion *S*-Transferasen Status in Kolontumorzelllinien und humanen Kolonzellen

Für die Untersuchungen zur Beeinflussbarkeit des Glutathion *S*-Transferasen-Status von Kolonzellen wurden im ersten Teil der Arbeit die basalen Konzentrationen der cytosolischen Glutathion *S*-Transferasen auf Proteinebene, die GST-Gesamtaktivität sowie der cytosolische Proteingehalt der Zellen bestimmt. Die Erfassung der Basalwerte wurde an makroskopisch gesundem Kolongewebe von 15 verschiedenen Patienten durchgeführt (s. 3.1.1.2). Da es keine Primärkulturen intestinaler Schleimhautzellen gibt, wurden zwei Kolonkarzinomzelllinien für die Durchführung der Inkubationen zum Screening der Testsubstanzen in die Untersuchungen einbezogen. Die aus einem humanen Kolontumor stammende Zelllinie HT29 und sein mit Butyrat ausdifferenzierter Klon 19A wurden, basierend auf ihrem unterschiedlichen Transformationsgrad, als Zellmodell für vergleichende Untersuchungen hinsichtlich der Modulierbarkeit ihres GST-Status ausgewählt. Des Weiteren wurde der GST-Status von zwei Fibroblastenkulturen bestimmt, welche aus dem Kolongewebe von zwei weiteren Patienten stammten.

4.1.1 *Cytosolischer Proteingehalt*

Der cytosolische Proteingehalt stellte neben der Zellzahl eine weitere Bezugsgröße für die Ergebnisse der biochemischen und immunologischen Untersuchungen dar. Er diente zur Ermittlung der spezifischen Aktivität der GST sowie zur Quantifizierung der Proteinkonzentration der GST-Isoenzyme bezüglich des Gesamtproteins. Des Weiteren konnte durch den Bezug des Proteingehalts auf die Zellzahl der Einfluss der Testsubstanzen auf das zelluläre Protein untersucht werden.

Wegen ihrer geringen Wechselwirkungen mit Störsubstanzen, wie z. B. EDTA, und ihrer ausreichend hohen Sensitivität wurde die Methode nach BRADFORD für die Bestimmung gewählt. Die ermittelten Proteinkonzentrationen wurden jeweils auf eine Million Zellen bezogen, wie in Tabelle 17 dargestellt. Die Proteingehalte der Tumorzelllinien (HT29, HT29 Klon 19A) und der primären Kolonzellen waren vergleichbar hoch. Dagegen hatten die wesentlich größeren Fibroblasten einen etwa 3,5fach (Kultur 1) bzw. 6,5fach (Kultur 2) höheren Proteingehalt im Vergleich zu den Kolonozyten.

4.1.2 Gesamtaktivität der Glutathion S-Transferasen

Die Aktivität der Glutathion S-Transferasen wurde nach der Methode von HABIG ET AL. (1974) mit 1-Chlor-2,4-dinitrobenzol (CDNB) als Substrat bestimmt. Gegenüber CDNB, als unspezifisches Modellsubstrat, weisen die Isoenzyme der GST-Klassen α , μ und π unterschiedlich hohe Aktivitäten auf, während die Isoenzyme der GST-Klasse θ keine Affinität gegenüber CDNB besitzen [EATON & BAMMLER 1999].

Die Ergebnisse der Aktivitätsbestimmung wurden jeweils auf Zellzahl und Gesamtprotein bezogen (Tabelle 17). Die HT29 und HT29 Klon 19A Zellen hatten im Vergleich zu den primären Kolonzellen deutlich höhere Aktivitäten, die auf Zellzahlebene etwa 150 % und auf Proteinebene ca. 200 % der Primärzellaktivität betragen. Im Gegensatz dazu waren die spezifischen Aktivitäten der Fibroblasten mit jenen der primären Kolonzellen vergleichbar hoch. In Beziehung zur Zellzahl wiesen die Fibroblasten jedoch deutlich höhere Aktivitäten als die Kolonozyten auf.

Tabelle 17: GST-Aktivität und cytosolischer Proteingehalt in humanen Kolonzellen

Zellen	GST Aktivität (nmol x min ⁻¹)		Gesamtprotein (mg)
	10 ⁻⁶ Zellen	mg ⁻¹ Protein	10 ⁻⁶ Zellen
HT29 (n = 38-45)	40 ± 7	319 ± 68	126 ± 27
HT29 Klon 19A (n = 38-43)	39 ± 7	308 ± 61	128 ± 34
Kolonfibroblasten Kultur 1 (n = 3)	58 ± 2	121 ± 11	480 ± 39
Kolonfibroblasten Kultur 2 (n = 5)	145 ± 15	176 ± 41	859 ± 194
Kolonfibroblasten Kultur 1 + 2	102 ± 36	149 ± 22	670 ± 155
Primäre Kolonzellen (n = 10-15)	27 ± 11	159 ± 76	133 ± 74

Angaben als Mittelwert ± Standardabweichung

4.1.3 Proteinexpression der Glutathion S-Transferasen Isoenzyme

Die Konzentration der mittels Western Blot-Technik nachgewiesenen cytosolischen GST-Isoenzyme wurde auf der Basis des cytosolischen Proteingehalts bzw. auf die Zellzahl bezogen berechnet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 18 dargestellt. Für die Bestimmung der basalen GST-Level der Zelllinien HT29 und HT29 Klon 19A sowie der Fibroblastenkulturen wurden Zellen im subkonfluenten Stadium 5 bzw. 10 Tage nach ihrer Aussaat geerntet. Die basalen GST-Konzentrationen der primären Kolonzellen wurden aus frisch aufgearbeiteten Gewebeproben ermittelt.

Tabelle 18: Proteinexpression der GST Isoenzyme in humanen Kolonzellen

Zellen	GST Protein (ng)									
	A1/2		M1		M2		P1		T1	
	10 ⁻⁶ Zellen	mg ⁻¹ Protein	10 ⁻⁶ Zellen	mg ⁻¹ Protein	10 ⁻⁶ Zellen	mg ⁻¹ Protein	10 ⁻⁶ Zellen	mg ⁻¹ Protein	10 ⁻⁶ Zellen	mg ⁻¹ Protein
HT29 (n = 17-19)	1,2 ± 0,3	9 ± 3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	805 ± 252	5768 ± 1344	126 ± 45	912 ± 307
HT29 Klon 19A (n = 19)	1,4 ± 0,5	11 ± 4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	734 ± 209	5555 ± 1245	194 ± 64	1461 ± 413
Kolonfibroblasten Kultur 1 (n = 3)	n.d.	n.d.	217 ± 19	453 ± 4	304 ± 36	637 ± 83	771 ± 73	1609 ± 115	<i>TI*0</i>	<i>TI*0</i>
Kolonfibroblasten Kultur 2 (n = 5)	n.d.	n.d.	<i>MI*0</i>	<i>MI*0</i>	964 ± 283	1108 ± 159	2797 ± 743	3050 ± 406	821 ± 221	992 ± 217
Kolonfibroblasten Kultur 1 + 2	n.d.	n.d.	217	453	634 ± 269	873 ± 236	1784 ± 827	2330 ± 721	821	992
Primäre Kolon- zellen (n = 11-15)	17 ± 15	92 ± 74	62 ± 31	682 ± 371	48 ± 28	427 ± 270	194 ± 90	1885 ± 1167	67 ± 37	541 ± 235
Literaturdaten										
Gesundes Kolongewebe ¹⁾		66 ± 15		281 ± 65		-		1330 ± 170		640 ± 550 ²⁾
Malignes Kolongewebe ¹⁾		29 ± 15		222 ± 57		-		2480 ± 300		507 ± 527 ²⁾

Angaben als MW ± SD; n. d. (nicht detektierbar); - (keine Angaben); *MI*0* und *TI*0* (nachgewiesener Nullpolymorphismus); 1) 24 Patienten [PETERS et al. 1992]; 2) 20 Patienten [DE BRUIN et al. 1999]

Die Zusammensetzung des detektierten GST-Proteins in Bezug auf das Gesamtprotein wurde in der Abbildung 12 (unter Verwendung der Daten aus Tabelle 18) für die untersuchten Zellen zusammengefasst. Die Abbildungen stellen die absoluten Proteinkonzentrationen der detektierten Isoenzyme sowie deren prozentualen Anteil am gesamten detektierten GST-Protein dar.

GSTP1 war in allen Zellen das dominierende Isoenzym, wobei es in den beiden Kolonkarzinomzelllinien am stärksten exprimiert wurde. Es bildete in HT29 und in HT29 Klon 19A mit durchschnittlich 5,8 bzw. 5,6 µg/mg Protein einen Anteil von 86 % bzw. 79 % am gesamten GST-Protein. Dahingegen entsprachen die Konzentrationen der GSTP1 in primären Kolonzellen und Fibroblasten nur ca. 30 – 50 % der GSTP1 in HT29-Zellen. Die GSTA1/2 (GST A1-1, A1-2, A2-2) waren am geringsten exprimiert. Sie wurden in den Kolontumorzelllinien marginal (0,13 – 0,16 % des GST-Proteins) exprimiert und lagen in beiden Fibroblastenkulturen unterhalb des Detektionslimits. Die höchsten Konzentrationen für

GSTA1/2 wurden in den Primärzellen mit durchschnittlich 2,5 % Anteil am GST-Protein gefunden, wobei sie in 9 von insgesamt 11 untersuchten Gewebeproben detektierbar waren. GSTM1 und GSTM2 waren in HT29 und HT29 Klon 19A nicht nachweisbar, obwohl beide Zelllinien für GSTM1 keinen Nullpolymorphismus aufweisen [EBERT et al. 2001; POOL-ZOBEL et al. 1999]. In den Primärzellen und Fibroblasten wurden beide Isoenzyme, sofern keine Nulldeletion für GSTM1 vorhanden war, in beachtlichen Mengen exprimiert. GSTT1 war in allen Zellen, mit Ausnahme der Zellen mit *GSTT1*0* Deletion, mit einem Anteil zwischen 15 – 22 % am GST-Protein detektierbar.

Die Fibroblastenkultur 1 wies für GSTT1 den Nullpolymorphismus auf, während bei Kultur 2 die *GSTM1*0* Deletion nachgewiesen wurde. Die individuelle GST-Expression der Primärzellen – einschließlich der Nullpolymorphismen – wurde in Abschnitt 4.1.3.1 bereits dargestellt.

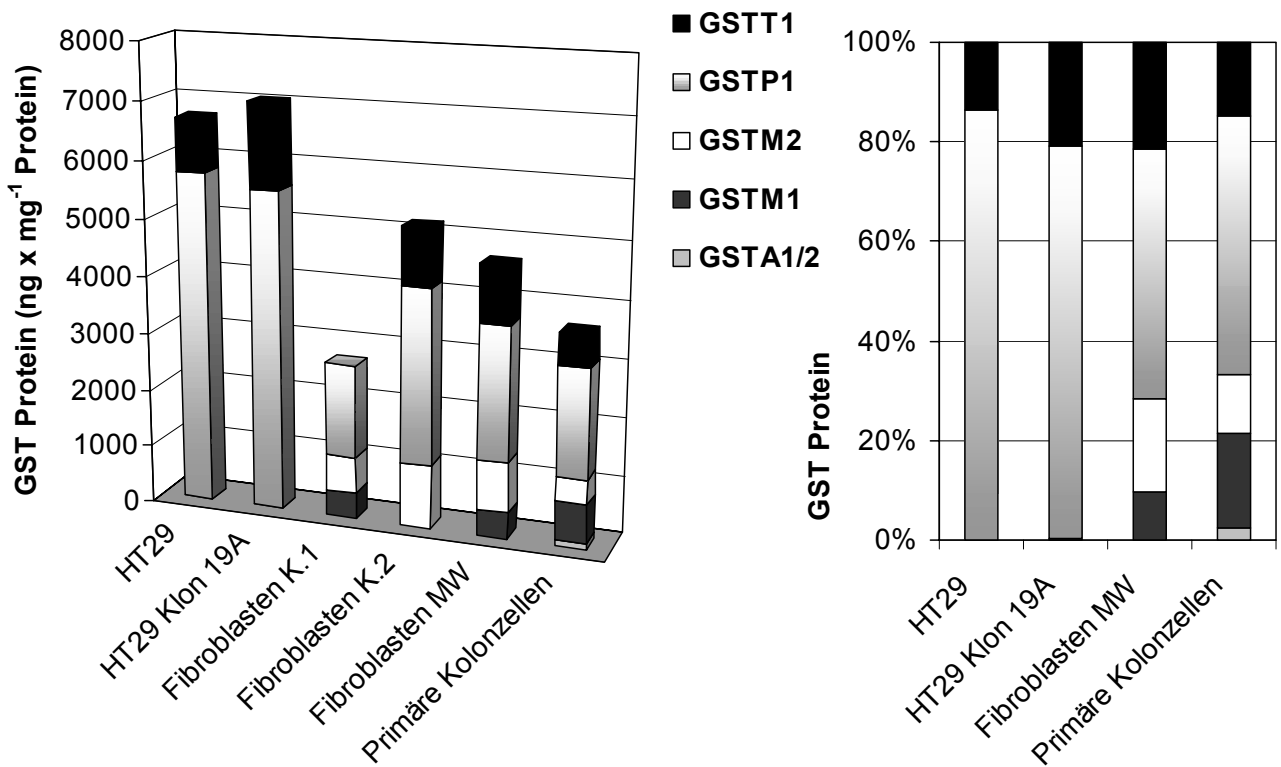


Abbildung 12: Absolute Konzentration (links) und prozentuale Verteilung (rechts) der quantifizierten GST Isoenzyme in humanen Kolonzellen

K. (Kultur); MW (Mittelwert aus Kultur 1 und 2); Daten s. Tabelle 18

In den untersuchten Zellen bildete das detektierte GST-Protein einen für Enzyme erheblichen Anteil am Gesamtprotein. So lag der mittlere Anteil der nachgewiesenen GST-Proteine bei 0,36 - 0,7 %, wobei HT29 und HT29 Klon 19A mit 6,7 µg bzw. 7 µg GST-Protein je mg Gesamtprotein die höchsten Gehalte aufwiesen.

Das GST-Spektrum der Kolonfibroblasten (Mittelwert beider Kulturen) war hinsichtlich Proteinkonzentration und prozentualer Anteile der detektierten Isoenzyme dem der primären Kolonzellen sehr ähnlich (Abbildung 12), was im Hinblick auf Zellmodelle mit kultivierbaren nicht transformierten Zellen von Interesse ist. Im Vergleich dazu waren die Unterschiede zwischen Kolontumorzelllinien und Primärzellen bei der GST-Expression stärker ausgeprägt.

4.1.3.1 Variabilität der Glutathion S-Transferasen-Expression in primären Kolonzellen

Im folgenden Abschnitt wurden die in der Literatur für die Expression der GST beschriebenen interindividuellen Unterschiede [COLES et al. 2000; MULDER et al. 1999] und das Auftreten des *GSTM1* bzw. *GSTT1* Nullgenotyps [STRANGE & FRYER 1999] in den Primärzellen untersucht.

4.1.3.1.1 GSTM1 und GSTT1 Nullpolymorphismen

Die DNA-Analyse bezüglich *GSTM1*- und *GSTT1*-Nullpolymorphismen wurde für die beiden Fibroblastenkulturen und bei allen Primärzellproben, bei welchen kein *GSTM1* bzw. *GSTT1* Protein detektierbar war, durchgeführt. Eine Ausnahme bildeten drei Gewebeproben mit fehlender *GSTM1*-Proteinexpression, bei denen aufgrund von nicht ausreichendem Untersuchungsmaterial keine DNA zur Analyse isoliert werden konnte. Der Nachweis beider Nullpolymorphismen erfolgte mittels Multiplex-PCR in einem PCR-Ansatz. Abbildung 13 zeigt ein repräsentatives PCR-Gel mit jeweils einer Beispielprobe für jeden Deletionstyp.

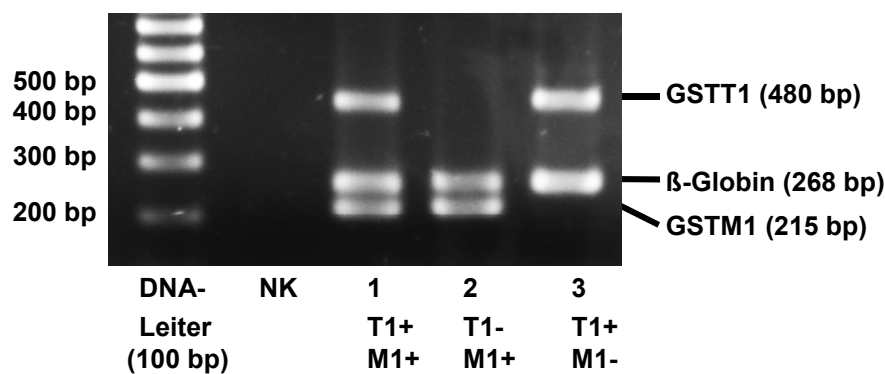


Abbildung 13: Beispielgel für PCR-Analyse zum Nachweis der Gene *GSTM1* und *GSTT1*

Das Gen für β -Globin wurde als interne Kontrolle mitamplifiziert. Als Negativkontrolle (NK) wurde H₂O anstelle der DNA im PCR-Ansatz verwendet. HT29-DNA (Spur 1) mit *GSTM1*- und *GSTT1*-Gen diente als Positivkontrolle. Die Spuren 2 und 3 zeigen die DNA primärer Kolonzellen mit Nullpolymorphismen für *GSTT1* (Spur 2; Patient 3) und *GSTM1* (Spur 3; Patient 8).

Von insgesamt 15 hinsichtlich ihres GST-Isoenzym-Musters untersuchten Primärzellproben, exprimierten sieben kein GSTM1- und zwei kein GSTT1-Protein. In allen mittels PCR untersuchten Proben wurde für das nicht exprimierte Enzym eine Nulldeletion nachgewiesen. Der Nullpolymorphismus war entweder für GSTM1 oder für GSTT1 vorhanden. Es wurde bei keiner der untersuchten Proben eine Nulldeletion beider Gene festgestellt. Die Proben mit fehlender Enzymexpression bzw. mit nachgewiesenem Polymorphismus sind bei der Darstellung der individuellen GST-Muster (Abbildung 14) entsprechend gekennzeichnet.

4.1.3.1.2 Interindividuelle Variation der Proteinexpression der GST-Isoenzyme

Die Untersuchungen zur GST-Expression wurden an primären Kolonzellen von 15 verschiedenen Patienten durchgeführt - mit Ausnahme der GSTA1/2, deren Expression aufgrund von nicht ausreichend verfügbarem Cytosol nur bei 11 Patienten bestimmt werden konnte. Für die Gewebeproben, aus denen die Fibroblasten für Kultur 1 und 2 isoliert wurden (Patient 16 und 17), konnte das GST-Spektrum der Kolonozyten nicht erfasst werden.

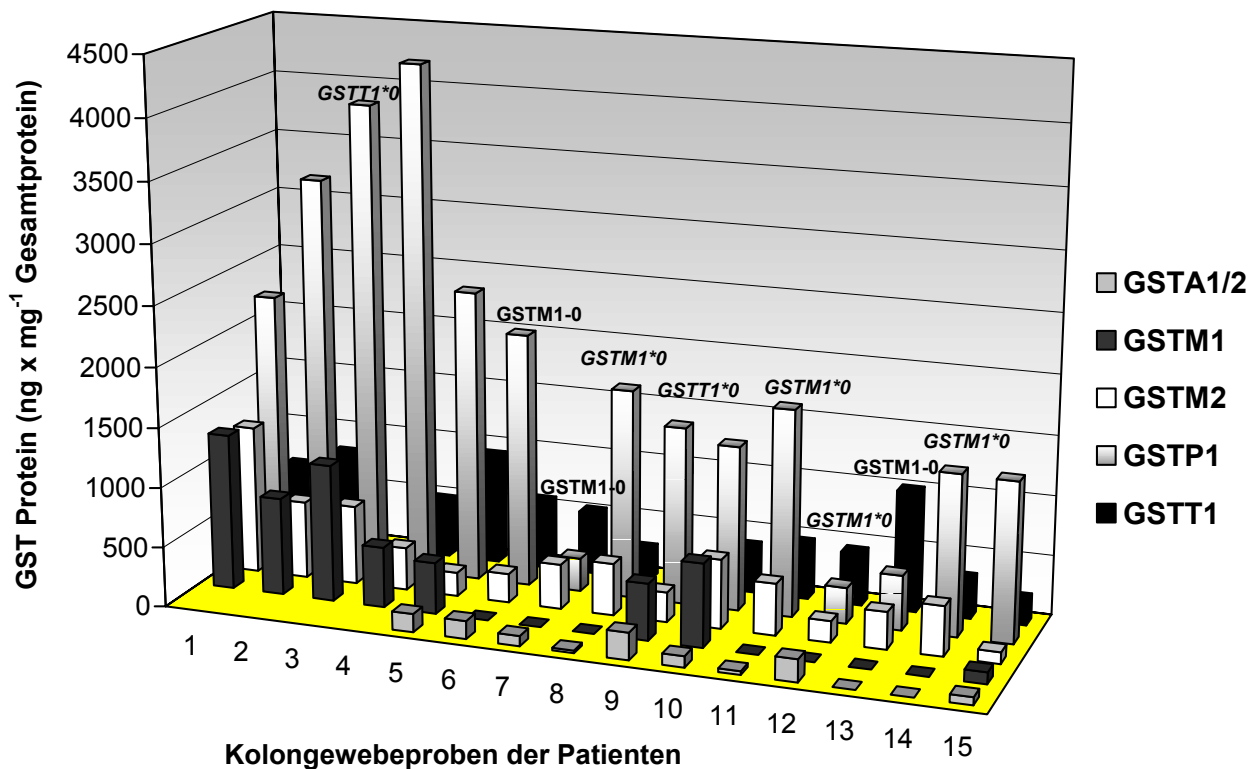


Abbildung 14: Individuelle Expression der GST-Isoenzyme in primären Kolonzellen

Einzeldarstellung der GST- Isoenzyme für 15 Proben; GSTM1-0 (Protein nicht detektierbar, keine DNA-Analyse); *GSTM1*0* bzw. *GSTT1*0* (nachgewiesener Nullpolymorphismus)

In Abbildung 14 und Abbildung 15 sind die GST-Muster der einzelnen Patienten graphisch dargestellt. Die absoluten Werte der GST-Isoenzym-Konzentrationen sowie der GST-Aktivität der Einzelproben sind in Tabelle 26 im Anhang zu finden.

Der GST-Status der Gewebeproben war individuell sehr verschieden. So reichte die Konzentration des gesamten detektierten GST-Proteins von 1,1 µg bis 5,7 µg je mg Gesamtprotein, was einem Unterschied von ca. 500 % zwischen der minimalen und maximalen GST-Konzentration entspricht.

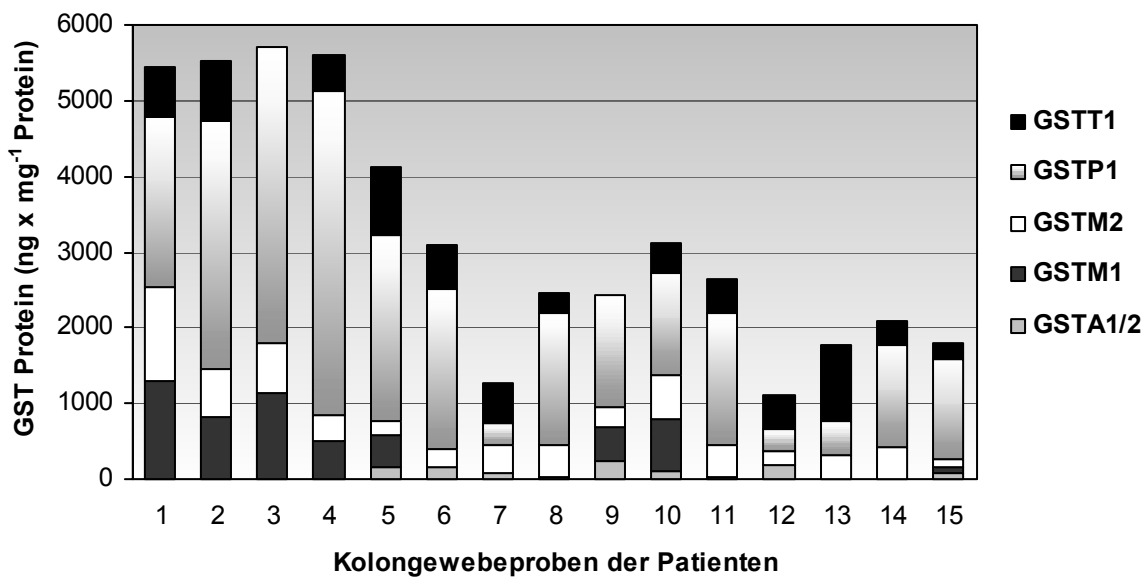


Abbildung 15: Individuelle Konzentration und Zusammensetzung des detektierten GST-Proteins in primären Kolonzellen

Die Spannweite der Proteinkonzentration der einzelnen GST-Isoenzyme, v. a. für GSTP1, (Abbildung 16) sowie deren Anteil am gesamten GST-Protein waren ebenfalls sehr unterschiedlich.

GSTP1, welche die durchschnittlich am stärksten exprimierte GST im Kolon ist, wurde in allen Proben detektiert. Ihre Konzentration reichte von 0,3 µg bis 4,3 µg je mg Gesamtprotein mit einem Anteil von 22 – 76 % des detektierten GST-Proteins. Der GSTP1-Gehalt war im Vergleich zu den übrigen Isoenzymen, zwischen denen es hinsichtlich ihrer Expression keine weiteren signifikanten Unterschiede gab, signifikant höher (Abbildung 16). Eine Ausnahme bildeten drei Proben, in denen GSTT1 das am stärksten exprimierte Isoenzym darstellte, was sich wahrscheinlich auf den geringen GSTP1-Gehalt und dem damit verbundenen geringen GST-Gesamtgehalt der Proben zurückführen lässt.

Für GSTT1 wurde in zwei Proben (das entspricht 13 % der Patienten) eine Nulldeletion des Gens nachgewiesen. In den übrigen Proben wurde GSTT1 mit 0,2 – 1 µg/mg Gesamtprotein exprimiert. Dabei betrug der minimale Anteil des Enzyms am GST-Protein 8 % und der maximale Anteil 56 %.

In ähnlichen Konzentrationen wurden GSTM1 (0,1-1,3 µg/mg) und GSTM2 (0,1-1,2 µg/mg) mit Anteilen - für jedes der beiden Enzyme - zwischen 5 % und 30 % am GST-Protein exprimiert. Der Anteil der Proben mit Nulldeletion für GSTM1 bzw. nicht detektierbarem GSTM1-Protein betrug 47 % (Abbildung 14).

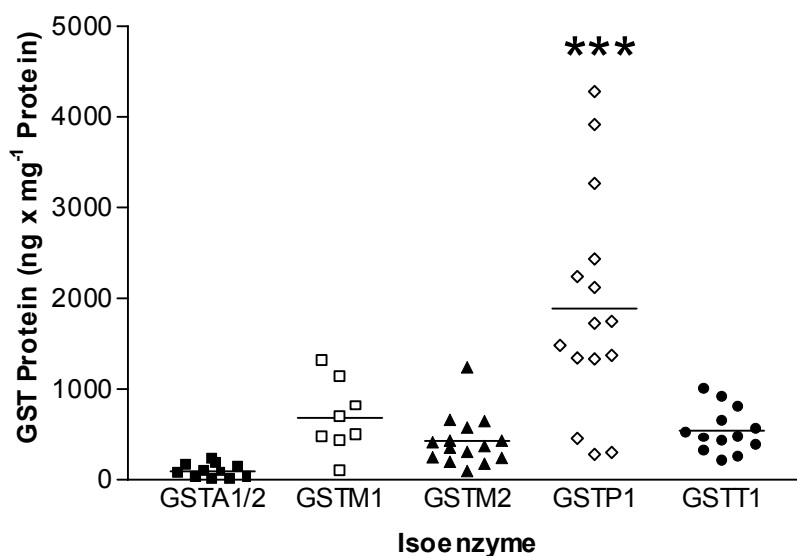


Abbildung 16: Spektrum der GST-Isoenzym-Expression in primären Kolonzellen

(***, $p < 0,001$; one-way ANOVA mit Tukey's Post Test, $n = 8-15$, ohne Einbeziehung der Nullpolymorphismen)

Die GSTA1/2 waren am geringsten exprimiert. Obwohl für GST α keine Nulldeletion bekannt ist, war das Enzymprotein in zwei Proben nicht detektierbar. Die höchste nachgewiesene Konzentration betrug 0,2 µg/mg Gesamtprotein. Der maximale Anteil am GST-Protein lag bei 17 %, wobei der durchschnittliche Anteil der GSTA1/2 $\approx 1 - 6$ % des GST-Proteins ausmachte.

Die interindividuelle Variation der GST-Isoenzyme, in Form der Variationskoeffizienten (in Prozent), zeigt Abbildung 17. Die Variationskoeffizienten der Isoenzyme gaben Aufschluss über die Variabilität der Expression des Enzymproteins zwischen den einzelnen Patienten. Die höchste Variabilität wies die GSTA1/2 auf, welche sowohl bei Bezug des Enzymproteins auf die Zellzahl als auch auf das Gesamtprotein einen deutlich höheren Variationskoeffizienten mit 95 % bzw. 85 % im Vergleich zu den anderen Isoenzymen hatte, deren Koeffizienten zwischen 45 % und 66 % lagen.

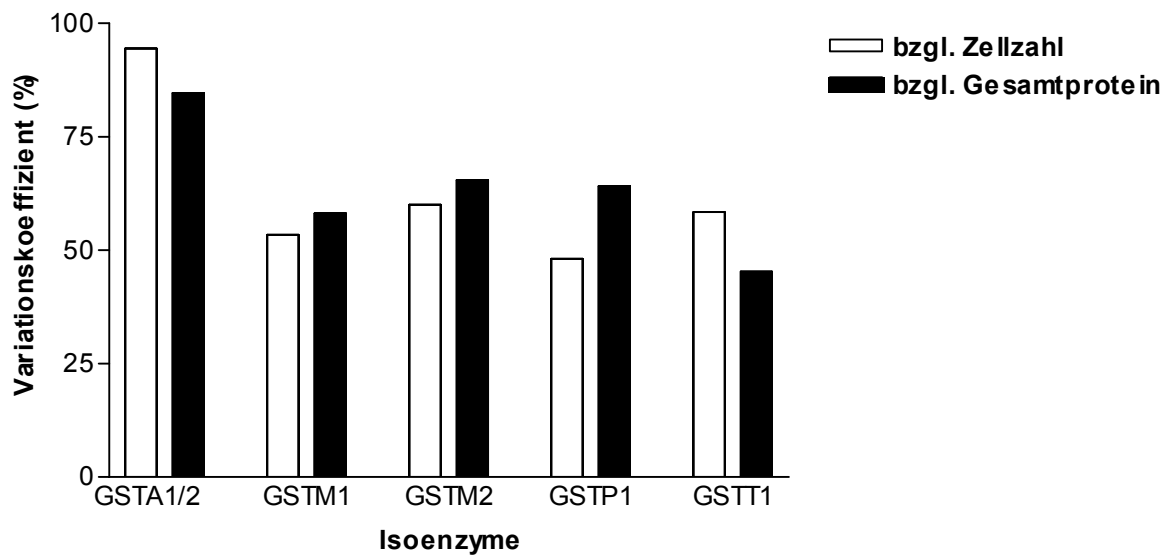


Abbildung 17: Interindividuelle Variation der GST-Isoenzyme in primären Kolonzellen

(Column statistics; n = 8-15, ohne Einbeziehung der Nullpolymorphismen)

4.1.3.1.3 Korrelationen zwischen GST-Isoenzym-Expression und GST-Aktivität

Die Proteinexpression der Isoenzyme wurde gegeneinander korreliert, um zu untersuchen, inwieweit die Expression einzelner Isoenzyme mit der Konzentration anderer Isoenzyme im Zusammenhang stehen und welchen Einfluss sie auf die GST-Gesamtaktivität haben. Die Proben mit Nullpolymorphismen wurden bei den Korrelationen mit GSTM1 und GSTT1 nicht mit einbezogen. Zur Berechnung der Korrelationen für GSTA1/2 und für die GST-Aktivität standen jeweils nur Daten von zehn Proben zur Verfügung.

Aufgrund der relativ kleinen Probenanzahl mit sehr unterschiedlichem Frauen- und Männeranteil (3 Frauen und 10 Männer) waren Bewertungen bezüglich des Geschlechts, des Alters und des Body Mass Indexes nicht möglich. Die Konzentration der GSTP1, als dem am stärksten exprimierten Isoenzym, korrelierte mit keinem der anderen Isoenzyme ($r < 0,5$). Ebenso wurde für die GSTT1-Expression kein Zusammenhang zu den übrigen Isoenzymen gefunden ($r < 0,5$). - Ergebnisse sind nicht dargestellt. - Im Vergleich dazu zeigte sich zwischen der Expression der Glutathion *S*-Transferasen GSTM1 und GSTM2, unter Ausschluss der Proben mit Nullpolymorphismus für GSTM1, eine stark positive Korrelation ($r = 0,93$; Abbildung 18 A). Interessanterweise war jedoch zwischen der Konzentration von GSTM2 und GSTA1/2 - unter Auslassung einer Ausreißerprobe - ein Trend für einen inversen Zusammenhang zu erkennen (Abbildung 18 B). Das gesamte detektierte GST-Protein und das

GSTP1-Protein korrelierten mit der GST-Aktivität ($r = 0,59$ und $r = 0,57$; Abbildung 18 C und D), wobei GSTP1 die höchste Korrelation gegenüber dem GST-Gesamtprotein ($r = 0,92$) aufgrund seiner hohen Expression aufwies. Der relativ niedrige Korrelationskoeffizient zwischen GSTP1 und GST-Aktivität ist sowohl auf die geringe Probenanzahl als auch auf den Anteil der anderen Isoenzyme, insbesondere der GST M1 und M2, an der Gesamtaktivität zurückzuführen. Diese zuletzt genannten Isoenzyme korrelierten ebenfalls mit dem GST-Gesamtprotein (GSTM1: $r = 0,72$ und GSTM2: $r = 0,61$).

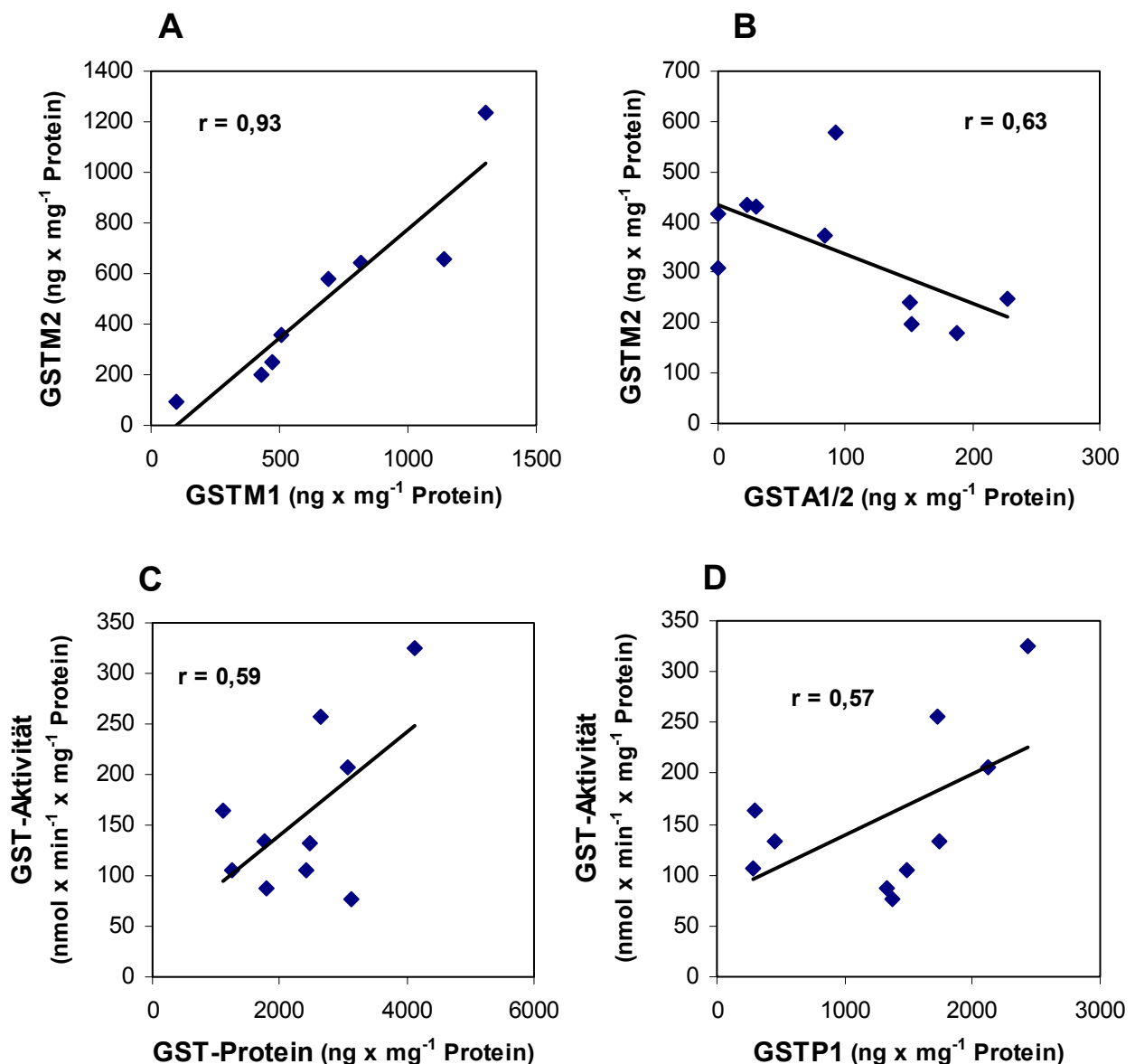


Abbildung 18: Korrelationen zwischen der Expression der GST-Proteine und der GST-Aktivität

A) GSTM1 gegen GSTM2; Proben ohne Nullpolymorphismen. B) GSTA1/2 gegen GSTM2. C) GSTP1 gegen das GST-Gesamtprotein. D) GSTP1 gegen die GST-Gesamtaktivität. r (Korrelationskoeffizient nach Pearson)

Zusammenfassend wurde gezeigt, dass es große interindividuelle Unterschiede in der GST-Expression im Kolon gibt. Hinsichtlich des Enzymspektrums der GST, mit GSTP1 als dem am stärksten exprimierten und in allen Zellen detektierbaren Isoenzym, waren die untersuchten Primärzellen sowie die Fibroblastenkulturen und Zelllinien miteinander vergleichbar, was die Basis für die sich anschließenden Versuche zur Modulation der GST-Expression bildete.

4.1.4 Diskussion

Die Glutathion *S*-Transferasen bilden ein wichtiges Entgiftungssystem im menschlichen Körper, wobei die Entgiftungskapazität der Zellen entscheidend durch das Spektrum der einzelnen GST-Isoenzyme und die Höhe der Expression beeinflusst wird. Durch hohe GST-Level sind Zellen in der Lage, effektiv exogene und endogen gebildete Karzinogene zu entgiften und somit das Gewebe vor DNA-Schäden zu schützen [HAYES & PULFORD 1995; KETTERER 1998]. Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurde der GST-Status in Kolonzellen hinsichtlich der Proteinexpression der GST-Isoenzyme und der GST-Aktivität erfasst. Die Untersuchungen, die vergleichend an primären Kolonzellen, Kolonfibroblasten und Kolonkarzinomzelllinien durchgeführt wurden, hatten zum Ziel, die Zellen hinsichtlich ihres GST-Status zu charakterisieren.

Bei der Bewertung des GST-Status der Zellen muss berücksichtigt werden, dass die Angaben der primären Kolonzellen die mittlere Konzentration bzw. Aktivität der aufgearbeiteten Zellen, welche verschiedene Zelltypen unterschiedlichen Differenzierungsgrads beinhalten, darstellen. So besteht das Kolonepithel sowohl aus sezernierenden (Becherzellen, Panethschen Körnerzellen, basalgekörnten Zellen) als auch aus resorbierenden Epithelzellen (Saumzellen, Enterozyten), welche aus den am Grund der Lieberkühn'schen Krypten lokalisierten undifferenzierten Stammzellen gebildet und anschließend ausdifferenziert werden. Während dieses Prozesses werden sie durch die kontinuierliche Neubildung von Zellen am Kryptengrund langsam zur Kryptenoberfläche geschoben. In Abhängigkeit von ihrem Differenzierungsgrad scheinen die Zellen eine unterschiedlich starke GST-Expression aufzuweisen. So wies MOORGHEN ET AL. GST π in Epithelzellen im tieferen Bereich der Krypten jedoch nicht an der Kryptenoberfläche immunohistochemisch nach [MOORGHEN et al. 1991]. Des Weiteren wurden bei der Isolierung von Epithelstreifen der Kolonproben auch anteilig das die Krypten umgebende Bindegewebe mit isoliert, wodurch in den Primärzellproben neben Kolonozyten in geringem Ausmaß auch Fibroblasten und Erythrozyten aufgearbeitet wurden. Im Gegensatz dazu stellen die Ergebnisse der Zelllinien HT29 und HT29 Klon 19A, welche undifferenzierte Kolonozyten der Kryptenregion simulieren, sowie der aus dem umgebenden Bindegewebe des Kolonepithels isolierten Fibroblastenkulturen den GST-Status jeweils einer Zellart dar.

Für den Vergleich der Basalwerte mit Daten aus der Literatur wurden diese, wenn nicht als bezüglich der Zellzahl gekennzeichnet, auf den cytosolischen Proteingehalt bezogen.

4.1.4.1 GST-Expression in transformierten und normalen Kolonzellen

Das in der Literatur für das Kolon beschriebene GST-Muster, bei der GST π das hauptsächlich exprimierte Isoenzym darstellt und GST α und μ in geringerem Ausmaß vorhanden sind [AWASTHI et al. 1994], wurde in allen untersuchten Zellen bestätigt. Die höchsten GSTP1-Gehalte wiesen die Kolonkarzinomzelllinien HT29 und HT29 Klon 19A mit ca. 2,4 – 3fach höheren Konzentrationen im Vergleich zum durchschnittlichen GSTP1-Gehalt der Primärzellen und Fibroblastenkulturen auf. Dahingegen waren die in den Primärzellen und Fibroblasten gut exprimierten Isoenzyme der GST-Klasse μ (GSTM1 und GSTM2) in den Kolonkarzinomzelllinien nicht detektierbar. Die ebenfalls im überwiegenden Teil der Primärzellproben exprimierte GST α (GSTA1 und GSTA2) war in beiden Zelllinien nur marginal nachweisbar. Ähnliche Ergebnisse für das GST-Muster der HT29-Zellen fand Beaumont et al., der GST α jedoch nicht immunobiochemisch detektieren konnte [BEAUMONT et al. 1998]. Die Hochregulierung der GST π - Expression im Kolonkarzinomgewebe auf Kosten der GST α und μ , deren Expression herabreguliert wurde, zeigte PETERS ET AL. im Vergleich zu gesundem Kolongewebe derselben Patienten [PETERS et al. 1992]. Die zusammengefassten Originaldaten der Studie sind in Tabelle 18 aufgeführt.

Die GSTT1, ein Isoenzym GST θ - Klasse, welche ebenfalls im Darm exprimiert wird [JURONEN et al. 1996b], bildete in HT29 und HT29 Klon 19A das am zweitstärksten exprimierte Isoenzym. In den primären Kolonzellen und Fibroblasten rangierte GSTT1 mit GSTM1 und GSTM2 ebenfalls an zweiter Stelle nach GSTP1. Verglichen mit den Primärzellen war der GSTT1-Gehalt in den HT29 und HT29 Klon 19A 1,7 bzw. 2,7fach höher. Die Fibroblastenkultur 2 hatte mit HT29 vergleichbar hohe Werte, während die Kultur 1 für GSTT1 eine Nulldeletion aufwies. Die Differenz in Bezug auf die Primärzellen ist wahrscheinlich auf die interindividuell sehr unterschiedliche Expression der GSTT1 zurückzuführen, was DE BRUIN ET AL. für die GST θ - Expression in Kolongewebeproben demonstrierte [DE BRUIN et al. 1999]. Die Studie von DE BRUIN, in welcher die Konzentration von GSTT1-1 und GSTT2-2 in normalem und karzinogenem Gewebe des Magens und Kolons untersucht wurde, zeigte, dass die Expression der GST θ in Kolontumoren unverändert hoch ist, während sie in Magentumoren im Vergleich zum normalen Gewebe erniedrigt war.

Die erhöhte GST-Gesamtaktivität der Tumorzelllinien, welche in den HT29 und HT29 Klon 19A etwa doppelt so hoch war wie die durchschnittliche Aktivität der Primärzellen, lässt sich über die Expressionshöhe der einzelnen Isoenzyme und deren Substratspezifität erklären. So besitzen gegenüber CDNB - mit Ausnahme der GST θ - fast alle Isoenzyme eine Affinität.

Allerdings unterscheiden sich die spezifischen Aktivitäten der Isoenzyme teilweise stark voneinander. So weist die GSTM2-2 (276 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ Protein) die höchste spezifische Aktivität gegenüber CDNB auf, während z. B. die GSTA4-4 (12,5 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ Protein) nur eine sehr geringe Affinität zu diesem Substrat hat [HAYES & PULFORD 1995]. Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten GSTs wiesen moderate Aktivitäten (GSTA1, GSTA2, GSTP1: $\approx 80\text{-}100$ $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ Protein) bzw. hohe Aktivitäten (GSTM1, GSTM2: $\approx 160\text{-}280$ $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ Protein) gegen CDNB auf [EATON & BAMMLER 1999; HAYES & PULFORD 1995]. GSTT1 war gegenüber CDNB inaktiv. Aufgrund des GST-Spektrums der beiden Kolontumorzelllinien ist deren erhöhte GST-Gesamtaktivität fast ausschließlich auf den hohen GSTP1-Gehalt der Zellen zurückzuführen. PETERS ET AL. fand in den Kolontumoren ebenfalls signifikant erhöhte GST-Aktivitäten (ca.1,4fach), wobei die GST π in allen Gewebeproben die vorrangige GST darstellte [PETERS et al. 1989; PETERS et al. 1992].

Die Überexpression der GSTP1 im Kolonkarzinomgewebe bei gleichzeitig erhöhter GST-Gesamtaktivität wurde von weiteren Autoren beschrieben. So wies MOORGHEN ET AL. mittels Western Blotting eine Erhöhung der GST π -Expression und der GST-Aktivität bei der Untersuchung von 10 Gewebeproben von kolorektalen Tumoren jeweils gepaart mit Proben des angrenzenden nicht erkrankten Gewebes nach [MOORGHEN et al. 1991]. HENGSTLER ET AL. fand bei ähnlichen Untersuchungen im Kolon für GST α und GST π erhöhte Proteinlevel im Tumorgewebe bei 12 bzw. 16 von insgesamt 23 Patienten, was einem Anteil von ca.50 bzw. 70 % der Patienten entspricht [HENGSTLER et al. 1998]. Die Unterschiede der mittleren GST-Konzentration zwischen normalem und tumorartigem Gewebe in dieser Studie waren sowohl für GST α als auch für GST π signifikant (GST α : 0,0 versus 0,4 $\mu\text{g}/\text{mg}$ Protein; GST π : 8,1 versus 15,1 $\mu\text{g}/\text{mg}$ Protein). Im Vergleich zu den HT29 Zellen und den Primärzellen waren die GST-Konzentrationen für GST π bei HENGSTLER ET AL. wesentlich höher, was u. a. an der Spezifität der verwendeten Antikörper, der zur Quantifizierung verwendeten Proteinstandards und der Methode zur Proteinbestimmung liegen kann. Die erhöhten GST α -Level im Tumorgewebe, welche im Widerspruch zu den Ergebnissen der HT29-Zellen und den Ergebnissen von PETERS ET AL. stehen [PETERS et al. 1992], könnten mit dem Differenzierungsgrad des untersuchten Tumorgewebes zusammenhängen. So exprimiert die humane Kolonkarzinomzelllinie Caco-2 mit zunehmender Differenzierung der Zellen in Kultur GST α in beachtlichen Mengen [BEAUMONT et al. 1998; PETERS & ROELOFS 1989]. Die Ergebnisse von CLAPPER ET AL. bildeten bezüglich der GST π -Überexpression eine Ausnahme. So wies CLAPPER ET AL. zwar erhöhte GST-Aktivitäten sowie verminderte GST μ - Level im Kolontumorgewebe nach, konnte

jedoch für die GST α und GST π keine veränderte Proteinexpression feststellen [CLAPPER et al. 1991].

Erhöhte GST π -Level bei gleichzeitig herabregulierter GST α -Konzentration und gesteigerter GST-Aktivität wurden auch in Tumoren des Magens beobachtet [PETERS et al. 1990; SCHIPPER et al. 1996]. Ebenso war GST π in verschiedenen anderen Tumorarten, u. a. im Lungenkarzinom [HOWIE et al. 1990], überexprimiert. Eine Ausnahme bildeten Tumore der Prostata, bei denen GSTP1 stark abgesenkt war [SINGAL et al. 2001]. Mit der GSTP1-Überexpression in Tumoren, die eine effektive Metabolisierung von Fremdstoffen, wie z. B. von Cytostatika, ermöglicht, wird deshalb die hohe Chemoresistenz von Tumorzellen assoziiert [HARBOTTLE et al. 2001; NAKAGAWA et al. 1990].

Aufgrund dieser Ergebnisse wird GST π auch als Tumormarker bezeichnet. GST π ist vor allem in Zellen mit hoher Proliferationsrate, wie z. B. den Stammzellen am Kryptengrund, exprimiert, was auch die Ergebnisse von MOORGHEN ET AL. unterstützen [MOORGHEN et al. 1991]. Den von MIYANISHI ET AL. veröffentlichten Ergebnissen zufolge ist die Überexpression der GST π in Tumorgewebe auf Mutationen im K-ras-Gen zurückzuführen, welche über die Aktivierung des AP-1 Faktors die verstärkte Expression des Enzyms bewirken [MIYANISHI et al. 2001; MORSE 2001]. So fand MIYANISHI ET AL. eine erhöhte Proteinexpression von K-ras und GSTP1 in ACF (aberrant crypt foci), Adenomen und Kolonkarzinomen im Vergleich zu normalem Kolongewebe sowie eine Beziehung zwischen erhöhter GSTP1-Expression und Mutationen im K-ras Gen. Im Gegensatz dazu werden die niedrigen GSTP1-Level beim Prostatakarzinom mit der Hemmung der Transkription durch Methylierung des GSTP1-Promotors in Verbindung gebracht [SINGAL et al. 2001].

Die Glutathion *S*-Transferasen gehören zu den wenigen Enzymen, die nennenswerten Anteil am cytosolischen Protein haben, was ihre Bedeutung als wichtige Entgiftungsenzyme im Stoffwechsel der Zellen unterstreicht. In den untersuchten Zellen war der Anteil des detektierten GST-Gesamtproteins am cytosolischen Protein mit ca. 0,7 % in den Zelllinien HT29 und HT29 Klon 19A am höchsten, die im Durchschnitt einen etwa zweimal so hohen GST-Gehalt wie die Primärzellen hatten. Damit hat das Kolon einen vergleichsweise geringen Anteil gegenüber GST-reichen Organen wie der Leber mit 4,8 % und den Hoden mit 7,1 % [ROWE et al. 1997]. Bei den Angaben muss jedoch berücksichtigt werden, dass nicht alle existenten Isoenzyme in die Berechnung einbezogen werden konnten. So wurden in der vorliegenden Arbeit nur die ersten beiden Isoenzyme - nach der Nomenklatur - der GST-Klassen α und μ erfasst, wobei beide Klassen jeweils mehr als zwei Isoenzyme umfassen. Bei den Angaben von ROWE ET AL.

wurde u. a. die Expression der GST Theta, die ebenfalls in beachtlichen Mengen in der Leber exprimiert wird [JURONEN et al. 1996b], nicht mit aufgeführt [ROWE et al. 1997]. Deshalb ist davon auszugehen, dass der Anteil des GST-Proteins am cytosolischen Protein in Wirklichkeit noch etwas höher ausfällt.

Der Vergleich der Expressionsmuster der GST-Isoenzyme in den untersuchten Zellen ergab, dass die beiden Kolonkarzinomzelllinien, HT29 und sein differenzierter Klon 19A, eine nahezu identische Expression und Aktivität der GST aufwiesen. Bis auf die etwas geringere GSTP1-Expression in den HT29 Klon 19A, was auf dem höheren Differenzierungsgrad der Zellen beruhen kann, unterschieden sich die beiden Zelllinien lediglich im GSTT1-Gehalt, der im Klon 19A ca. 1,5fach höher als in den HT29 war. Die Primärzellen hatten hingegen einen wesentlich niedrigeren GSTP1-Gehalt bei stärkerer Expression der GST α und GST μ , was Ergebnisse zur Abnahme von GSTP1 mit zunehmendem Differenzierungsgrad der Zellen [PETERS & ROELOFS 1989] bestätigen. Unterstützt werden die Daten durch Ergebnisse der Diplomarbeit von FESTAG [FESTAG 2002] mit der humanen Adenomzelllinie LT97 [RICHTER et al. 2002]. Diese weist ein ähnliches GST-Muster wie die HT29-Zellen auf, enthält aber aufgrund ihres geringeren Transformationsgrads nur ca. 50 % der GSTP1 ($2,8 \pm 1,3 \mu\text{g}/\text{mg}$ Protein) im Vergleich zu den HT29.

Interessanterweise wiesen die aus dem Kolon stammenden Fibroblasten im Vergleich zu den - hauptsächlich aus Kolonozyten bestehenden - primären Kolonzellen eine sehr ähnliche GST-Expression und Aktivität auf. Lediglich die GSTA1/2 konnte in den Fibroblasten nicht nachgewiesen werden, wofür die Ursache in der zu niedrigen Proteinkonzentration der Cytosole, bedingt durch die geringe Zellausbeute der sehr langsam wachsenden Fibroblasten, liegen könnte. Bezüglich der Zellzahl sind die Ergebnisse aufgrund des Größenunterschieds zwischen den Fibroblasten und Kolonozyten (Fibroblasten: ca. $30 \mu\text{m}$; HT29 Klon 19A: ca. $12 \mu\text{m}$) nicht vergleichbar. Jedoch deuten die Ergebnisse in Bezug auf das cytosolische Protein darauf hin, dass die Fibroblasten ihr GST-Muster wahrscheinlich an das sie umgebende Kolonepithel angepasst haben. Dafür spricht die unterschiedliche GST-Expression der Fibroblasten in verschiedenen Geweben [HANADA et al. 1991; MANNERVIK et al. 1987; MATTEY et al. 1993]. Weiterhin hat der GST-Status der Fibroblasten großen Einfluss auf deren Chemosensitivität gegenüber reaktiven Metaboliten, wie die Studie von CHANG ET AL. anhand der Empfindlichkeit von Mundschleimhautfibroblasten gegenüber Nikotin zeigt [CHANG et al. 2001]. Fibroblasten sind ebenfalls an der menschlichen Immunabwehr, wie der Hochregulierung des hepatischen Wachstumsfaktors im Magen bei Infektionen mit *Helicobacter pylori*, beteiligt [TAKAHASHI et al. 2000]. Im Hinblick auf das Kolon könnte die den Kolonozyten

möglicherweise ähnliche Exposition der Fibroblasten mit aus dem Darmlumen stammenden Substanzen sowie endogen gebildeten Metaboliten die Ursache für die Anpassung der GST-Expression sein. Auf der Grundlage des mit den Kolonozyten annähernd identischen Expressionsmusters wurden die Fibroblasten als Modell für die Untersuchungen an kultivierbaren nicht transformierten Zellen des Kolons eingesetzt.

4.1.4.2 Interindividuelle Variabilität der GST-Isoenzyme im normalen Kolongewebe

Die Daten zur GST-Expression der einzelnen Primärzellproben zeigten große interindividuelle Unterschiede. So variierte der totale GST-Gehalt zwischen den Proben um den Faktor 5. Eine große Variation zeigten auch Ergebnisse von COLES ET AL. mit 7,3fachen Unterschieden in der totalen GST-Expression zwischen Pankreasgewebeproben verschiedener Patienten [COLES et al. 2000].

Die mittlere Expressionshöhe der GST-Isoenzyme in den Primärzellen war – mit Ausnahme der GST μ , die deutlich höher exprimiert wurde, - mit den Werten von PETERS ET AL. und DE BRUIN ET AL. (für GSTT1) sehr gut vergleichbar (Tabelle 18) [DE BRUIN et al. 1999; PETERS et al. 1992]. Beim Vergleich der Expressionswerte muss jedoch berücksichtigt werden, dass neben der Anzahl der untersuchten Gewebeproben auch der Ort der Probennahme im Kolon sowie die Aufarbeitung des Gewebes Einfluss auf die Ergebnisse haben können. So wurde im Unterschied zu den eigenen Untersuchungen, bei welchen die Epithelschicht der Gewebeproben so gut wie möglich separiert wurde, in den oben genannten Studien das gesamte Gewebe einschließlich der Muskelschicht aufgearbeitet. In Bezug auf die unterschiedliche GST-Expression im Darm zeigen zwei weitere Studien eine Abnahme der GST, insbesondere der GST α , vom Dünndarm zum Kolon [COLES et al. 2002; PETERS et al. 1991], was vermuten lässt, dass es auch Unterschiede in der Expression zwischen den einzelnen Abschnitten des Kolons gibt. Die geringe Expression der GSTA1/2, die in zwei Proben nicht detektierbar war, zeigte sich auch in der Studie von HENGSTLER ET AL., der GST α in lediglich 5 von 23 Kolonproben nachweisen konnte [HENGSTLER et al. 1998]. Die von COLES ET AL. beschriebene Korrelation zwischen der Proteinexpression von GSTP1 und GSTM1 im Pankreas [COLES et al. 2000] konnte im Kolon nicht bestätigt werden, wobei die Aussagekraft durch den hohen Anteil der Kolonproben mit *GSTM1**0-Deletion eingeschränkt ist. Ebenso korrelierten im Vergleich zu dieser Studie die wenig exprimierten Enzyme GSTA1/2 nicht mit dem totalen GST-Protein. Dafür scheint es zu der Expression der Enzyme der GST μ -Klasse einen Zusammenhang zu geben, was durch die Ergebnisse von COLES ET AL. bezüglich der Korrelation zwischen GSTM1 und GSTM3 unterstützt wird.

Die interindividuellen Unterschiede waren bei der Expression der am geringsten exprimierten GSTA1/2 am größten, während sich die übrigen gut exprimierten Isoenzyme GST M1, M2 und T1 sowie die am stärksten exprimierte GSTP1 hinsichtlich ihrer Variation nicht deutlich voneinander unterschieden. Eine Ursache für die hohe Variabilität der GSTA1/2 könnte in ihrer geringen z. T. unterhalb der Nachweisgrenze liegenden Expression liegen. In einer von COLES ET AL. veröffentlichten Studie wird die hohe interindividuelle Variabilität der nur gering im Kolon exprimierten GST A1 und A2 bestätigt [COLES et al. 2002]. In einer weiteren Studie zeigte COLES ET AL. für die GST-Expression im Pankreas große interindividuelle Unterschiede auf, wobei die Variation der gut exprimierten Isoenzyme GST P1, A2 und M3 (6-15fach) ebenfalls am kleinsten war [COLES et al. 2000]. Die Variation der weniger stark exprimierten GSTs (GSTM1: 12fach; GST A1 und M2: 17-30fach) lag im mittleren Bereich. Dahingegen war die Variabilität der am geringsten exprimierten Isoenzyme, GST A4 und A5, am größten (50-100fach), was COLES ET AL. als Hinweis auf die hohe Induzierbarkeit dieser Enzyme interpretierte.

Als Ursache für die hohe Variabilität der GSTA1/2 fand COLES ET AL. Polymorphismen im GSTA1-Promotor, die in Abhängigkeit von der Allel-spezifischen Variante eine unterschiedliche GSTA1-Expression in der Leber bewirkten, wobei die Expression der GSTA2 jeweils stark mit dem GSTA1-Protein korrelierte [COLES et al. 2001b]. Weiterhin zeigte ZHU ET AL., dass die in Mäusen natürlich auftretenden mGSTA1-Promotormutanten besser induzierbar sind als der Wildtyp [ZHU et al. 2001]. Der Immunstatus der operierten Patienten scheint ebenfalls Einfluss auf die Expression der GST A1 und A2 zu haben. So beobachtete LANGOUET ET AL. in kultivierten humanen Hepatozyten einen signifikanten Anstieg der beiden Isoenzyme nach Behandlung der Zellen mit Interleukin-4, welches eine zentrale Rolle bei allergischen Prozessen spielt [LANGOUET et al. 1995]. Des Weiteren zeigten Untersuchungen zur Expression der GST α sowohl im Kolon als auch in der Leber geschlechtsspezifische Unterschiede, wobei Männer die GST α im Kolon stärker exprimierten, während Frauen in der Leber die höheren Gehalte aufwiesen [MULDER et al. 1999; SINGHAL et al. 1992]. In der vorliegenden Arbeit war aufgrund des sehr niedrigen Frauenanteils eine Auswertung hinsichtlich geschlechtsspezifischer Unterschiede nicht möglich.

Die Variationsbreite der GST ist auch durch das Auftreten von Deletionspolymorphismen für GSTM1 bzw. GSTT1, die zum Verlust der Proteinexpression dieser Enzyme führen, bedingt. In der europäischen Bevölkerung variiert die Häufigkeit des GSTM1*0 Genotyps zwischen 39 % - 62 % und die des GSTT1*0 Genotyps zwischen 10 %-21 % [COTTON et al. 2000], was sich auch in der Frequenz der untersuchten Kolonproben mit fehlender Proteinexpression für

GSTM1 (47 %) und GSTT1 (13 %) widerspiegelt. Interessanterweise wies keine der untersuchten Proben für beide Gene einen Nullpolymorphismus auf.

Deletionspolymorphismen können bei der Entgiftung von Risikofaktoren eine wichtige Rolle spielen. So zeigen *in vitro* Untersuchungen von SALAMA ET AL., dass die Behandlung mit Benzo[a]pyren, dessen karzinogene Metabolite Substrate der GSTM1 sind, in humanen Lymphozyten mit *GSTM1*-Nullgenotyp zu signifikant höheren Chromsomenaberrationen als beim Wildtyp führt [SALAMA et al. 2001]. Weitere Untersuchungen an humanen Lymphozyten zeigen eine höhere Chemosensitivität der Nullgenotypen gegenüber den Genotoxinen 1,2-Epoxy-3-buten (*GSTM1*0*) und Diepoxybutan (*GSTT1*0*) in Form von verstärktem Auftreten des Austauschs von Schwesterchromatiden [SASIADEK et al. 1999; SCHLADE-BARTUSIAK et al. 2000]. Diese *in vitro* Ergebnisse lassen ein erhöhtes Krebsrisiko für *GSTM1*- und *GSTT1*-Nullgenotypen vermuten, welches in Humanstudien in Bezug auf das Kolonkrebsrisiko jedoch nur teilweise bestätigt wird (Tabelle 19). So hatte der Genotyp in der Hälfte der hier aufgeführten Studien keinen Einfluss auf die Inzidenz des Kolonkarzinoms, während in den übrigen Studien zumindest einer der beiden bzw. in einer Studie sogar beide Nullgenotypen häufiger bei den Krebspatienten auftraten. In Bezug auf die Induktion der GST durch protektive Nahrungsinhaltstoffe wären gerade Träger von Nulldeletionen als Individuen mit wahrscheinlich erhöhter Chemosensitivität und damit erhöhtem Kolonkrebsrisiko interessant, um durch gezielte Induktion anderer Isoenzyme die verminderte Entgiftungskapazität zu kompensieren.

Tabelle 19: Humanstudien zur GSTM1- bzw. GSTT1-Nulldeletion und Kolonkrebs

<i>Angaben aus:</i>	<i>Kolonkrebspatienten/ Kontrollen (Anzahl)</i>	<i>Frequenz der Nulldeletion in Krebspatienten im Vergleich zu Kontrollen</i>	
		<i>GSTM1-0</i>	<i>T1-0</i>
[ZHANG et al. 1999]	99 / 109	erhöht (Tendenz)	signifikant erhöht
[KATOH et al. 1996]	103 / 126	erhöht (Tendenz)	kein Unterschied
[ZHONG et al. 1993]	196 / 225	signifikant erhöht	-
[CHENEVIX-TRENCH et al. 1995]	132 / 200	kein Unterschied	kein Unterschied
[LIN et al. 1995]	446 / 488	kein Unterschied	-
[GERTIG et al. 1998]	212 / 221	kein Unterschied	kein Unterschied
[DEAKIN et al. 1996]	252 / 577	kein Unterschied	signifikant erhöht
[WELFARE et al. 1999]	178 / 178	kein Unterschied	kein Unterschied

- (nicht untersucht)

4.2 Induzierbarkeit der Glutathion S-Transferasen

Aufgrund des Mangels an Primärkulturen von intestinalen Schleimhautzellen (Kolonozyten) wurden zum Screening der Testsubstanzen hinsichtlich ihres GST-modulierenden Potentials die humane Kolontumorzelllinie HT29 und sein differenzierter Klon 19A untersucht. Die Zelllinien wurden im Hinblick auf den Impact der Substanzen in primären Kolonzellen als Modell gewählt, um vergleichende Untersuchungen an Zellen mit unterschiedlichem Transformationsgrad durchführen zu können. Für die Überprüfung der Substanzwirkung an Primärzellen wurde der stärkste Effektor zusätzlich mit primären Kolonepithelstreifen sowie mit zwei aus Kolongewebe isolierten Fibroblastenkulturen, welche als Modell für nicht transformierte Kolonzellen dienten, inkubiert. Die Ergebnisse zur Aktivität und Proteinexpression der GST wurden, um den Einfluss der Testsubstanzen auf den Proteingehalt der Zellen einbeziehen zu können, auf die Zellzahl und das cytosolische Protein bezogen.

4.2.1 Induzierbarkeit der Gesamtaktivität der Glutathion S-Transferasen

4.2.1.1 Einfluss kurzkettiger Fettsäuren auf Glutathion S-Transferasen-Gesamtaktivität

Butyrat, Acetat und Propionat wurden hinsichtlich ihres Einflusses auf die GST-Aktivität untersucht. Dabei zeigte Butyrat die stärksten Effekte. So wurde die GST-Aktivität schon ab 2 mM Butyrat (72 h) signifikant induziert (Abbildung 19). Niedrigere Konzentrationen (0,5 und 1 mM) hatten keine Aktivitätssteigerung zur Folge (Ergebnisse sind nicht dargestellt).

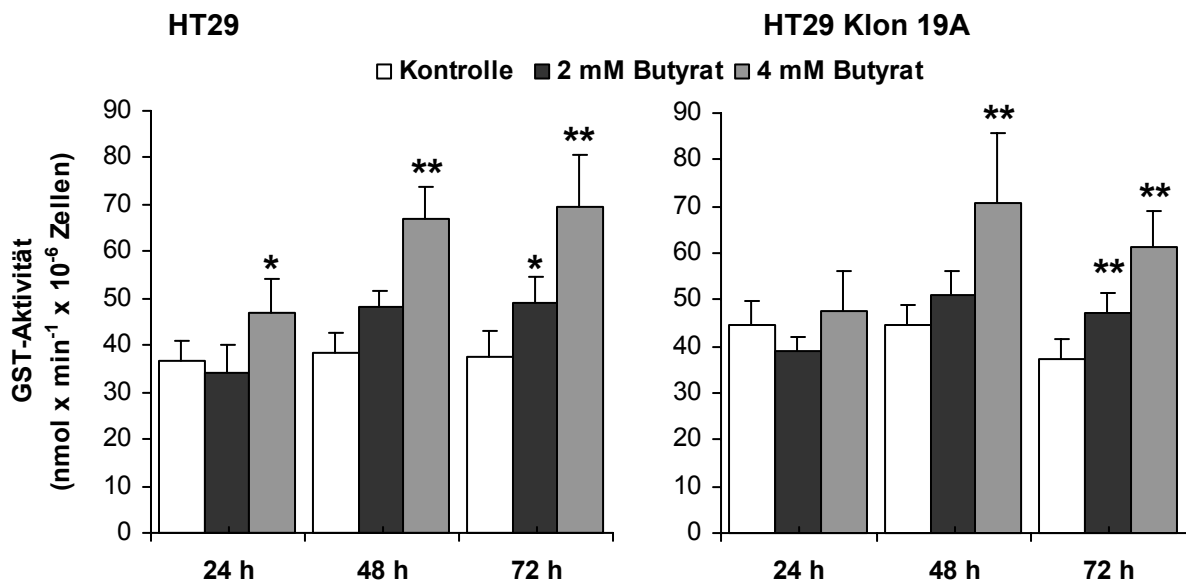


Abbildung 19: Induktion der GST-Aktivität auf der Basis der Zellzahl in HT29 (links) und HT29 Klon 19A (rechts) in Abhängigkeit von der Inkubationszeit mit Butyrat (24-72 h)

MW ± SD (n = 3-8); Behandlung versus Kontrolle: *, p<0,05; **, p<0,01 (one-way ANOVA mit Dunnetts Posttest)

Die stärkste Wirkung hatte 4 mM Butyrat. Es führte schon nach 24 h (HT29) bzw. 48 h (Klon 19A) zur signifikanten Induktion, wobei durch längere Inkubation mit Butyrat die Aktivität nicht weiter gesteigert werden konnte (Abbildung 19 und Abbildung 20). Die Induktionsfaktoren lagen nach 72 h auf Proteinebene (1,4fach; Abbildung 20) deutlich niedriger als bei Bezug der Ergebnisse auf die Zellzahl (1,7-1,9fach; Abbildung 19). Dabei wurde in beiden Zelllinien ein ähnliches Induktionsniveau erreicht.

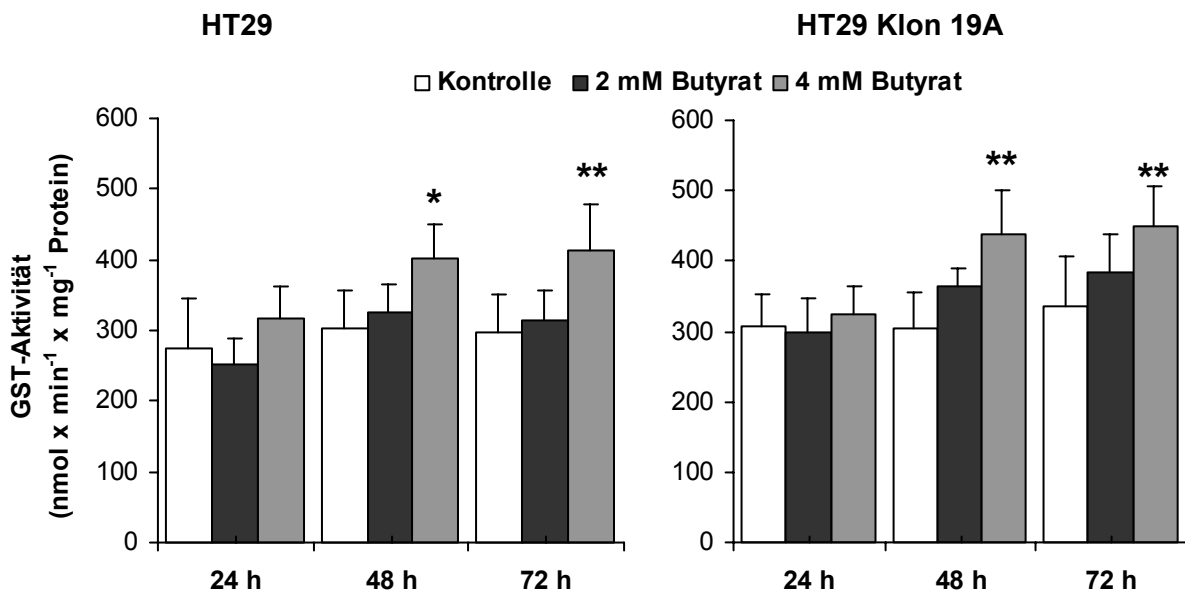


Abbildung 20: Induktion der GST-Aktivität auf der Basis des cytosolischen Proteingehalts in HT29 (links) und HT29 Klon 19A (rechts) in Abhängigkeit von der Inkubationszeit mit Butyrat (24-72 h)

Angaben als MW ± SD (n = 3-8); Behandlung versus Kontrolle: *, p < 0,05; **, p < 0,01 (signifikant in one-way ANOVA mit Dunnetts Posttest)

Im Gegensatz zu Butyrat unterschied sich die Wirkung von Acetat und Propionat in beiden Zelllinien deutlich. So hatten 72 h Inkubation mit Acetat (15 und 30 mM) und Propionat (2,5 und 5 mM) in HT29 keinen signifikanten Effekt auf die GST-Aktivität (Abbildung 21, links). Im Vergleich dazu induzierte 30 und 60 mM Acetat in HT29 Klon 19A die Aktivität signifikant in Bezug auf die Zellzahl (jeweils 1,4fach) jedoch nicht in Bezug auf den cytosolischen Proteingehalt (Abbildung 21, rechts). Am effektivsten von beiden Testsubstanzen wirkte Propionat in HT29 Klon 19A. In diesen Zellen führte Propionat (5 und 10 mM) sowohl auf Zellzahl- als auch auf Proteinebene zu einem signifikanten Aktivitätsanstieg (Abbildung 21, rechts). Dabei wurde die maximale Induktion schon bei 5 mM Propionat erreicht. Wie auch schon bei Butyrat beobachtet, waren die Induktionsfaktoren auf Zellzahlebene (1,6-1,7fach) deutlich höher als in Bezug auf den cytosolischen Proteingehalt (1,3fach).

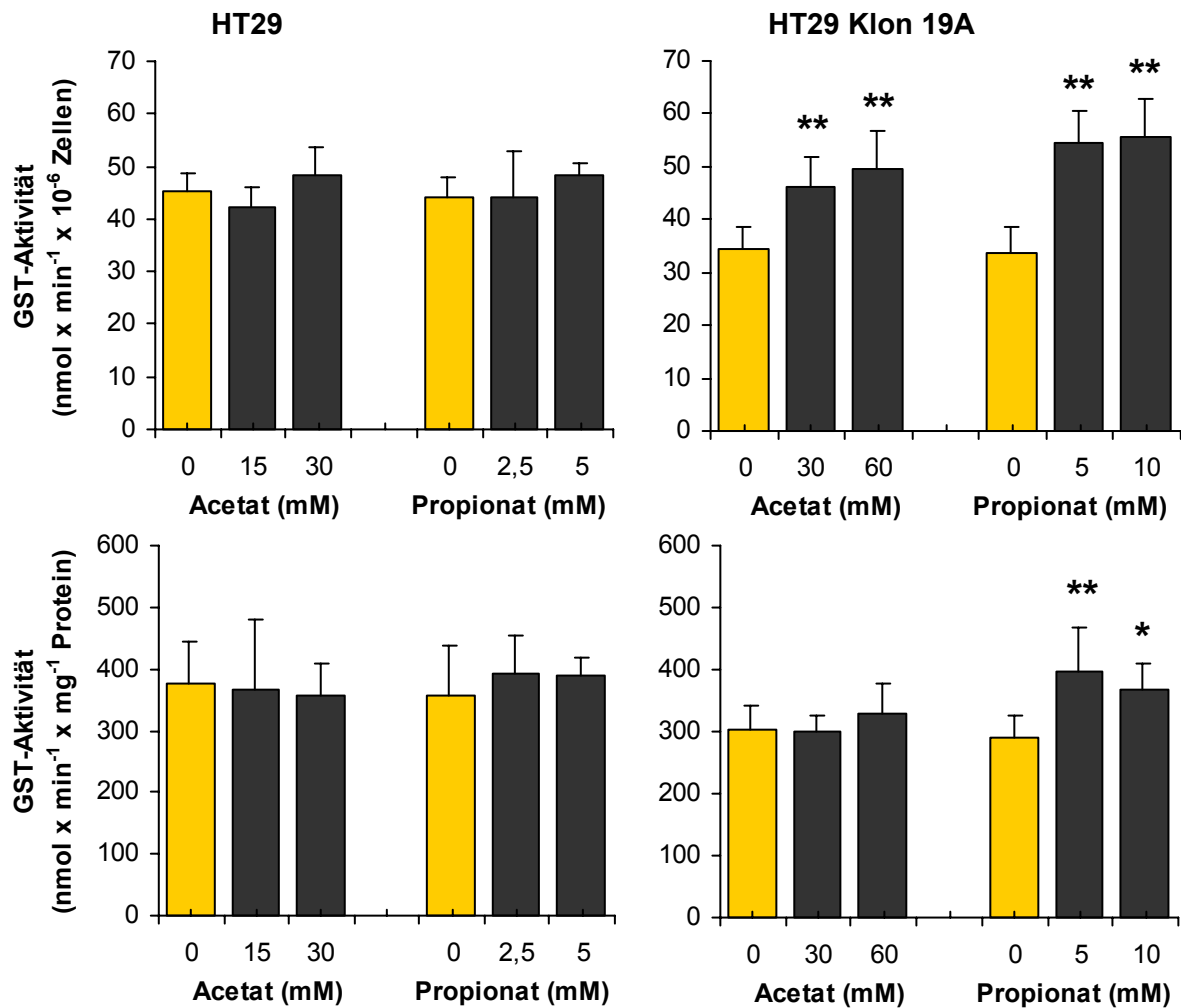


Abbildung 21: Modulation der GST-Aktivität nach 72 h Inkubation mit Acetat und Propionat in HT29 (links) und HT29 Klon 19A (rechts)

Angaben als MW ± SD (n = 5-9); Behandlung versus Kontrolle: *, p < 0,05; **, p < 0,01 (signifikant in one-way ANOVA mit Dunnetts Posttest)

4.2.1.2 Einfluss sekundärer Pflanzenstoffe und von Oltipraz auf die GST-Aktivität

Es wurden verschiedene sekundäre Pflanzenstoffe aus unterschiedlichen Stoffgruppen hinsichtlich ihres Potentials, die GST-Aktivität modulieren zu können, getestet. Als komplexes Naturprodukt mit unterschiedlichem Anteil verschiedener Polyphenole wurde der Grünteextrakt sowie als Einzelsubstanz sein Hauptpolyphenol Epigallocatechingallat (EGCG) in beiden Zelllinien untersucht. Die Behandlung (72 h) mit Grünteextrakt bzw. EGCG hatte keine signifikante Aktivitätssteigerung zur Folge (Abbildung 22 bzgl. Protein und im Anhang Abbildung 43 bzgl. Zellzahl).

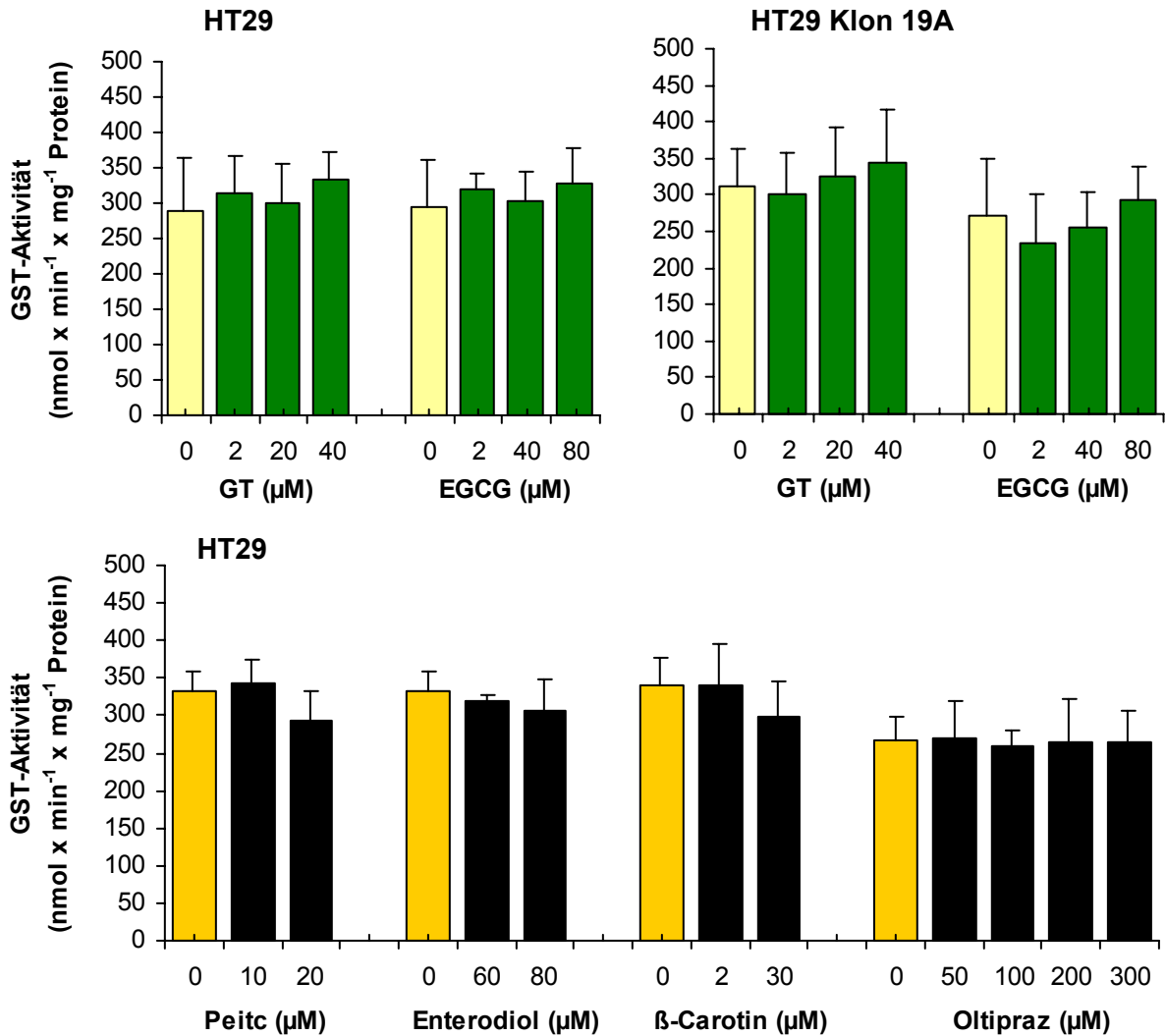


Abbildung 22: GST-Aktivität nach 72 h Behandlung mit Grüntee bzw. EGCG in HT29 (rechts oben) und HT29 Klon 19A (links oben) sowie nach 72 h Inkubation mit PEITC, Enterodiol, β-Carotin und Oltipraz in HT29 (untere Graphik)

Angaben als MW ± SD (n = 3-7)

Des Weiteren wurden das Isothiocyanat Phenethylisothiocyanat (PEITC), Enterodiol aus der Gruppe der Lignane und das Carotinoid β-Carotin in HT29 untersucht. Keine der Substanzen hatte bei den getesteten Konzentrationen einen modulierenden Effekt auf die Aktivität - weder auf Proteinebene, wie Abbildung 22 (unten) zeigt, noch auf Zellzahlebene (Abbildung 43 im Anhang). Ebenso führte das synthetische Chemopräventivum Oltipraz, welches als Induktor der hepatischen GST-Aktivität bekannt ist [WANG et al. 1999], in HT29 unter den in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Testbedingungen nicht zum Anstieg der GST-Aktivität (Abbildung 22 und im Anhang Abbildung 43).

4.2.1.3 Auswirkungen der Testsubstanzen auf den cytosolischen Proteingehalt

Der Einfluss der Testsubstanzen auf den Proteingehalt wurde durch Bezug des cytosolischen Proteins auf eine Million Zellen dargestellt. Von den untersuchten Substanzen führten die kurzkettigen Fettsäuren zu signifikanten Veränderungen des Proteingehalts. So induzierten 2 und 4 mM Butyrat (72 h) signifikant den Proteingehalt in HT29 (1,2 bzw. 1,3fach; Abbildung 23, rechts), wobei der Anstieg in HT29 Klon 19A (4 mM, 72 h: 1,2fach) keine Signifikanz erreichte. Während in HT29 Acetat (15-30 mM) und Propionat (2,5-5 mM) nach 72 h Inkubation zu keiner Veränderung des Proteingehalts führten, induzierten in HT29 Klon 19A beide Substanzen signifikant das cytosolische Protein (1,2-1,4fach; Abbildung 23, links). Alle weiteren untersuchten Substanzen hatten keinen signifikanten Effekt auf den Proteingehalt der Zellen.

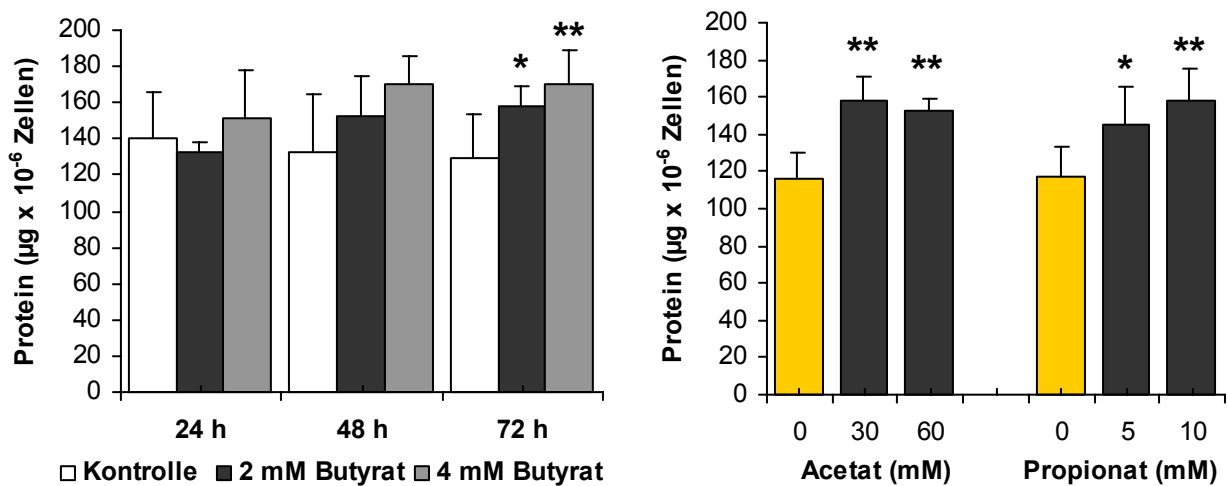


Abbildung 23: Induktion des cytosolischen Proteingehalts durch Inkubation mit Butyrat (24-72 h) in HT29 (rechts) bzw. mit Acetat und Propionat (72 h) in HT29 Klon 19A (links)

MW \pm SD (n = 3-9); Behandlung versus Kontrolle: *, p<0,05; **, p<0,01 (one-way ANOVA mit Dunnetts Posttest)

Die GST-Aktivität wurde am stärksten durch 4 mM Butyrat induziert, wobei in beiden Zelllinien die Aktivität gleichermaßen gesteigert wurde. Das Aktivitätsmaximum wurde nach 48 h Inkubation erreicht und konnte nach 72 h auf dem Level gehalten werden. Butyrat führte ebenfalls zur Induktion des Proteingehalts der Zellen (1,2-1,4fach), worin die Ursache für die unterschiedlichen Induktionsfaktoren auf Zellzahl- und Proteinebene (1,7-1,9fach bzw. 1,4fach) zu sehen ist. Acetat und Propionat hatten in HT29 keinen Effekt. Sie führten aber in HT29 Klon 19A zur Aktivitätssteigerung (72 h, 30-60 mM Acetat: 1,4fach, 5-10 mM Propionat: 1,7-1,9fach bzgl. Zellzahl) sowie zur Induktion des Proteingehalts (1,2-1,4fach). Grüntee und EGCG sowie die übrigen Testsubstanzen (PEITC, Enterodiol, β -Carotin, Oltipraz) hatten unter den getesteten Bedingungen keinen modulierenden Effekt auf die GST-Aktivität (s. auch 4.2.2.3 Tabelle 24).

4.2.2 Induzierbarkeit der Proteinexpression der Glutathion S-Transferasen

4.2.2.1 Induktion der GST Isoenzyme in Kolontumorzelllinien

Der immunobiochemische Nachweis der GST-Isoenzyme wurde durchgeführt, um den Zusammenhang zwischen der erhöhten GST-Aktivität und der Expression einzelner Isoenzyme auf Proteinebene zu untersuchen. Für die Experimente wurden Butyrat, Propionat und Acetat aufgrund ihrer Effekte auf die GST-Aktivität in HT29 bzw. HT29 Klon 19A ausgewählt. Der Grünteeextrakt sowie sein Hauptpolyphenol Epigallocatechingallat (EGCG) wurden ebenfalls in die Untersuchungen einbezogen, da Grünteeextrakt die extrazellulär regulierte Proteinkinase 1/2 (ERK 1/2) in der Diplomarbeit von KAUTENBURGER aktivierte [KAUTENBURGER 2000]. Die ERK 1/2 ist an der Regulation des Transkriptionsfaktors AP-1 beteiligt [WHITMARSH & DAVIS 1996], dessen Aktivierung wiederum mit der Genexpression verschiedener GST Isoenzyme assoziiert wird [DESMOTS et al. 1998; MIYANISHI et al. 2001; MOFFAT et al. 1994]. Der Nachweis der GST-Proteine erfolgte mittels Western Blot. Außerdem wurde der Einfluss von Butyrat auf die GSTP1- Expression zusätzlich mit ELISA bestimmt.

4.2.2.1.1 Butyrat

Da die GST-Aktivität am stärksten nach 72 h Inkubation mit 2 und 4 mM Butyrat induziert war, wurde unter diesen Bedingungen ebenfalls die Expression des GST-Proteins untersucht. Die Isoenzyme GST A1/2, M2 und P1 wurden in beiden Zelllinien durch 4 mM Butyrat signifikant induziert, während die GSTT1-Level nicht beeinflusst wurden (Tabelle 20 und in Bezug auf die Zellzahl Tabelle 27 im Anhang). 2 mM Butyrat erhöhte ebenfalls die GSTM2 und in geringem Maße die GSTP1. Abbildung 24 zeigt für beide Zelllinien repräsentative Blots.

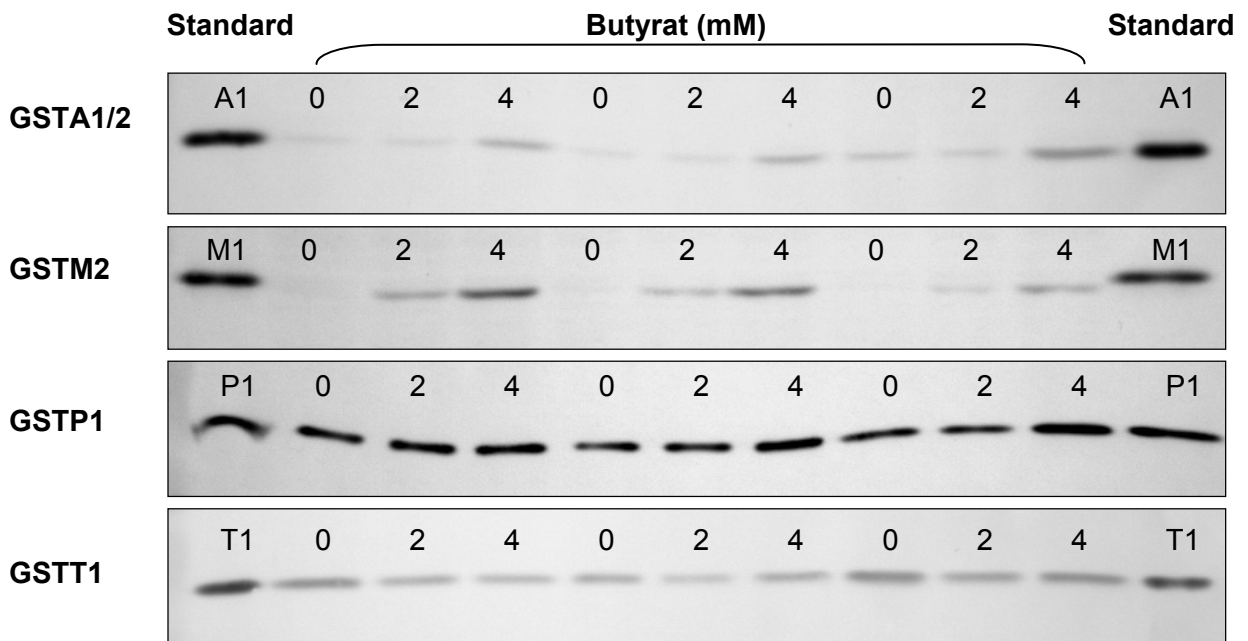
Tabelle 20: GST-Expression nach 72 h Butyratbehandlung in HT29 und HT29 Klon 19A

<i>Zellen / Behandlung</i>	<i>GST (ng / mg Protein)</i>			
	<i>A1/2</i>	<i>M2</i>	<i>P1</i>	<i>T1</i>
<i>HT29</i>				
Kontrolle	6,4 ± 2	n. d.	5855 ± 535	880 ± 192
2 mM Butyrat	6,3 ± 1	25 ± 8	6465 ± 1101	682 ± 189
4 mM Butyrat	23 ± 8 *	73 ± 28	8691 ± 919 **	874 ± 291
<i>HT29 Klon 19A</i>				
Kontrolle	5,9 ± 2	n. d.	5472 ± 1186	1581 ± 142
2 mM Butyrat	9 ± 3,6	23 ± 7	6966 ± 1660	1392 ± 206
4 mM Butyrat	21 ± 17 **	48 ± 17	8714 ± 1918 **	1373 ± 161

Angaben als MW ± SD (n = 6); n. d. (nicht detektierbar)

Behandlung versus Kontrolle: *, p < 0,05; **, p < 0,01 (signifikant in one-way ANOVA mit Dunnetts Posttest)

HT29



HT29 Klon 19A



Abbildung 24: Repräsentative Blots mit je 3 Versuchen für die Expression der GST-Isoenzyme nach 72 h Butyratbehandlung in HT29 und HT29 Klon 19A

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde der Einfluss der effektivsten Butyratkonzentration (4 mM) in Abhängigkeit von der Inkubationszeit in beiden Zelllinien untersucht. Für HT29 sind die Ergebnisse der Zeitkinetik (24 – 72 h) mit repräsentativen Beispielblots in Abbildung 25 und Abbildung 26 graphisch dargestellt.

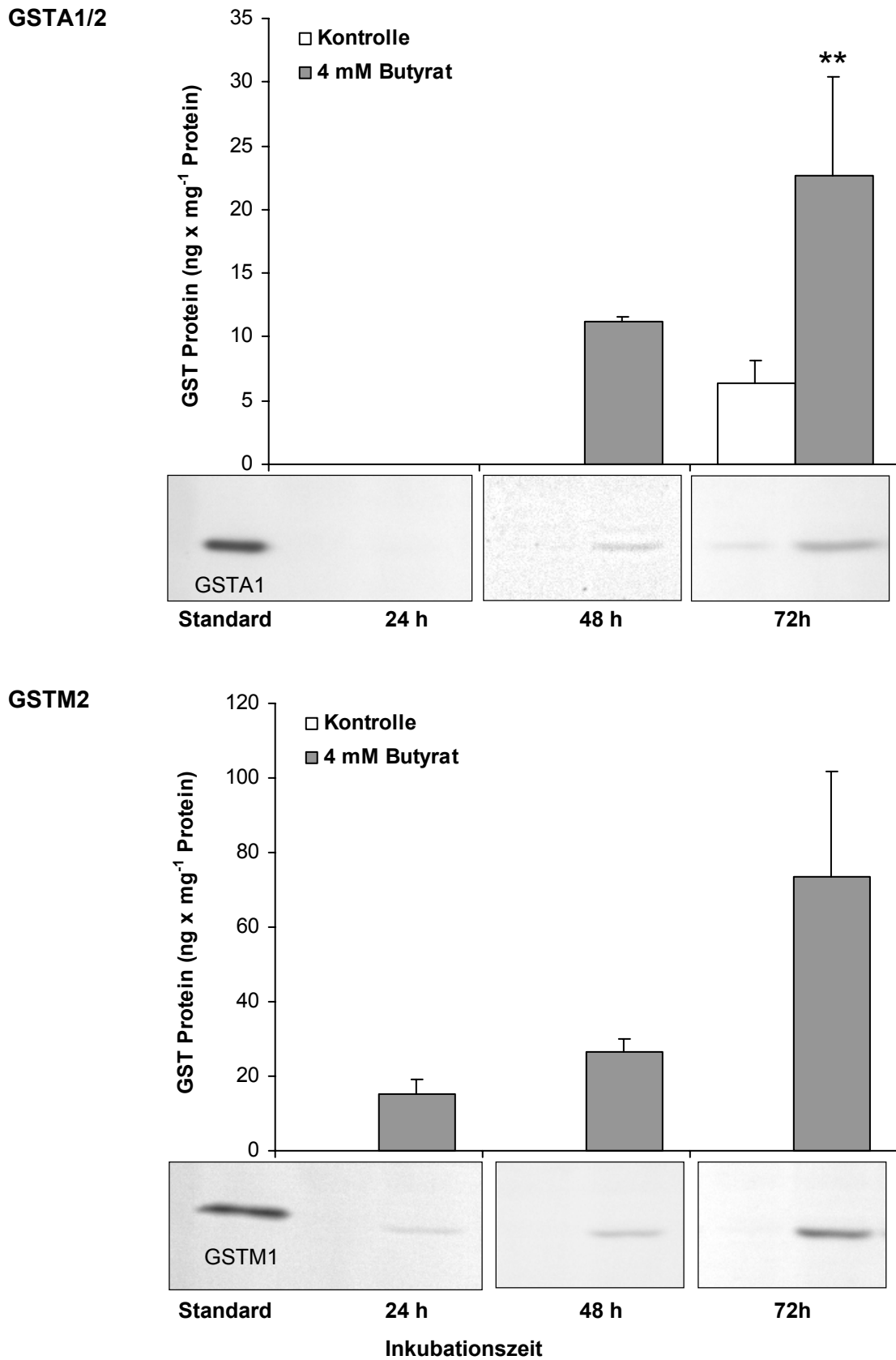


Abbildung 25: Zeitabhängige Induktion der GST A1/2 und M2 in HT29 nach Butyratbehandlung
 Angaben als MW ± SD (n = 3-6) mit repräsentativen Beispielblots. Behandlung mit 4 mM Butyrat versus Kontrolle: **, p < 0,01 (signifikant im zweiseitigen, ungepaarten t-Test).

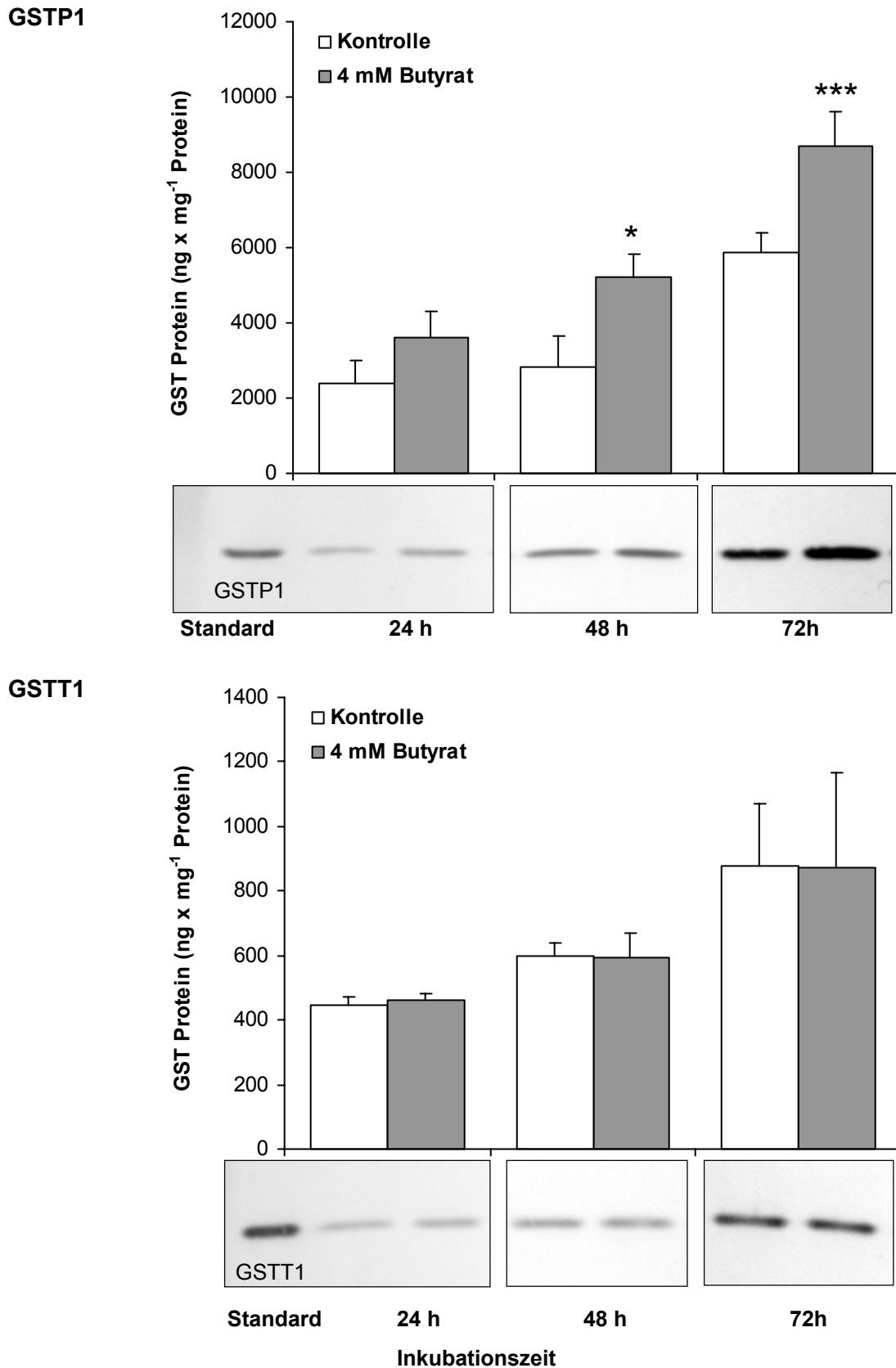


Abbildung 26: Zeitabhängige Induktion der GST P1 und T1 in HT29 nach Butyratbehandlung

Angaben als MW ± SD (n = 3-6) mit repräsentativen Beispielblots. Behandlung mit 4 mM Butyrat (24-72 h) versus Kontrolle: *, p < 0,05; ***, p < 0,001 (signifikant im zweiseitigen, ungepaarten t-Test).

In HT29 steigerte die Inkubation mit 4 mM Butyrat die Proteinkonzentration der Isoenzyme GSTA1/2, GSTM2 und GSTP1 im Vergleich zur Kontrolle in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer, wobei mit steigender Inkubationszeit auch die nachgewiesene Proteinmenge anstieg (Abbildung 25 und Abbildung 26). Das GSTM1-Protein lag zu allen Zeitpunkten unterhalb des Detektionslimits (Abbildung 25). Ebenso wurde die Expression von GSTT1 durch Butyrat (4 mM) nicht beeinflusst (Abbildung 26). Die Induktion war für GSTM2 schon nach 24 h und für GSTA1/2 und GSTP1 nach 48 h detektierbar. Dabei muss berücksichtigt werden, dass die GSTM2 nur in den butyratbehandelten Zellen nachweisbar war und die GSTA1/2 erst nach 72 h in den Kontrollen und nach 48 h in den mit Butyrat behandelten Zellen detektiert wurde. Die maximalen Proteinlevel der Isoenzyme wurden nach 72 h Inkubation mit signifikanter Induktion der GSTA1/2 (3,5fach), GSTP1 (1,5fach) und GSTM2 (9,5fach; Abschätzung der Induktion gegenüber dem Blothintergrund) gemessen. Für GSTM2 nahm der Induktionsfaktor innerhalb der Zeitkinetik gegenüber den Kontrollen, in welchen es unterhalb der Nachweisgrenze lag, kontinuierlich zu. So wurde nach 72 h Inkubation gegenüber dem 24 h-Wert ca.5 mal mehr Protein detektiert. Im Vergleich dazu erreichte bei GSTP1 die relative Induktion nach 48 h ihr Maximum (1,8fach) und konnte durch längere Inkubationszeit nicht mehr gesteigert werden. Sie fiel nach 72 h sogar leicht ab (1,5fach), was auf höhere GSTP1-Konzentrationen in den Kontrollen zurückzuführen ist. Dieses Resultat geht konform mit den Ergebnissen der Induktion der GST-Gesamtaktivität und des cytosolischen Proteingehalts durch Butyrat, bei welchen ebenfalls das Erreichen eines Plateaus bei maximaler Induktion nach 48 h zu beobachten war.

In den HT29 Klon 19A waren die Effekte von 4 mM Butyrat hinsichtlich der Induktion der GST-Isoenzyme ähnlich. Die entsprechenden Abbildungen der Zeitkinetik befinden sich im Anhang (Abbildung 44). Das Ausmaß der Induktion unterschied sich lediglich für GSTM2, welche nach 72 h Inkubation in den HT29 Klon 19A mit 65 % des in HT29 nachgewiesenen Proteins weniger stark induzierbar war (Tabelle 20). Ein weiterer Unterschied zeigte sich in der Expression der GSTA1/2, deren Induktion erst nach 72 h in HT29 Klon 19A detektierbar war.

Die Auswertung der Ergebnisse in Bezug auf die Zellzahl zeigte im Vergleich zu den auf das cytosolische Protein bezogenen Ergebnissen bei beiden Zelllinien analoge Induktionsmuster der untersuchten Isoenzyme, wobei die Unterschiede zwischen Kontrollzellen und behandelten Zellen ebenfalls signifikant waren. Während die Induktionsfaktoren nach 24 h Inkubation für Protein und Zellzahl fast identisch waren, lag die zellzahlbezogene Induktion nach 48 h und 72 h durchschnittlich um ca. 10-17 % höher, was mit dem Anstieg des cytosolischen Protein-

gehalts der Zellen erklärt werden kann. Die Ergebnisse bezüglich der Zellzahl befinden sich im Anhang (Tabelle 27).

Neben der Induktion einzelner Isoenzyme war mit zunehmender Kultivierungszeit auch in den Kontrollen eine Veränderung der basalen Enzymkonzentrationen zu beobachten. So wurde die GSTA1/2 in den Kontrollen beider Zelllinien nach 72 h klar detektierbar, während ihre Konzentration vorher unterhalb des Detektionslimits lag (HT29: Abbildung 25). Mit längerer Inkubationszeit stiegen ebenfalls die Konzentrationen für GSTP1 und GSTT1, was der Vergleich der Enzymlevel nach 24 h und 72 h Inkubation zeigte. In den HT29-Kontrollen erreichte der Anstieg der GSTP1 von 2395 ± 595 (24 h) zu 5855 ± 535 (72 h) ng/mg Protein Signifikanz (***, $p < 0,001$; one-way Anova mit Tukeys Posttest), während die Erhöhung der GSTT1-Level (24 h: 448 ± 24 versus 72 h: 880 ± 192 ng/mg Protein) nicht signifikant war. In den Kontrollzellen der HT29 Klon 19A war der Unterschied zwischen GSTT1-Gehalt nach 24 h und 72 h Inkubation signifikant (705 ± 50 versus 1581 ± 142 ng/mg Protein: ***, $p < 0,001$; one-way Anova mit Tukeys Posttest). Der GSTP1-Anstieg (24 h: 4120 ± 342 versus 72 h: 5472 ± 1186 ng/mg Protein) erlangte jedoch keine Signifikanz.

Ergebnisse des ELISA für GSTP1

Die Untersuchungen der GSTP1 Expression mittels ELISA zeigten ebenfalls die induzierende Wirkung von 4 mM Butyrat (Tabelle 21). Im Vergleich zu den Ergebnissen des Western Blots war nach 72 h Inkubation die Induktion auf Zellzahlebene in HT29 und HT29 Klon 19A mit Induktionsfaktoren von 2,1 bzw. 2,4 stärker ausgeprägt. In Bezug auf den cytosolischen Proteingehalt unterschied sich der Induktionsfaktor für HT29 Klon 19A (2,3fach) nicht. Dagegen war die Induktion in HT29 auf Proteinebene deutlich niedriger (1,2fach), was auf den starken Anstieg des cytosolischen Proteingehalts (1,8fach) im ausgewerteten Versuch zurückzuführen ist. Die GSTP1-Induktion war in HT29 Klon 19A statistisch signifikant. Für die Messung in HT29 war keine statistische Auswertung möglich, da die Induktion in nur einem Versuch mit drei Parallelen bestimmt wurde.

Tabelle 21: ELISA-Ergebnisse für GSTP1 nach 72 h Butyratinkubation

Zellen	GSTP1 Protein (ng)			
	Kontrolle		4 mM Butyrat	
	10 ⁻⁶ Zellen	mg ⁻¹ Protein	10 ⁻⁶ Zellen	mg ⁻¹ Protein
HT29 (n = 3) ¹⁾	77 ± 10	858 ± 70	164 ± 21	999 ± 66
HT29 Klon 19A (n = 3)	56 ± 9	758 ± 162	133 ± 32*	1738 ± 417*

Angaben als MW ± SD. 1) 3 Parallelansätze eines Versuchs.

Behandlung versus Kontrolle: *, p < 0,05; (signifikant im zweiseitigen, ungepaarten *t*-Test).

Das GSTP1-Protein korrelierte in beiden Zelllinien stark mit der in den Proben ermittelten GST-Gesamtaktivität, wie Abbildung 27 zeigt, woraus geschlossen werden kann, dass die Induktion der GST-Gesamtaktivität hauptsächlich auf den erhöhten GSTP1-Proteinkonzentrationen beruht.

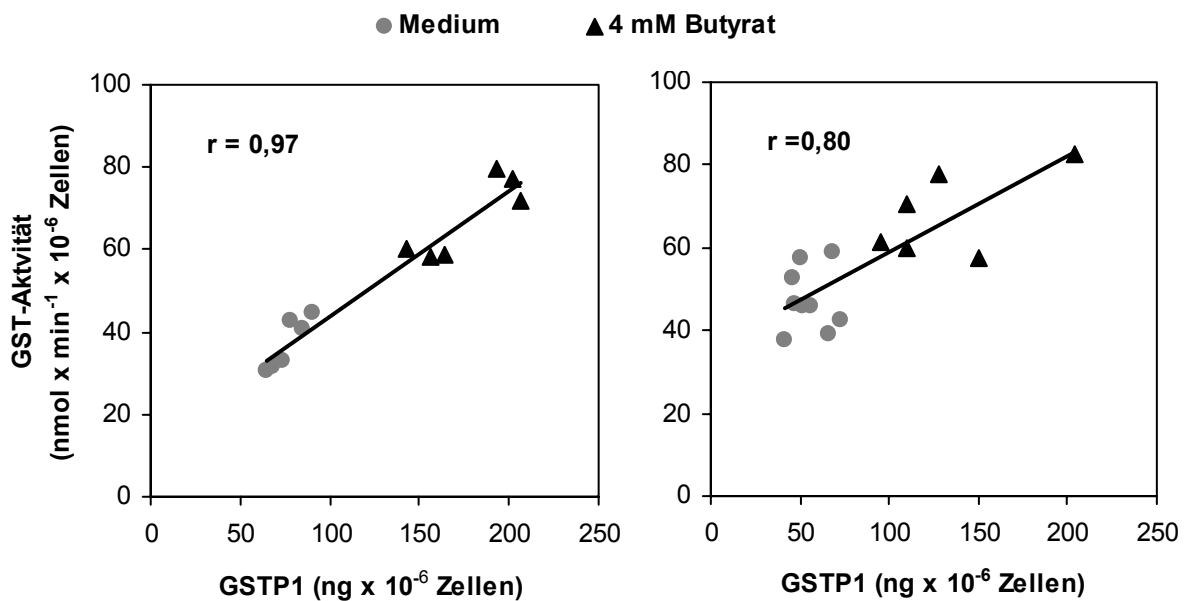


Abbildung 27: Korrelation zwischen GSTP1-Protein und GST-Aktivität in HT29 (links) und HT29 Klon 19A (rechts) nach 48-72 h bzw. 72 h Butyratinkubation

r (Korrelationskoeffizient nach Pearson)

Der Vergleich der basalen GSTP1-Konzentrationen mit den Western Blot-Daten zeigte große Unterschiede auf. So war in beiden Zelllinien der GSTP1-Gehalt der Kontrollen im ELISA auf Proteinebene ca. 7fach und auf Zellzahlebene ca. 10-13fach niedriger. Ursachen für diese Unterschiede könnten zum einen methodischer Art sein. So werden beim Sandwich-ELISA Antikörper gegen GSTP1 mit unterschiedlicher Epitopspezifität verwendet, um das Enzym nachweisen zu können. Da bei beiden Methoden die Quantifizierung des Enzyms über die mitgeführten Standards erfolgt, ist der hauptsächliche Grund in der Verwendung verschiedener Standards (mit unterschiedlichen Konzentrationen und unterschiedlicher Bindungskapazität der Antikörper) zu sehen. Aufgrund dessen, dass beide Methoden zu verschiedenen Zeitpunkten etabliert und mit unterschiedlichen Zellchargen durchgeführt wurden, konnten die Standards für GSTP1 nicht überprüft werden. Die Annahme wird jedoch durch Ergebnisse von TREPTOW-VAN LIESHAUT unterstützt, welche mit dem ELISA-System der gleichen Firma ebenfalls große quantitative Unterschiede im Vergleich zur GSTP1-Quantifizierung mit der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) fand [TREPTOW-VAN LIESHAUT 1998]. Ihre HPLC-Analyse des ELISA-Standards für GSTP1 ergab ebenfalls eine 10fach höhere Konzentration. Aufgrund dieser Unterschiede ist ein direkter Vergleich der Absolutwerte beider Methoden nicht möglich. Um die Vergleichbarkeit der Expression der GSTP1 mit den anderen Isoenzymen zu gewährleisten, wurden in der vorliegenden Arbeit die Immunoblottingdaten als Grundlage für die Interpretation der Ergebnisse verwendet.

4.2.2.1.2 Acetat und Propionat

Die Ergebnisse zur Expression der GST-Isoenzyme nach 72 h Inkubation mit Acetat und Propionat sind für beide Zelllinien in Tabelle 22 dargestellt, wobei die Proteinexpression der GSTM1 und GSTM2 sowohl bei Acetat als auch bei Propionat unterhalb des Detektionslimits lag. Die Behandlung der Zelllinien mit Acetat (15 - 60 mM) hatte keinen Einfluss auf den Proteingehalt der GSTA1/2 und GSTT1. Die GSTP1-Level wurden durch 30 mM Acetat in beiden Zelllinien hinsichtlich Zellzahl und cytosolischem Proteingehalt leicht induziert (1,1 - 1,3fach). Der Anstieg war jedoch nicht signifikant. Ebenso hatte Propionat (2,5 – 10 mM) keine signifikanten Effekte auf die GST-Expression. Während die Expression der Isoenzyme in HT29 unbeeinflusst war, induzierte Propionat (10 mM) in den HT29 Klon 19A-Zellen tendenziell die GSTA1/2 (1,4-1,7fach) und GSTP1 (1,2-1,3fach).

Tabelle 22: Expression der GST-Isoenzyme nach 72 h Inkubation mit Acetat bzw. Propionat in HT29 und HT29 Klon 19A

<i>Zellen / Behandlung</i>	<i>GST (ng)</i>					
	<i>A1/2</i>		<i>P1</i>		<i>T1</i>	
	10^{-6} Zellen	mg^{-1} Protein	10^{-6} Zellen	mg^{-1} Protein	10^{-6} Zellen	mg^{-1} Protein
<i>HT29</i>						
Kontrolle	0,8 ± 0,3	6,4 ± 3	716 ± 253	5272 ± 1461	126 ± 39	961 ± 354
15 mM Acetat	0,8 ± 0,1	6,2 ± 0,4	800 ± 86	5800 ± 501	107 ± 52	777 ± 370
30 mM Acetat	0,7 ± 0,3	5,1 ± 1,3	904 ± 111	6370 ± 730	109 ± 37	751 ± 190
<i>HT29 Klon 19A</i>						
Kontrolle	1,3 ± 0,1	8,9 ± 0,5	1075 ± 245	7329 ± 1281	174 ± 42	1199 ± 277
2,5 mM Propionat	0,9 ± 0,3	7,4 ± 1,7	838 ± 328	7301 ± 2107	129 ± 57	1119 ± 403
5 mM Propionat	1,4 ± 0,2	11 ± 2	923 ± 134	7089 ± 1388	147 ± 41	1115 ± 317
<i>HT29 Klon 19A</i>						
Kontrolle	1,7 ± 0,2	13,9 ± 2,1	636 ± 57	5090 ± 190	171 ± 73	1341 ± 469
30 mM Acetat	1,7 ± 0,2	10,9 ± 1,4	820 ± 136	5409 ± 949	203 ± 63	1342 ± 416
60 mM Acetat	2 ± 0,4	13,4 ± 3	728 ± 221	4789 ± 1221	201 ± 83	1318 ± 490
Kontrolle	1,5 ± 0,5	12 ± 5	816 ± 269	6157 ± 1506	187 ± 75	1418 ± 485
5 mM Propionat	1,8 ± 0,6	11,7 ± 3,5	1008 ± 174	6874 ± 1662	225 ± 33	1532 ± 359
10 mM Propionat	2,6 ± 0,7	16,6 ± 3	1084 ± 162	7099 ± 1493	229 ± 46	1507 ± 429

Angaben als MW ± SD (n = 3).

4.2.2.1.3 Grüntee und Epigallocatechingallat

Die Inkubation mit Grünteeextrakt beeinflusste die Proteinexpression der GSTA1/2 in den untersuchten Zellen. So wurde GSTA1/2 in beiden Zelllinien durch 72 h Inkubation mit 20 µM und 40 µM Grüntee signifikant induziert. Die Induktion war in dem differenzierteren Klon 19A deutlich stärker ausgeprägt (2,2 - 2,8fach) als in den HT29 (1,3 – 1,6fach), was die obere Graphik mit repräsentativen Beispielblots in Abbildung 28 veranschaulicht. Die stärkste Induktion wurde bei 40 µM Grüntee mit Induktionsfaktoren von 2,8 in HT29 Klon 19A und 1,6 in HT29 in Bezug auf das cytosolische Protein erreicht. 2 µM Grüntee hatte hingegen keinen Einfluss auf die GSTA1/2-Level.

Um zu untersuchen, inwieweit die mittels Grüntee hervorgerufenen Effekte auf die GSTA1/2-Expression durch das Hauptpolyphenol des Grünen Tees, Epigallocatechingallat (EGCG), bewirkt werden, wurden die Zellen zusätzlich mit diesem Polyphenol inkubiert. Dazu wurden die physiologische Konzentration (2 µM), die höchste Grünteekonzentration in EGCG-Äquivalenten (40 µM) und die EC₅₀ (80 µM) für EGCG untersucht [STEINER 2001]. Im Ergebnis zeigte sich, dass EGCG als Einzelsubstanz ebenfalls eine induzierende Wirkung auf die GSTA1/2 hatte, wobei das Induktionsniveau in beiden Zelllinien mit dem der

Grünteebehandlung vergleichbar war (Abbildung 28). Allerdings wirkte EGCG nicht so effektiv wie der Grünteeextrakt. So wurde in den HT29 Klon 19A die GSTA1/2 durch 40 und 80 µM EGCG signifikant induziert (jeweils 2,3fach). Durch die Behandlung mit 40 µM EGCG wurde lediglich die gleiche Proteinkonzentration wie bei Behandlung mit 20 µM Grünteeextrakt erreicht, welche sich durch die Steigerung der EGCG-Konzentration auf 80 µM auch nicht weiter erhöhen ließ. In den HT29 induzierte nur 80 µM EGCG signifikant die GSTA1/2, während 40 µM EGCG keinen Effekt auf die Expression hatte. Die Inkubation mit 2 µM EGCG zeigte in den HT29 Klon 19A ebenfalls eine tendenzielle Erhöhung der GSTA1/2, welche durch die Ergebnisse mit 2 µM Grüntee jedoch nicht bestätigt wurde.

Auf die übrigen untersuchten Isoenzyme hatte die Behandlung mit Grüntee und EGCG keine signifikanten Effekte. Tendenziell führte die Inkubation mit 2 und 80 µM EGCG in HT29 Klon 19A zu erhöhten GSTP1-Proteinkonzentrationen (1,2-1,4fach). Die Ergebnisse in Bezug auf die Zellzahl waren analog zu denen auf Proteinebene (Tabelle 23).

Tabelle 23: Expression der GST-Isoenzyme nach 72 h Inkubation mit Grünteeextrakt bzw. Epigallocatechingallat (EGCG) in HT29 und HT29 Klon 19A

<i>Zellen / Behandlung</i>	<i>GST (ng)</i>					
	<i>A1/2</i>		<i>P1</i>		<i>T1</i>	
	10^{-6} Zellen	mg^{-1} Protein	10^{-6} Zellen	mg^{-1} Protein	10^{-6} Zellen	mg^{-1} Protein
<i>HT29</i>						
Kontrolle	1,4 ± 0,1	10,3 ± 2,2	809 ± 166	5707 ± 444	140 ± 43	1006 ± 338
2 µM Grüntee	1,4 ± 0,1	11,1 ± 1	736 ± 22	5626 ± 228	163 ± 60	1223 ± 371
20 µM Grüntee	1,8 ± 0,1*	14,5 ± 1*	723 ± 93	5858 ± 502	141 ± 39	1137 ± 266
40 µM Grüntee	2,3 ± 0,1*	16,1 ± 0,1*	786 ± 95	5475 ± 605	182 ± 64	1276 ± 455
Kontrolle	1,3 ± 0,2	10,4 ± 2,2	666 ± 230	5061 ± 1543	85 ± 15	638 ± 96
2 µM EGCG	1,3 ± 0,3	10,9 ± 1,6	666 ± 239	5465 ± 1409	89 ± 22	736 ± 90
40 µM EGCG	1,7 ± 0,3	11,5 ± 1,9	878 ± 368	5949 ± 2270	109 ± 1	721 ± 37
80 µM EGCG	2,5 ± 0,5*	16,5 ± 3,1*	828 ± 273	5744 ± 1429	95 ± 6	654 ± 75
<i>HT29 Klon 19A</i>						
Kontrolle	1,6 ± 0,3	12,1 ± 2,2	689 ± 170	5155 ± 1240	230 ± 64	1698 ± 399
2 µM Grüntee	1,4 ± 0,4	11,5 ± 2,1	644 ± 159	5238 ± 1022	202 ± 30	1654 ± 227
20 µM Grüntee	3,5 ± 1,1*	28 ± 5,7*	736 ± 180	5837 ± 468	213 ± 15	1758 ± 307
40 µM Grüntee	4 ± 0,6*	34,3 ± 2,2*	641 ± 55	5489 ± 486	212 ± 54	1782 ± 309
Kontrolle	1,7 ± 0,3	12,6 ± 1,3	775 ± 188	5707 ± 1213	172 ± 58	1266 ± 394
2 µM EGCG	2,7 ± 0,4	17,1 ± 2,3	1064 ± 143	6746 ± 284	186 ± 30	1196 ± 260
40 µM EGCG	4,5 ± 0,3*	29,1 ± 0,9*	997 ± 298	6288 ± 1433	209 ± 58	1395 ± 518
80 µM EGCG	4,3 ± 1,3*	28,9 ± 6,2*	1074 ± 183	7313 ± 1358	227 ± 91	1542 ± 645

Angaben als MW ± SD (n = 3-4). Angabe der GrünteeKonzentration in EGCG-Äquivalenten.

*) signifikant in one-way ANOVA mit Dunnetts Posttest (Behandlung versus Kontrolle).

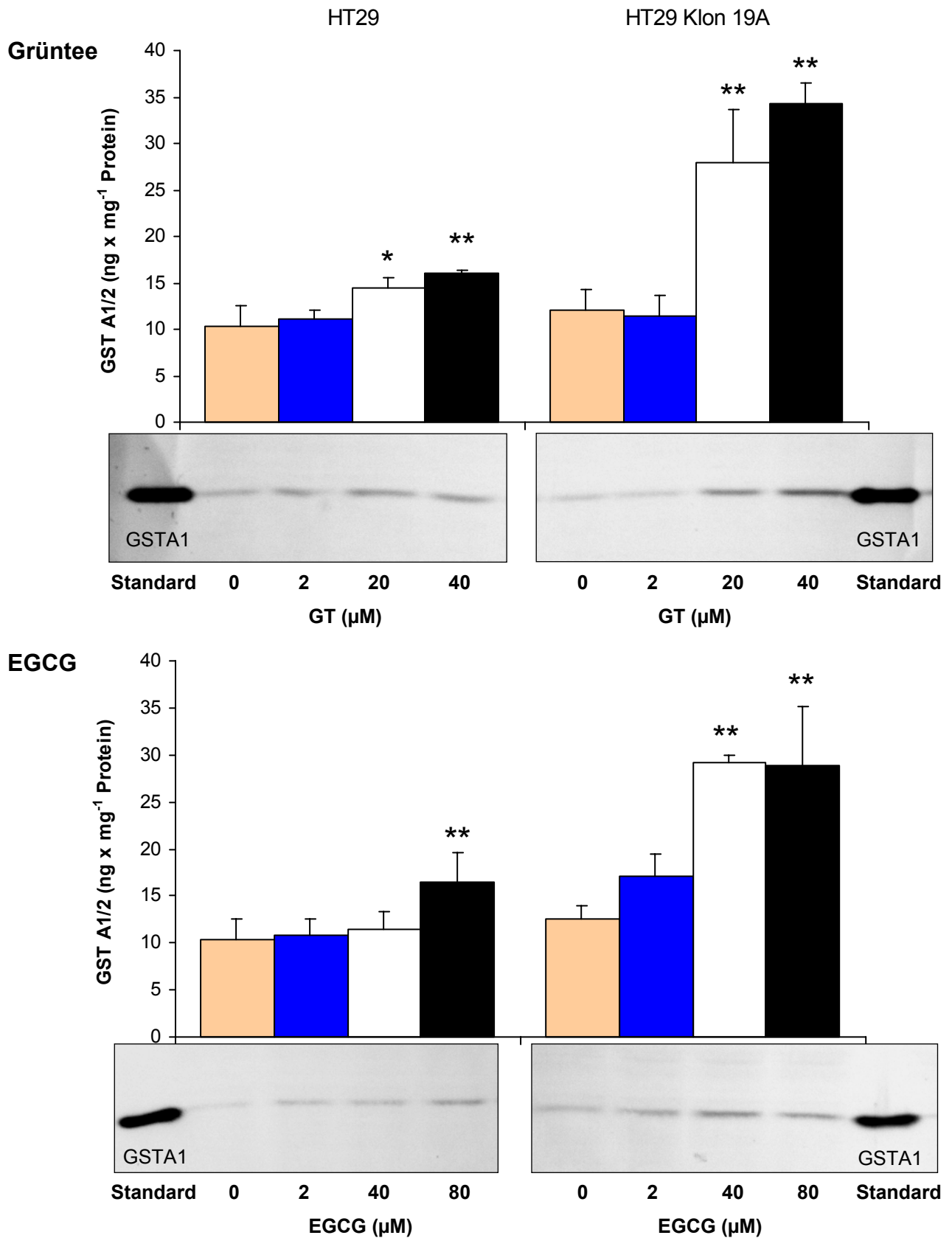


Abbildung 28: Induktion der GSTA1/2 nach 72 h Behandlung mit Grünteeextrakt (GT) und Epigallocatechingallat (EGCG) in HT29 (links) und HT29 Klon 19A (rechts)

Angaben als MW ± SD (n=3-4) mit Beispielblots. GT-Konzentration als EGCG-Äquivalente. 72 h Behandlung mit GT bzw. EGCG versus Kontrolle: *, p < 0,05; **, p < 0,01 (signifikant in one-way ANOVA mit Dunnetts Posttest).

4.2.2.2 Untersuchungen an primären Kolonzellen

Im Hinblick auf die Krebsrisikoreduktion über die Erhöhung der Entgiftungskapazität durch ernährungsrelevante Substanzen sind die eigentlichen Zielzellen der Glutathion S-Transferasen-Induktion nicht transformierte Kolonzellen. Basierend auf den Ergebnissen in den Kolontumorzelllinien wurden die Experimente mit Butyrat als dem stärksten Effektor der GST durchgeführt, um zu untersuchen, ob Butyrat auch in primären (differenzierten) Kolonzellen zur GST-Induktion führt.

Zunächst wurden die als Epithelstreifen vorliegenden Kolonozyten mit 4 mM Butyrat inkubiert, da diese Konzentration in HT29 und HT29 Klon 19A die GST am stärksten induzierte. Wie Abbildung 29 zeigt, führte die Inkubation mit 4 mM Butyrat nach 24 h zum tendenziellen Anstieg der GSTM2 (1,4fach) und GSTT1 (1,6fach) – Ergebnisse sind nicht signifikant, während die Proteinlevel der GSTA1/2, GSTM1 und GSTP1 nicht beeinflusst wurden. Für die GSTM1 war aufgrund des Auftretens der Nulldeletion nur ein Versuch auswertbar. In Abbildung 30 sind Beispielblots des Immunoblottings mit Primärzellen dargestellt.

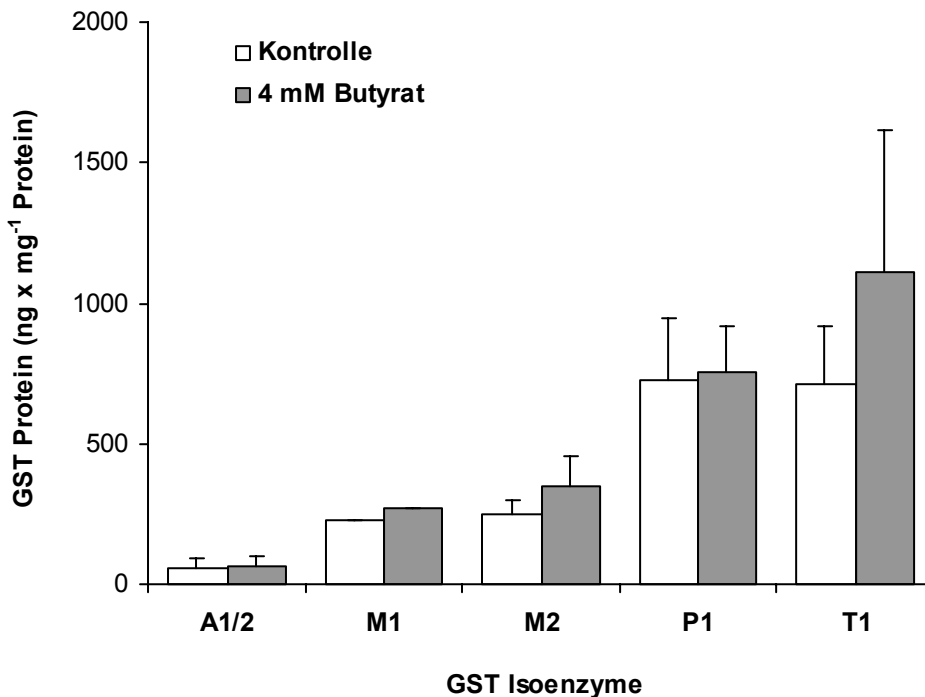


Abbildung 29: Einfluss von 4 mM Butyrat (24 h) auf GST Isoenzyme in Primärzellen

Angaben als MW ± SD (n = 3 = verschiedene Patienten). Für GSTM1 keine SD (n = 1) aufgrund Nulldeletion.

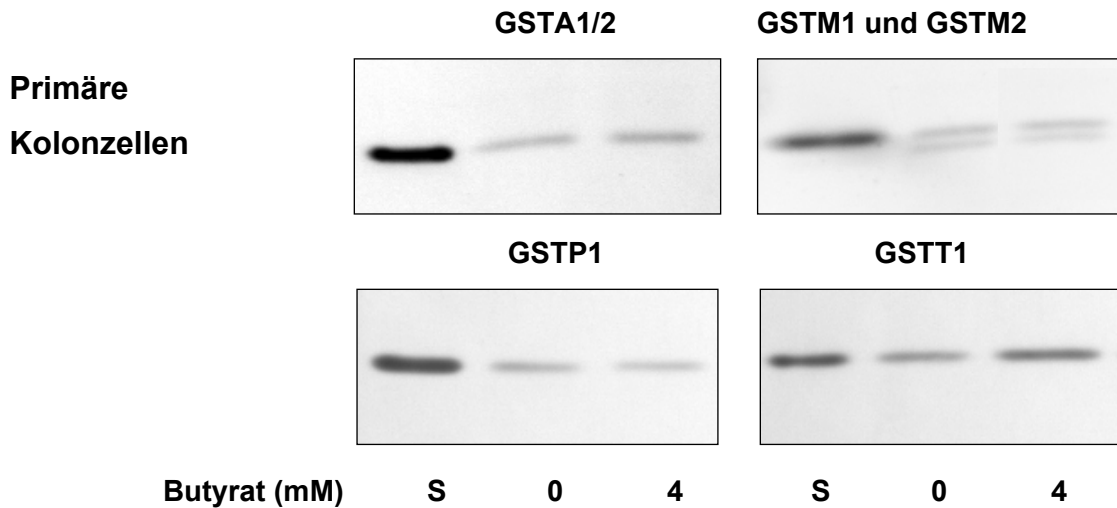


Abbildung 30: Beispielblots für die Expression der GST-Isoenzyme mit entsprechenden Standardproteinen in primären Kolonzellen nach 24 h Butyratbehandlung

S (Standardprotein). Blot mit GSTM1 (obere Bande analog Standard) und GSTM2 (untere Bande).

Da im Darmlumen in Abhängigkeit von der Ernährung auch höhere Butyratkonzentrationen von Relevanz sein können, wurden als weitere Konzentrationen 10 und 20 mM Butyrat für 24 h untersucht. Diese hatten jedoch keinen Einfluss auf die GST-Expression oder führten sogar zur tendenziellen Abnahme des Enzymproteins (Abbildung 31).

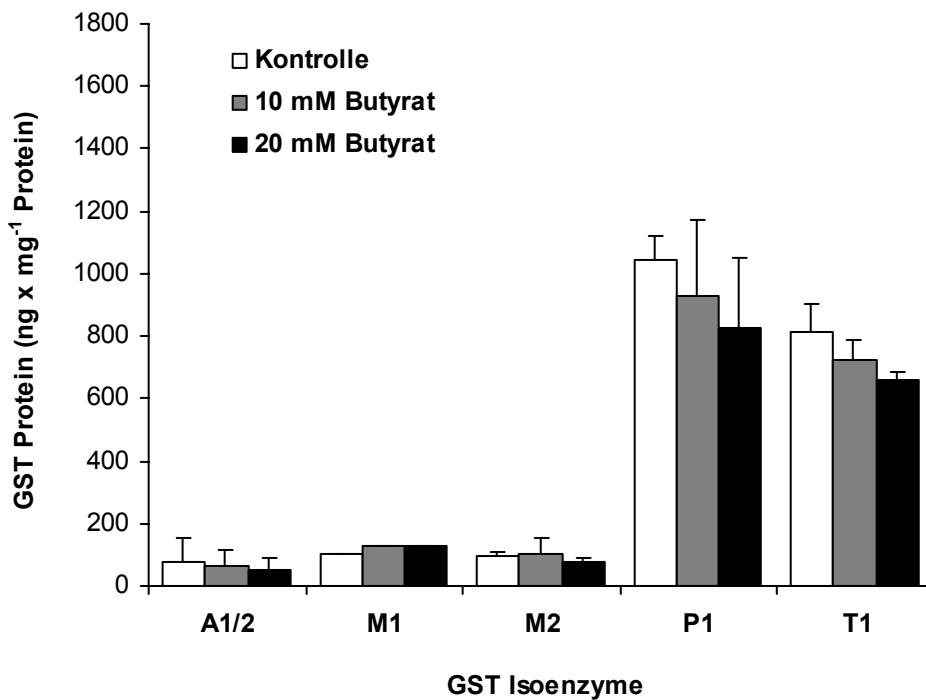


Abbildung 31: Einfluss von 10 und 20 mM Butyrat (24 h) auf GST Isoenzyme in Primärzellen

Angaben als MW ± SD (n = 1-3; 3 verschiedene Patienten). GSTA1/2 (n = 2) war in einer Probe nicht detektierbar. GSTM1 (n = 1) und GSTT1 (n = 2) aufgrund Nulldeletion.

Die Ergebnisse zur Proteinexpression der GST wurden durch die Messergebnisse auf Aktivitätsebene unterstützt. Die 24 h-Inkubation mit 4 mM Butyrat führte tendenziell zu einer geringfügigen Induktion der GST-Gesamtaktivität auf Proteinebene, während 10 und 20 mM Butyrat keinen Effekt auf die Aktivität hatten (Abbildung 32).

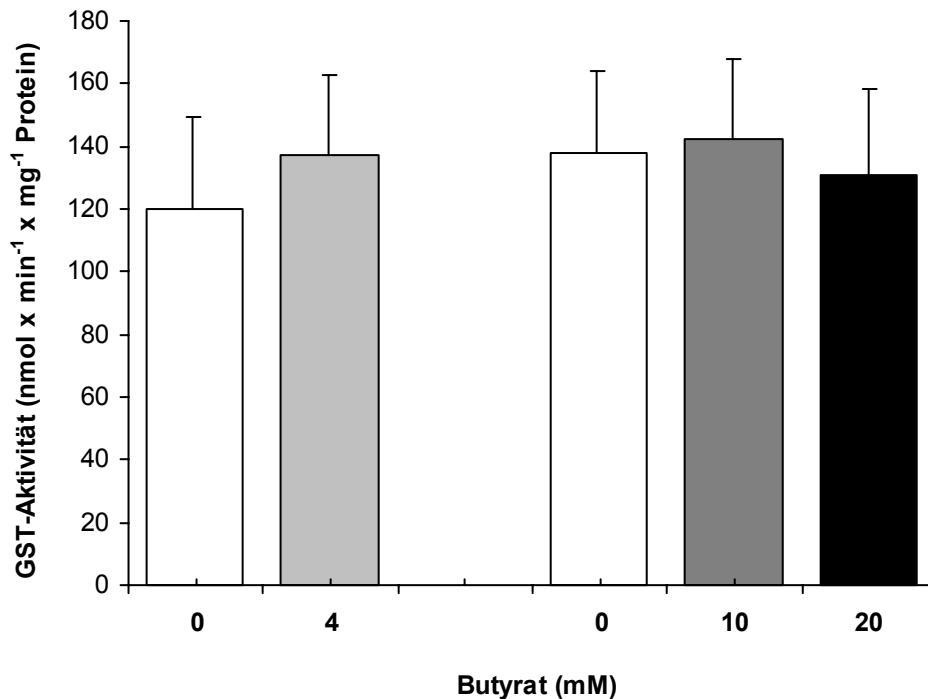


Abbildung 32: GST-Aktivität nach 24 h Butyratbehandlung in primären Kolonzellen

Angaben als MW \pm SD (n = 3).

Die Inkubationszeit von 24 h erwies sich hinsichtlich signifikant messbarer Effekte auf die GST-Expression in Primärzellen als nicht ausreichend. Jedoch war eine Verlängerung der Inkubationsdauer aufgrund des starken Abfalls der Zellvitalität nicht möglich. So kam es mit steigender Inkubationsdauer zum rapiden Vitalitätsverlust der Kolonozyten, welcher aufgrund der Apoptose fördernden Eigenschaften von Butyrat durch dieses noch beschleunigt wurde. Das könnte auch den Abfall des Enzymproteins in den mit 10 und 20 mM Butyrat behandelten Zellen gegenüber den Kontrollen erklären.

Die Vergleichbarkeit der Ergebnisse auf Proteinebene mit denen auf Zellzahlebene ist nur bedingt gegeben, da v. a. bei den höheren Butyratkonzentrationen durch die große Anzahl an Zelltrümmern, apoptotischen und nekrotischen Zellen nur die Lebendzellzahlen bestimmt werden konnten und deshalb die zellzahlbezogenen Angaben verzerrt sind. Die Daten sind in Tabelle 27 im Anhang zu finden.

4.2.2.3 Untersuchungen an Kolonfibroblastenkulturen

Da die stärkste Induktion der GST-Isoenzyme in den Tumorzelllinien nach 72 h Inkubation mit 4 mM Butyrat gemessen wurde, war es von Interesse diesen Inkubationszeitpunkt auch in nicht transformierten Kolonzellen zu untersuchen. Aufgrund der Beschränkung der Inkubationsdauer auf maximal 24 h in den primären Kolonzellen wurden für diese Untersuchungen zwei aus Kolongewebeproben isolierte Fibroblastenkulturen (Kultur 1 und Kultur 2) verwendet. Die Fibroblasten wurden auf der Grundlage ihres im Vergleich zu primären Kolonozyten sehr ähnlichen GST-Musters als Modell für nicht transformierte kultivierbare Zellen des Kolons ausgewählt (s. 4.1.3). Ziel war es, die Relevanz der in HT29 beobachteten Effekte an primären aus dem Kolon stammenden Zellen zu überprüfen.

Die Behandlung mit 4 mM Butyrat resultierte in der Fibroblastenkultur 2 in einer signifikanten Induktion des GSTM2-Proteins (1,3fach), während in Kultur 1 keine signifikante Änderung der GST-Expression in Bezug auf den cytosolischen Proteingehalt der Zellen zu beobachten war (Abbildung 33). Die GST-Gesamtaktivität blieb jedoch in beiden Kulturen auf Proteinebene unbeeinflusst. Abbildung 34 zeigt Beispielblots der detektierten Isoenzyme für beide Kulturen nach Butyratbehandlung.

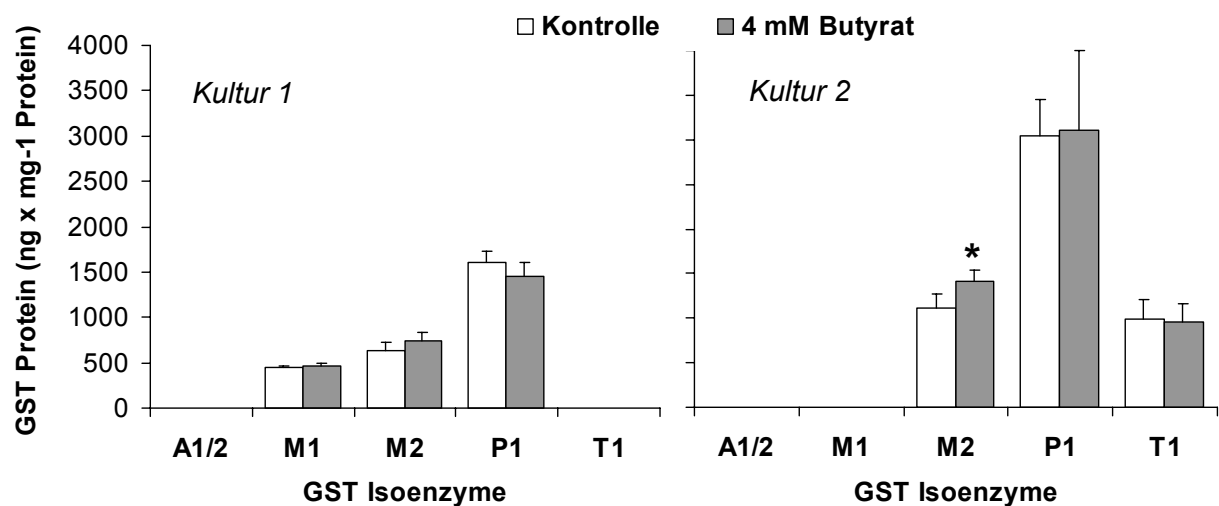


Abbildung 33: Modulation der Proteinexpression der GST in primären Kolonfibroblastenkulturen auf der Basis des Proteingehalts durch 72 h Inkubation mit 4 mM Butyrat

MW \pm SD (n = 3-5). Behandlung versus Kontrolle: *, p < 0,05 (signifikant im zweiseitigen, ungepaarten *t*-Test).

Die Inkubation mit Butyrat beeinflusste, wie bei HT29 und Klon 19A, den Proteingehalt der Zellen. So wurde das cytosolische Protein in Kultur 2 durch 4 mM Butyrat (72 h) signifikant induziert (1,4fach), wohingegen die Induktion in Kultur 1 (1,2fach) nicht statistisch signifikant war (Abbildung 35, links).

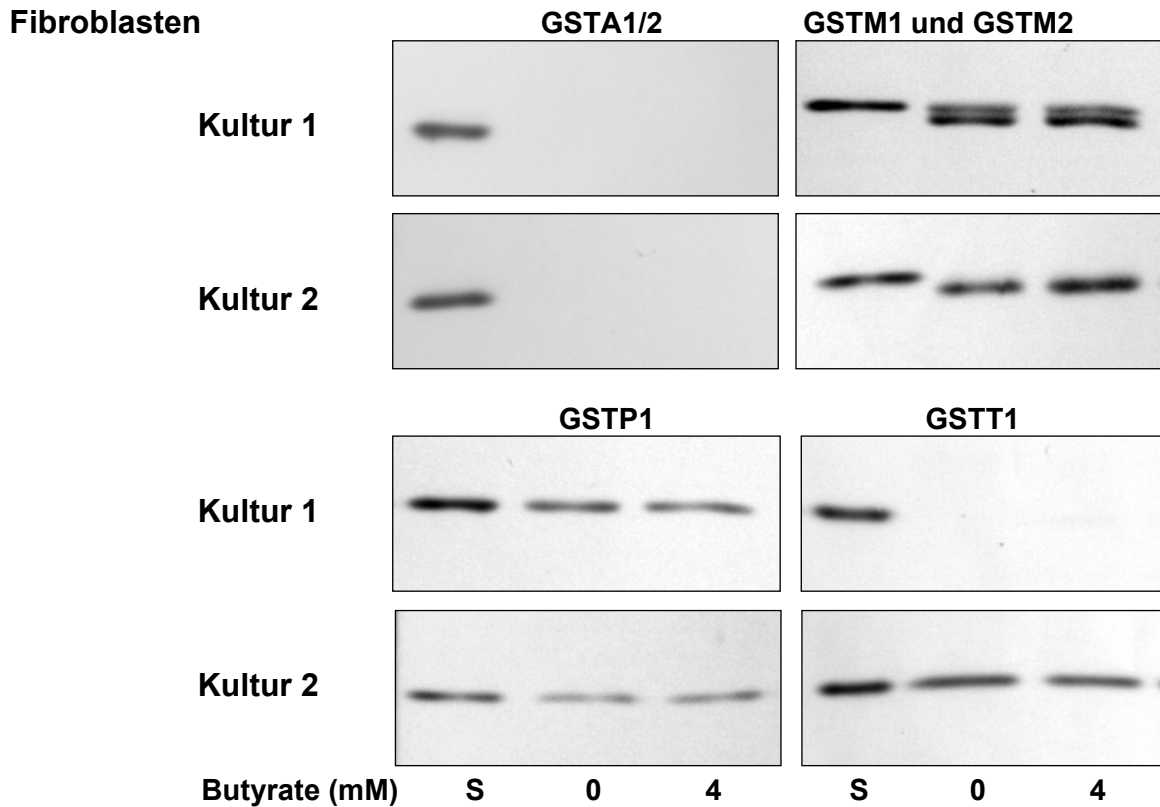


Abbildung 34: Beispielblots für die Expression der GST-Isoenzyme mit entsprechenden Standards in primären Kolonfibroblastenkulturen nach 72 h Butyratbehandlung

S (Standardprotein). Blot mit GSTM1 (obere Bande analog Standard) und GSTM2 (untere Bande).

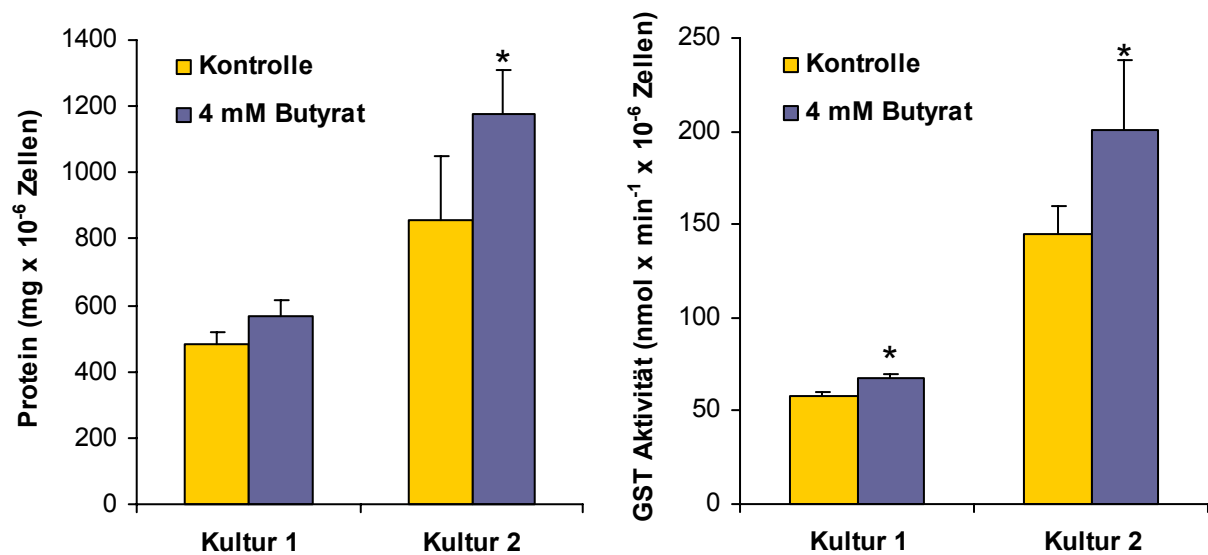


Abbildung 35: Induktion des cytosolischen Proteingehalts (links) u. der GST-Aktivität (rechts) in Bezug auf die Zellzahl in Kolonfibroblastenkulturen nach 72 h Butyratbehandlung

Angaben als MW ± SD (n = 3-5). Behandlung mit 4 mM Butyrat (72 h) versus Kontrolle: *, p < 0,05 (signifikant im zweiseitigen, ungepaarten t-Test).

Aufgrund der Induktion des Proteingehalts der Fibroblasten waren neben der GSTM2-Induktion in Kultur 2 auch die Induktion der GSTM1 und GSTM2 in Kultur 1 (Abbildung 36) sowie der Anstieg der GST-Aktivität in beiden Kulturen (Abbildung 35, rechts) signifikant, wenn die Ergebnisse auf Basis der Zellzahl berechnet wurden.

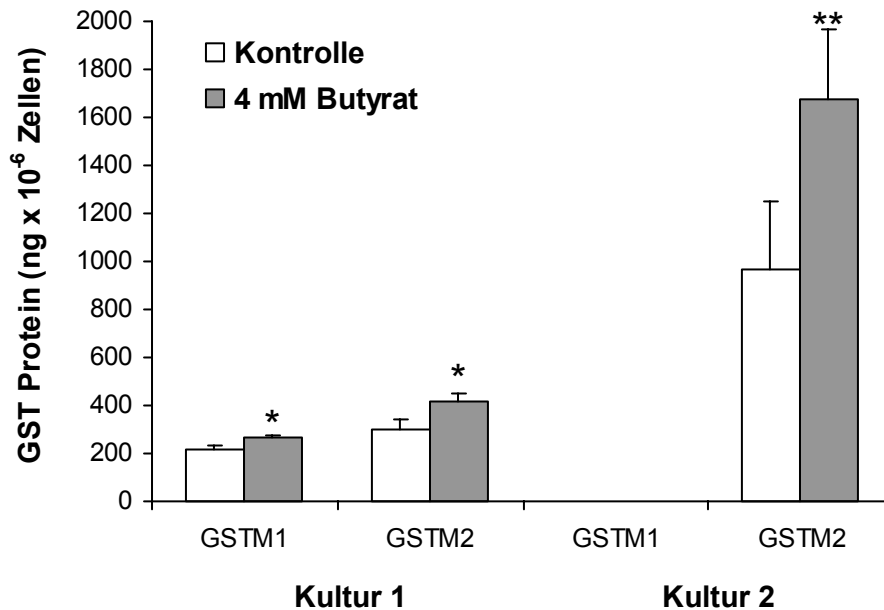


Abbildung 36: Induktion des GSTM1- und GSTM2-Proteins auf der Basis der Zellzahl in Kolonfibroblastenkulturen nach 72 h Butyratbehandlung

Angaben als MW ± SD (n = 3-5). Behandlung mit 4 mM Butyrat (72 h) versus Kontrolle: *, p < 0,05 (signifikant im zweiseitigen, ungepaarten t-Test).

Von den untersuchten Testsubstanzen hatte Butyrat den stärksten Einfluss auf die Proteinexpression der GST-Isoenzyme. In HT29 und HT29 Klon19A induzierte 4 mM Butyrat (72 h) die GSTA1/2, GSTM2 und GSTP1 am effektivsten, während Acetat und Propionat die GST-Isoenzyme nicht signifikant modulierten. Die Inkubation (72 h) mit Grünteeextrakt (20-40 µM) und EGCG (40-80 µM) führte ebenfalls zur signifikanten Induktion der GSTA1/2 in beiden Zelllinien. Der Vergleich der Induktionslevel beider Zelllinien nach 72 h zeigte, dass die GSTM2 in HT29 durch Butyrat stärker induzierbar war, während Grüntee und EGCG die GSTA1/2 in den HT29 Klon19A mehr induzierte. Die Experimente an primären Kolonzellen mit Butyrat führten aufgrund von Vitalitätsverlust und maximal möglicher Inkubationszeit von 24 h zu keinen signifikanten Veränderungen der GST. Dagegen induzierte Butyrat (4 mM, 72 h) in beiden Fibroblastenkulturen die GSTM2 und die GST-Aktivität sowie in Kultur 1 die GSTM1.

In Tabelle 24 sind die Ergebnisse zur GST-Induktion in Übersichtsform dargestellt.

Tabelle 24: Induktionsfaktoren der GST in den Kolonzellen nach Behandlung mit den Testsubstanzen auf der Basis der Zellzahl

<i>Substanz/ Zellen</i>	<i>Effektive Konzentration/ Zeit</i>	<i>GST</i>						<i>Gesamt- Protein</i>
		<i>A1/2</i>	<i>M1</i>	<i>M2</i>	<i>P1</i>	<i>T1</i>	<i>Aktivität</i>	
Butyrat HT29	4 mM 24 h			++	(+)	-	+	-
	48 h	++		++	+	-	+	+
	72 h	++		++	+	-	+	+
Klon 19A	24 h			++	+	-	-	-
	48 h			++	+	-	+	-
	72 h	++		++	+	-	+	(+)
Primäre Kolonzellen	24 h	-	(+)	(+)	-	(+)	-	-
Fibroblasten Kultur 1	72 h		+	+	-		+	-
Kultur 2	72 h			+	(+)	(+)	+	+
Acetat HT29	30-60 mM 72 h (30mM)	-			(+)	-	-	-
	Klon 19A 72 h (30;60mM)	-			30 mM (+)	-	+	+
Propionat HT29	5-10 mM 72 h (5mM)	-			-	-	-	-
	Klon 19A 72 h (5;10mM)	10 mM (+)			10 mM (+)	-	+	+
Grüntee HT29	20-40 µM 72 h	+			-	(+)	-	-
	Klon 19A 72 h	++			-	-	-	-
EGCG HT29	40-80 µM 72 h	40 µM (+)			40 µM (+)	-	-	-
	Klon 19A 72 h	80 µM ++			(+)	80µM (+)	-	-
		[2 µM] (+)			[2 µM] (+)			

- keine Induktion.
- (+) tendenzielle Induktion (Induktionsfaktor ≥ 1,3).
- + Induktionsfaktor ≤ 2,1.
- ++ Induktionsfaktor > 2,1.

4.2.3 Induzierbarkeit der Glutathion S-Transferase GSTM2 auf mRNA-Ebene

Ein weiteres Ziel der Arbeit war zu untersuchen, inwieweit die Induktion des GSTM2-Proteins auf einer erhöhten Expression der mRNA beruht, um damit den Anstieg dieses Isoenzym zu verifizieren. Die Untersuchungen wurden für GSTM2 durchgeführt, da GSTM2 das am stärksten induzierte Isoenzym infolge der Butyratinkubation in den Zelllinien darstellte und es durch Butyrat ebenfalls in geringerem Ausmaß in den Fibroblastenkulturen induzierbar war. Die mRNA-Expression der GSTM2 wurde mittels RT-PCR semi-quantitativ bestimmt, wobei die Expression der GSTM2 auf die Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) mRNA bezogen wurde, welche als sogenanntes „house keeping gene“ als interne Kontrolle diente.

4.2.3.1 Kalibrierung der PCR Zyklanzahl für semi-quantitative RT-PCR

Um die Ergebnisse quantitativ auswerten zu können, musste die Produktentnahme für GSTM2 und GAPDH im exponentiellen Bereich der Amplifikation stattfinden. Dazu wurde in Vorversuchen die Anzahl der PCR-Zyklen für GAPDH im Bereich von 15 - 41 Zyklen und für GSTM2 im Bereich von 35 - 41 Zyklen kalibriert.

Die Expression der GAPDH mRNA war nach 25 Zyklen marginal detektierbar (Ergebnisse sind nicht dargestellt). Auf der Grundlage des exponentiellen Anstiegs der GAPDH-Expression bis zu 30 PCR-Zyklen, wie das repräsentative Beispielgel in Abbildung 37 zeigt, wurden 28 Zyklen für die quantitative Auswertung der GAPDH-Banden gewählt. Die GSTM2-Expression war in den mit Butyrat behandelten Zellen nach 35 Zyklen als schwache Bande detektierbar (Ergebnisse sind nicht dargestellt). Aufgrund der marginalen bzw. nicht detektierbaren Expression der GSTM2 mRNA in den unbehandelten Kontrollen (Abbildung 39) wurden für die Auswertung der GSTM2-Expression 41 PCR-Zyklen durchgeführt.

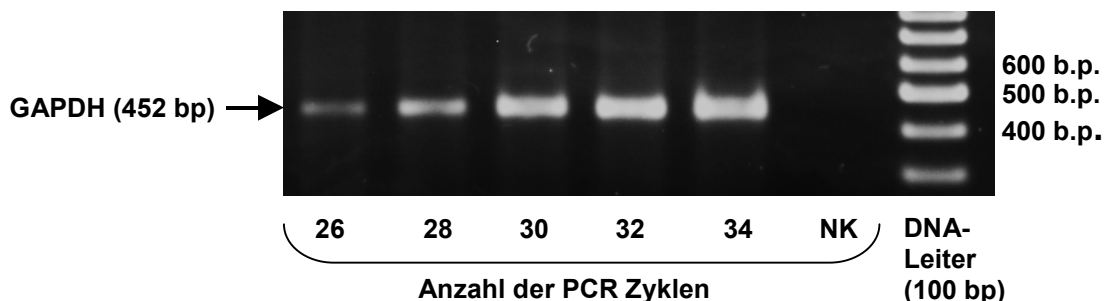


Abbildung 37: Kalibrierung der Anzahl der PCR-Zyklen für GAPDH (repräsentatives Gel)

NK (Negativkontrolle = PCR-Ansatz ohne DNA)

4.2.3.2 Einfluss von Butyrat auf die GSTM2 mRNA in HT29 und HT29 Klon 19A

Die Untersuchungen wurden in HT29 und HT29 Klon 19A, den Zellen mit der stärksten Induktion des GSTM2-Proteins, durchgeführt, während in den Fibroblastenkulturen - aufgrund der verhältnismäßig geringen Induktion des GSTM2-Proteins (Induktionsfaktor < 2) - die Expression auf mRNA-Ebene nicht untersucht wurde.

Die mRNA-Expression wurde nach 24 h und 72 h Inkubationszeit mit 4 mM Butyrat bestimmt. Der 72 h-Inkubationszeitpunkt wurde untersucht, da bei diesem die maximalen Konzentrationen an GSTM2-Protein gemessen wurden. Da die mRNA-Synthese ein frühes Ereignis in der Genexpression ist und schon nach 24 h erhöhte GSTM2-Proteinlevel detektierbar waren, wurde der 24 h-Inkubationswert ebenfalls einbezogen.

In beiden Zelllinien war die GSTM2 mRNA nach 24 h und 72 h Inkubation in den mit Butyrat behandelten Zellen im Vergleich zur Kontrolle signifikant erhöht (Abbildung 38). Dabei unterschieden sich HT29 und HT29 Klon 19A bezüglich ihres Induktionsniveaus nur unwesentlich. Ein repräsentatives Gel für die GSTM2 mRNA-Induktion in Bezug auf die GAPDH mRNA in HT29 zeigt Abbildung 39.

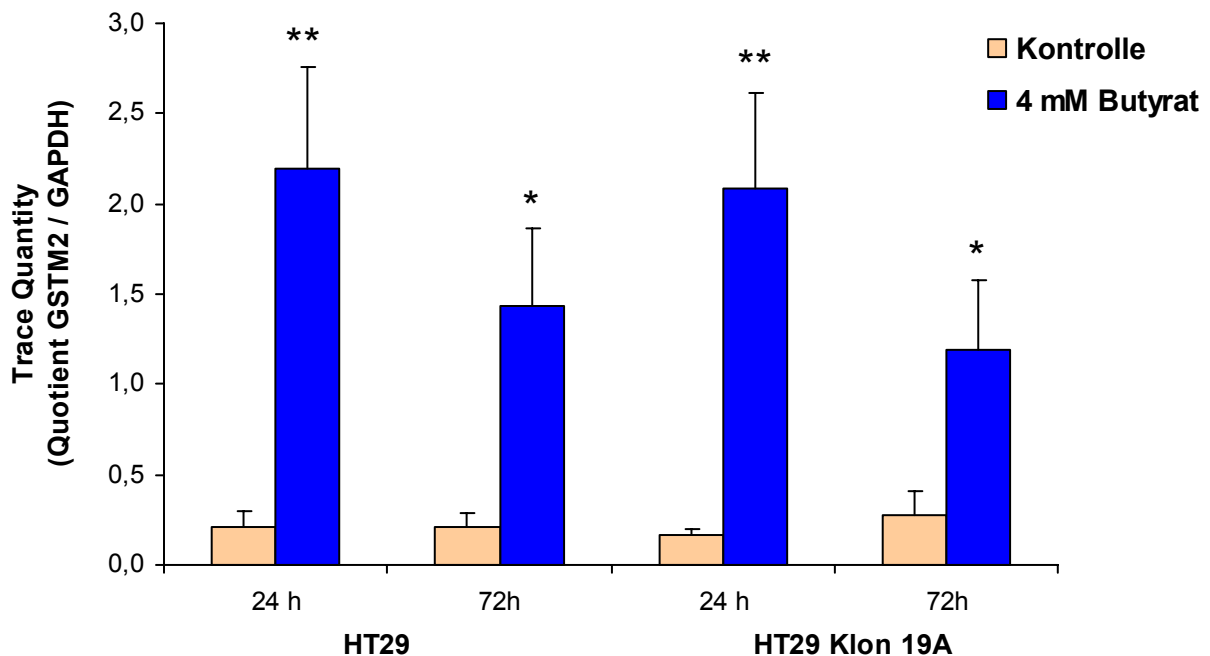


Abbildung 38: Expression der GSTM2 mRNA in Bezug auf GAPDH mRNA in HT29 und HT29 Klon 19A nach 24 h und 72 h Butyratbehandlung

Trace Quantity der Banden (Quotient GSTM2 / GAPDH) dargestellt. Angaben als MW \pm SD (n = 4). Behandlung mit 4 mM Butyrat versus Kontrolle: *, p < 0,05; **, p < 0,01 (signifikant im zweiseitigen, gepaarten t-Test).

Während die Expression der GSTM2 mRNA in allen Kontrollen der HT29 Klon 19A zumindest marginal detektiert werden konnte, war sie in HT29 in jeweils zwei Kontrollen (nach 24 bzw. 72 h) nicht detektierbar. Bei diesen Proben wurde der Hintergrund der scheinbar nicht sichtbaren Banden vermessen, um Induktionslevel in Bezug auf die GAPDH-Expression berechnen zu können.

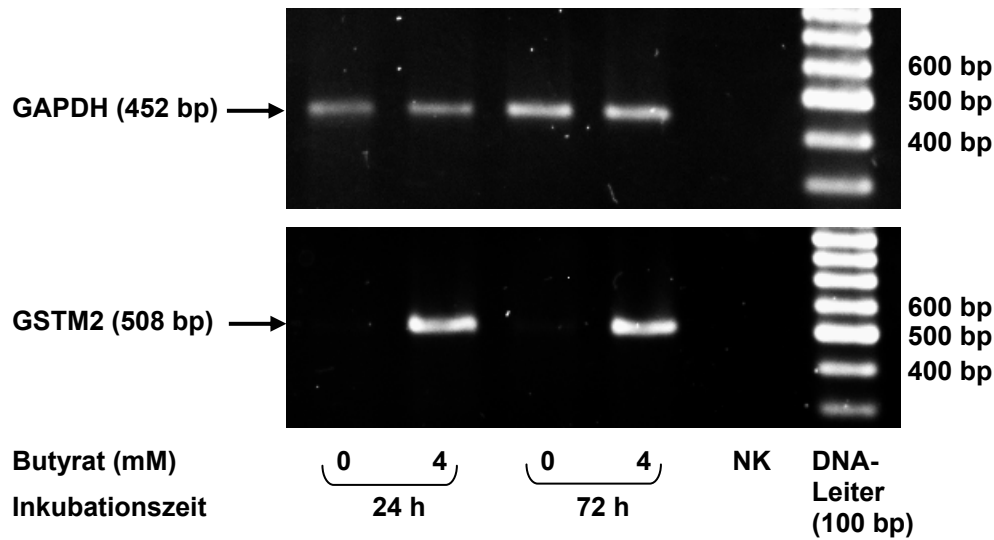


Abbildung 39: Repräsentatives PCR-Gel für die mRNA-Expression von GSTM2 und GAPDH nach 24 und 72 h Butyratbehandlung in HT29

NK (Negativkontrolle = PCR-Ansatz ohne DNA)

Hinsichtlich der Inkubationszeit war die Induktion nach 24 h stärker ausgeprägt, was sich auch in der Höhe des Induktionsfaktors widerspiegelte. So wurde in HT29 und HT29 Klon 19A die GSTM2 mRNA nach 24 h Inkubation ca.14fach (± 9) bzw. ca.13fach (± 4) und nach 72 h ca.8fach (± 5) bzw. 6fach (± 4) induziert. Jedoch waren die Unterschiede in der Trace Quantity zwischen den mit Butyrat behandelten Zellen einer Zelllinie (24 h- und 72 h-Wert in Abbildung 38) in HT29 nicht signifikant und in HT29 Klon 19A nur tendenziell signifikant ($p = 0,057$ im ungepaarten, zweigeteilten *t*-Test). Die relativ großen Schwankungen der Induktionsfaktoren zwischen den einzelnen Versuchen sind vor allem auf die an bzw. unterhalb der Detektionsgrenze liegende GSTM2 mRNA-Expression in den Kontrollen zurückzuführen.

Im Hinblick auf die Ergebnisse der Immunodetektion kann geschlussfolgert werden, dass der Anstieg des GSTM2-Proteins auf die erhöhte Transkription des Gens zurückzuführen ist. Der tendenzielle Abfall der mRNA nach 72 h könnte mit der Stabilisierung der mRNA nach längerer Einwirkzeit von Butyrat auf niedrigerem Niveau erklärt werden.

Im Gegensatz zur GSTM2 mRNA stieg die Konzentration des GSTM2-Proteins mit zunehmender Inkubationszeit an (s. 4.2.2.1.1 Abbildung 25), was - im Vergleich zur Transkription – auf den späteren Beginn der Translation hinweist. Des Weiteren kommt es durch die verstärkte Proteinsynthese wahrscheinlich zur allmählichen Anreicherung des Enzyms in den Zellen, womit die großen Unterschiede hinsichtlich der Enzymkonzentrationen zwischen 24 h- und 72 h-Wert (Faktor 4,8 in HT29 und 3,6 in Klon 19A) erklärbar wären.

Analog zu den immunobiochemischen Daten war GSTM2 auf mRNA-Ebene in HT29 und HT29 Klon 19A nicht bzw. marginal exprimiert. Die Inkubation der Zelllinien mit 4 mM Butyrat führte nach 24 h und 72 h zur signifikant erhöhten GSTM2 mRNA-Expression, woraus geschlossen werden kann, dass die Induktion des GSTM2-Proteins auf die erhöhte Transkription des Gens zurückzuführen ist. Der Anstieg der mRNA nach 24 h und 72 h weist auf den längerfristigen Einfluss von Butyrat auf die Genexpression hin.

4.2.4 Diskussion

Es ist bekannt, dass Ernährung und Lebensstil die Entwicklung von kolorektalem Krebs stark beeinflussen. Epidemiologische Daten weisen darauf hin, dass die hohe Aufnahme von butyrogenen Ballaststoffen oder resistenter Stärke mit einer verminderten Inzidenz des kolorektalen Karzinoms assoziiert wird [CASSIDY et al. 1994]. Weiterhin korreliert der Verzehr von Gemüse und Obst invers zum Risiko für kolorektalen Krebs, wobei insbesondere ein hoher Gemüsekonsum sich als protektiv erwies [STEINMETZ & POTTER 1991]. In diesem Zusammenhang werden unterschiedliche Mechanismen der Risikoreduktion diskutiert, wovon die Induktion der Glutathion *S*-Transferasen einen möglichen darstellt.

4.2.4.1 Butyrat

Butyrat, bekannt dafür, Apoptose und Differenzierung in Tumorzellen zu induzieren, kann auch die Aktivität von Phase-II-Enzymen erhöhen [KIRLIN et al. 1999]. Zwar wurde über die induzierende Wirkung von Butyrat auf die GST-Aktivität bereits berichtet [STEIN et al. 1996], allerdings ist bisher wenig darüber bekannt, welche GST-Isoenzyme im Kolon für diese Effekte verantwortlich sind und welche Konsequenzen die Induktion auf die Chemosensitivität der Kolonozyten gegenüber potentiellen Risikofaktoren (s. 4.3) hat.

Unsere Daten zeigen in beiden Zelllinien eine zeitabhängige Steigerung der GST-Aktivität verbunden mit einer Hochregulierung der Enzymproteine der GSTA1/2, GSTM2 und GSTP1 durch Butyrat. In Bezug auf die Induktionslevel unterschieden sich HT29 und die differenzierteren HT29 Klon 19A bis auf das GSTM2-Protein, welches in den HT29 stärker induziert wurde, nur unwesentlich. Es ist sicher eine Frage der Auffassung den Anstieg der GSTP1 als chemopräventiv zu beschreiben, da GSTP1 aufgrund seiner Überexpression in vielen Tumorgewebe, wie auch dem Kolonkarzinom, als Tumormarker diskutiert wird [MIYANISHI et al. 2001]. Jedoch kann der Anstieg der GSTA1/2 und der GSTM2, deren Proteinexpression in Kolontumorzellen herunterreguliert ist [PETERS et al. 1992], sehr wohl als Beitrag zur Differenzierung transformierter Zellen interpretiert werden. Die Induzierbarkeit der GSTP1 war verglichen mit den Induktionsfaktoren der GSTA1/2 und GSTM2 relativ gering, was durch die sehr hohe basale Expression dieses Isoenzym erklärt werden könnte. Trotz der bemerkenswerten Induktion der GSTA1/2- und GSTM2-Proteine um Faktor 3,5 bzw. 9,5 stellen die absoluten Mengen dieser Isoenzyme weniger als ein Prozent des detektierten GSTP1-Proteins dar. Deshalb basiert die Induktion der GST-Gesamtaktivität wahrscheinlich hauptsächlich auf dem Anstieg der GSTP1, obwohl die GSTM2 gegenüber CDNB, dem

Substrat zur Bestimmung der Gesamtaktivität, eine etwa dreimal höhere spezifische Aktivität aufweist (s. 4.3.3, Tabelle 25). Diese Annahme wird durch die hohe Korrelation zwischen den mittels ELISA bestimmten GSTP1 Proteinkonzentrationen und den dazugehörigen GST-Aktivitäten weiter gestützt. Bei der Induktion der GST-Aktivität durch die GSTP1 ist auch zu berücksichtigen, dass beide Zelllinien homozygot den *GSTP1*B* Genotyp aufweisen, welcher verglichen mit dem Wildtyp eine 3-4fach geringere Aktivität gegenüber CDNB besitzt (s. 1.4.4) [EATON & BAMMLER 1999]. Das Induktionsmaximum der GST-Aktivität ist bereits nach 48 h erreicht, während die höchsten Enzymkonzentrationen nach 72 h in den Zelllinien messbar sind. Mögliche Ursachen für diesen Unterschied sind die Induktion weiterer in dieser Arbeit nicht untersuchter GST-Isoenzyme sowie die höhere katalytische Effizienz der Enzymproteine nach 48 h, welche nach 72 h durch die weitere Zunahme der Proteinkonzentrationen der Isoenzyme wieder abnimmt. Die mit steigender Inkubationszeit höheren GST-Proteinlevel, wie sie für die GSTA1/2 und die GSTP1 detektiert wurden (Vergleich nach 24 h und 72 h Inkubationszeit), werden durch vorhergehende Ergebnisse von PETERS ET AL. in der humanen Adenokarzinomzelllinie Caco-2 gestützt, welche ebenfalls eine Zunahme des GST-Proteins bei längerer Kultivierung der Zellen fanden [PETERS & ROELOFS 1989]. Die durch Butyrat bedingte Induktion des cytosolischen Gesamtproteins, welche in HT29 stärker ausgeprägt war als in HT29 Klon 19A, deutet auf die Hochregulierung vieler weiterer Gene hin [BEYER-SEHLMAYER & POOL-ZOBEL 2002; IACOMINO et al. 2001].

Die beträchtliche Induktion der GSTM2 mRNA-Expression in HT29 und HT29 Klon 19A durch 4 mM Butyrat bestätigt den Nachweis des erhöhten GSTM2-Proteins mittels Western Blot. Die codierenden Sequenzen der *GSTM1* und *GSTM2* sind zu 99 % identisch [PEARSON et al. 1993]. Aufgrund dieser Sequenzhomologie bindet der in dieser Arbeit verwendete Mausantikörper anti-GSTM1 wahrscheinlich auch das Antigen der *GSTM2* [GRUBBEN et al. 2000]. TAKAHASHI ET AL. zeigte ebenfalls die mögliche Auftrennung der hGSTM1 und hGSTM2 aufgrund ihrer unterschiedlichen Molekulargewichte in der SDS-Page sowie den immunologischen Nachweis beider Isoenzyme mittels gegen GSTM1 gerichteter Antiseren [TAKAHASHI et al. 1993]. Die weiteren Isoenzyme der μ -Klasse (GSTM3, GSTM4 und GSTM5) sind aufgrund ähnlicher Molekulargewichte (25,4 – 26,4 kD) in der SDS-Page nicht klar von GSTM1 und GSTM2 auftrennbar, jedoch konnten die GSTM3 und GSTM5 nur mit den für das jeweilige Isoenzym spezifischen Antiseren nachgewiesen werden [ROWE et al. 1997; TAKAHASHI et al. 1993]. Diese Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass es sich bei dem nachgewiesenen induzierten Protein um die GSTM2 handelt. Mit diesem Ergebnis wird zum ersten Mal eine butyratvermittelte Induktion der GSTM2 im humanen Kolon demonstriert.

Eine Induktion dieses Isoenzym wurde bereits in der Rattenleber nach Applikation von Grünem Tee nachgewiesen, durch welchen auch die hepatische GST-Aktivität erhöht wurde (s. 4.2.4.2) [CHOU et al. 2000]. Die GSTM2 ist als effektives Entgiftungsenzym für Aminochrom bekannt, welches als neurotoxisches Oxidationsprodukt des Catecholamins Dopamin mit der Entwicklung der Parkinson Krankheit in Verbindung gebracht wird [BAEZ et al. 1997]. Außerdem weist die hepatische rGSTM2 der Ratte beachtenswerte Aktivitäten gegenüber dem genotoxischen Lipidperoxidationsprodukt HNE auf (s. 4.3.3) [ESTERBAUER et al. 1990; HIRATSUKA et al. 2001]. Dennoch ist die Rolle der GSTM2 im Metabolismus reaktiver Substanzen, insbesondere denen mit Relevanz für die Kolonkarzinogenese, noch nicht aufgeklärt. Die Hochregulierung der Transkription der *GSTM2* nach 24 und 72 h Inkubation erlaubt die Annahme, dass der durch Butyrat bedingte Einfluss auf die Genexpression über eine relativ lange Zeit besteht. Es ist für die humane GSTM2 nicht bekannt, wie die Induktion der mRNA-Level im Detail vor sich geht. Bei der Maus enthält die Promotorregion keine TATA-Box und die Aktivierung des Gens basiert auf einer SP-1 Bindungsstelle [KUMAR & REDDY 2001]. Die Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren des humanen *GSTM2*-Gens wurden dagegen noch nicht charakterisiert.

Die Induktion des GSTP1-Proteins ist vermutlich ebenfalls auf eine erhöhte Transkriptionsrate des Gens zurückzuführen. So wurde in HT29 mittels Northern Blot ein schwacher aber signifikanter Anstieg der *GSTP1* mRNA (ca. 1,5fach) nach 24 h Inkubation mit 4 mM Butyrat detektiert, welcher in etwa der Induktion des GSTP1-Proteins entspricht [EBERT et al. 2001]. Für den Einfluss von Butyrat auf die mRNA-Expression der *GSTA1* und *GSTA2* liegen keine Daten vor. Jedoch wurde für die Expression sowie die Induzierbarkeit der *GSTA1* in der Leber von Mäusen der Einfluss von Mutationen in der Promotorregion nachgewiesen (s. 4.1.4.2) [ZHU et al. 2001]. Ein potentieller Mechanismus für die Induktion der Expression der *GSTP1* und *GSTA1* durch Butyrat könnte die Aktivierung der Mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK) Kaskade sein. Durch Behandlung von HT29 mit 4 mM Butyrat wurde dieser Signaltransduktionsweg über die Erhöhung der Phosphorylierung der extrazellulär regulierten Kinasen 1/2 (ERK1/2) aktiviert [EBERT et al. 2001]. Die ERK1/2 regulieren die Aktivität des Transkriptionsfaktors AP-1, welcher in der Promotorregion von *GSTP1* und *GSTA1* binden kann und darüber die Gen-Expression induziert [WHALEN & BOYER 1998; WHITMARSH & DAVIS 1996]. Die GSTP1 als auch die GSTA1 und GSTA2 schützen vor Produkten des oxidativen Stresses und spielen somit bei der Protektion vor endogenen Risikofaktoren der Karzinogenese eine wichtige Rolle. Die GSTP1 entgiftet spezifisch Basenpropenale, während die GST A1 und A2 gegenüber physiologisch relevanten Hydroperoxiden (z. B. Cumen-

hydroperoxid) eine hohe katalytische Effizienz aufweist [BERHANE et al. 1994; ZHAO et al. 1999]. Des Weiteren entgiftet die GSTA1 spezifisch N-Acetoxy-2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridin (N-Acetoxy-PhIP), welches aufgrund seines karzinogenen Potentials in der Kolonkarzinogenese von Relevanz sein könnte [COLES et al. 2001a].

Die Konsequenzen der Erhöhung des GST-Status durch Butyrat in den beiden Zelllinien HT29 und HT29 Klon 19A können von zwei verschiedenen Aspekten aus betrachtet werden. Im Fall von Kolontumorzellen ist ein Anstieg der GST für den Organismus nicht von Nutzen, da er zur Resistenz der Zellen gegenüber Chemotherapeutika in der Krebstherapie beiträgt. Folglich wurden spezifische Inhibitoren für die humane GSTP1 entwickelt, um auf diese Weise der Chemoresistenz durch GSTP1-Induktion vorzubeugen [JOHANSSON et al. 2000]. Im Fall von nicht transformierten oder durch Einzelereignisse initiierten Kolonozyten, welche sich im sehr frühen Stadium der Karzinogenese befinden, könnte die erhöhte Chemoresistenz infolge GST-Induktion zur Prävention von Krebs bzw. seiner weiteren Entwicklung beitragen, indem die Wirkung karzinogener Substanzen vermindert wird. Die HT29 Klon 19A stellen hierbei die differenzierteren Zellen dar und sind daher für Rückschlüsse auf die Mechanismen in nicht transformierten humanen Kolonozyten ein geeigneteres Zellmodell als die HT29 [AUGERON & LABOISSE 1984]. Da es sich bei HT29 Klon 19A aber trotzdem um transformierte Zellen handelt, können sie Untersuchungen mit normalen Primärzellen des Kolons nicht ersetzen. Deshalb war es von Interesse die Wirkung von Butyrat auch an nicht transformierten primären Kolonozyten zu untersuchen.

Die Untersuchungen an primären Kolonozyten wurden mit 4-20 mM Butyrat durchgeführt, welche in Abhängigkeit von der Ernährung den physiologischen Konzentrationen im Darm entsprechen und von normalen Kolonozyten toleriert werden. Im Vergleich zu den Zelllinien zeigte die Behandlung mit Butyrat (24 h) in den primären Kolonozyten keine signifikanten Effekte auf die GST-Isoenzymlevel. Trends für leicht erhöhte Proteinlevel der GSTM2 und GSTT1 wurden bei 4 mM Butyrat beobachtet, während es durch Inkubation mit 10 - 20 mM Butyrat sogar teilweise zum leichten Abfall des Enzymproteins kam. Die fehlende Reaktion dieser Zellen könnte durch verschiedene Faktoren erklärt werden. Die Hauptursache ist wahrscheinlich der Verlust der Zellvitalität aufgrund von Apoptose während der Inkubation. Deshalb konnten die Zellen nur für eine maximale Dauer von 24 h unter den in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Zellkulturbedingungen kultiviert werden, was in Bezug auf die starken Effekte von Butyrat nach 48 bzw. 72 h Inkubation in den Zelllinien vergleichsweise kurz ist. Aufgrund dieser kurzen Inkubationszeit und als Folge der Heterogenität der individuellen Isoenzymexpression der GST [PETERS et al. 1992], wäre eine große Anzahl an Patienten

notwendig, um für diese geringen Änderungen der GST-Expression eventuell signifikante Ergebnisse zu erhalten.

Das Kolonepithel besteht hauptsächlich aus Enterozyten und Saumzellen. Beide Zellarten werden unter dem Begriff Kolonozyten zusammengefasst. Diese sind auf einer Basalmembran zu einem hochprismatischen Epithel angeordnet und über diese mit dem darunter liegenden Bindegewebe, welches Fibroblasten enthält, verbunden. Fibroblasten zeigen unterschiedliche Genexpressionsmuster der GST-Isoenzyme in verschiedenen Geweben [HANADA et al. 1991; MATTEY et al. 1993]. Weiterhin sind Fibroblasten in der Körperabwehr des Menschen über adaptive Expression von Genen [TAKAHASHI et al. 2000] sowie der Entgiftung von Xenobiotika durch ihre GST-Expression beteiligt [CHANG et al. 2001]. Das Enzymmuster der Fibroblasten im Kolon könnte an das umgebende Kolongewebe angepasst sein, da die Fibroblasten möglicherweise den gleichen aus dem Darmlumen stammenden Substanzen ausgesetzt sind. Folglich kann ein den Kolonozyten ähnliches GST-Isoenzymmuster in den Kolonfibroblasten vorhanden sein. Deshalb wurden die Kolonfibroblasten als Zellmodell für die Untersuchungen mit nicht transformierten Zellen des Kolons genutzt. Die Butyratbehandlung der Fibroblasten (4 mM; 72 h) zeigte einen geringen aber signifikanten Anstieg der schon stark exprimierten GSTM1- und GSTM2-Proteinlevel sowie der GST-Aktivität in Bezug auf die Zellzahl. Bei Vergleich der beiden Fibroblastenkulturen scheint die Expression des GSTM2-Proteins besser induzierbar zu sein (1,7fach gegenüber 1,4fach bei Bezug auf die Zellzahl), wenn für *GSTM1* der Nullpolymorphismus vorhanden ist. Diese Hypothese wird durch eine Fall-Kontroll-Studie von SLATTERY ET AL. unterstützt, in welcher der Zusammenhang zwischen in der Nahrung enthaltenen GST-Induktoren und der Relevanz des *GSTM1*-Genotyps bei Kolonkrebs untersucht wurde [SLATTERY et al. 2000]. In dieser Studie wurde bei Individuen mit *GSTM1*0* Genotyp, die älter als 55 Jahre waren, eine inverse Assoziation zwischen der Inzidenz von Kolonkrebs und dem hohen Verzehr von Gemüse der Kreuzblütengewächse, welche die GST induzieren, im Vergleich zu einer Gruppe, die kein Kreuzblütlergemüse aß, beobachtet. Für Individuen mit funktionsfähigem *GSTM1* Gen wurde dagegen kein Zusammenhang zwischen dem Verzehr von Kreuzblütlergemüse und Kolonkrebs gefunden. Ebenso zeigte LAMPE ET AL. in einer Interventionsstudie, dass der *GSTM1* Genotyp Einfluss auf die Induzierbarkeit der GST durch verschiedene Gemüsedäten hat [LAMPE et al. 2000]. So waren durch eine brassicareiche Diät die Proteinlevel der GST α im Serum der Probanden mit *GSTM1* Nulldeletion stärker induzierbar als bei Probanden mit dem Wildtyp-Allel. Da der *GSTM1*0* Genotyp möglicherweise mit einer erhöhten Empfänglichkeit für Krebs

zusammenhängt [COTTON et al. 2000; STRANGE & FRYER 1999], könnten diese Ergebnisse bedeutend für weitere Strategien in der Krebsprävention sein.

Auf der Basis dieser Ergebnisse kann angenommen werden, dass der Einfluss von Butyrat auf die GST in den Kolonfibroblasten – im Hinblick auf die spezifische Induktion der Isoenzyme der GST μ -Klasse und den Anstieg der Gesamtaktivität – auch auf die Modulation der GST-Expression in den primären Kolonozyten hindeutet. Die Relevanz dieser These wird durch Experimente mit Ratten gestützt, welche zeigen, dass Diäten mit nicht verdaulichen Polysacchariden die GST-Expression im Kolon modulieren können, wie z. B. die Steigerung der GSTP1 durch resistente Stärke [TREPTOW-VAN LISHAUT et al. 1999] bzw. der GSTA1/2 durch Weizenkleie [HELSEBY et al. 2000]. In beiden Studien wird die GST-Erhöhung auf erhöhte luminale Butyratkonzentrationen zurückgeführt. Zellkulturexperimente mit Butyrat, welche erhöhte GST-Aktivitäten [KIRLIN et al. 1999] sowie GSTP1-Proteinlevel [STEIN et al. 1996] zeigen, bestätigen diese Hypothese. Trotz der umfassenden Literatur über mögliche Mechanismen von Butyrat chemopräventiv zu wirken, ist sein *in vivo* Potential noch nicht aufgeklärt. Die Induktion des zellulären Proteingehalts durch Butyrat, die auch in den Fibroblasten beobachtet wurde, ist ein Anzeichen für eine insgesamt gesteigerte Genexpression [IACOMINO et al. 2001]. Dabei zeigt die Aktivierung von Signaltransduktionswegen, wie die Phosphorylierung der ERK1/2, und die Modifizierung der Histonacetylierung durch Butyrat [RAGIONE et al. 2001] mögliche Wege seiner Genregulation auf.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass Butyrat die GST-Isoenzyme, insbesondere die GSTM2, sowie die GST-Aktivität in Kolonzellen induzieren kann. Sie unterstützen damit die Theorie zur Verminderung des Kolonkrebsrisikos über die Aufnahme von Ballaststoffen, die im Darm zu Butyrat fermentiert werden. Die butyratbedingte Hochregulierung der GST in primären Kolonozyten kann zur besseren Deaktivierung exo- und endogener Risikofaktoren beitragen, wobei die genetische Disposition, wie das Auftreten von Polymorphismen, Einfluss auf die Induzierbarkeit der GST und folglich auf die Chemosensitivität der Zellen zu haben scheint.

4.2.4.2 Acetat und Propionat

Die kurzkettigen Fettsäuren Acetat und Propionat, welche ebenfalls das Wachstum von Tumorzelllinien hemmen, hatten im Vergleich zu Butyrat weitaus geringere Effekte auf den GST-Status. Interessanterweise wurde die GST-Aktivität in den HT29 Klon 19A jedoch nicht in HT29 induziert, wobei in Bezug auf das cytosolische Protein nur Propionat leicht induzierend (1,2fach) wirkte. Beide Fettsäuren hatten keine signifikanten Effekte auf das GST-Protein. Die tendenzielle Induktion des GSTA1/2- und GSTP1-Enzymproteins durch 10 mM Propionat,

wurde für die GSTP1-Level in Caco-2 Zellen nach Inkubation mit 5 mM Propionat auch von STEIN ET AL. beobachtet [STEIN et al. 1996]. Leicht induzierend wirkte auch Acetat in HT29 auf die GSTP1. Dabei könnte die erhöhte GST-Aktivität möglicherweise auch auf der Induktion weiterer hier nicht untersuchter Isoenzyme beruhen. So weist der Anstieg des cytosolischen Proteins durch Acetat und Propionat in den HT29 Klon 19A auf eine gesteigerte Expression weiterer Gene hin. Die bessere Induzierbarkeit der GST im Klon 19A scheint mit der geringeren Empfindlichkeit dieser Zellen gegenüber Acetat und Propionat im Zusammenhang zu stehen. So konnten die Zellen bei physiologischen Konzentrationen inkubiert werden, während das Wachstum von HT29 durch die Fettsäuren stärker inhibiert wurde. Aufgrund ihrer geringen Wirkung wurden beide Fettsäuren bei den Untersuchungen mit primären Kolonzellen nicht berücksichtigt.

4.2.4.3 Grüner Tee und Epigallocatechingallat

Grüner Tee und sein Hauptcatechin Epigallocatechingallat (EGCG) werden in der Krebsprävention als protektive Faktoren diskutiert, wobei ein wichtiger Mechanismus die Induktion von Phase-II-Enzymen darstellt. In den bisher vorwiegend an Ratten durchgeführten Studien zur Modulation von Phase-II-Enzymen wurden für die GST ausschließlich die Gesamtaktivität untersucht, während der Einfluss von Grüntee auf die Expression der einzelnen Isoenzyme noch weitgehend unbekannt ist. Im Hinblick auf mögliche protektive Wirkungen von Grüntee auf die Kolonkarzinogenese ist es von besonderem Interesse, seinen Einfluss auf die GST-Expression im Kolon zu untersuchen, da zu diesem bisher noch keine Daten in der Literatur vorliegen.

Die Inkubation mit Grüntee hatte in den Zelllinien HT29 und HT29 Klon 19A keinen signifikanten Einfluss auf die GST-Aktivität. Ebenso führte die Inkubation mit EGCG als Einzelsubstanz zu keinem Aktivitätsanstieg. Die Ergebnisse zur GST-Induktion von *in vivo* Studien mit Ratten sind heterogen. Die Behandlung von Wistar Ratten mit Grünteeextrakt (2 % bzw. 2,5-7,5 %, w/v, in Wasser) über vier Wochen führte in zwei Studien zum signifikanten Anstieg der hepatischen GST-Aktivität [BU-ABBAS et al. 1998; MALIAKAL et al. 2001]. Dagegen hatte in einer Studie mit F344 Ratten die Verabreichung von Grüntee (2 %, w/v, 6 Wochen) keinen Effekt auf die GST-Aktivität in der Leber [SOHN et al. 1994]. Ebenso hatte die Grüntee-Behandlung (2,5 %, w/v) in einer früheren Studie von BU-ABBAS ET AL. keine GST-induzierende Wirkung [BU-ABBAS et al. 1995], während die Aktivität der UDP-Glucuronosyltransferase in allen genannten Studien durch Grüntee gesteigert wurde. *In vitro* wurde in einer Studie von STEELE ET AL. die Aktivität der GST sowie der Quinonreduktase in der humanen Lungentumorzelllinie A427 durch Grüntee induziert, während gleichzeitig die Bildung von

Benzo[a]pyren-Addukten mit der DNA stark inhibiert wurde [STEELE et al. 2000]. Für die Entgiftung des karzinogenen Benzo[a]pyren-9,10-Epoxids weisen die GST-Klassen μ und π Substratspezifitäten auf [HAYES & PULFORD 1995]. Im Hinblick darauf ist die zweifache Induktion des hepatischen GSTM2-Proteins in Sprague-Dawley-Ratten nach Venenperfusion mit EGCG (9 h) in einer Studie von CHOU ET AL. von Interesse [CHOU et al. 2000].

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit zur Expression der GST-Isoenzyme in den Kolontumorzelllinien HT29 und HT29 Klon 19A zeigten keine Induktion des GSTM2-Proteins nach Behandlung mit EGCG. Jedoch wurde die Proteinexpression der GSTA1/2 durch Grüntee (20 - 40 μ M; 72 h) in beiden Zelllinien signifikant gesteigert. Die Induktionslevel lagen bei dem differenzierten Klon 19A wesentlich höher als bei HT29, was auf eine selektive Induktion der GST durch Grüntee in weniger transformierten Zellen hindeutet. Die Behandlung mit EGCG (80 μ M in HT29 bzw. 40 - 80 μ M in HT29 Klon 19A) führte zu ähnlichen, insgesamt etwas schwächeren, Induktionsleveln der GSTA1/2. Daraus lässt sich schließen, dass EGCG als mengenmäßig wichtigstes Catechin des Grünen Tees einen nicht unbedeutenden Anteil an der GST-Induktion durch Grüntee hat. Die Induktion der GSTA1/2 könnte für die Entgiftung des Karzinogens 2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo-(4,5-b)pyridin (PhIP), welches N-Acetoxy-PhIP aktiviert wird, bedeutsam sein, da letzteres spezifisch durch die GSTA1 entgiftet wird [COLES et al. 2001a]. Unterstützt wird diese Annahme durch Ergebnisse von SCHUT UND SNYDERWINE, die im Rattenkolon eine signifikante Absenkung der PhIP-DNA-Addukte durch die Gabe von Grüntee nachgewiesen haben [SCHUT & SNYDERWINE 1999]. Aufgrund der geringen Expression der GST α im Kolon [COLES et al. 2002] könnte der Konsum von Grüntee über die Induktion der GSTA1 entscheidend zur verminderten Chemosensitivität beitragen.

Die über Grüntee-Aufnahme erreichbaren Plasmakonzentrationen liegen mit 2 μ M weit unter den effektiv GST-induzierenden Konzentrationen (20-40 μ M) und hatten in der vorliegenden Arbeit maximal tendenzielle Effekte auf die GST. Jedoch zeigt die Studie von CHOU ET AL. für die GSTM2 schon nach 3 h den Anstieg der mRNA und nach 9 h den des Proteins sowie nach 12 h eine 28fach erhöhte GST-Aktivität, was auf eine sehr schnelle „adaptive response“ hinweist. So könnten möglicherweise die kurzzeitige Einwirkung von 2 μ M Grüntee schon für eine effektive Induktion der GST-Aktivität ausreichen, welche allerdings nach Ausschleußung der Wirkstoffe schnell wieder auf die Basallevel zurückgeht. Diese Hypothese wird durch die schnelle Aktivierung der ERK1/2 (nach 10 min) als möglichen Signaltransduktionsweg für die GST-Induktion durch 2 μ M Grünteeextrakt in HT29 Klon 19A unterstützt, welche jedoch innerhalb von 30 min nach Applikation wieder abfällt [KAUTENBURGER 2000]. Das antioxidative Response Element als weiterer möglicher Signaltransduktionsweg für die GSTA2-

Induktion wird ebenfalls durch die Polyphenole des Grüntees aktiviert [CHEN et al. 2000]. Die Induzierbarkeit der *GSTA1* scheint außerdem abhängig von Mutationen im Promotor zu sein (s. 4.1.4.2).

Mit Blick auf die stärkere GST-Induktion im Klon 19A, lassen die Ergebnisse die Hypothese zu, dass Grüntee durch Erhöhung des GST-Status in primären Kolonzellen zur verbesserten Zellabwehr gegenüber ernährungsrelevanten Karzinogenen wie PhIP beiträgt und darüber in wenig transformierten Zellen zur Verzögerung des Zelltransformationsprozesses führt.

4.2.4.4 Weitere Testsubstanzen

Isothiocyanate können Phase-II-Enzyme induzieren, wobei es große Unterschiede zwischen den einzelnen Substanzen in Bezug auf ihr Induktionspotential gibt [WATZL & LEITZMANN 1999]. ZHANG UND TALALAY zeigten in diesem Zusammenhang, dass Isothiocyanate, welche in hohem Maße von der Zelle aufgenommen und akkumuliert werden, gleichfalls starke Induktoren von Phase-II-Enzymen sind [ZHANG & TALALAY 1998]. Während **Phenethylisothiocyanat** (PEITC) unter den Versuchsbedingungen der vorliegenden Arbeit zu keiner signifikanten Änderung der GST-Gesamtaktivität führte, induzierte PEITC in einem 14tägigen Fütterungsversuch von VAN LIESHOUT ET AL. die GST-Aktivität (1,2fach) und die GSTP1 (1,3fach) jedoch nicht die GST α , μ und T1 im Kolon der Ratten [VAN LIESHOUT et al. 1996; VAN LIESHOUT et al. 1998]. In Bezug auf die GST-Aktivität liegt dieser geringe Induktionsfaktor in dem in der vorliegenden Arbeit getesteten Versuchsaufbau an der Detektionsgrenze für statistisch gesicherte Aussagen. Weiterhin zeigt eine Arbeit von YE UND ZHANG in zwei Mauszelllinien einen Zusammenhang zwischen der geringen Akkumulation von PEITC in den Zellen sowie seiner schnellen Ausschleußung und der sehr geringen Induzierbarkeit der GST-Aktivität durch PEITC auf [YE & ZHANG 2001]. Die Induktion der GST-Aktivität konnte in dieser Studie durch die dreimalige Erneuerung des Mediums mit 5 μ M PEITC innerhalb des Inkubationszeitraums (24 h) jedoch stark gesteigert werden. Diese Ergebnisse sprechen für den schnellen Abbau von PEITC, welcher aufgrund der langen Inkubationszeit (72 h) wiederum eine mögliche Ursache für die fehlende Erhöhung der GST-Aktivität in den untersuchten Kolonzelllinien darstellt.

Hinsichtlich der Wirkung von Phytoöstrogenen auf die Expression von Phase-II-Enzymen zeigten Versuche mit Ratten, dass die Fütterung von Soja, welches die beiden Isoflavonoide Genistein und Daidzein enthält, zum signifikanten Aktivitätsanstieg der hepatischen GST und der Quinonreduktase im Kolon führte [APPELT & REICKS 1997]. Für **Enterodiol** konnte unter den getesteten Versuchsbedingungen kein messbarer Effekt auf die GST-Aktivität festgestellt

werden. Ebenso führte **β -Carotin** – sowohl in physiologisch relevanter Konzentration als auch die EC₅₀ – zu keiner signifikanten Induktion der GST-Aktivität in beiden Zelllinien. Während es *in vivo* in einer Studie von POOL-ZOBEL ET AL. durch die Intervention mit Karottensaft bei einem Teil der Probanden zur Induktion der GST-Aktivität sowie des GSTP1-Proteins in den peripheren Lymphozyten kam, konnte dieses Ergebnis *in vitro* nicht bestätigt werden [GLEI et al. 2002; POOL-ZOBEL et al. 1998]. In der oben beschriebenen Studie von VAN LIESHOUT ET AL. induzierte β -Carotin signifikant die Proteinexpression der GST μ in Magen und Leber (je 1,2fach) aber nicht im Kolon von Ratten [VAN LIESHOUT et al. 1996].

Dithiolthione, welche neben Isothiocyanaten, Flavonoiden und Phenolen ebenfalls im Gemüse von Kreuzblütlern (z. B. Rosenkohl) vorkommen, sind bekannt für ihre induzierende Wirkung auf die GST bei gleichzeitiger Anhebung des intrazellulären Glutathionspiegels [BENSON 1993]. Das synthetische Dithiolthion **Oltipraz** wurde im Vergleich zu den natürlich vorkommenden Substanzen ebenfalls auf sein GST-induzierendes Potential untersucht, da es sich in einer Interventionsstudie in China als effektiver GST-Induktor erwies [WANG et al. 1999]. In dieser Studie wirkte es unter anderem über die Steigerung der hepatischen GST-Aktivität chemoprotektiv auf die Entstehung von Aflatoxin B₁-induziertem Leberkrebs. In Bezug auf die Modulation der GST im Kolon führte Oltipraz in einer Untersuchung von RAO ET AL. mit F344 Ratten zum 3-4fachen Anstieg der GST-Aktivität [RAO et al. 1991]. Dagegen zeigte es in einer Studie von VAN LIESHOUT ET AL. keinen signifikanten Effekt auf die GST im Kolon von Wistar-Ratten [VAN LIESHOUT et al. 1996]. *In vitro* verursachte Oltipraz (100 μ M, 24 h) in einer Studie von O'DWYER ET AL. einen dreifachen Anstieg der GST-Aktivität in HT29 [O'DWYER et al. 1997], während es unter den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Inkubationsbedingungen (50-300 μ M, 72 h) in beiden Kolontumorzelllinien keinen aktivitätssteigernden Effekt hatte, wofür die Ursache in der längeren Inkubationszeit liegen könnte. In einer dreimonatigen Interventionsstudie von SZARKA ET AL. führte die Verabreichung von Oltipraz (zweimal wöchentlich 125 bzw. 250 mg) an Probanden mit erhöhtem Kolonkrebsrisiko ebenfalls zu keiner signifikanten Modulation der GST-Aktivität im Kolon [SZARKA et al. 2001].

Diese Ergebnisse zusammenfassend weisen darauf hin, dass bezüglich der Protektion von Dickdarmkrebs das antikanzerogene Potential von PEITC, β -Carotin und Enterodiol wahrscheinlich auf anderen Mechanismen als der Induktion der GST in den Kolonozyten beruht. Hingegen lassen die sehr unterschiedlichen Ergebnisse zu Oltipraz vermuten, dass die Höhe sowie die Art und Häufigkeit der Dosierung einen entscheidenden Einfluss auf die GST-modulierende Wirkung von Oltipraz im Kolon hat.

4.3 Einfluss der GST Induktion auf die Genotoxizität

Der abschließende Teil dieser Arbeit hatte zum Ziel, die Konsequenzen einer erhöhten GST-Expression auf die Entgiftungskapazität der Zellen zu untersuchen und zu prüfen, inwieweit diese Modulation zu einer verbesserten Chemoprotektion beiträgt. Für die mittels Einzelzellmikrogelelektrophorese (Comet-Assay) durchgeführten Untersuchungen wurden zwei Substanzen mit genotoxischem Potential (1-Chlor-2,4-dinitrobenzol und 4-Hydroxy-2-nonenal) ausgewählt, welche gleichzeitig Substrate der GST darstellten. Als induzierende Substanz wurde Butyrat gewählt, das bei einer Konzentration von 4 mM nach 72 h Inkubationszeit die GST-Gesamtaktivität - aufgrund der erhöhten Isoenzymexpression - in den untersuchten Zellen am effektivsten steigerte. Die Durchführung der Experimente erfolgte für HNE mit den Zelllinien HT29 und HT29 Klon 19A und für CDNB mit HT29, welche die stärksten Effekte in Bezug auf die Modulation der GST durch Butyrat zeigten. Um auszuschließen, dass die in den Zellen gemessenen DNA-Schäden nicht auf cytotoxischen Effekten von CDNB bzw. HNE beruhten, wurde die Vitalität der Zellen nach der Substanzbehandlung mittels Trypanblau-Ausschlusstest bestimmt.

4.3.1 Auswirkungen auf die Genotoxizität von CDNB

1-Chlor-2,4-dinitrobenzol (CDNB) wurde als nicht natürlich vorkommende Modellsubstanz ausgewählt, da es als Substrat bei der Bestimmung der GST-Gesamtaktivität von fast allen GST-Isoenzymen - mit Ausnahme der GST θ - metabolisiert wird (s. 3.2.2.2 Abbildung 10) und genotoxisches Potential besitzt [EATON & BAMMLER 1999; KERKLAAN et al. 1987].

CDNB wirkte im eingesetzten Konzentrationsbereich (25 bis 62,5 μ M) bei einer Inkubationsdauer von 15 min in HT29 nicht cytotoxisch. Die Vitalitäten betragen bei den Kontrollen (Ethanol- und Mediumkontrolle) und den mit CDNB geschädigten Zellen durchschnittlich 84 % bzw. 85 %, wobei sich die mit Butyrat vorbehandelten Zellen nicht von den unbehandelten Zellen unterschieden. Die Ursache des leichten Vitalitätsabfalls lag im versuchstechnischen Ablauf begründet, in welchem die Vitalitätsbestimmung erst 2 - 3 h nach der Behandlung mit der schädigenden Substanz durchgeführt werden konnte und die Zellen während dieser Zeit auf Eis standen.

Das genotoxische Potential von CDNB wurde bei den Untersuchungen in HT29 bestätigt. Abbildung 40 zeigt die konzentrationsabhängige Steigerung der DNA-Strangbrüche - in Form der „tail intensity“ (TI) - in mit Butyrat (4 mM; 72 h) vorbehandelten Zellen im Vergleich zu den unbehandelten Zellen der Mediumkontrollen.

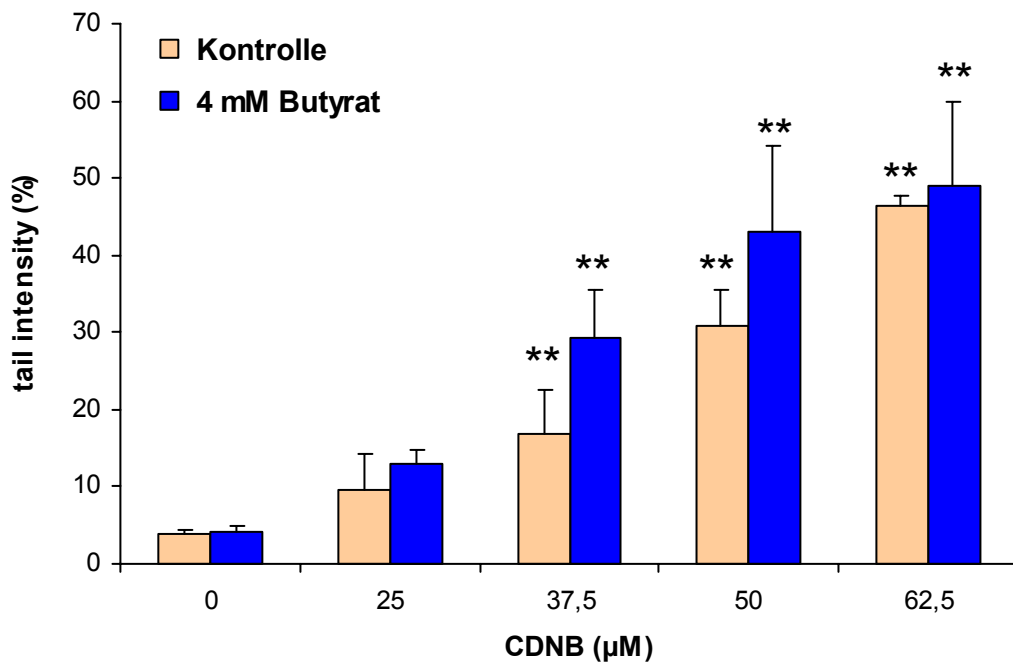


Abbildung 40: Durch 1-Chlor-2,4-dinitrobenzol (CDNB) induzierte DNA-Stangbrüche in HT29 nach 72 h Butyratinkubation im Vergleich zur Kontrolle

Angaben als MW \pm SD (n = 4). CDNB-Behandlung versus zugehörige Ethanolkontrolle ohne CDNB: **, p < 0,01 (signifikant in one-way ANOVA mit Dunnetts Posttest).

CDNB setzte schon bei 25 μ M, der niedrigsten getesteten Konzentration, im Vergleich zur nicht geschädigten Ethanolkontrolle DNA-Schäden, wobei die Schädigung sowohl für die mit Butyrat behandelten als auch für die unbehandelten Zellen erst ab Konzentrationen \geq 37,5 μ M CDNB signifikant war (Abbildung 40).

Hinsichtlich des Einflusses der GST-Induktion auf die Genotoxizität von CDNB zeigten die mit Butyrat vorinkubierten Zellen bei allen getesteten Konzentrationen tendenziell höhere DNA-Schäden, wobei die Unterschiede bei 37,5 μ M und 50 μ M CDNB am größten waren. Aufgrund des variierenden Niveaus der DNA-Schädigung zwischen den einzelnen Versuchen und der daraus folgenden Standardabweichung, waren die Differenzen für 37,5 μ M und 50 μ M nicht signifikant. Bei der Auswertung der Versuche nach dem prozentualen Anteil der geschädigten Zellen, bei welcher Zellen mit einer tail intensity > 6 % als geschädigt bewertet wurden, erreichte der Unterschied zwischen Butyratbehandlung und Kontrolle bei 50 μ M CDNB Signifikanz im gepaarten *t*-Test (Abbildung 41). Die geringe Differenz zwischen Behandlung und Kontrolle bei 62,5 μ M CDNB ist wahrscheinlich auf die Detektionsgrenzen der Methode zurückzuführen, die bei stark geschädigter DNA nicht mehr sensitiv für kleine Unterschiede ist.

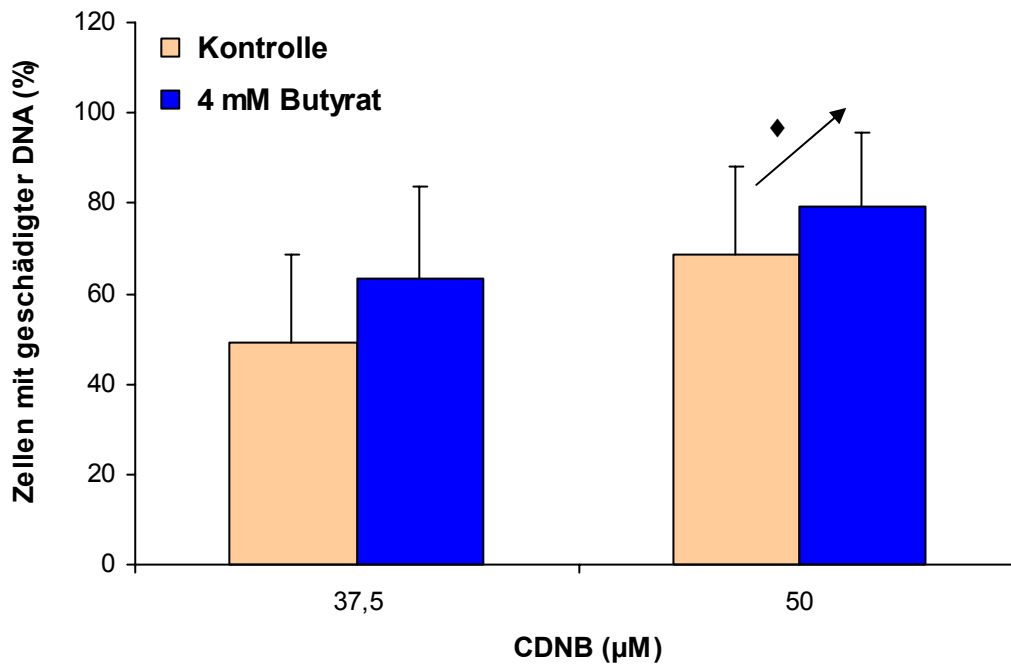


Abbildung 41: Prozentualer Anteil der HT29-Zellen mit durch CDNB geschädigter DNA nach 72 h Butyratinkubation im Vergleich zur Kontrolle

Angaben als MW \pm SD (n = 5). Mit 4 mM Butyrat vorinkubierte Zellen versus nicht vorbehandelte Zellen: \blacklozenge , p < 0,05 (signifikant im zweiseitigen, gepaarten *t*-Test).

4.3.2 Auswirkungen auf die Genotoxizität von HNE

4-Hydroxy-2-nonenal (HNE), welches bei der Lipidperoxidation endogen gebildet wird, stellte als zweite untersuchte Substanz ebenfalls ein Substrat für verschiedene Isoenzyme der GST dar (s. 1.4.3.3 Abbildung 7) [BERHANE et al. 1994; KETTERER 1998]. Es wurde ausgewählt, da es aufgrund seiner hohen Reaktivität gegenüber Lipiden und DNA als relevanter Risikofaktor in der Karzinogenese diskutiert wird [ESTERBAUER et al. 1990].

Im Hinblick auf cytotoxische Wirkungen unterschieden sich mit durchschnittlich 78 – 80 % Vitalität die Ethanolkontrollen der mit Butyrat vorbehandelten Zellen sowie der nicht vorbehandelten Zellen in HT29 und HT29 Klon 19A nicht voneinander. Im Vergleich zu den Ethanolkontrollen hatte die Behandlung mit HNE (100 bis 200 µM über 30 min) – insbesondere die höchste Testkonzentration – leicht cytotoxische Effekte, wobei die Zelllinie HT29 empfindlicher als ihr Klon 19A reagierte. Bei HT29 (Stamm) fiel die mittlere Vitalität der mit HNE geschädigten Zellen um ca. 15 % auf 64 % (Kontrolle) bzw. 66 % (Butyrat). Dagegen hatte HNE bei den HT29 Klon 19A nur einen leichten Einfluss auf die Vitalität der mit Butyrat behandelten Zellen (71 %), während die Vitalität der nicht behandelten Zellen sich im Vergleich

zur Ethanolkontrolle nicht veränderte. Die Vitalitätsbestimmung konnte jeweils erst nach 2-3 h durchgeführt werden, was als Ursache für die insgesamt etwas niedrigere Vitalität der Zellen in Betracht gezogen werden muss.

HNE wirkte in beiden Zelllinien genotoxisch, wobei die gemessenen DNA-Schäden bei HT29 im Vergleich zum Klon 19A deutlich höher waren (Abbildung 42 A und B). In den Zellen ohne Butyratbehandlung induzierte HNE ab 100 μM (in HT29) bzw. 150 μM (in HT29 Klon 19A) gegenüber den jeweiligen Ethanolkontrollen signifikant höhere DNA-Strangbrüche.

Im Unterschied zu CDNB wurde die Genotoxizität von HNE durch die Vorinkubation der Zellen mit Butyrat in beiden Zelllinien deutlich vermindert. Durch die Behandlung der Zellen mit Butyrat wurde die tail intensity im Vergleich zu den nicht behandelten Zellen in den HT29 bei 100 μM und 150 μM HNE signifikant auf das Schädigungsniveau der Ethanolkontrollen abgesenkt (Abbildung 42 A). Bei 200 μM HNE war die Absenkung nicht so stark ausgeprägt, was sich mit der Auslastung der Entgiftungskapazität des Glutathion-/GST-Systems erklären lässt. Außerdem waren in den gegenüber HNE empfindlicheren HT29 (Stamm) bei der Exposition mit 200 μM HNE leicht cytotoxische Effekte nicht auszuschließen. Im Vergleich dazu war in den HT29 Klon 19A die Verminderung der DNA-Schäden bei 150 μM und 200 μM signifikant, wobei bei 150 μM die Schäden ebenfalls auf Kontrollniveau abgesenkt wurden (Abbildung 42 B).

Die Ergebnisse zusammenfassend wurde gezeigt, dass die Induktion der Expression und Aktivität der Glutathion S-Transferasen durch Behandlung der Zellen mit Butyrat entscheidenden Einfluss auf die Genotoxizität von CDNB und HNE hat. Während die Genotoxizität der Modellsubstanz CDNB aufgrund der GST-vermittelten Giftungsreaktion in den butyratbehandelten Zellen gesteigert war, wurde HNE als endogener Risikofaktor bei der Karzinogenese in diesen Zellen effektiver entgiftet, was zur deutlichen Verminderung seiner Genotoxizität führte. Beim Vergleich der beiden Zelllinien waren die stärker differenzierten HT29 Klon 19A gegenüber der genotoxischen Wirkung von HNE weniger empfindlich als die HT29.

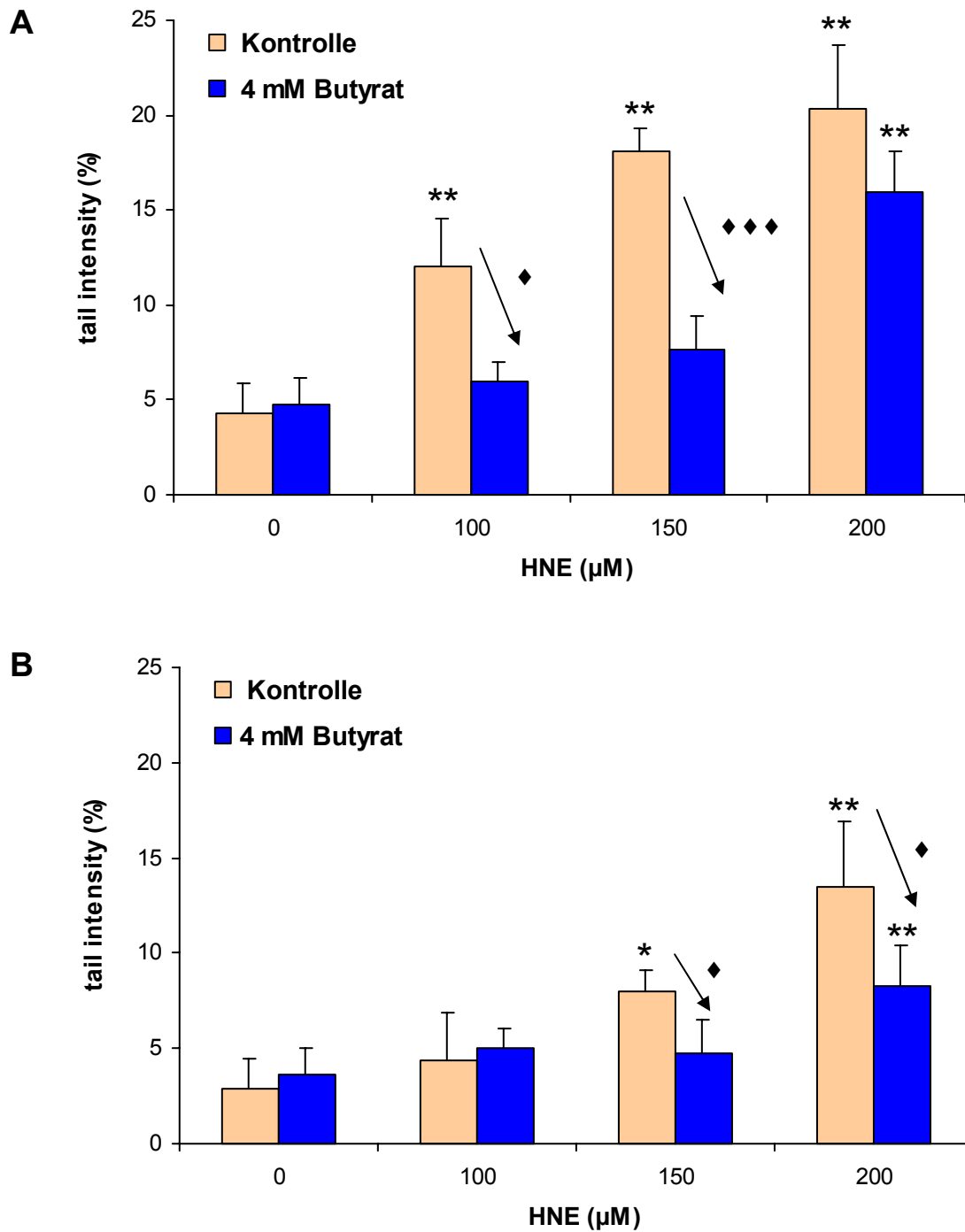


Abbildung 42: Durch 4-Hydroxy-2-nonenal (HNE) induzierte DNA-Strangbrüche in HT29 (A) und HT29 Klon 19A (B) nach 72 h Butyratinkubation im Vergleich zur Kontrolle

Angaben als MW ± SD (n = 3-4). HNE-Behandlung versus zugehörige Ethanolkontrolle ohne HNE: *, p < 0,05; **, p < 0,01 (signifikant in one-way ANOVA mit Dunnetts Posttest). Mit 4 mM Butyrat vorinkubierte Zellen versus nicht vorbehandelte Zellen: ♦, p < 0,05; ♦♦♦, p < 0,001 (signifikant im zweiseitigen, ungepaarten t-Test).

4.3.3 Diskussion

Die Induktion von Phase-II-Enzymen, wie den Glutathion *S*-Transferasen, gilt als eine von mehreren möglichen Strategien bei der Krebsprävention, die insbesondere für Individuen mit niedrigem GST-Status von Relevanz zu sein scheint. Die interindividuell sehr unterschiedliche Expression der GSTs scheint bei der Induzierbarkeit eine große Rolle zu spielen wie Studien von LAMPE ET AL. und SLATTERY ET AL. für Individuen mit dem *GSTM1*0* Genotyp gezeigt haben [LAMPE et al. 2000; SLATTERY et al. 2000]. Das Konzept der Chemoprotektion durch GST-Induktion wurde bereits mit Oltipraz in China zur Prävention von Aflatoxin B₁-induziertem Leberkrebs praktiziert. In diesen Interventionsstudien wurde gezeigt, dass Oltipraz über die Induktion der hepatischen GST-Aktivität zur vermehrten Ausscheidung von Aflatoxin-Mercaptursäuren im Harn und damit zur verminderten Exposition der Hepatozyten mit dem karzinogenen Aflatoxin B₁-8,9-Epoxid führt [JACOBSON et al. 1997; WANG et al. 1999]. Anhand dieser Humanstudien konnte erstmalig die Möglichkeit des gezielten Einsatzes von GST-Induktoren in der Chemoprävention der Karzinogenese gezeigt werden.

Für das Kolon erwies sich - als Ergebnis der vorliegenden Arbeit - Butyrat als effektivster Induktor der GST. Im Gegensatz zu dem pharmazeutischen Wirkstoff Oltipraz stellt Butyrat eine natürliche Substanz dar, welche als wichtiges Abbauprodukt bei der mikrobiellen Fermentation im Kolon entsteht. Butyrat induzierte in den untersuchten Kolonzelllinien die Expression und Gesamtaktivität der GST am stärksten und hatte auch auf den GST-Status in primären Kolonfibroblasten steigernde Effekte. Auf der Grundlage dieser Ergebnisse wurden die Untersuchungen zur Chemoprotektion mit Butyrat durchgeführt.

Es ist bisher nicht genau bekannt, in welchem Umfang karzinogene Lebensmittelkontaminanten oder andere Faktoren, wie z. B. oxidativer Stress, Dickdarmkrebs induzieren. Man geht jedoch davon aus, dass exogene Faktoren wie karzinogene Substanzen in Lebensmitteln zusammen mit endogenen Risikofaktoren zum Krebsgesamtrisiko beitragen. Als endogene Risikofaktoren werden Produkte des oxidativen Stresses angesehen. Dazu zählen verschiedene Aldehyde, 2-Alkenale und 4-Hydroxyalkenale, welche während des physiologischen Prozesses der Lipidperoxidation von Membranlipiden und Lipoproteinen entstehen. Ein Hauptvertreter dieser physiologisch relevanten Oxidationsprodukte ist 4-Hydroxy-2-nonenal (HNE), eine biologisch hochaktive Substanz mit cytotoxischen, hepatotoxischen, mutagenen und genotoxischen Eigenschaften. HNE wirkte in Versuchen mit Rattenzellen ab 900 µM cytotoxisch und zeigte bei zehnfach niedrigeren Konzentrationen Mutagenität [ESTERBAUER et al. 1990].

In den Zelllinien HT29 und HT29 Klon 19A wurde in der vorliegenden Arbeit mittels Comet-Assay ebenfalls die genotoxische Wirkung von HNE nachgewiesen. Im Vergleich zu den HT29-Zellen reagierte der aus dieser Zelllinie differenzierte Klon 19A weniger chemosensitiv gegenüber der HNE-Exposition. So induzierten in HT29 schon 100 μM HNE signifikant höhere DNA-Strangbrüche gegenüber unbehandelten Zellen, während in HT29 Klon 19A diese erst ab 150 μM HNE messbar waren. Die geringere Empfindlichkeit der differenzierteren Klonzellen lässt vermuten, dass Primärzellen ebenfalls eine größere Chemotoleranz gegenüber HNE besitzen. So sind trotz Anwesenheit von Entgiftungsenzymen Basallevel von etwa 0,3 μM HNE im Plasma normal, welche die permanente Anwesenheit niedriger Konzentrationen reaktiver Sauerstoffspezies im Körper widerspiegeln [KETTERER 1998]. Unter Bedingungen des oxidativen Stresses können durch Lipidperoxidation relativ große Mengen an HNE im Konzentrationsbereich von 10 – 5000 μM gebildet werden. Diese hohen Konzentrationen werden *in vivo* maßgeblich für die cytopathologischen Effekte während oxidativen Stresses verantwortlich gemacht [UCHIDA et al. 1999].

HNE, welches bei der Oxidation von ω -6-mehrfach ungesättigten Fettsäuren wie Arachidonsäure und Linolsäure entsteht, kann über drei Wege metabolisiert werden: (1.) über die GST-katalysierte Konjugation von Glutathion zu HNE-GSH-Konjugaten (HNE-GSH) – diese Konjugate werden im Organismus aus der Zelle über membrangebundene GSH-Konjugat-Transporter eliminiert [KEPPLER 1999] und anschließend hauptsächlich in der Niere zu Mercaptursäuren abgebaut – (2.) der Oxidation der Aldehydgruppe durch die Aldehyddehydrogenase zu 4-hydroxy-2-nonenischer Säure (HNA) oder (3.) der Reduktion des Aldehyds durch die Alkoholdehydrogenase zu 1,4-Dihydroxy-2-nonen (DHN) [KETTERER 1998]. In Studien mit isolierten Rattenhepatozyten fand für jedes Substratmolekül nur eine dieser Umsetzungen entweder zu HNE-GSH, HNA oder DHN statt [KETTERER 1998]. Bei tierexperimentellen Versuchen mit Ratten, denen HNE verabreicht wurde, wurden jedoch im Urin vier verschiedene Mercaptursäuren des HNE-Stoffwechsels, nämlich HNE-Mercaptursäuren (von HNE-GSH) sowie HNA-, HNA-Lacton- und DHN-Mercaptursäuren identifiziert. Da die HNE-Mercaptursäuren nicht als Substrate für Dehydrogenasen dienen, wird angenommen, dass *in vivo* in der Ratte die Oxidation bzw. Reduktion der Aldehydgruppe von HNE essentielle Initialreaktionen darstellen, deren Produkte HNA und DNH ebenfalls als Substrate für die GST dienen [KETTERER 1998].

Sowohl bei der Umsetzung von HNE in isolierten Rattenhepatozyten als auch in der Rattenhepatomazelllinie H35 bildeten die HNE-GSH-Konjugate den Hauptteil der Abbauprodukte [KETTERER 1998; TJALKENS et al. 1999], womit der GST-vermittelten GSH-Konjugation

eine Schlüsselrolle bei der Entgiftung von HNE zukommt. Folglich scheinen die deutlich niedrigeren DNA-Schäden in den butyratbehandelten Zellen beider Zelllinien eine direkte Konsequenz der GST-Induktion zu sein. Die einzelnen GST-Isoenzyme haben jedoch aufgrund ihrer Substratspezifität unterschiedliche katalytische Aktivitäten gegenüber HNE (Tabelle 25). So kann HNE zwar von sehr vielen Isoenzymen verstoffwechselt werden, eine hohe Affinität zu diesem Oxidationsprodukt besitzt allerdings nur die GSTA4-4. Ähnlich der murinen mGST4-4 (zur GST α -Klasse gehörend) als auch der entsprechenden Isoform der Ratte ist die humane GSTA4-4 hochaktiv gegenüber α,β -ungesättigten Aldehyden, einschließlich HNE [HUBATSCH et al. 1998; NANDURI & ZIMNIAK 1999]. Die hGSTA4-4 weist im Vergleich zu den übrigen GST-Isoenzymen eine im Mittel um zwei Zehnerpotenzen höher liegende spezifische Aktivität auf (Tabelle 25).

Tabelle 25: Aktivitäten humaner GSTs gegenüber CDNB und HNE

<i>Isoenzym</i>	<i>Spezifische Aktivität</i> (in $\mu\text{mol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1} \text{ Protein}$)	
	<i>CDNB</i>	<i>HNE</i>
GSTA1-1	82,0	5,0 ²⁾ 0,9 ²⁾
GSTA1-2	—	—
GSTA2-2	80,0	—
GSTA4-4	12,5	176,0 ²⁾ 189,0 ²⁾ 54,0 ²⁾
GSTM1a-1a	190,0	3,3
GSTM1a-1b	161,0	2,3
GSTM1b-1b	172,0	2,5
GSTM1b-2	203,0	3,0
GSTM2-2	276,0	3,6
GSTM2-3	172,0	3,3
GSTM3-3	15,2	1,8
GSTM4-4	1,4	—
GSTP1-1	103,0	1,6
GSTT1-1	0	—
GSTT2-2	0	0,1 ²⁾

Alle Daten, wenn nicht anders gekennzeichnet, aus [HAYES & PULFORD 1995].

2) aus [KETTERER 1998]. (—) keine Angaben.

Im Hinblick auf die hohe katalytische Effizienz der GSTA4-4 gegenüber HNE ist die spezifische Induktion dieses Isoenzym bei der Chemoprotektion vor diesem Metaboliten von großer Bedeutung. In der vorliegenden Arbeit konnte die Expression dieses Isoenzym und seine Modulierbarkeit durch Butyrat nicht untersucht werden, da der entsprechende Antikörper nicht zur Verfügung stand. Erste Untersuchungen zur Genexpression auf mRNA-Ebene mittels Northern Blot zeigen jedoch eine Induktion der mRNA-Expression der GSTA4-4 durch Butyrat in HT29 [Pool-Zobel et al., unveröffentlichte Ergebnisse]. Unter der Annahme einer 2fach erhöhten Proteinexpression der GSTA4-4 würde sich die HNE-Konjugation ausgehend von ursprünglich 1 mg Enzymprotein von 176 μmol auf 352 μmol je Minute erhöhen. Im Vergleich dazu steigert sich die Umsetzung von HNE infolge der 1,5fachen Induktion des GSTP1-Proteins durch Butyrat (4 mM, 72 h) nur von 1,6 μmol auf 2,4 μmol je Minute, wenn von ursprünglich 1 mg Enzymprotein ausgegangen wird. Anhand dieses Rechenbeispiels wird deutlich, dass durch die Induktion der GSTA4-4, selbst bei geringer Expression dieses Enzyms in den Kolonozyten, die Entgiftung von HNE wesentlich verbessert wird, was die deutlich verminderte Genotoxizität von HNE in den butyratbehandelten Zellen erklären würde.

Da die GSTP1 den Hauptteil des GST-Proteins in den Kolonozyten bildet, hat die erhöhte Proteinexpression der GSTP1 durch Butyrat trotz ihrer geringen spezifischen Aktivität gegenüber HNE vermutlich ebenfalls Anteil an dessen verbesserter Entgiftung. Ebenso trägt die Induktion der GSTA1/2 und GSTM2, welche eine durchschnittlich zwei- bis dreifach höhere spezifische Aktivität als GSTP1 gegenüber HNE besitzen, zur besseren katalytischen Umsetzung und damit zur verminderten Genotoxizität von HNE bei. Studien mit Ratten zeigen sogar eine 20fach höhere katalytische Effizienz (k_{cat}/K_m) der rGSTM2 im Vergleich zu rGSTP1, was eine ähnliche Effizienz der humanen Isoenzyme erwarten lässt [HIRATSUKA et al. 2001].

In diesem Zusammenhang muss der Einfluss von Polymorphismen auf die katalytische Effizienz der GST-Isoenzyme diskutiert werden. So wurde in beiden untersuchten Zelllinien HT29 und HT29 Klon 19A für GSTP1 ein homozygoter Sequenzpolymorphismus im Codon 104 am Nukleotid 313 - auch als *GSTP1*B* Genotyp bezeichnet - identifiziert (s. auch 1.4.4) [EBERT et al. 2001]. In einer Studie mit Hep G2 Zellen, welche mit verschiedenen Varianten des *GSTP1*-Gens transfiziert worden waren, wurde für die Allelvarianten der GSTP1 ein unterschiedliches Potential bei der Konjugation von Benzo[*a*]pyren-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxid nachgewiesen [HU et al. 1999b]. In den Zellen mit der Transitionsmutation am Nukleotid 313, bei welcher Valin statt Isoleucin eingebaut wird, führte die Behandlung mit Benzo[*a*]pyren-Metaboliten zu signifikant weniger DNA-Addukten im Vergleich zu den Zellen mit dem Wildtyp-Allel. Diese Studie demonstriert, dass der Typ der Allelvarianten der GST entscheidend für die katalytische

Aktivität der Zielzellen sein kann und dass im Fall des Benzo[*a*]pyren-Metaboliten die polymorphen Varianten effektiver sind. In Bezug auf die katalytische Effizienz der Varianten ist für andere Substanzen jedoch das Gegenteil der Fall. So zeigen vorhergehende Studien für die Enzymvarianten der GSTP1 eine verminderte katalytische Aktivität gegenüber CDNB (s. 1.4.4) [ZIMNIAK et al. 1994]. Folglich ist, in Abhängigkeit vom Substrat, der Wildtyp oder der Polymorphismus eines Enzyms für die Chemoprotektion der Zielzellen von Vorteil. Weiterhin veranschaulichen Studien zum Redesign der GST die Beeinflussbarkeit ihrer enzymatischen Aktivität durch Mutationen. So kann durch gezielte Mutationen in der substratbindenden Seite der GSTA1-1 deren Substratspezifität gegenüber Alkenalen um mehr als das 3000fache gesteigert werden, so dass die katalytische Effizienz dieser Variante für einige Alkenale (z. B. Nonenal) sogar größer ist als die der natürlicherweise gegenüber Alkenalen hochaktiven GSTA4-4 [NILSSON et al. 2000].

Neben der GST-Expression scheint auch der intrazelluläre Glutathionspiegel auf die Genotoxizität von HNE Einfluss zu haben. So führte die Behandlung mit Butyrat in HT29 und HT29 Klon 19A zur Aufrechterhaltung der Glutathionkonzentration über den Inkubationszeitraum von 72 h, während der Glutathiongehalt der unbehandelten Zellen sich verringerte und im Vergleich zur Butyratbehandlung nach 72 h signifikant niedriger war [EBERT et al. 2001]. Weitere Untersuchungen mit HT29 zeigen, dass durch die Hemmung der Glutathionneusynthese mittels Buthioninsulfoximin, einem spezifischen Inhibitor der γ -Glutamylcystein-Synthetase, die Genotoxizität von HNE infolge der Depletion des intrazellulären Glutathions signifikant anstieg [KNOLL 2001]. Ebenso können hohe HNE-Konzentrationen die Depletion von Glutathion in der Zelle bewirken [CHEESEMAN 1993], was eine Erklärung für die nachlassende Schutzwirkung von Butyrat bei der höchsten HNE-Konzentration (200 μ M) in HT29 wäre.

Weiterführende Untersuchungen mit Butyrat von BEYER-SEHLMAYER ET AL. bestätigten dessen Schutzwirkung vor HNE in HT29 [BEYER-SEHLMAYER et al., unveröffentlichte Ergebnisse]. Dahingegen hatte der Zusatz von *in vitro* aus Ballaststoffen erzeugten Fermentationsüberständen (5-15 %, v/v) in dieser Studie keinen protektiven Effekt auf die Genotoxizität, obwohl künstliche SCFA-Mischungen mit analogen Konzentrationen von Acetat, Propionat und Butyrat diese deutlich absenkten. Eine mögliche Erklärung für diese Ergebnisse ist das Vorhandensein von auf die GST-Expression inhibierend wirkenden Faktoren in den Fermentationsproben, welche - *in vitro* erzeugt - nicht der *in vivo*- Situation entsprechen müssen. Weiterhin lagen die Butyratlevel aufgrund des geringen Anteils der Fermentationsüberstände im Medium - bedingt durch ihre hohe Cytotoxizität in HT29 - mit weniger als 2 mM deutlich unter der physiologischen Konzentration, was im Hinblick auf die induzierenden

Effekte von Butyrat auf den GST-/GSH-Status in HT29 unterhalb dessen wirksamen Konzentrationsbereich liegt.

HNE selbst kann ebenfalls seine Entgiftung induzieren, indem es über die intrazelluläre Peroxidbildung Stress-Signaltransduktionswege, wie z. B. die Phosphorylierung der c-Jun N-terminalen Kinase (JNK) aktiviert, welche über die Induktion der c-Jun-Transkription zur AP-1-induzierten Transkription von Phase-II-Enzymen wie der GST führt [UCHIDA et al. 1999]. Jedoch zeigen die Ergebnisse mit Butyrat, dass die Zellen mit bereits induziertem GST-Status dieses Kanzerogen effektiver entgiften und es bis zu einer Konzentration von 100 μM HNE in HT29 bzw. 150 μM HNE in HT29 Klon 19A gar nicht erst zur Schädigung der DNA kommt.

Im Kontrast dazu bewirkt die Modellsubstanz 1-Chlor-2,4-dinitrobenzol (CDNB) in HT29 einen Anstieg der Genotoxizität in den mit Butyrat inkubierten Zellen. Die höhere Toxizität von CDNB reflektiert wahrscheinlich ebenso den erhöhten GST-Status der Zellen, da CDNB durch die Konjugation mit Glutathion zu S-2,4-Dinitrophenylglutathion metabolisch aktiviert wird (s. 3.2.2.2, Abbildung 10). Sowohl Mutagenitätstests mit *Salmonella typhimurium* als auch Cytotoxizitätstests mit MCF7-Brustkrebszellen zeigen, dass die CDNB-Toxizität von der GSH-Konjugation abhängig und in GSH-defizienten Bakterienstämmen bzw. GSH-depletierten Zellen deutlich niedriger ist [DIAH et al. 1999; KERKLAAN et al. 1987]. Da alle GST-Klassen bis auf GST θ gegenüber CDNB katalytisch aktiv sind (Tabelle 25), ist seine gesteigerte Umsetzung auf alle induzierten Isoenzyme - vor allem jedoch auf die GSTP1 aufgrund ihrer Dominanz in HT29 – zurückzuführen. Aufgrund des *GSTP1*B*-Genotyps in HT29 ist die katalytische Aktivität der GSTP1 gegenüber CDNB im Vergleich zum Wildtyp um das drei- bis vierfache niedriger [EATON & BAMMLER 1999].

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zusammenfassend zeigen, dass Butyrat die GST am effektivsten induziert und über einen erhöhten GST-Status zur Verminderung der Genotoxizität von HNE führt. Letzteres Ergebnis ist bedeutungsvoll, da HNE ein reaktives Lipidperoxidationsprodukt ist, welches mit einer Reihe degenerativer Erkrankungen (z. B. Arteriosklerose, Parkinson und Alzheimer) in Zusammenhang gebracht wird und darüber hinaus einen relevanten Risikofaktor in der Karzinogenese darstellt [CHUNG et al. 1996; HUBATSCH et al. 1998]. Die Prävention seiner genotoxischen Wirkung durch effektive Entgiftung mittels Glutathionkonjugation kann entscheidend zur Krebsrisikosenkung beitragen. Im Hinblick auf die Chemoprotektion vor speziellen Risikofaktoren durch die GST ist insbesondere die Induktion des substratspezifischen Isoenzym, wie die GSTA4-4 für Lipidperoxidationsprodukte, einschließlich HNE, von großer Bedeutung. Zur Entgiftung weiterer Risikofaktoren sind wiederum andere durch Butyrat induzierte GST-Isoenzyme spezifisch, so die GSTA1 für N-Acetoxy-PhIP, die GSTM2 für Aminochrom und die GSTP1 für Basenpropenale [BAEZ et al. 1997; COLES et al. 2001a; HAYES & PULFORD 1995], welche aufgrund ihrer überlappenden Substratspezifitäten auch zu einer erhöhten Chemoresistenz der Zellen gegenüber HNE beitragen. Die aktuellen Ergebnisse einer großen europäischen Kohortenstudie mit mehr als 500.000 Teilnehmern sowie einer Fall-Kontroll-Studie mit etwa 34.000 Probanden, welche beide einen Zusammenhang zwischen hoher Ballaststoffaufnahme und einem verminderten Risiko für kolorektalen Krebs aufzeigten, liefern weitere Beweise für den Einfluss der Ernährung auf die kolorektale Karzinogenese und die mögliche chemoprotektive Rolle von Butyrat [BINGHAM et al. 2003; PETERS et al. 2003].

Für die *in vivo* vorherrschende Situation des „gesunden“ Darms wird angenommen, dass sich mit zunehmendem Alter im „normalen“ humanen Kolon wahrscheinlich Dysplasien, Mikroadenome und Adenome entwickeln, deren veränderte Zellen in das Darmlumen hineinragen und folglich verstärkt den im Darminhalt vorkommenden Karzinogenen ausgesetzt sind [POTTER 1999]. Die Anwesenheit von Butyrat als Konsequenz des mikrobiellen Abbaus von Ballaststoffen kann über die Steigerung der zellulären Abwehr infolge der Induktion von Entgiftungsmechanismen wie der GST kontinuierlich zur Absenkung des toxischen Potentials von Risikosubstanzen im Darmlumen beitragen. Während der Einsatz von Oltipraz als einem pharmazeutischen Wirkstoff mit möglichen Nebenwirkungen nur für die Chemoprävention in spezifischen Risikopopulationen geeignet ist, ist die Möglichkeit der GST-Modulation über die Ernährung, wie am Beispiel von Butyrat auch an primären Kolonzellen demonstriert wurde, ein viel versprechender Ansatzpunkt für eine lebenslange Reduktion von Risikofaktoren und damit einem verbesserten Schutz der Bevölkerung vor Kolonkrebs.

5 SCHLUSSFOLGERUNGEN UND AUSBLICK

Aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit lassen sich folgende Schlüsse auf den GST-Status im Kolon ziehen:

- Die GSTP1 ist das am stärksten exprimierte Isoenzym in den humanen Kolonzellen. Des Weiteren sind in beachtlichen Mengen die GSTM1, GSTM2 und GSTT1 gleichermaßen exprimiert, während die GSTA1/2 nur in geringen Konzentrationen in Kolonzellen nachgewiesen werden.
- Bei der GST-Expression im Kolon gibt es interindividuell sehr große Unterschiede. Dabei ist die Variabilität der am wenigsten exprimierten Isoenzyme GSTA1/2 am größten.
- In den transformierten Zellen der Kolontumorzelllinien wird die GSTP1 überexprimiert, während die Isoenzyme der GST-Klassen α und μ stark vermindert exprimiert werden.
- Die Kolonfibroblasten stellen aufgrund ihres den primären Kolonozyten ähnlichen Expressionsmusters ein geeignetes Zellmodell für Untersuchungen an nicht transformierten Zellen des Kolons dar.

In Bezug auf die Induzierbarkeit der GST zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass die kurzkettigen Fettsäuren Butyrat, Acetat und Propionat sowie die zu den sekundären Pflanzenstoffen zählenden Polyphenole des Grünen Tees und sein Hauptcatechin Epigallocatechingallat den GST-Status in humanen Kolonzelllinien erhöhen können.

Aus den Ergebnissen der Zelllinien lässt sich schlussfolgern, dass Butyrat durch Induktion des GST-Proteins, insbesondere des dominant exprimierten Isoenzym GSTP1, zum Anstieg der GST-Aktivität führt, während die Mechanismen des Aktivitätsanstiegs durch Acetat und Propionat nicht durch die Proteinexpression der GST erklärt werden können sowie der Anstieg der GSTA1/2 durch Grüntee und Epigallocatechingallat nicht ausreichend war, um die GST-Aktivität signifikant zu erhöhen.

Butyrat, welches die GST auf Aktivitäts-, Protein- und mRNA-Ebene induzierte, erwies sich als effektivster Induktor. Aus den Ergebnissen mit Butyrat lässt sich weiterhin schlussfolgern:

- Die Induktion des GSTM2-Proteins ist die Folge der verstärkten Transkription dieses Gens, wobei Butyrat einen längerfristigen Einfluss auf die Genexpression zu haben scheint.
- Die Zunahme des cytosolischen Proteingehalts weist auf die verstärkte Expression vieler weiterer Gene hin.

- Die erhöhten Proteinkonzentrationen der GSTM1 und GSTM2 in den Kolonfibroblasten lassen vermuten, dass Butyrat die GST in primären Kolonepithelzellen induzieren kann. Die „non-response“ der primären Kolonozyten ist mit der relativ kurzen Inkubationszeit und dem Vitalitätsverlust der Zellen erklärbar. Des Weiteren war die Probenanzahl (n = 3 - 4) in Bezug auf die interindividuelle Variabilität der GST-Expression im Kolon nicht ausreichend, um die tendenzielle Induktion einzelner Isoenzyme statistisch abzusichern.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse zur butyratvermittelten Erhöhung der GST die spezifische Induktion der GSTM2 in transformierten als auch in primären Kolonzellen, was auf das chemoprotektive Potential von Butyrat im Kolon hinweist.

Weiterhin zeigen die Untersuchungen zur Induktion des GST-Proteins, dass schwach bzw. nicht exprimierte Isoenzyme (GSTA1/2 und GSTM2) besser induzierbar zu sein scheinen als stark exprimierte Untereinheiten (GSTP1), was den Schluss zulässt, dass die Induzierbarkeit der GST in starkem Maße von deren Expressionshöhe und Variabilität abhängig ist.

Am Beispiel des Lipidperoxidationsprodukts HNE wird demonstriert, dass ein durch Butyrat erhöhter GST-Status zur effektiveren Entgiftung dieses Risikofaktors und damit zur verminderten Chemosensitivität führt. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass bestimmte Ernährungsfaktoren, wie eine ausreichende Zufuhr von butyrogenen Ballaststoffen, welche zu einem hohen Anteil zu Butyrat fermentiert werden, über die Stimulierung der Entgiftungskapazität der GST protektiv auf die Kolonkarzinogenese wirken.

Die aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit gewonnenen Erkenntnisse liefern Ansatzpunkte für weiterführende Untersuchungen bzw. Studien. So müsste geklärt werden, ob die mRNA-Expression der GSTA1 bzw. GSTA2 durch Grüntee und Epigallocatechingallat induziert wird und welche Konsequenzen die erhöhten Enzymlevel auf die Genotoxizität von GSTA1-spezifischen Kanzerogenen, wie z. B. N-Acetoxy-PhIP, hat. Weiterhin wäre von Interesse die mögliche Modulation weiterer GST-Isoenzyme, insbesondere der GSTA4 als effektivstem Katalysator bei der Entgiftung von HNE, durch Butyrat zu untersuchen. Um die Wirkung von Butyrat auf die GST in primären Kolonozyten zu prüfen, wäre neben der *in vitro*-Untersuchung einer großen Anzahl von Gewebeproben die Durchführung von Interventionsstudien mit butyrogenen Ballaststoffen wie resistenter Stärke an Patienten mit erhöhtem Darmkrebsrisiko (z. B. Colitis ulcerosa-Patienten) sinnvoll, wobei aufgrund interindividueller Unterschiede in der GST-Expression die Probandenanzahl ausreichend groß sein sollte.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Einleitung: Das kolorektale Karzinom ist nach den Herz-Kreislauf-Erkrankungen die zweithäufigste Todesursache in Deutschland und steht bei der Häufigkeit der Krebserkrankungen von Männern und Frauen an jeweils zweiter Stelle. Die Inzidenz des kolorektalen Karzinoms in Westeuropa wird in engem Zusammenhang mit den Ernährungsgewohnheiten gesehen, wobei zahlreiche Studien auf eine inverse Beziehung zwischen dem Krebsrisiko und einer Ernährung mit hohem Anteil an pflanzlichen Produkten hinweisen. Schätzungen zufolge wären bis zu 75 % der Erkrankungsfälle durch Veränderung der Ernährungsgewohnheiten vermeidbar. Ein möglicher Mechanismus in der Krebsprävention durch Ernährungsfaktoren ist die Induktion körpereigener Schutzsysteme, zu denen die Glutathion *S*-Transferasen (GST) als wichtige Phase-II-Enzyme, gehören. Die GSTs werden in zwei mikrosomale sowie mehrere cytosolische Klassen mit teilweise überlappenden Substratspezifitäten unterteilt, welche aufgrund ihrer Entgiftungsfunktion – insbesondere bei hoher Expression – zu einer verminderten Exposition mit Karzinogenen und damit zur Senkung des Krebsrisikos beitragen können. Über die Induzierbarkeit humaner GSTs durch Pflanzenstoffe ist bisher wenig bekannt. Versuche an Ratten sind für Rückschlüsse auf die Expression der humanen GST aufgrund unterschiedlicher Promotorsequenzen und folglich anderer Expressions- und Induktionsmuster nur bedingt geeignet.

Zielstellung: Ziel der vorliegenden Arbeit war es, (1.) die Basalexpression und die Variabilität der cytosolischen GSTs in humanen Kolonzellen zu erfassen, (2.) die Wirkung von kurzkettigen Fettsäuren, als wichtigen Fermentationsprodukten der Mikroflora des Kolons, sowie von verschiedenen ernährungsrelevanten sekundären Pflanzenstoffen auf die Induzierbarkeit der GST hinsichtlich Aktivität, Protein- und mRNA-Expression in humanen Kolonzellen zu untersuchen und (3.) die Konsequenzen einer erhöhten GST-Expression auf die Chemosensitivität der Kolonzellen gegenüber genotoxischen Verbindungen unter Verwendung des effektivsten GST-Induktors zu prüfen.

Material und Methoden: Da es keine Primärkulturen von epithelialen Kolonzellen gibt, wurden die Versuche mit den Kolontumorzelllinien HT29 und seinem differenzierten Klon 19A durchgeführt. Für die Prüfung der Ergebnisse an nicht transformierten Zellen wurden aus Kolongewebeproben isolierte Kolonepithelstreifen sowie zwei aus Kolongewebe isolierte Fibroblastenkulturen verwendet. Zur Erfassung des basalen GST-Status (GST-Aktivität und GST-Protein) wurden Gewebeproben von 15 Patienten sowie alle verwendeten Zellmodelle untersucht.

Als Testsubstanzen wurden die kurzkettigen Fettsäuren Butyrat, Acetat und Propionat, die sekundären Pflanzenstoffe Grünteextrakt (Grünteepolyphenole), Epigallocatechingallat (EGCG), Phenethylisothiocyanat (PEITC), Enterodiol und β -Carotin und das synthetische Chemopräventivum Oltipraz verwendet. Die Inkubation erfolgte über 24 – 72 h, wobei die höchste Substanzkonzentration jeweils die EC_{50} der getesteten Zelllinie darstellte.

Die Bestimmung der GST-Aktivität erfolgte spektralphotometrisch gegenüber 1-Chlor-2,4-dinitrobenzol (CDNB). Die Proteinexpression der GST-Isoenzyme A1/2, M1, M2, P1 und T1 wurde mittels Western Blot und für GSTP1 zusätzlich mittels ELISA durchgeführt. Aktivität und Enzymprotein der GST wurden auf Basis des cytosolischen Proteingehalts und der Zellzahl berechnet, da der Proteingehalt der Zellen durch die Substanzbehandlung ebenfalls moduliert wurde, während die Zellzahl eine konstante Bezugsgröße darstellte. Bei fehlender Proteinexpression der GSTM1 bzw. GSTT1 wurde die DNA für die Deletionspolymorphismen dieser Enzyme mittels Multiplex-PCR genotypisiert. Die mRNA-Expression wurde über die Technik der Reversen Transkriptions-PCR (RT-PCR) in Bezug auf die Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) mRNA bestimmt. Die Untersuchungen zur Genotoxizität wurden mittels Einzelzellmikrogelelektrophorese (Comet-Assay) über die fluoreszenzmikroskopische Auswertung der DNA-Strangbrüche durchgeführt. Als genotoxische Verbindungen wurden CDNB, das Substrat zur Bestimmung der GST-Aktivität, und das in der Karzinogenese relevante Lipidperoxidationsprodukt 4-Hydroxy-2-nonenal (HNE) eingesetzt.

Ergebnisse: 1. Status der GST-Proteine Die GSTP1 war in allen untersuchten Zellen am stärksten exprimiert. Neben der GSTP1 wurden in den aus Gewebeproben isolierten primären Kolonzellen die GST M1, M2 und T1 in beachtlichen Mengen sowie in geringen Konzentrationen die GSTA1/2 nachgewiesen. Die Expression war individuell sehr unterschiedlich, wobei die GSTA1/2 die größte interindividuelle Variabilität aufwies. Des Weiteren besaßen 47 % der Proben für *GSTM1* und 13 % für *GSTT1* einen Deletionspolymorphismus. Die Kolonfibroblasten zeigten ein den Primärzellen sehr ähnliches GST-Spektrum auf. Jedoch waren die Proteine der GSTA1/2 nicht detektierbar. Dagegen exprimierten die Tumorzelllinien die GSTP1 – bei gleichzeitig stark vermindertem Enzymprotein der GST A1/2 und nicht detektierbarer GST M1 und M2 – deutlich stärker, was sich auch in einer höheren GST-Aktivität im Vergleich zu den Primärzellen widerspiegelte.

2. Induzierbarkeit der GST Die GST-Aktivität wurde am effektivsten durch 4 mM Butyrat in den Kolontumorzelllinien HT29 und HT29 Klon 19A induziert (nach 48-72 h: 1,7-1,9fach bzgl. Zellzahl), während 30-60 mM Acetat und 5-10 mM Propionat nur in HT29 Klon 19A

induzierend wirkten (nach 72 h: 1,4fach bzw. 1,7-1,9fach bzgl. Zellzahl). Die Aktivitätszunahme war jeweils von einem Anstieg des cytosolischen Proteingehalts (1,2-1,4fach) begleitet. Die übrigen Testsubstanzen hatten keinen signifikanten Effekt auf die GST-Aktivität.

Der Zusammenhang zwischen erhöhter Aktivität und den GST-Proteinen wurde an den kurzkettigen Fettsäuren, als Induktoren der GST-Aktivität, und an Grüntee und Epigallocatechingallat untersucht. Butyrat (4 mM) induzierte die Proteinexpression der GST-Isoenzyme in beiden Zelllinien gleichermaßen in Abhängigkeit von der Inkubationszeit (24-72 h). Die höchste Induktion war nach 72 h für die Isoenzyme GSTA1/2 (ca. 3,5fach), GSTM2 (keine Kontrollbande) und GSTP1 (ca. 1,5fach bzgl. Protein) messbar, während GSTM1 und GSTT1 nicht induziert wurden. Acetat und Propionat zeigten keinen signifikanten Einfluss auf die GST-Proteinexpression. Die Inkubation mit Grüntee (20-40 µM) und Epigallocatechingallat (40-80 µM) über 72 h führte in beiden Zelllinien zur Induktion des Enzymproteins der GSTA1/2, wobei der Anstieg in HT29 Klon 19A (2,3-2,8fach) deutlich stärker ausgeprägt war als in HT29 (1,4-1,6fach bzgl. Protein; ohne 40 µM EGCG).

Für die Experimente zur Induzierbarkeit der GST in primären Kolonzellen wurde Butyrat als stärkste induzierende Substanz ausgewählt. Die Untersuchungen mit 4-20 mM Butyrat zeigten nach 24 h Inkubation keine signifikanten Veränderungen des GST-Status. Jedoch wurden die GSTM2 und GSTT1 durch 4 mM Butyrat tendenziell induziert. Aufgrund des Vitalitätsverlusts der primären Kolonozyten mit steigender Inkubationszeit wurden für die Inkubationen über 72 h zwei primäre Kolonfibroblastenkulturen verwendet. In diesen induzierte 4 mM Butyrat die Aktivität (1,2-1,4fach) und das Protein der GSTM1 und GSTM2 (1,2fach bzw. 1,4-1,7fach bzgl. Zellzahl), wobei ebenfalls das cytosolische Protein (1,2-1,4fach) anstieg.

Die mRNA-Expression wurde für die GSTM2 nach Behandlung mit 4 mM Butyrat untersucht, da diese in beiden Tumorzelllinien am stärksten induziert wurde und das Enzymprotein ebenfalls in den Kolonfibroblastenkulturen erhöht war. Im Ergebnis führt Butyrat nach 24 bzw. 72 h Inkubation zur signifikant erhöhten mRNA-Expression der GSTM2 (13-14fach bzw. 6-8fach) in beiden Zelllinien. Aufgrund des geringen Induktionsfaktors des GSTM2-Proteins (<2) in den Fibroblastenkulturen, wurde die mRNA-Expression in diesen Zellen nicht bestimmt.

3. Konsequenzen der GST-Induktion Der abschließende Teil der Arbeit beschäftigte sich mit den funktionellen Konsequenzen eines durch Butyrat erhöhten GST-Status auf die Genotoxizität von CDNB und HNE. Beide Substanzen zeigten im Comet-Assay genotoxisches Potential. Die Anzahl der DNA-Strangbrüche in HT29 wurde durch 37,5-62,5 µM CDNB bzw. 100-200 µM HNE (nach 15 min bzw. 30 min) signifikant erhöht. Die GST-Induktion in mit

Butyrat vorbehandelten Zellen (4 mM, 72 h) führte bei CDNB, aufgrund der GST-vermittelten Giftungsreaktion, zur tendenziellen Steigerung der Genotoxizität in HT29 (signifikanter Unterschied bei 50 μ M CDNB). Im Gegensatz dazu war die Genotoxizität von HNE in beiden Zelllinien signifikant vermindert (100-150 μ M HNE in HT29 bzw. 150-200 μ M HNE in HT29 Klon 19A), wobei der stärker differenzierte HT29 Klon 19A gegenüber der genotoxischen Wirkung von HNE weniger empfindlich als die HT29-Zellen reagierte.

Schlussfolgerungen:

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass kurzkettige Fettsäuren sowie Grüner Tee und sein Hauptcatechin Epigallocatechingallat induzierend auf den GST-Status in Kolonzellen wirken können. Als effektivster GST-Induktor erwies sich Butyrat, welches die GST auf Aktivitäts-, Protein- und mRNA-Ebene induzierte. Aus den Ergebnissen mit Butyrat lässt sich schlussfolgern, dass der Anstieg der GST-Aktivität hauptsächlich auf der Induktion der am stärksten exprimierten GSTP1 beruht und dass die Induktion der Proteinexpression der GSTM2 die Folge der verstärkten Transkription dieses Gens ist. Weiterhin lassen die erhöhten Proteinkonzentrationen der GSTM1 und GSTM2 in den Kolonfibroblasten – die aufgrund ihres primären Kolonozyten ähnlichen Expressionsmusters ein geeignetes Modell für nicht transformierte Zellen darstellen – vermuten, dass Butyrat auch in primären Kolonepithelzellen die GST induzieren kann. Die Untersuchungen zur Modulation des GST-Proteins, welche eine starke Induktion schwach bzw. nicht exprimierter Isoenzyme gegenüber einer geringen Induktion stark exprimierter Enzymproteine aufzeigen, lassen den Schluss zu, dass neben dem Auftreten von Deletionspolymorphismen die Expressionshöhe der GST entscheidenden Einfluss auf deren Induzierbarkeit durch Phytoprotektanten hat. Am Beispiel von HNE wird demonstriert, dass ein höherer GST-Status zur verminderten Chemosensitivität der Zellen gegenüber endogenen Risikofaktoren über deren effektivere Entgiftung beitragen kann, was im Hinblick auf die großen interindividuellen Unterschiede bei der GST-Expression im Kolon insbesondere für Individuen mit niedrigem basalen GST-Status von Relevanz wäre. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass bestimmte Ernährungsfaktoren, wie z. B. eine ausreichende Zufuhr von butyrogener Ballaststoffen, welche zu einem hohen Anteil zu Butyrat fermentiert werden, über die Stimulierung der Entgiftungskapazität der GST protektiv auf die Kolonkarzinogenese wirken können.

LITERATURVERZEICHNIS

- ABRAHAMSE,S.L., Pool-Zobel,B.L., Rechkemmer,G. (1999) Potential of short chain fatty acids to modulate the induction of DNA damage and changes in the intracellular calcium concentration in isolated rat colon cells. *Carcinogenesis*, **20**, 629-634.
- AMES,B.N., Wakimoto,P. (2002) Are vitamin and mineral deficiencies a major cancer risk ? *Nature Reviews*, **2**, 694-704.
- APPELT,L.C., Reicks,M.M. (1997) Soy feeding induces phase II enzymes in rat tissues. *Nutr Canc*, **28**, 270-275.
- ARBEITSGEMEINSCHAFT BEVÖLKERUNGSBEZOGENER KREBSREGISTER. Krebs in Deutschland - Häufigkeiten und Trends. 3. erweiterte Ausgabe. 2002. Saarbrücken, Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland in Zusammenarbeit mit dem Robert Koch - Institut.
- AUGERON,C., Laboisse,C.L. (1984) Emergence of permanently differentiated cell clones in a human colonic cancer cell line in culture after treatment with sodium butyrate. *Cancer Res*, **44**, 3961-3969.
- AWASTHI,Y.C., Sharma,R., Singhal,S.S. (1994) Human glutathione S-transferases. *Int J Biochem*, **26**, 295-308.
- BACHRACH,U., Wang,Y.C. (2002) Cancer therapy and prevention by green tea: role of ornithine decarboxylase. *Amino.Acids*, **22**, 1-13.
- BAEZ,S., Segura-Aguilar,J., Widersten,M., Johansson,A.S., Mannervik,B. (1997) Glutathione transferases catalyse the detoxication of oxidized metabolites (o-quinones) of catecholamines and may serve as an antioxidant system preventing degenerative cellular processes. *Biochem J*, **324**, 25-28.
- BARNARD,J.A., Warwick,G. (1993) Butyrate rapidly induces growth inhibition and differentiation in HT-29 cells. *Cell Growth Differentiation*, **4**, 495-501.
- BATRAM,H.-P., Kasper,H. (1995) Bedeutung mehrfach ungesättigter Fettsäuren bei der Kolonkarzinogenese. *Akt Ernähr-Med*, **20**, 31-35.
- BEAUMONT,P.O., Moore,M.J., Ahmad,K., Payne,M.M., Lee,C., Riddick,D.S. (1998) Role of glutathione S-transferases in the resistance of human colon cancer cell lines to doxorubicin. *Cancer Res*, **58**, 947-955.
- BECKER,N., WAHRENDORF,J. (1998) *Krebsatlas der Bundesrepublik Deutschland 1981-1990*. Springer Verlag, Berlin.
- BECKETT,G.J., Hayes,J.D. (1993) Glutathione S-transferases: biomedical applications. *Adv Clin Chem*, **30**, 281-380.
- BENSON,A.B. (1993) Oltipraz: a laboratory and clinical review. *J Cell Biochem*, **17**, 278s-291s.
- BERHANE,K., Widersten,M., Engstrom,A., Kozarich,J.W., Mannervik,B. (1994) Detoxication of base propenals and other α,β -unsaturated aldehyde products of radical reactions and lipid peroxidation by humane glutathione transferases. *Proc Natl Acad Sci USA*, **91**, 1480-1484.
- BEYER-SEHLMAYER,G., Pool-Zobel,B.L. Modulierbarkeit der Genexpression in humanen Kolonkarzinomzellen durch Inkubation (24 h) mit Butyrat (4 mM). *Proc Germ Nutr Soc*. **4**, 33. 2002.
- BINGHAM,S.A., Day,N.E., Luben,R., Ferrari,P., Slimani,N., Norat,T., Clavel-Chapelon,F., Kesse,E., Nieters,A., Boeing,H., Tjonneland,A., Overvad,K., Martinez,C., Dorronsoro,M., Gonzalez,C.A., Key,T.J., Trichopoulou,A., Naska,A., Vineis,P., Tumino,R., Krogh,V., Bueno-de-Mesquita,H.B., Peeters,P.H.M., Berglund,G., Hallmans,G., Lund,E., Skeie,G., Kaaks,R., Riboli,E. (2003) Dietary fibre in food and

- protection against colorectal cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC):an observational study. *Lancet*, **361**, 1496-1501.
- BLOCK,G., Patterson,B., Subar,A. (1992) Fruit vegetables, and cancer prevention: A review of the epidemiological evidence. *Nutr Canc*, **18**, 1-29.
- BOSTICK,R.M., Potter,J.D., Kushi,L.H., Sellers,T.A., Steinmetz,K.A., McKenzie,D.R., Gapstur,S.M., Folsom,A.R. (1994) Sugar, meat, and fat intake, and non-dietary risk factors for colon cancer incidence in Iowa women (United States). *Cancer Causes Control*, **5**, 38-52.
- BOYLE,P., Veronesi,U., Tubiana,M., Alexander,F.E., Calais da Silva,F., Denis,L.J., Freire,J.M., Hakama,M., Hirsch,A., Kroes,R., La Vecchia,C., Maisonneuve,P., Martin-Moreno,J.M., Newton-Bishop,J., Pindborg,J.J., Saracci,R., Scully,C., Standaert,B., Storm,H., Blanco,S., Malbois,R., Bleeheh,N., Dicato,M., Plesinar,S. (1995) European School of Oncology Advisory Report to the European Commission for the "Europe Against Cancer Programme": European Code Against Cancer. *Eur J Cancer*, **31A**, 1395-1405.
- BRADFORD,M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, **72**, 248-254.
- BRUCE,W.R., Giacca,A., Medline,A. (2000) Possible mechanisms relating diet and risk of colon cancer. *Canc Epid Biom Prev*, **9**, 1271-1279.
- BU-ABBAS,A., Clifford,M.N., Ioannides,C., Walker,R. (1995) Stimulation of rat hepatic UDP-glucuronosyl transferase activity following treatment with green tea. *Food Chem Toxicol*, **33**, 27-30.
- BU-ABBAS,A., Clifford,M.N., Walker,R., Ioannides,C. (1998) Contribution of caffeine and flavanols in the induction of hepatic Phase II activities by green tea. *Food Chem.Toxicol.*, **36**, 617-621.
- CASSIDY,A., Bingham,S.A., Cummings,J.H. (1994) Starch intake and colorectal cancer risk: an international comparison. *Br J Cancer*, **69**, 937-942.
- CHANG,Y.C., Hu,C.C., Tseng,T.H., Tai,K.W., Lii,C.K., Chou,M.Y. (2001) Synergistic effects of nicotine on arecoline-induced cytotoxicity in human buccal mucosal fibroblasts. *J Oral Pathol Med*, **30**, 458-464.
- CHEESEMAN,K.H. (1993) Mechanisms and effects of lipid peroxidation. *Molec Aspects Med*, **11**, 191-197.
- CHEN,C., Yu,R., Owuor,E.D., Kong,A.N.T. (2000) Activaton of antioxidativ-response element (ARE), mitogen-activated protein kinases (MAPKs) and caspases by major green tea polyphenols components during cell survival and death. *Arch Pharm Res*, **23**, 605-612.
- CHENEVIX-TRENCH,G., Young,J., Coggan,M., Board,P. (1995) Glutathione S-transferase M1 and T1 polymorphisms: Susceptibility to colon cancer and age of onset. *Carcinogenesis*, **16**, 1655-1657.
- CHOU,F.-P., Chu,Y.-C., Hsu,J.-D., Chiang,H.-C., Wang,C.-J. (2000) Specific induction of glutathione S-transferase GSTM2 subunit expression by epigallocatechin gallate in rat liver. *Biochem Pharmacol*, **60**, 643-650.
- CHUNG,F.L., Chen,H.J., Nath,R.G. (1996) Lipid peroxidation as a potential endogenous source for the formation of exocyclic DNA adducts. *Carcinogenesis*, **17**, 2105-2111.
- CLAPPER,M.L., Hoffman,S.J., Tew,K.D. (1991) Glutathione S-transferases in normal and malignant human colon tissue. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1096**, 209-216.
- CLAPPER,M.L., Szarka,C.E., Pfeiffer,G.R., Graham,T.A., Balshem,A.M., Litwin,S., Goosenberg,E.B., Frucht,H., Engstrom,P.F. (1997) Preclinical and clinical evaluation of broccoli supplements as inducers of glutathione S-transferase activity. *Clin Cancer Res*, **3**, 25-30.

- COLES,B., Nowell,S.A., MacLeod,S.L., Sweeney,C., Lang,N.P., Kadlubar,F.F. (2001a) The role of human glutathione S-transferases (hGSTs) in the detoxification of the food-derived carcinogen metabolite N-acetoxy-PhIP, and the effect of a polymorphism in hGSTA1 on the colorectal cancer risk. *Mutat Res*, **482**, 3-10.
- COLES,B.F., Anderson,K.E., Doerge,D.R., Churchwell,M.I., Lang,N.P., Kadlubar,F.F. (2000) Quantitative analysis of interindividual variation of glutathione S-transferase expression in human pancreas and the ambiguity of correlating genotype with phenotype. *Cancer Res*, **60**, 573-579.
- COLES,B.F., Chen,G., Kadlubar,F.F., Radominska-Pandya,A. (2002) Interindividual variation and organ-specific patterns of glutathione S-transferase alpha, mu, and pi expression in gastrointestinal tract mucosa of normal individuals. *Arch Biochem Biophys*, **403**, 270-276.
- COLES,B.F., Morel,F., Rauch,C., Huber,W.W., Yang,M., Teitel,C.H., Green,B., Lang,N.P., Kadlubar,F.F. (2001b) Effect of polymorphism in the human glutathione S-transferase A1 promoter on hepatic GSTA1 and GSTA2 expression. *Pharmacogenetics*, **11**, 663-669.
- COMPHER,C.W., Frankel,W.L., Tazelaar,J., Lawson,J.A., McKinney,S., Segall,S., Kinoshian,B.P., Williams,N.N., Rombeau,J.L. (1999) Wheat bran decreases aberrant crypt foci, preserves normal proliferation, and increases intraluminal butyrate levels in experimental colon cancer. *J Parenter Enteral Nutr*, **23**, 269-277.
- COMPTON,S.J., Jones,C.G. (1985) Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. *Analyt Biochem*, **151**, 369-374.
- COTTON,S.C., Sharp,L., Little,J., Brockton,N. (2000) Glutathione S-transferase polymorphisms and colorectal cancer: a HuGE review. *Am J Epidemiol*, **151**, 7-32.
- CRAIG,W.J. (1999) Health-promoting properties of common herbs. *Am J Clin Nutr*, **70**, 491s-499s.
- DE BRUIN,W.C.C., Wagenmans,M.J.M., Board,P.G., Peters,W.H.M. (1999) Expression of glutathione S-transferase theta class isoenzymes in human colorectal and gastric cancers. *Carcinogenesis*, **20**, 1453-1457.
- DEAKIN,M., Elder,J., Hendrickse,C., Peckham,D., Baldwin,D., Pantin,C., Wild,N., Leopard,P., Bell,D.A., Jones,P., Duncan,H., Brannigan,K., Alldersea,J., Fryer,A.A., Strange,R.C. (1996) Glutathione S-transferase GSTT1 genotypes and susceptibility to cancer: studies of interactions with GSTM1 in lung, oral, gastric and colorectal cancers. *Carcinogenesis*, **17**, 881-884.
- DESMOTS,F., Rauch,C., Henry,C., Guillouzo,A., Morel,F. (1998) Genomic organization, 5'-flanking region and chromosomal localization of the human glutathione transferase A4 gene. *Biochem J*, **336**, 437-442.
- DIAH,S.K., Smitherman,P.K., Townsend,A.J., Morrow,C.S. (1999) Detoxification of 1-chloro-2,4-dinitrobenzene in MCF7 breast cancer cells expressing glutathione S-transferase P1-1 and/or multidrug resistance protein 1. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **157**, 85-93.
- DOLL,R., Peto,R. (1981) The causes of cancer: Quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. *J Natl Cancer Inst*, **66**, 1191-1308.
- DUTHIE,S.J., Ma,A., Ross,M.A., Collins,A.R. (1996) Antioxidant supplementation decreases oxidative DNA damage in human lymphocytes. *Cancer Res*, **56**, 1291-1295.
- EATON,D.L., Bammler,T.K. (1999) Concise Review of the glutathione S-transferases and their significance to toxicology. *Toxicol Sci*, **49**, 156-164.
- EBERT,M.N., Beyer-Sehlmeyer,G., Liegibel,U.M., Kautenburger,T., Becker,T.W., Pool-Zobel,B.L. (2001) Butyrate induces glutathione S-transferase in human colon cells and protects from genetic damage by 4-hydroxy-2-nonenal. *Nutr Canc*, **41**, 156-164.
- EMENAKER,N.J., Calaf,G.M., Cox,D., Basson,M.D., Qureshi,N. (2001) Short-chain fatty acids inhibit invasive human colon cancer by modulating uPA, TIMP-1; TIMP-2, mutant p53, bcl-2, bax, p21 and PCNA protein expression in an in vitro cell culture model. *J Nutr*, **131**, 3041s-3046s.

- ESTERBAUER,H., Eckl,P., Ortner,A. (1990) Possible mutagens derived from lipids and lipid precursors. *Mutat Res*, **238**, 223-233.
- FEARON,E.R., Vogelstein,B. (1990) A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*, **61**, 759-767.
- FEMIA,A.P., Luceri,C., Dolara,P., Giannini,A., Biggeri,A., Salvadori,M., Clune,Y., Collins,K.J., Paglierani,M., Caderni,G. (2002) Antitumorigenic activity of the prebiotic inulin enriched with oligofructose in combination with the probiotics *Lactobacillus rhamnosus* and *Bifidobacterium lactis* on azoxymethane-induced colon carcinogenesis in rats. *Carcinogenesis*, **23**, 1953-1960.
- FESTAG,G. Charakterisierung der GST-Isoenzyme der humanen Kolonzelllinie LT97 - eine neue Zelllinie aus einem früheren Adenomstadium. 2002. Diplomarbeit. Lehrstuhl für Ernährungstoxikologie, Friedrich-Schiller-Universität Jena.
- FODDE,R., Smits,R., Clevers,H. (2001) APC, signal transduction and genetic instability in colorectal cancer. *Nature Reviews*, **1**, 55-67.
- FOGH,J., Trempe,G. (1975) New human tumor cell lines. In Fogh,J. (ed.) *Human tumor cells in vitro*. Plenum Press, New York, 115-141.
- FUCHS,C.S., Giovannucci,E., Colditz,G.A., Hunter,D.J., Stampfer,M.J., Rosner,B., Speizer,F.E., Willett,W.C. (1999) Dietary fiber and the risk of colorectal cancer and adenoma in women. *N Engl J Med*, **340**, 169-176.
- FUJIKI,H., Suganuma,M., Imai,K., Nakachi,K. (2002) Green tea: cancer preventive beverage and/or drug. *Cancer Lett.*, **188**, 9-13.
- FUJIKI,H., Suganuma,M., Okabe,S., Sueoka,N., Komori,A., Sueoka,E., Kozu,T., Tada,Y., Suga,K., Imai,K., Nakachi,K. (1998) Cancer inhibition by green tea. *Mutat Res*, **402**, 307-310.
- GAARD,M., Tretli,S., Loken,E.B. (1996) Dietary factors and risk of colon cancer: a prospective study of 50,535 young Norwegian men and women. *Eur J Cancer Prev*, **5**, 445-454.
- GAO,Y.T., McLaughlin,J.K., Blot,W.J., Ji,B.T., Dai,Q., Fraumeni Jr.,J.F. (1994) Reduced risk of esophageal cancer associated with green tea consumption. *J Natl Cancer Inst*, **86**, 855-858.
- GERTIG,D.M., Stampfer,M., Haiman,C., Hennekens,C.H., Kelsey,K., Hunter,D.J. (1998) Glutathione S-transferase *GSTM1* and *GSTT1* polymorphisms and colorectal cancer risk: a prospective study. *Canc Epid Biom Prev*, **7**, 1001-1005.
- GIOVANNUCCI,E., Willett,W.C. (1994) Dietary factors and risk of colon cancer. *Ann Med*, **26**, 443-452.
- GLEI,M., Liegibel,U.M., Ebert,M.N., Böhm,V., Pool-Zobel,B.L. (2002) β -Carotene reduces bleomycin-induced genetic damage in human lymphocytes. *Toxicol Appl Pharmacol*, **179**, 65-73.
- GRUBBEN,M.J.A.L., van den Braak,C.C.M., Broekhuizen,R., de Jong,R., van Rijt,L., de Ruijter,E., Peters,W.H.M., Katan,M.B., Nagengast,F.M. (2000) The effect of unfiltered coffee on potential biomarkers for colonic cancer risk in healthy volunteers: a randomized trial. *Aliment Pharmacol Ther*, **14**, 1181-1190.
- HABIG,W.H., Pabst,M.J., Jakoby,W.B. (1974) Glutathione S-transferase. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem*, **249**, 7130-7139.
- HAGUE,A., Manning,A.M., Hanlon,K.A., Huschtscha,L.I., Hart,D., Paraskeva,C. (1993) Sodium butyrate induces apoptosis in human colonic tumour cell lines in a p53 - independent pathway: implications for the possible role of dietary fibre in the prevention of large-bowel cancer. *Int J Cancer*, **55**, 505.
- HAGUE,A., Paraskeva,C. (1995) The short-chain fatty acid butyrate induces apoptosis in colorectal tumour cell lines. *European Journal of Cancer Prevention*, **4**, 359-364.

- HAGUE,A., Singh,B., Paraskeva,C. (1997) Butyrate acts as a survival factor for colonic epithelial cells: further fuel for the in vivo versus in vitro debate. *Gastroenterology*, **112**, 1036-1040.
- HANADA,K., Ishikawa,H., Tamai,K., Hashimoto,I., Sato,K. (1991) Expression of glutathione S-transferase-pi in malignant skin tumors. *J Dermatol Sci*, **2**, 18-23.
- HARBOTTLE,A., Daly,A.K., Atherton,K., Campbell,F.C. (2001) Role of glutathione S-transferase P1, P-glycoprotein and multidrug resistance-associated protein 1 in acquired doxorubicin resistance. *Int J Cancer*, **92**, 777-783.
- HAYES,J.D., Pulford,D.J. (1995) The glutathione S-transferase supergene family: Regulation of GST* and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit Revs Biochem Mol Biol*, **30**, 445-460.
- HELSEBY,N.A., Zhu,S., Pearson,A.E., Tingle,M.D., Ferguson,L.R. (2000) Antimutagenic effects of wheat bran diet through modification of xenobiotic metabolising enzymes. *Mutat Res*, **454**, 77-88.
- HENGSTLER,J.G., Böttger,T., Tanner,B., Dietrich,B., Henrich,M., Knapstein,P.G., Junginger,Th., Oesch,F. (1998) Resistance factors in colon cancer tissue and the adjacent normal colon tissue: glutathione S-transferases alpha and pi, glutathione and aldehyde dehydrogenase. *Cancer Lett*, **128**, 105-112.
- HERNAEZ,J.F., Xu,M., Dashwood,R.H. (1998) Antimutagenic activity of tea towards 2-hydroxyamino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline:effect of tea concentration and brew time on electrophile scavenging. *Mutat Res*, **402**, 299-306.
- HINNEBUSCH,B.F., Meng,S., Wu,J.T., Archer,S.Y., Hodin,R.A. (2002) The effects of short-chain fatty acids on human colon cancer cell phenotype are associated with histone hyperacetylation. *J Nutr*, **132**, 1012-1017.
- HIRATSUKA,A., Tobita,K., Saito,H., Sakamoto,Y., Nakano,H., Ogura,K., Nishiyama,T., Watabe,T. (2001) (S)-preferential detoxification of 4-hydroxy-2(E)-nonenal enantiomers by hepatic glutathione S-transferase isoforms in guinea-pigs and rats. *Biochem J*, **355**, 237-244.
- HIROSE,M., Hoshiya,T., Mizoguchi,Y., Nakamura,A., Akagi,K., Shirai,T. (2001) Green tea catechins enhance tumor development in the colon without effects in the lung or thyroid after pretreatment with 1,2-Dimethylhydrazine or 2,2'-dihydroxy-di-n-propylnitrosamine in male F344 rats. *Cancer Lett*, **168**, 23-29.
- HOWE,G.R., Benito,E., Castelletto,R., Cornee,J., Esteve,J., Gallagher,R.P., Iscovich,J.M., Deng-ao,J., Kaaks,R., Kune,G.A., Kune,S., L'Abbe,K.A.', Lee,H.P., Lee,M., Miller,A.B., Peters,R.K., Potter,J.D., Riboli,E., Slattery,M.L., Trichopoulos,D., Tuyns,A., Tzonou,A., Whittemore,A.S., Wu-Williams,H., Shu,Z. (1992) Dietary intake of fiber and decreased risk of cancers of the colon and rectum: Evidence from the combined analysis of 13 case-control studies. *J Natl Cancer Inst*, **84**, 1887-1896.
- HOWIE,A.F., Forrester,L.M., Glancey,M.J., Schlager,J.J., Powis,G., Beckett,G.J., Hayes,J.D., Wolf,C.R. (1990) Glutathione S-transferase and glutathione peroxidase expression in normal and tumour human tissues. *Carcinogenesis*, **11**, 451-458.
- HU,F.B., Manson,J.E., Liu,S., Hunter,D., Colditz,G.A., Michels,K.B., Speizer,F.E., Giovannucci,E. (1999a) Prospective study of adult onset diabetes mellitus (Type 2) and risk of colorectal cancer in women. *J Natl Cancer Inst*, **91**, 542-546.
- HU,X., Herzog,C., Zimniak,P., Singh,S.V. (1999b) Differential protection against benzo[a]pyrene-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxide-induced DNA damage in HepG2 Cells stably transfected with allelic variants of π class human glutathione S-transferases. *Cancer Res*, **59**, 2358-2362.
- HUBATSCH,I., Ridderström,M., Mannervik,B. (1998) Human glutathione transferase A4-4: an Alpha class enzyme with high catalytic efficiency in the conjugation of 4-hydroxynonal and other genotoxic products of lipid peroxidation. *Biochem J*, **330**, 175-179.

- HYLLA,S., Gostner,A., Dusel,G., Anger,H., Batram,H.-P., Christl,S.U., Kasper,H., Scheppach,W. (1998) Effects of resistant starch on the colon in healthy volunteers: possible implications for cancer prevention. *Am J Clin Nutr*, **67**, 136-142.
- IACOMINO,G., Tecce,M.F., Grimaldi,C., Tosto,M., Russo,G.L. (2001) Transcriptional response of a human colon adenocarcinoma cell line to sodium butyrate. *Biochem Biophys Res Commun*, **285**, 1280-1289.
- JACOBASCH,G., Dongowski,G. (2000) Ballaststoffe mit spezifischen Wirkungen. In Erbersdobler,H.F. and Meyer,A.H. (eds.) *Praxishandbuch Functional Food*. Behr's Verlag, Hamburg, 1-34.
- JACOBS,D.R., Marquart,L., Slavin,J., Kushi,L.H. (1998) Whole-grain intake and cancer: an expanded review and meta-analysis. *Nutr Canc*, **30**, 85-96.
- JACOBSON,L.P., Zhang,B.C., Zhu,Y.R., Wang,J.B., Wu,Y., Zhang,Q.N., Yu,L.Y., Qian,G.S., Kuang,S.Y., Li,Y.F., Fang,X., Zarba,A., Chen,B., Enger,C., Davidson,N.E., Gorman,M.B., Gordon,G.B., Prochaska,H.J., Egner,P.A., Groopman,J.D., Munoz,A., Helzlsouer,K.J., Kensler,T.W. (1997) Oltipraz chemoprevention trial in Qidong, People's Republic of China: Study design and clinical outcomes. *Canc Epid Biom Prev*, **6**, 257-265.
- JOHANSSON,A.S., Ridderström,M., Mannervik,B. (2000) The human glutathione transferase P1-1 specific inhibitor TER 117 designed for overcoming cytostatic-drug resistance is also a strong inhibitor of glyoxalase I. *Molecular Pharmacology*, **57**, 619-624.
- JURONEN,E., Tasa,G., Uusküla,M., Pooga,M., Mikelsaar,A.-V. (1996a) Production and characterization of monoclonal antibodies against class theta glutathione S-transferase T1-1. *Hybridoma*, **15**, 77-82.
- JURONEN,E., Tasa,G., Uusküla,M., Pooga,M., Mikelsaar,A.-V. (1996b) Purification, characterization and tissue distribution of human class theta glutathione S-transferase T1-1. *Biochemistry and Molecular Biology International*, **39**, 21-29.
- KANG,K.W., Cho,I.J., Lee,C.H., Kim,S.G. (2003) Essential role of phosphatidylinositol 3-kinase-dependent CCAAT/enhancer binding protein β activation in the induction of glutathione S-transferase by oltipraz. *J Natl Cancer Inst*, **95**, 53-66.
- KATIYAR,S.K., Mukhtar,H. (1997) Tea antioxidants in cancer chemoprevention. *J Cell Biochem*, **27**, 59s-67s.
- KATOH,T., Nagata,N., Kuroda,Y., Itoh,H., Kawahara,A., Kuroki,N., Ookuma,R., Bell,D.A. (1996) Glutathione S-transferase M1 (GSTM1) and T1 (GSTT1) genetic polymorphism and susceptibility to gastric and colorectal adenocarcinoma. *Carcinogenesis*, **17**, 1855-1859.
- KAUTENBURGER,T. Stimulierung der MAP-Kinase-Kaskade durch Pflanzenstoffe und ihre Metabolite. 2000. Diplomarbeit. Lehrstuhl für Ernährungstoxikologie, Friedrich-Schiller-Universität Jena.
- KEPPLER,D. (1999) Export pumps for glutathione S-conjugates. *Free Rad Biol Med*, **27**, 985-991.
- KERKLAAN,P.R.M., Bouter,S., te Koppele,J.M., Vermeulen,N.P.E., van Bladeren,P.J., Mohn,G.R. (1987) Mutagenicity of halogenated and other substituted dinitrobenzenes in *Salmonella typhimurium* TA100 and derivatives deficient in glutathione (TA100/GSH⁻) and nitroreductase (TA100NR). *Mutation Res*, **176**, 171-178.
- KETTERER,B. (1998) Glutathione S-transferases and prevention of cellular free radical damage. *Free Rad Res*, **28**, 647-658.
- KIM,Y.I., Mason,J.B. (1996) Nutrition chemoprevention of gastrointestinal cancers: a critical review. *Nutrition Reviews*, **54**, 259-279.
- KINZLER,K.W., Vogelstein,B. (1996) Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell*, **87**, 159-170.

- KINZLER, K.W., Vogelstein, B. (1998) Colorectal tumors. In Vogelstein, B. and Kinzler, K.W. (eds.) *The genetic basis of human cancer*. McGraw-Hill, New York, 565-586.
- KIRLIN, W.G., Cai, J., DeLong, M.J., Patten, E.J., Jones, D.P. (1999) Dietary compounds that induce cancer preventive phase 2 enzymes activate apoptosis at comparable doses in HT29 colon carcinoma cells. *J Nutr*, **129**, 1827-1835.
- KNASMÜLLER, S., Friesen, M.D., Holme, J.A., Alexander, J., Sanyal, R., Kassie, F., Bartsch, H. (1996) Effects of phenethyl isothiocyanate on metabolism and on genotoxicity of dimethylnitrosamine and 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4, 5-b]pyridine (PhIP). *Mutat Res*, **350**, 93-102.
- KNASMÜLLER, S., Huber, W.W., Kienzl, H., Schulte-Hermann, R. (1992) Inhibition of repairable DNA-damage in Escherichia coli K-12 cells recovered from various organs of nitrosamine-treated mice by vitamin A, phenethylisothiocyanate, oleic acid and triolein. *Carcinogenesis*, **13**, 1643-1650.
- KNOLL, N. Untersuchungen zur Hemmung des Glutathion / Glutathion S-Transferase - Systems in den humanen Darmtumorzellen HT29. Auswirkungen auf die Genotoxizität von 4-Hydroxy-2-nonenal. 2001. Diplomarbeit. Lehrstuhl für Ernährungstoxikologie, Friedrich-Schiller-Universität Jena.
- KRISHNAN, K., Ruffin, M.T., Brenner, D.E. (2000) Chemoprevention for colorectal cancer. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, **33**, 199-219.
- KRITCHEVSKY, D. (1997) Dietary fibre and cancer (Review). *Eur J Cancer Prev*, **6**, 435-441.
- KUMAR, A., Reddy, E.P. (2001) Genomic organization and characterisation of the promoter region of murine GSTM2 gene. *Gene*, **270**, 221-229.
- KYSE-ANDERSON, J. (1984) Electroblothing of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Meth*, **10**, 203-209.
- LAEMMLI, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- LAMPE, J.W., Chen, C., Li, S., Prunty, J.A., Grate, M.T., Meehan, D.E., Barale, K.V., Dightman, D.A., Feng, Z., Potter, J.D. (2000) Modulation of human glutathione S-transferases by botanically defined vegetable diets. *Canc Epid Biom Prev*, **9**, 787-793.
- LANGOUET, S., Corcos, L., Abdel-Razzak, Z., Loyer, P., Ketterer, B., Guillouzo, A. (1995) Up-regulation of glutathione S-transferases alpha by interleukin 4 in human hepatocytes in primary culture. *Biochem Biophys Res Commun*, **216**, 793-800.
- LE LEU, R.K., Hu, Y., Young, G.P. (2002) Effects of resistant starch and nonstarch polysaccharides on colonic luminal environment and genotoxin-induced apoptosis in the rat. *Carcinogenesis*, **23**, 713-719.
- LIN, H.J., Probst-Hensch, N.M., Ingles, S.A., Han, C.Y., Lin, B.K., Lee, D.B., Frankl, H.D., Lee, E.R., Longnecker, M.P., Haile, R.W. (1995) Glutathione transferase (*GSTM1*) null genotype, smoking and prevalence of colorectal adenomas. *Cancer Res*, **55**, 1224-1226.
- LUPTON, J.R. (1995) Butyrate and colonic cytokinetics: differences between *in vitro* and *in vivo* studies. *European Journal of Cancer Prevention*, **4**, 373-378.
- MALIAKAL, P.P., Coville, P.F., Wanwimolruk, S. (2001) Tea consumption modulates hepatic drug metabolizing enzymes in Wistar rats. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, **53**, 569-577.
- MANNERVIK, B., Awasthi, Y.C., Board, P.G., Hayes, J.D., Di Ilio, C., Ketterer, B., Listowsky, I., Morgenstern, R., Muramatsu, M., Pearson, W.R. (1992) Nomenclature for human glutathione transferases. *Biochem J*, **282**, 305-308.
- MANNERVIK, B., Castro, V.M., Danielson, U.H., Tahir, M.K., Hansson, J., Ringborg, U. (1987) Expression of class Pi glutathione transferase in human malignant melanoma cells. *Carcinogenesis*, **8**, 1929-1932.

- MARQUARDT,H., SCHÄFER,S.G. (1997) *Lehrbuch der Toxikologie*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg; Berlin.
- MATTEY,D.L., Nixon,N., Alldersea,J.E., Cotton,W., Fryer,A.A., Zhao,L., Jones,P., Strange,R.C. (1993) Alpha, mu and pi class glutathione S-transferases in human synovium and cultured synovial fibroblasts: effect of interleukin-1 alpha, hydrogen peroxide and inhibition of eicosanoid synthesis. *Free Rad Res Commun*, **19**, 159-171.
- MAZUR,W.M., Wahala,K., Rasku,S., Salakka,A., Hase,T., Adlercreutz,H. (1998) Lignan and isoflavonoid concentrations in tea and coffee. *Br J Nutr*, **79**, 37-45.
- MCINTOSH,G.H., Royle,P.J., Pointing,G. (2001) Wheat aleurone flour increases cecal β -glucuronidase activity and butyrate concentration and reduce colon adenoma burden in azoxymethane-treated rats. *J Nutr*, **131**, 127-131.
- MELLEMKJAER,L., Olsen,J.H., Frisch,M., Johansen,C., Gridley,G., McLaughlin,J.K. (1995) Cancer in patients with ulcerative colitis. *Int J Cancer*, **60**, 330-333.
- METZ,N., Lobstein,A., Schneider,Y., Gosse,F., Schleiffer,R., Anton,R., Raul,F. (2000) Suppression of azoxymethane-induced preneoplastic lesions and inhibition of cyclooxygenase-2 activity in the colonic mucosa of rats drinking a crude green tea extract. *Nutr Cancer*, **38**, 60-64.
- MIYANISHI,K., Takayama,T., Ohi,M., Hayashi,T., Nobuoka,A., Nakajima,T., Takimoto,R., Kogawa,K., Kato,J., Sakamaki,S., Niitsu,Y. (2001) Glutathione S-transferase pi overexpression is closely associated with K-ras mutation during human colon carcinogenesis. *Gastroenterology*, **121**, 865-874.
- MOFFAT,G.J., McLaren,A.W., Wolf,C.R. (1994) Involvement of Jun and Fos proteins in regulating transcriptional activation of the human pi class glutathione S-transferase gene in multidrug-resistant MCF7 breast cancer cells. *J Biol Chem*, **269**, 16397-16402.
- MOFFAT,G.J., McLaren,A.W., Wolf,C.R. (1996) Sp1-mediated transcriptional activation of the human pi class glutathione S-transferase promoter. *J Biol Chem*, **271**, 1054-1060.
- MOORGHEN,M., Cairns,J., Forrester,L.M., Hayes,J.D., Hall,A., Cattan,A.R., Wolf,C.R., Harris,A.L. (1991) Enhanced expression of glutathione S-transferases in colorectal carcinoma compared to non-neoplastic mucosa. *Carcinogenesis*, **12**, 13-17.
- MORSE,M.A. (2001) The role of glutathione S-transferase P1-1 in colorectal cancer: friend or foe? *Gastroenterology*, **121**, 1010-1013.
- MULDER,T.P.J., Court,D.A., Peters,W.H.M. (1999) Variability of glutathione S-transferase alpha in human liver and plasma. *Clin Chem*, **45**, 355-359.
- NAKAGAWA,K., Saijo,N., Tsuchida,S., Sakai,M., Tsunokawa,Y., Yokota,J., Muramatsu,M., Sato,K., Terada,M., Tew,K.D. (1990) Glutathione S-transferase pi as a determinant of drug resistance in transfectant cell lines. *J Biol Chem*, **265**, 4296-4301.
- NANDURI,B., Zimniak,P. (1999) Role of active-site residues 107 and 108 of glutathione S-transferase mGST4-4 in determining the catalytic properties of the enzyme for 4-hydroxynonenal. *Archives Biochemistry Biophysics*, **362**, 167-174.
- NELSON,R.L. (2001) Iron and colorectal cancer risk: human studies. *Nutr Rev*, **59**, 140-148.
- NIJHOFF,W.A., Groen,G.M., Peters,W.H.M. (1993) Induction of rat hepatic and intestinal glutathione S-transferases and glutathione by dietary naturally occurring anticarcinogens. *Int J Oncology*, **3**, 1131-1139.
- NIJHOFF,W.A., Grubben,M.J.A.L., Nagengast,F.M., Jansen,J.B.M.J., Verhagen,H., vanPoppel,G., Peters,W.H.M. (1995) Effects of consumption of brussels sprouts on intestinal and lymphocytic glutathione S-transferases in humans. *Carcinogenesis*, **16**, 2125-2128.
- NILSSON,L.O., Gustafsson,A., Mannervik,B. (2000) Redesign of substrate-selectivity determining modules of glutathione transferase A1-1 installs high catalytic efficiency with toxic alkenal products of lipid peroxidation. *PNAS*, **97**, 9408-9412.

- O'DWYER,P.J., Clayton,M., Halbherr,T., Myers,C.B., Yao,K. (1997) Cellular kinetics of induction by oltipraz and its keto derivative of detoxification enzymes in human colon adenocarcinoma cells. *Clin Cancer Res*, **3**, 783-791.
- PATTEN,E.J., DeLong,M.J. (1999) Effects of sulindac, sulindac metabolites, and aspirin on the activity of detoxification enzymes in HT-29 human colon adenocarcinoma cells. *Cancer Lett*, **147**, 95-100.
- PEARSON,W.R., Vorachek,W.R., Xu,S., Berger,R., Hart,I., Vannais,D., Patterson,D. (1993) Identification of class-mu glutathione transferase genes *GSTM1-GSTM5* on human chromosome 1p13. *Am J Hum Genet*, **53**, 220-233.
- PERRIN,P., Pierre,F., Patry,Y., Champ,M., Berreur,M., Pradal,G., Bornet,F., Meflah,K., Menanteau,J. (2001) Only fibres promoting a stable butyrate producing colonic ecosystem decrease the rate of aberrant crypt foci in rats. *GUT*, **48**, 53-61.
- PETERS,U., Sinha,R., Chatterjee,N., Subar,A.F., Ziegler,R.G., Kulldorff,M., Bresalier,R., Weissfeld,J.L., Flood,A., Schatzkin,A., Hayes,R.B., Screening Trial Project Team (2003) Dietary fibre and colorectal adenoma in a colorectal cancer early detection programme. *Lancet*, **361**, 1491-1495.
- PETERS,W.H.M., Boon,C.E.W., Roelofs,H.M.J., Wobbes,T., Nagengast,F.M., Kremers,P.G. (1992) Expression of drug-metabolizing enzymes and P-170 glycoprotein in colorectal carcinoma and normal mucosa. *Gastroenterology*, **103**, 448-455.
- PETERS,W.H.M., Nagengast,F.M., Kremers,P.G. (1991) Biotransformation enzymes in human intestine: critical low levels in the colon ? *GUT*, **32**, 408-412.
- PETERS,W.H.M., Nagengast,F.M., Wobbes,T. (1989) Glutathione S-transferases in normal and cancerous human colon tissue. *Carcinogenesis*, **10**, 2371-2374.
- PETERS,W.H.M., Roelofs,H.M.J. (1989) Time-dependent activity and expression of glutathione S-transferases in the human colon adenocarcinoma cell line Caco-2. *Biochem J*, **264**, 613-616.
- PETERS,W.H.M., Wormskamp,N.G.M., Thies,E. (1990) Expression of glutathione S-transferases in normal gastric mucosa and in gastric tumors. *Carcinogenesis*, **11**, 1593-1596.
- POOL-ZOBEL,B.L. (1999) Phytoestrogens and the prevention of cancer. In Gaukel,V. and Spieß,W.E.L. (eds.) Bundesforschungsanstalt für Ernährung, Karlsruhe, 36-49.
- POOL-ZOBEL,B.L., Abrahamse,S.L., Collins,A.R., Kark,W., Gugler,R., Oberreuther,D., Siegel,E.G., Treptow-van Lishaut,S., Rechkemmer,G. (1999) Analysis of DNA strand breaks, oxidized bases and glutathione S-transferase P1 in human colon cells. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, **8**, 609-614.
- POOL-ZOBEL,B.L., Abrahamse,S.L., Rechkemmer,G. (1996) Pretreatment of colon cells with sodium butyrate but not iso-butyrate protects them from DNA damage induced by hydrogen peroxide. In American Institute for Cancer Research (ed.) *Dietary Phytochemicals in Cancer Prevention and Treatment*. Plenum Press, New York and London, 287.
- POOL-ZOBEL,B.L., Bub,A., Liegibel,U.M., Treptow-van Lishaut,S., Rechkemmer,G. (1998) Mechanisms by which Vegetable Consumption Reduces Genetic Damage in Humans. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, **7**, 891-899.
- POOL-ZOBEL,B.L., Bub,A., Müller,H., Wollowski,I., Rechkemmer,G. (1997) Consumption of vegetables reduces genetic damage in humans: first results of an intervention trial with carotenoid-rich foods. *Carcinogenesis*, **18**, 1847-1850.
- POOL-ZOBEL,B.L., Van Loo,J., Rowland,I.R., Roberfroid,M.B. (2002) Experimental evidences on the potential of prebiotic fructans to reduce the risk of colon cancer. *Br J Nutr*, **87**, 273s-281s.
- POTTER,J.D. (1999) Colorectal cancer: Molecules and populations. *J Natl Cancer Inst*, **91**, 916-932.

- PRIMIANO,T., Egner,P.A., Sutter,T.R., Kelloff,G.J., Roebuck,B.D., Kensler,T.W. (1995) Intermittent dosing with oltipraz: relationship between chemoprevention of aflatoxin-induced tumorigenesis and induction of glutathione S-transferases. *Cancer Res*, **55**, 4319-4324.
- QIN,G., Ning,Y., Lotlikar,P.D. (2000) Chemoprevention of aflatoxin B1-initiated and carbon tetrachloride-promoted hepatocarcinogenesis in the rat by green tea. *Nutr Cancer*, **38**, 215-222.
- RAGIONE,F.D., Criniti,V., Pietra,V.D., Borriello,A., Oliva,A., Indaco,S., Yamamoto,T., Zappia,V. (2001) Genes modulated by histone acetylation as new effectors of butyrate activity. *FEBS Letters*, **499**, 199-204.
- RAO,C.V., Nayini,J., Reddy,B.S. (1991) Effect of oltipraz [5-(2-Pyrazinyl)-4-methyl-1,2-dithiol-3-thione] on azoxymethane-induced biochemical changes related to early colon carcinogenesis in male F344 rats. *Dietary Oltipraz and Colon Carcinogenesis*, 77-84.
- RICHTER,M., Jurek,D., Wrba,F., Kaserer,K., Wurzer,G., Karner-Hanusch,J., Marian,B. Cells obtained from colorectal microadenomas mirror early premalignant growth patterns in vitro. *Eur J Cancer* . 2002.
- RIEGER,M.A., Parlesak,A., Pool-Zobel,B.L., Rechkemmer,G., Bode,C. (1999) A diet high in fat and meat but low in dietary fibre increases the genotoxic potential of 'faecal water'. *Carcinogenesis*, **20**, 2311-2316.
- ROWE,J.D., Nieves,E., Listowsky,I. (1997) Subunit diversity and tissue distribution of human glutathione S-transferases: interpretations based on electrospray ionization-MS and peptide sequence-specific antisera. *Biochem J*, **325**, 481-486.
- SACHSE,C., Smith,G., Wilkie,M.J.V., Barrett,J.H., Waxman,R., Sullivan,F., Forman,D., Bishop,D.T., Wolf,C.R., Colorectal Cancer Study Group (2002) A pharmacogenetic study to investigate the role of dietary carcinogens in the etiology of colorectal cancer. *Carcinogenesis*, **23**, 1839-1849.
- SALAMA,S.A., Sierra-Torres,C.H., Oh,H.Y., Hamada,F.A., Au,W.W. (2001) Variant metabolizing gene alleles determine the genotoxicity of benzo[a]pyrene. *Environm Mol Mutagen*, **37**, 17-26.
- SANDSTRÖM,B. (1965) Studies on cells from liver tissue cultivated in vitro. *Exp Cell Res*, **37**, 552-568.
- SASIADEK,M., Hirvonen,A., Noga,L., Paprocka-Borowicz,M., Norppa,H. (1999) Glutathione S-transferase M1 genotype influences sister chromatid exchange induction but not adaptive response in human lymphocytes treated with 1,2-epoxy-3-butene. *Mutat Res*, **439**, 207-212.
- SCHÄFERHENRICH,A., Sendt,W., Scheele,J., Kuchler,A., Liehr,T., Claussen,U., Rapp,A., Greulich,K.O., Pool-Zobel,B.L. Endogenous cancer risk factors induce damage of *Tp53* in primary human colon cells isolated from surgical samples. *Food Chem Toxicol* . 2002.
- SCHEPPACH,W. (1995) Kurzkettige Fettsäuren und Dickdarm - Physiologie, Pathophysiologie und Therapie. *Akt Ernähr-Med*, **20**, 74-78.
- SCHEPPACH,W., Batram,H.-P., Richter,F. (1995) Role of short-chain fatty acids in the prevention of colorectal cancer. *Eur J Cancer*, **31A**, 1077-1080.
- SCHIPPER,D.L., Wagenmans,M.J.M., Peters,W.H.M., van Haelst,U., Wobbes,T., Verhofstad,A.A.J., Wagener,D.J.TH. (1996) Glutathione S-transferases in gastric carcinomas and in adjacent normal gastric epithelium: immunohistochemical and biochemical analyses. *Anticancer Research*, **16**, 3721-3724.
- SCHLADE-BARTUSIAK,K., Sasiadek,M., Kozłowska,J. (2000) The influence of *GSTM1* and *GSTT1* genotypes on the induction of sister chromatid exchanges and chromosome aberrations by 1,2:3,4-diepoxybutane. *Mutat Res*, **465**, 69-75.
- SCHUT,H.A.J., Snyderwine,E.G. (1999) DNA adducts of heterocyclic amine food mutagens: implications for mutagenesis and carcinogenesis. *Carcinogenesis*, **20**, 353-368.

- SHERRATT,P.J., Manson,M.M., Thomson,A.M., Hissink,E.A.M., Neal,g.E., van Bladeren,P.J., Green,T., Hayes,J.D. (1998) Increased bioactivation of dihaloalkanes in rat liver due to induction of class Theta glutathione S-transferase T1-1. *Biochem J*, **335**, 619-630.
- SINGAL,R., van Wert,J., Bashambu,M. (2001) Cytosine methylation represses glutathione S-transferase P1 (*GSTP1*) gene expression in human prostate cancer cells. *Cancer Res*, **61**, 4820-4826.
- SINGH,N.P., McCoy,M.T., Tice,R.R., Schneider,E.L. (1988) A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res*, **175**, 184-191.
- SINGHAL,S.S., Saxena,M., Awasthi,S., Ahmad,H., Sharma,R., Awasthi,Y.C. (1992) Gender related differences in the expression and characteristics of glutathione S-transferases of human colon. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1171**, 19-26.
- SLATTERY,M.L. (2000) Diet, lifestyle, and colon cancer. *Semin Gastrointest Dis*, **11**, 142-146.
- SLATTERY,M.L., Benson,J., Berry,T.D., Duncan,D., Edwards,S.L., Caan,B.J., Potter,J.D. (1997a) Dietary sugar and colon cancer. *Canc Epid Biom Prev*, **6**, 677-685.
- SLATTERY,M.L., Kampman,E., Samowitz,W., Caan,B.J., Potter,J.D. (2000) Interplay between dietary inducers of GST and the GSTM-1 genotype in colon cancer. *Int J Cancer*, **87**, 728-733.
- SLATTERY,M.L., Potter,J.D., Coates,A., Ma,K.N., Berry,T.D., Duncan,D.M., Caan,B.J. (1997b) Plant foods and colon cancer: an assessment of specific foods and their related nutrients (United States). *Cancer Causes Control*, **8**, 575-590.
- SMITH,J.G., Yokoyama,W.H., German,J.B. (1998) Butyric acid from the diet: actions at the level of gene expression. *Crit Rev Food Sci*, **38**, 259-297.
- SOHN,O.S., Surace,A., Fiala,E.S., Richie Jr.,J.P., Colosimo,S., Zang,E., Weisburger,J.H. (1994) Effects of green tea and black tea on hepatic xenobiotic metabolizing systems in the male F344 rat. *Xenobiotica*, **24**, 119-127.
- SREERAMA,L., Hedge,M.W., Sladek,N.E. (1995) Identification of a class 3 aldehyde dehydrogenase in human saliva and increased levels of this enzyme, glutathione S-transferases, and DT-diaphorase in the saliva of subjects who continually ingest large quantities of coffee or broccoli. *Clinical Cancer Research*, **1**, 1153-1163.
- STATISTISCHES BUNDESAMT (2001) *Statistisches Jahrbuch*. Metzler-Poeschel, Stuttgart.
- STEELE,V.E., kelloff,G.J., Balentine,D., Boone,C.W., Mehta,R., Bagheri,D., Sigman,C.C., Zhu,S., Sharma,S. (2000) Comparative chemopreventive mechanisms of green tea, black tea and selected polyphenol extracts measured by *in vitro* bioassays. *Carcinogenesis*, **21**, 63-67.
- STEIN,J., Schröder,O., Bonk,M., Oremek,G., Lorenz,M., Caspary,W.F. (1996) Induction of glutathione-S-transferase-pi by short-chain fatty acids in the intestinal cell line Caco-2. *Eur J Clin Invest*, **26**, 84-87.
- STEINER,C. Etablierung einer Methode zur Detektion protektiver antioxidativer Mechanismen durch sekundäre Pflanzenstoffe in Zellkulturen. 2001. Diplomarbeit. Lehrstuhl für Ernährungstoxikologie, Friedrich-Schiller-Universität Jena.
- STEINKELLNER,H., Rabot,S., Freywald,C., Nobis,E., Scharf,G., Chabicovsky,M., Knasmüller,S., Kassie,F. (2001) Effects of cruciferous vegetables and their constituents on drug metabolizing enzymes involved in the bioactivation of DNA-reactive dietary carcinogens. *Mutat Res*, **480-481**, 285-297.
- STEINMETZ,K.A., Potter,J.D. (1991) Vegetables, fruit, and cancer. I. Epidemiology. *Cancer Causes and Control*, **2**, 325-357.
- STRANGE,R.C., Fryer,A.A. (1999) The glutathione S-transferases: influence of polymorphism on cancer susceptibility. In Vineis,P., Malats,N., Lang,M., d'Errico,A.,

- Caporaso,N., Cuzick,J., and Boffetta,P. (eds.) *Metabolic Polymorphisms and Susceptibility to Cancer*. IARC, Lyon, 231-250.
- STRANGE,R.C., Spiteri,M.A., Ramachandran,S., Fryer,A.A. (2001) Glutathione S-transferase family of enzymes. *Mutat Res*, **482**, 21-26.
- SUZUKI,Y., Isemura,M. (2001) Inhibitory effect of epigalloatechin gallate on adhesion of murine melanoma cells to laminin. *Cancer Lett*, **173**, 15-20.
- SZARKA,C.E., Yao,K.S., Pfeiffer,G.R., Balshem,A.M., Litwin,S., Frucht,H., Goosenberg,E.B., Engstrom,P.F., Clapper,M.L., O'Dwyer,P.J. (2001) Chronic dosing of oltipraz in people at increased risk for colorectal cancer. *Cancer Detection and Prevention*, **25**, 352-361.
- TAKAHASHI,M., Katayama,I., Takada,H., Kuwayama,H., Terano,A. (2000) The effect of NSAIDs and a COX-2 specific inhibitor on Helicobacter pylori-induced PGE₂ and HGF in human gastric fibroblasts. *Aliment Pharmacol Ther*, **14**, 44-49.
- TAKAHASHI,Y., Campbell,E.A., Hirata,Y., Takayama,T., Listowsky,I. (1993) A basis for differentiating among the multiple human Mu-glutathione S-transferases and molecular cloning of brain *GSTM5**. *J Biol Chem*, **268**, 8893-8898.
- THIER,R., Taylor,J.B., Pemble,E.E., Griffith,H.W., Persmark,M., Ketterer,B., Guengerich,F.P. (1993) Expression of mammalian glutathione S-transferase 5-5 in *Salmonella typhimurium* TA 1535 leads to base-pair mutations upon exposure to dihalomethanes. *Proc Natl Acad Sci USA*, **90**, 8576-8580.
- TJALKENS,R.B., Cook,L.W., Petersen,D.R. (1999) Formation and export of the glutathione conjugate of 4-hydroxy-2,3-*E*-nonenal (4-HNE) in hepatoma cells. *Archives Biochemistry Biophysics*, **361**, 113-119.
- TREPTOW-VAN LISHAUT,S. Modulation von Glutathion S-Transferasen durch Ernährungsfaktoren - Untersuchungen zur Beeinflussung eines körpereigenen Schutzsystems. 1998. Insitut für Ernährungsphysiologie, Bundesforschungsanstalt für Ernährung, Karlsruhe.
- TREPTOW-VAN LISHAUT,S., Reckemmer,G., Rowland,I.R., Dolara,P., Pool-Zobel,B.L. (1999) The carbohydrate crystalline and colonic microflora modulate expression of glutathione S-transferase subunits in colon of rats. *Eur J Nutr*, **38**, 76-83.
- UCHIDA,K., Shiraishi,M., Naito,Y., Torii,Y., Nakamura,Y., Osawa,T. (1999) Activation of stress signaling pathways by the end product of lipid peroxidation. *J Biol Chem*, **274**, 2234-2242.
- UESATO,S., Kitagawa,Y., Kamishimoto,M., Kumagai,A., Hori,H., Nagasawa,H. (2001) Inhibition of green tea catechins against the growth of cancerous human colon and hepatic epithelial cells. *Cancer Lett*, **170**, 41-44.
- VAN LIESHOUT,E.M., Tiemessen,D.M., Peters,W.H., Jansen,J.B. (1997) Effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on glutathione S-transferases of the rat digestive tract. *Carcinogenesis*, **18**, 485-490.
- VAN LIESHOUT,E.M.M., Bedaf,M.M.G., Pieter,M., Ekkel,C., Nijhoff,W.A., Peters,W.H.M. (1998) Effects of dietary anticarcinogens on rat gastrointestinal glutathione S-transferase theta 1-1 levels. *Carcinogenesis*, **19**, 2055-2057.
- VAN LIESHOUT,E.M.M., Peters,W.H.M., Jansen,J.B. (1996) Effect of oltipraz, alpha-tocopherol, betacarotene and phenethylisothiocyanate on rat oesophageal, gastric, colonic and hepatic glutathione, glutathione S-transferase and peroxidase. *Carcinogenesis*, **17**, 1439-1445.
- VELAZQUEZ,O.C., Lederer,H.M., Rombeau,J.L. (1996) Butyrate and the colonocyte, implications for neoplasia: a review. *Dig Dis Sci*, **41**, 727-739.
- WÄCHTERSCHÄUSER,A., Stein,J. (2000) Rationale for the luminal provision of butyrate in intestinal diseases (Review). *Eur J Nutr*, **39**, 164-171.
- WANG,J.S., Shen,X., He,X., Zhu,Y.R., Zhang,B.C., Wang,J.B., Quian,G.S., Kuang,S.Y., Zarba,A., Egner,P.A., Jacobson,L.P., Munoz,A., Helzlsouer,K.J., Groopman,J.D.,

- Kensler, T.W. (1999) Protective alterations in phase 1 and 2 metabolism of aflatoxin B1 by oltipraz in residents of Qidong, People's Republic of China. *J Natl Cancer Inst*, **91**, 347-353.
- WATTENBERG, L.W. (1983) Inhibition of neoplasia by minor dietary constituents. *Cancer Res*, **43**, 2448s-2453s.
- WATTENBERG, L.W. (1992) Inhibition of carcinogenesis by minor dietary constituents. *Cancer Res*, **52**, 2085s-2091s.
- WATZL, B., LEITZMANN, C. (1999) *Bioaktive Substanzen in Lebensmitteln*. Hippokrates, Stuttgart.
- WCRF, AICR (1997) *Food, Nutrition and the Prevention of Cancer: a global perspective*. American Institute for Cancer Research, Washington DC.
- WELFARE, M., Adekun, A.M., Bassendine, M.F., Daly, A.K. (1999) Polymorphisms in *GSTP1*, *GSTM1*, and *GSTT1* and susceptibility to colorectal cancer. *Canc Epid Biom Prev*, **8**, 289-292.
- WHALEN, R., Boyer, T.D. (1998) Human glutathione S-transferases (review). *Seminars in Liver Disease*, **18**, 345-358.
- WHITMARSH, A.J., Davis, R.J. (1996) Transcription factor AP-1 regulation by mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways. *J Mol Med*, **74**, 589-607.
- WILLETT, W.C., Stampfer, M.J., Colditz, G.A., Rosner, B.A., Speizer, F.E. (1990) Relation of meat, fat, and fiber intake to the risk of colon cancer in a prospective study among women. *N Engl J Med*, **323**, 1664-1672.
- YAMANE, T., Hagiwara, N., Tateishi, M., Akachi, S., Kim, M., Okuzumi, J., Kitao, Y., Inagake, M., Kuwata, K., Takahashi, T. (1991) Inhibition of azoxymethane-induced colon carcinogenesis in rat by green tea polyphenol fraction. *Jpn J Cancer Res*, **82**, 1336-1339.
- YANG, G., Liao, J., Kim, K., Yurkow, E.J., Yang, C.S. (1998) Inhibition of growth and induction of apoptosis in human cancer cell lines by tea polyphenols. *Carcinogenesis*, **19**, 611-616.
- YANNAI, S., Day, A.J., Williamson, G., Rhodes, M.J.C. (1998) Characterization of flavonoids as monofunctional or bifunctional inducers of quinone reductase in murine hepatoma cell lines. *Fd Chem Toxicol*, **36**, 623-630.
- YE, L., Zhang, Y. (2001) Total intracellular accumulation levels of dietary isothiocyanates determine their activity in elevation of cellular glutathione and induction of Phase 2 detoxification enzymes. *Carcinogenesis*, **22**, 1987-1992.
- ZHAI, S., Dai, R., Friedman, F.K., Vestal, R.E. (1998) Comparative inhibition of human cytochromes P450 1A1 and 1A2 by flavonoids. *Drug Metab Dispos*, **26**, 989-992.
- ZHANG, H., Ahmadi, A., Arban, G., Zdolsek, J., Carstensen, J., Nordenskjöld, B., Söderkvist, P., Sun, X.-F. (1999) Glutathione S-transferase T1 and M1 genotypes in normal mucosa, transitional mucosa and colorectal adenocarcinoma. *Int J Cancer (Pred. Oncol.)*, **84**, 135-138.
- ZHANG, Y., Talalay, P. (1998) Mechanism of differential potencies of isothiocyanates as inducers of anticarcinogenic phase 2 enzymes. *Cancer Res*, **58**, 4632-4639.
- ZHANG, Y., Talalay, P., Cho, C.G., Posner, G.H. (1992) A major inducer of anticarcinogenic protective enzymes from broccoli: Isolation and elucidation of structure. *Proc Natl Acad Sci USA*, **89**, 2399-2403.
- ZHAO, T., Singhal, S.S., Piper, J.T., Cheng, J., Pandya, U., Clark-Wronski, J., Awasthi, S., Awasthi, Y.C. (1999) The role of human glutathione S-transferases hGSTA1-1 and hGSTA2-2 in protection against oxidative stress. *Archives Biochemistry Biophysics*, **367**, 216-224.
- ZHONG, S., Wyllie, a.H., Barnes, D., Wolf, C.R., Spurr, N.K. (1993) Relationship between the *GSTM1* genetic polymorphism and susceptibility to bladder, breast and colon cancer. *Carcinogenesis*, **14**, 1821-1824.

- ZHU, M., Chapman, W.G., Oberley, M.J., Wasserman, W.W., Fahl, W.E. (2001) Polymorphic electrophile response elements in the mouse glutathione S-transferase *GSTa1* gene that confer increased induction. *Cancer Lett*, **164**, 113-118.
- ZIMNIAK, P., Nanduri, B., Pikula, S., Bandorowicz-Pikula, J., Singhal, S.S., Strivastava, S.K., Awasthi, S., Awasthi, Y.C. (1994) Naturally occurring human glutathione S-transferase GSTP1-1 isoforms with isoleucine and valine in position 104 differs in enzymic properties. *European Journal of Biochemistry*, **224**, 27566-27573.

ANHANG

Anhang I: Material

Geräte

Analysenwaage (Sartorius Basic plus)	Sartorius AG, Göttingen
Bildauswertungssystem (Comet Assay II 1.03).....	Perspective Instruments, Halstead, UK
BioRad-MultimanagersS	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Brutschrank (Steri Cult 200).....	Forma Scientific, Inc.
Elektronikrührer (Monotherm variomag)	H+P Labortechnik GmbH, München
Elektrophoreseeinheit (Consort E831).....	cti GmbH, Idstein/Taunus
Elektrophoreseeinheit (Power Pack P25).....	Biometra, Göttingen
Elektrophoresekammer, horizontal.....	Biometra, Göttingen
Elektrophoresekammer, horizontal.....	Renner GmbH, Dannstadt-Schauernheim
Elektrophoresekammer, vertikal.....	cti GmbH, Idstein/Taunus
Fluoreszenz-Mikroskop (AXIOLAB)	Carl Zeiss Jena GmbH, Jena
Gelgießstand	cti GmbH, Idstein/Taunus
Konfokales Mikroskop (Axiovert M100).....	Carl Zeiss Jena GmbH, Jena
Magnetrührer (Combimag).....	Fisher Scientific, Schwerte
Mikroskop (Axiovert 25).....	Carl Zeiss Jena GmbH, Jena
Mikrowellengerät (HMT 700B)	Robert Bosch Hausgeräte GmbH
Minischüttler (MS1 Minishaker)	IKA-Werke, Staufen
MTP-Fluoreszenz-Photometer (SpectralFluor Plus)	Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim
Netzgerät (Sonoplus HD2070)	Bandelin electronic GmbH & Co. KG, Berlin
SemiDry Blotter.....	cti GmbH, Idstein/Taunus
Sterile Werkbank (HeraSafe H12)	Heraeus Instruments GmbH, Hanau
Thermocycler.....	Biometra, Göttingen
Thermomixer (Compact)	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg
Tischzentrifuge (CR 4.22)	Jouan GmbH, Hanau
Titan-Ultraschall-Homogenisator Sonoplus	Bandelin electronic GmbH & Co. KG, Berlin
Ultraschallbad (Ultracleaner Eltrosonic)	neoLab, Heidelberg
Ultrazentrifuge.....	Beckmann Coulter GmbH, München
UV-Vis-Spektrophotometer Cary 3 E	Varian Deutschland GmbH, Darmstadt
Wärmeplatte (HP 9060).....	Labotect GmbH, Göttingen
Wasserbad.....	Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach
Wippe (Duomax 1030)	Heidolph GmbH & Co. KG, Schwabach
Zentrifuge (biofuge fresco).....	Heraeus Instruments GmbH, Hanau
Zentrifuge (biofuge pico).....	Heraeus Instruments GmbH, Hanau

Arbeitsmittel

Deckgläser (24 x 24 mm; 24 x 70 mm)	Menzel, Braunschweig
Einweg-Pipetten (2 ml – 50 ml).....	Fisher Scientific, Schwerte
Einwegspritzen Norm-Ject (2-10 ml)	Henke Sass Wolf GmbH, Tuttlingen
Filterpapier (Gel-Blotting-Papier GB 004).....	Schleicher und Schuell GmbH, Dassel
Handstückzähler	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Kanülen Sterican.....	B. Braun Medical AG, Emmenbrücke
Mehrkanal-Luftpolsterpipette (Transferpipette).....	Brand GmbH & Co., Wertheim

Mikrotiterplatten (96 well), 6-well-Platten	Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden
Nitrozellulosetransfermembran (PROTRAN®)	Schleicher und Schuell GmbH, Dassel
Objektträger (einseitig aufgeraut)	Menzel, Braunschweig
Pasteurpipetten (steril)	NeoLab, Heidelberg
Pipetten (0,2 µl – 2000 µl)	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg
Pipettenspitzen filter tip Gel 100	Greiner Labortechnik GmbH, Frickenhausen
Pipettierhilfe (accu-jet)	Brand GmbH & Co., Wertheim
Reaktionsgefäße (0,2 - 2 ml)	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg
Reaktionsgefäße (15 ml; 50 ml)	Greiner Labortechnik GmbH, Frickenhausen
SLG Filterspitzen	Süd-Laborbedarf GmbH, Gauting
Sterilfilter FisherBrand	Fisher Scientific, Schwerte
Ultrazentrifugenröhrchen (ultraclear)	Beckmann Coulter GmbH, München
Zellkulturflaschen (25 cm ² ; 75 cm ²)	Becton Dickinson Labware, Heidelberg
Zellschaber, steril	Greiner Labortechnik GmbH, Frickenhausen
Zellzählkammer nach NEUBAUER (geeicht)	Fisher Scientific, Schwerte

Chemikalien und Reagenzien

4-Hydroxy-2-nonenal	Calbiochem-Novabiochem GmbH, Bad Soden
Agarose, NuSieve 3:1	Biozym Diagnostics, Hameln
Agarose, Sea Plaque GTG (low melting)	Biozym Diagnostics, Hameln
Agarose, SEAKEM HGT	Biozym Diagnostics, Hameln
Collagenase P [$>1,5$ U/mg]	Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim
DNA-Leiter 100 bp	peQLab Biotechnologie GmbH, Erlangen
dNTP-Mix [100 mM]	STRATAGENE, Amsterdam Zuidooost
Dulbecco's Modified Eagle Medium	Life Technologies GmbH, Karlsruhe
Enterodiol	Institut für Getreideverarbeitung, Potsdam-Rehbrücke
Fötale Kälberserum	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Formaldehyd	Calbiochem-Novabiochem GmbH, Bad Soden
Grünteepulver	VK-Mühlen AG, Hamburg
GST-Antikörper (monoklonal, mouse anti hGST)	
GSTA1/2, GSTM1/2, GSTP1	
..... [PETERS et al. 1992], University Hospital St. Rasboud, Nijmegen, Niederlande	
GSTT1	LabAs Ltd., Tartu, Estland
GST- Standardproteine (hGST)	
GSTA1, GSTP1 [rekombinant; 2,5 µg/µl]	
..... Calbiochem-Novabiochem GmbH, Bad Soden	
GSTM1	
..... [PETERS et al. 1992], University Hospital St. Rasboud, Nijmegen, Niederlande	
GST T1 [0,1 µg/µl]	LabAs Ltd., Tartu, Estland
HotStarTaq-Polymerase [5 units/µl]	QIAGEN GmbH, Hilden
Ladepuffer [6x]	peQLab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Milchpulver (Blotting Grade Blocker, Non-Fat-Dry-Milk)	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Mineralöl (Light White Oil)	ICN Biomedicals Inc., Aurora, Ohio
Na-Propionat	Fisher Scientific, Schwerte
Oltipraz	Unité 456, Université de Rennes I, Rennes cedex, Frankreich
PCR Puffer [10x] (15 mM MgCl ₂)	QIAGEN GmbH, Hilden
Penicillin-Streptomycin-Lösung	Life Technologies GmbH, Karlsruhe
Primer (4.2.3.1.3 und 4.2.3.2.5)	MWG Biotech AG, Ebersberg
Rabbit anti mouse-immunglobulins-HRP	DAKO, Hamburg

Rainbow-Marker.....	Amersham Life Science, Little Chalfont Buckinghamshire, UK
Rinderserum-Albumin	Life Technologies GmbH, Karlsruhe
RPMI 1640 Medium (ohne L-Gluthamin).....	Gibco, Eggenstein
TRIZol-Reagenz	Gibco BRL, München
Trypsin-Versene-Lösung	Life Technologies GmbH, Karlsruhe

Alle weiteren verwendeten Chemikalien wurden, sofern nicht anders gekennzeichnet, von den Firmen Merck, Darmstadt, Sigma-Aldrich, Steinheim bzw. Carl Roth, Karlsruhe bezogen.

Medien, Lösungen und Puffer

Die im Folgenden beschriebenen Lösungen wurden mit doppelt destilliertem Wasser hergestellt und, soweit nicht anders angegeben, bei 4°C gelagert.

ZELLKULTUR / KOLONGEWEBE

Zellkulturmedium (DMEM + 10 % FCS + 1 % Pen-Strep)

Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM)	450 ml
Fötales Kälberserum (FCS)	50 ml
Penicillin-Streptomycin-Lösung (Pen-Strep)	5 ml

Penicillin-Streptomycin-Lösung (Fertiglösung)

Penicillin G	5000 U/ml
Streptomycin-Sulfat in physiologischer Kochsalzlösung.....	5000 µg/ml
Lagerung: - 20 °C	

Trypsin-Versene-Lösung (Fertiglösungen)

Trypsin [10x] 25 g/ml physiologischer Kochsalzlösung.....	10 ml
Versene [10x] 0,2 g/L isotonisch gepufferter Kochsalzlösung	100 ml

Hank's Balanced Salt Solution (HBSS; mit 20 mM Hepes)

NaCl.....	137 mM
KCL	5,4 mM
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	0,42 mM
KH ₂ PO ₄	0,45 mM
Glucose	5,6 mM
NaHCO ₃	4,2 mM
Hepes	20 mM
pH 7,4 (mit 1N NaOH eingestellt); steril filtriert	

Phosphate Buffered Saline (PBS)

NaCl.....	137 mM
KCL	2,7 mM
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	8,1 mM
KH ₂ PO ₄	1,5 mM
pH 7,3 (mit 1N NaOH eingestellt); autoklaviert	

PBS + Ca²⁺ + Mg²⁺

MgCl ₂ x 6H ₂ O.....	0,13 g/l PBS
CaCl ₂ x 2H ₂ O.....	0,10 g/l PBS
pH 7,3; steril filtriert	

PBS + Ca²⁺ + Mg²⁺ + BSA [0,5 %]

BSA.....	5 g/l PBS + Ca ²⁺ + Mg ²⁺
pH 7,3; steril filtriert	

CYTOSOLEXTRAKTION / GST-AKTIVITÄT / PROTEINBESTIMMUNG

Homogenisationspuffer

Tris-HCl.....	25 mM
Saccharose	250 mM
Na ₂ EDTA.....	1 mM
Pefabloc (Zugabe nach Einstellen des pH-Wertes)	1 mM
pH 7,8 (mit 1N NaOH oder 2N HCl eingestellt)	

IB-Homogenisationspuffer

Tris	20 mM
Saccharose	250 mM
Dithiothreitol	1 mM
Pefabloc (Zugabe nach Einstellen des pH-Wertes)	1 mM
pH 7,4 (mit 2 N HCl eingestellt)	

Phosphatpuffer [0,1 M]

NaH ₂ PO ₄ x 2H ₂ O (Lösung 1)	0,1 M
K ₂ HPO ₄ (Lösung 2)	0,1 M
pH 6,5 (durch Titrieren der Lösung 1 mit Lösung 2 eingestellt); autoklaviert	

CDNB-Stammlösung [20 mM]

CDNB	40,5 g
Ethanol absolut	10 ml
Vor Gebrauch bei RT 1:5 mit Phosphatpuffer verdünnen.	

Glutathion-Lösung [4 mM]

Glutathion	30,7 mg
Phosphatpuffer [0,1 M].....	25 ml
Lagerung: aliquotiert bei -20°C	

BRADFORD-Farbreagenz

Coomassie Brilliant Blau G	50 mg
Ethanol absolut	23,5 ml
Phosphorsäure.....	50 ml
unter Rühren (mindestens 3 Stunden) lösen	
H ₂ O	ad 500 ml
filtriert, Lagerung: lichtgeschützt	

BSA-Stammlösung [1 % (w/v)]

BSA.....	50 mg
Homogenisationspuffer	5 ml
steril filtriert; Lagerung: aliquotiert bei -20 °C	

WESTERN BLOT

Puffer für Trenngel

Tris.....	1,5 M
pH 8,8 (mit konz. HCl eingestellt)	

Puffer für Sammelgel

Tris.....	0,5 M
pH 6,8 (mit konz. HCl eingestellt)	

Stammpuffer für Elektrophorese und Blotting [10x]

Tris.....	250 mM
Glycin	1,92 M
pH ≈ 8,8	

Sodiumdodecylsulfat (SDS) -Lösung [10 % (w/v)]

SDS	10 g
H ₂ O	ad 100 ml
Lagerung: RT	

Monomer Acrylamid und Bisacrylamid [37,5:1] (Fertiglösung: Rotiphorese Gel 30)

Acrylamid	30 % (w/v)
Bisacrylamid.....	0,8 % (w/v)
Lagerung: lichtgeschützt	

Ammoniumperoxodisulfat (APS)-Lösung [10 % (w/v)]

APS	500 mg
H ₂ O	ad 5 ml
Lagerung: aliquotiert bei -20 °C	

Tris-Puffer [20 mM]

Tris.....	20 mM
pH 7,4 (mit 2N HCl eingestellt), steril filtriert	

Trenngel [12 % Acrylamid / Bisacrylamid] (Mengen für 2 kleine Gele)

H ₂ O.	4,935 ml
Puffer für Trenngel	3,75 ml
Monomer (Rotiphorese Gel 30) [30 %].....	6 ml
SDS [10 %]	150 µl
APS [10 %].....	150 µl
TEMED.....	15 µl
Reagenzien der Reihenfolge nach pipettieren, nach TEMED-Zugabe gut mischen und sofort die Gele gießen, Gele mit H ₂ O überschichten; Polymerisationsdauer: 10-15 min	

Sammelgel [3 % Acrylamid / Bisacrylamid] (Mengen für 2 kleine Gele)

H ₂ O.....	3,05 ml
Puffer für Trenngel.....	1,2 ml
Monomer (Rotiphorese Gel 30) [30 %].....	650 µl
SDS [10 %].....	50 µl
APS [10 %].....	50 µl
TEMED.....	10 µl

Reagenzien der Reihenfolge nach pipettieren, nach TEMED-Zugabe gut mischen und sofort die Gele auf die polymerisierten Trenngele gießen; Polymerisationsdauer: 15-20 min

SDS-PAGE-Ladepuffer (Probenpuffer)

Puffer für Sammelgel [0,5 M Tris].....	2,5 ml
SDS [10 %].....	2 ml
Glycerol [99 %].....	1 ml
Harnstoff.....	3,6 g
Bromphenolblau.....	10 mg
DTT.....	500 mg
H ₂ O.....	ad 10 ml

Lagerung: aliquotiert bei -20 °C

Elektrophoresepuffer

Stamm-puffer für Elektrophorese/Blotting [10x].....	15 ml
SDS [10 %].....	1,5 ml
H ₂ O.....	ad 150 ml

Vor Gebrauch hergestellt.

Transferpuffer (Blottingpuffer) [5 % Methanol]

Stamm-puffer für Elektrophorese/Blotting [10x].....	100 ml
H ₂ O.....	850 ml
Methanol.....	50 ml

Gelfärbelösung

Coomassie Blau G 250.....	0,2 g
Methanol.....	90 ml
Essigsäure.....	20 ml

unter Rühren (mindestens 3 Stunden) lösen

H ₂ O.....	ad 200 ml
-----------------------	-----------

filtriert, Lagerung: lichtgeschützt

Tris Buffered Saline (TBS) [10x]

Tris-HCl.....	160 mM
Tris.....	40 mM
NaCl.....	1,37 M

pH 7,4 (mit konz. HCl eingestellt); autoklaviert; Lagerung: RT

TBS Tween (TBST)

TBS [10x].....	100 ml
H ₂ O.....	900 ml
Tween 20.....	0,5 ml

Lagerung: RT (1 Woche)

Blockingpuffer mit 5 % (w/v) Milchpulver

Milchpulver.....	50 g
TBST.....	1 l
Lagerung: -20 °C	

3,3'-Diaminobenzidin (DAB)-Stammlösung

DAB Tetrahydrochlorid.....	450 mg
PBS.....	9 ml
Lagerung: aliquotiert bei -20 °C	

DAB-Substratlösung

PBS.....	29,7 ml
DAB-Stammlösung.....	300 µl
Cobaltchlorid.....	1 kl. Spatelspitze (ca. 3 mg)
Imidazol.....	1 kl. Spatelspitze (ca. 1 mg)
H ₂ O ₂ [30 % v/v].....	5 µl
Kurz vor Gebrauch hergestellt.	

MULTIPLEX-PCR / RT-PCR

Tris-Acetat EDTA (TAE)-Puffer [50x]

Tris.....	2 M
EDTA.....	50 mM
Essigsäure.....	5,72 % (v/v)
pH 8,3 (mit 1N NaOH oder Essigsäure eingestellt); Lagerung: RT	

TAE-Puffer [1x]

TAE-Puffer [50x].....	20 ml
H ₂ O.....	980 ml
pH 8,3; Lagerung: RT	

Dimethylpyrocarbonat (DMPC)-Lösung [1% (v/v)]

Ethanol absolut.....	495 ml
H ₂ O.....	495 ml
DMPC.....	10 ml

DMPC-Wasser

DMPC-Lösung [1 %].....	100 ml
H ₂ O.....	900 ml
30 min bei RT inkubiert; autoklaviert; Lagerung: RT	

4-Morpholinpropansulfonsäure (MOPS)-Puffer (10x)

MOPS.....	41,86 g
Na-Acetat.....	4,102 g
Na ₂ EDTA.....	3,722 g
DMPC-H ₂ O.....	ad 1 l
pH 7,0 (mit Essigsäure oder 1N NaOH eingestellt); autoklaviert; Lagerung: RT	

MOPS-Puffer (1x)

MOPS-Puffer (10x) 10 % (v/v)
mit DMPC-H₂O verdünnt; Lagerung: RT

Lithiumchlorid-Lösung

LiCl 4 M
mit DMPC-H₂O hergestellt, Lagerung: RT

RNA-Auftragspuffer (Stammlösung)

Bromphenolblau 0,07 % (w/v)
SDS 7 % (w/v)
Glycerin 33 % (v/v)

RNA-Auftragspuffer (Gebrauchslösung)

MOPS-Puffer (10x) 3,6 µl
Formaldehyd [37,6 %] 6,4 µl
Formamid 18 µl
RNA-Auftragspuffer (Stammlösung) 4 µl
Ethidiumbromid-Lösung [10 mg/ml] 0,2 µl
Kurz vor Gebrauch hergestellt.

COMET-ASSAY

Lyselösung (Stammlösung)

NaCl 2,5 M
Na₂EDTA 100 mM
Tris 10 mM
pH 10 (mit 1N NaOH eingestellt)
Na-Lauroylsarcosinat 10 g
steril filtriert; Lagerung: RT

Lyselösung (Gebrauchslösung)

Lyse-Stammlösung 356 ml
DMSO 40 ml
Triton X-100 4 ml
Gebrauchslösung jeweils frisch angesetzt und bis zum Gebrauch bei 4°C aufbewahrt.

Elektrophoresepuffer

NaOH [10 N] 60 ml
Na₂EDTA [200 mM] 10 ml
H₂O ad 2 l
pH 13; Gebrauchslösung frisch angesetzt und bis zum Gebrauch bei 4°C aufbewahrt.

Ethidiumbromid-Stammlösung

Ethidiumbromid 10 mg
H₂O 50 ml
Lagerung: lichtgeschützt; kurz vor Gebrauch Lösung 1:10 mit H₂O verdünnen

Neutralisationspuffer

Tris-Base.....0,4 M
pH 7,5 (mit konzentrierter HCl eingestellt); steril filtriert; Lagerung: RT

Agarosen

LMA (Sea Plaque GTG Agarose)..... 0,7 % (w/v)
NMA (SEAKEM HGT Agarose) 0,5 % (w/v)
in PBS hergestellt

Mess- und Auswertungssoftware

CaryWin UV Bio 2.0 Varian Deutschland GmbH, Darmstadt
Comet Assay II 1.03 Perceptive Instruments, Halstead, UK
EasyWin Curve Fitting V 4.0a..... Tecan Deutschland
GraphPad PRISM® 2.0 und 3.02 GraphPad Software
MetaMorph 4.1.5 Universal Imaging Corporation
X-Fluor Tecan AG, Crailsheim
Quantity One.....Bio-Rad Laboratories GmbH, München

Anhang II: Tabellen und Abbildungen**Tabelle 26: GST-Expression und GST-Aktivität der Kolongewebeproben - Einzeldaten**

Patient	GST-Protein (ng/mg Protein)					GST-Aktivität (nmol/min/mg Protein)
	GSTA1/2	GSTM1	GSTM2	GSTP1	GSTT1	
1	-	1303	1239	2239	653	-
2	-	814	646	3264	802	-
3	-	1143	660	3916	<i>GSTT1*0</i>	-
4	-	504	355	4277	480	-
5	152	427	199	2434	919	325
6	151	GSTM1-0	241	2120	571	207
7	85	GSTM1-0	374	279	524	106
8	22	<i>GSTM1*0</i>	434	1744	260	133
9	227	472	249	1480	<i>GSTT1*0</i>	105
10	93	692	577	1371	382	77
11	30	<i>GSTM1*0</i>	431	1724	462	256
12	187	<i>GSTM1*0</i>	179	301	437	164
13	n.d.	GSTM1-0	310	456	1003	134
14	n.d.	<i>GSTM1*0</i>	416	1342	327	-
15	66	97	96	1331	210	88

n. d. (nicht detektierbar); - (keine Analyse); GSTM1-0 (Protein nicht detektierbar, keine DNA-Analyse); *GSTM1*0* bzw. *GSTT1*0* (nachgewiesener Nullpolymorphismus)

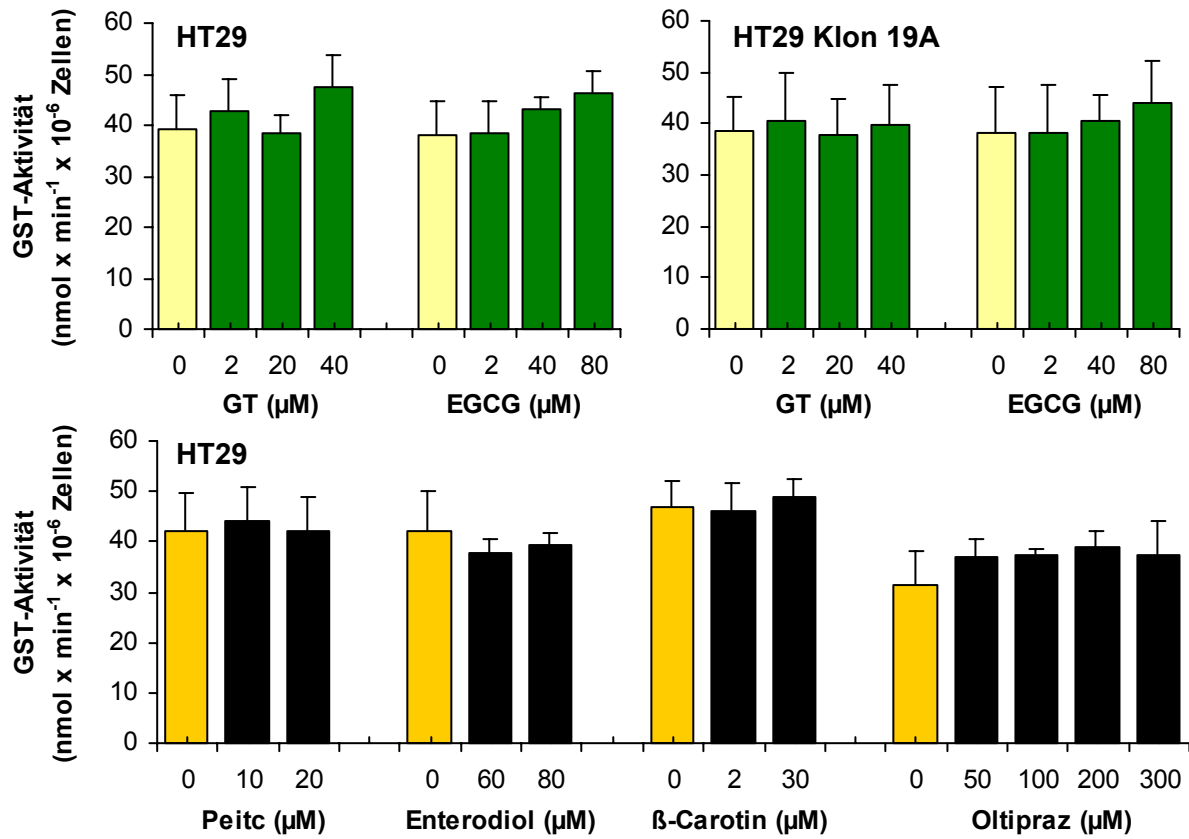


Abbildung 43: GST-Aktivität auf Basis der ZZ nach 72 h Inkubation mit GT, EGCG, PEITC, Enterodiol, β-Carotin u. Oltipraz in HT29 bzw. HT29 Klon 19A (MW ± SD, n=3-7)

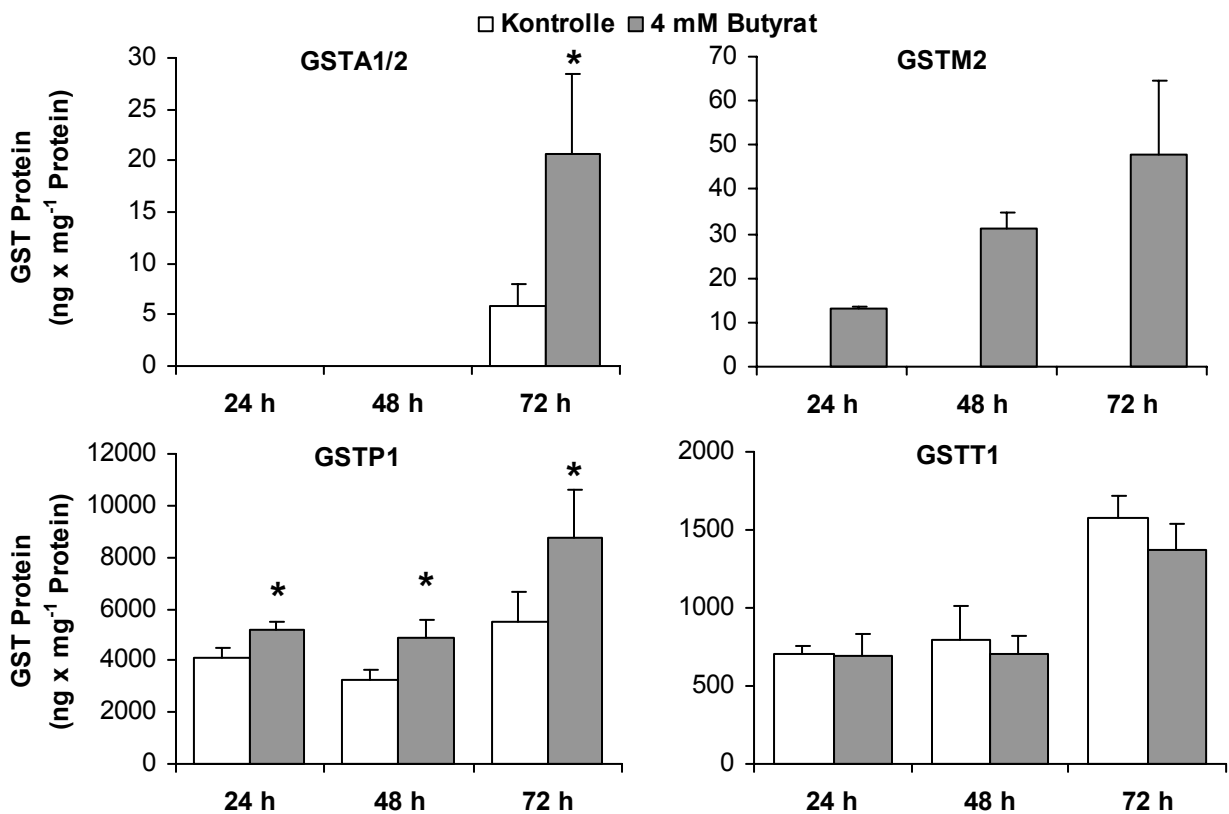


Abbildung 44: Zeitabhängige GST-Induktion in HT29 Klon 19A nach Butyratbehandlung

MW ± SD (n = 3-6). 4 mM Butyrat versus Kontrolle (24-72 h): *, p < 0,05; (zweiseitiger, ungepaarter t-Test).

Tabelle 27: Proteinexpression und Aktivität der GST (auf der Basis der Zellzahl) nach Butyratbehandlung in HT29, HT29 Klon 19A, primären Kolonzellen und Kolonfibroblasten

Zellen (Zeit) / Butyrat (mM)	GST (ng x 10 ⁻⁶ Zellen)					Aktivität (nmol x min ⁻¹ x 10 ⁻⁶ Zellen)
	A1/2	M1	M2	P1	T1	
<i>HT29 (24 h, n=3)</i>						
0	n. d.	n. d.	n. d.	378±74	71±3	36,5±4,3
4	n. d.	n. d.	2,5±0,3	611±128	78±10	46,8±7,3*
<i>(48 h, n=3)</i>						
0	n. d.	n. d.	n. d.	442±97	96±16	38,5±4,1
4	2±0,1	n. d.	4,8±0,6	945±96*	108±12	67,1±6,8*
<i>(72 h, n=5-8)</i>						
0	0,9±0,2	n. d.	n. d.	827±185	124±37	37,4±5,5
2	0,9±0,2	n. d.	3,9±1,5	995±154	108±39	49,2±5,5*
4	3,3±1,4*	n. d.	11,9±5,9	1337±196*	141±61	69,7±10,8*
<i>HT29 Klon 19A (24 h, n=3)</i>						
0	n. d.	n. d.	n. d.	758±43	131±21	44,6±5,1
4	n. d.	n. d.	2,3±0,1	904±20*	122±32	47,7±8,6
<i>(48 h, n=3)</i>						
0	n. d.	n. d.	n. d.	602±52	142±42	44,7±4,2
4	n. d.	n. d.	6,2±0,7	1016±48*	141±9	70,6±15*
<i>(72 h, n=5-8)</i>						
0	0,8±0,3	n. d.	n. d.	723±216	207±32	37,1±4,5
2	1,3±0,8	n. d.	2,9±0,5	913±190	183±26	47,2±4,1*
4	3,2±1,5*	n. d.	7,0±2,0	1292±255*	206±26	61,1±7,8*
<i>Primäre Kolon- zellen (24h,n=1-4)</i>						
0	9,7±7,7	11,3	21±8	58±29	58±26	14,7±7,7
4	8,4±4,7	14,1	33±16	70±35	93±49	15,6±7,5
0	9,5±9	14,1	10,6±4	110±26	79±31	11,3±1,6
10	8,7±7,7	16,2	12,7±6,7	114±15	91±21	14,8±2,4
20	11,4±10,6	16,9	12,6±3,4	123±2	118±33	14,3±3,5
<i>Fibroblasten Kultur 1(72h,n=3)</i>						
0	n. d.	217±19	304±36	771±73	GSTT1*0	58±2
4	n. d.	266±10*	413±36*	826±136	GSTT1*0	68±2*
<i>Fibroblasten Kultur 2(72h,n=5)</i>						
0	n. d.	GSTMI*0	964±283	2797±743	821±221	145±15
4	n. d.	GSTMI*0	1671±293*	3821±1537	1119±320	201±37*

Angaben als MW ± SD; n. d. (nicht detektierbar); MI*0 und T1*0 (nachgewiesener Nullpolymorphismus);

(*) signifikant im zweiseitigen unpearten *t*-Test bzw. in one-way-ANOVA mit Dunnetts Post Test;

Ergebnisse der primären Kolonzellen sind auf die Lebendzellzahl bezogen.

DANK

Frau Prof. Dr. Beatrice L. Pool-Zobel danke ich dafür, dass sie mich für ihr Forschungsgebiet begeistert und mir die Möglichkeit gegeben hat, dieses interessante und vielseitige Promotionsthema am Lehrstuhl für Ernährungstoxikologie der Friedrich-Schiller-Universität Jena zu bearbeiten sowie für ihre stete Bereitschaft zur wissenschaftlichen Diskussion, die wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Frau Dr. Gabriele Beyer-Sehlmeyer gilt an dieser Stelle mein besonderer Dank, denn in ihr fand ich eine außerordentlich engagierte Ansprechpartnerin, der Teamarbeit wichtig ist, die ständig zu Diskussionen über auftretende Probleme bereit war und mir wichtige Denkanstöße für meine Arbeit gegeben hat.

Mein aufrichtiger Dank gilt Herrn Dr. Wilbert H. M. Peters, St. Radboud Hospital, Nijmegen, Niederlande, für die Möglichkeit, bei ihm den Nachweis der GST-Proteine mittels Western Blot-Technik zu erlernen sowie für die Bereitstellung der monoklonalen GST-Antikörper. Der wissenschaftliche Kontakt zu ihm und seiner Mitarbeiterin Frau Hennie Roelof hat aufgrund ihrer Erfahrungen auf dem Gebiet der GST-Forschung die Arbeit stark voran gebracht.

Allen ehemaligen und derzeitigen Mitarbeitern des Lehrstuhls für Ernährungstoxikologie möchte ich für die gute Zusammenarbeit danken, insbesondere Frau Dr. Annett Klinder, Herrn Dr. Thomas Becker, Frau Dr. Ute Liegiebel, Frau Dipl. troph. Grit Festag und Frau Dipl. troph. Tanja Kautenburger für ihre Unterstützung bei der Etablierung der Methoden sowie Frau Dipl. troph. Nadine Knoll und Frau Stefanie Kühler für technische Unterstützung bei der Messung der GST-Aktivität.

Herrn Dr. W. Sendt und Prof. Dr. J. Scheele, der chirurgischen Abteilung der Universitätsklinik Jena, danke ich für die Bereitstellung von Kolongewebeproben sowie den Patienten für ihr Einverständnis zur Untersuchung dieser.

Mein Dank gilt auch der Deutschen Krebshilfe, welche diese Arbeit innerhalb des Projekts (10-1572-Po1): „Chemoprotektion nach Induktion von Entgiftungsenzymen durch Phytoprotektanten: Analyse der Wirkungsmechanismen und Charakterisierung der zu erwartenden Chemoresistenz“ finanziert hat sowie der Firma VK Mühlen für die Bereitstellung des Grünteepulvers.

Ganz herzlich möchte ich mich bei allen meinen Freunden und meiner Mutter Erika Ebert für die Motivation und Unterstützung während der Anfertigung meiner Arbeit bedanken. Ein besonderes Dankeschön geht an Christiane Schnee, Bettina Weil und Ulrike Schreckenbach.

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Literatur angefertigt habe.

Jena,

LEBENS LAUF

Name: Miriam Nannette Ebert
Geboren: 14.05.1974 in Leipzig
Familienstand: ledig

Schul Ausbildung

1980 – 1990 Allgemeinbildende Polytechnische Oberschule in Leipzig
1990 – 1992 Erweiterte Oberschule „Thomasschule“ in Leipzig
26.06.1992 Allgemeine Hochschulreife

Studium

1992 – 1998 Studium der Ernährungswissenschaften an der Friedrich-Schiller-Universität (FSU) Jena
1994 – 1995 jeweils 1 Praxissemester in Frankreich (ökologische Landwirtschaft) und bei der CPC Deutschland GmbH, Heilbronn (Ernährungswiss. Abteilung)
1997 – 1998 Diplomarbeit bei der PHARMAPLANT GmbH, Artern, und der Bundesanstalt für Züchtungsforschung, Quedlinburg zum Thema: „Identifizierung der ätherischen Öle ausgewählter Pflanzenarten mit zitronenartigem Aroma und deren sensorische Bewertung als Teedrogen“
08.09.1998 Abschluss als Diplom-Trophologin

Postgraduale Ausbildung

1998 – 2002 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Lehrstuhl Ernährungstoxikologie (Prof. Dr. B. L. Pool-Zobel), Institut für Ernährungswissenschaften der FSU Jena

Publikationen

EBERT, M.N.; KLINDER, A.; PETERS, W.H.M.; SCHÄFERHENRICH, A.; SENDT, W.; SCHEELE, J.; POOL-ZOBEL, B.L. (2003) Butyrate is an efficient inducer of glutathione S-transferases in human colon cells. *Carcinogenesis*, **24** (10), 1637-44.

EBERT, M.N., BEYER-SEHLMAYER, G., LIEGIBEL, U.M., KAUTENBURGER, T., BECKER, T.W. & POOL-ZOBEL, B.L. (2001) Butyrate induces glutathione S-transferase in human colon cells and protects from genetic damage by 4-hydroxy-2-nonenal. *Nutr Canc*, **41**, 156-164.

GLEI, M., LIEGIBEL, U.M., EBERT, M.N., BÖHM, V. & POOL-ZOBEL, B.L. (2002) β -Carotene reduces bleomycin-induced genetic damage in human lymphocytes. *Toxicol Appl Pharmacol*, **179**, 65-73.