

**Genexpressionsprofile in humanen peripheren mononukleären  
Blutzellen als neuer Biomarker für Interventionsstudien**

**Dissertation**

**zur Erlangung des akademischen Grades  
doctor rerum naturalium**

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



**von Dipl.-Troph.**

**Thomas Georg Hofmann**

**geboren am 08.01.1976**

**in Bayreuth**

**Gutachter:**

Erster Gutachter: PD. Dr. Michael Glei

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Gerhard Jahreis

Dritter Gutachter: Prof. Dr. Gerhard Eisenbrand

**Tag der öffentlichen Disputation:** 20.07.2009

## Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>III</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1 Krebs und Ernährung .....	1
1.1.1 Ballaststoffe.....	5
1.1.2 Glucosinolate.....	5
1.1.3 Polyphenole.....	6
1.2 Biomarker.....	7
1.2.1 Nachteile von Biomarker-Untersuchungen.....	8
1.2.2 Auswahl des Gewebes für Biomarkeruntersuchungen.....	8
1.3 Blut und Blutzellen als Surrogat-Gewebe.....	10
1.3.1 Physiologische Funktionen von peripheren mononukleären Blutzellen .....	12
1.3.2 Genexpressionsprofile in peripheren mononukleären Blutzellen.....	13
1.3.3 Mechanismen der Chemoprävention in peripheren mononukleären Blutzellen .....	15
1.4 Problemstellung und Ziele der Arbeit .....	16
<b>2 Publikationen.....</b>	<b>18</b>
2.1 Publikation I: Use of gene expression profiles in human peripheral blood mononuclear cells as biomarker for nutritional <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> investigations. Thomas Hofmann, Stefanie Klenow, Anke Borowicki, Chris Gill, Beatrice L. Pool- Zobel, Michael Glej; <i>Eingereicht bei Genes and Nutrition</i> .....	18
2.2 Publikation II: Intervention with polyphenol-rich fruit juices results in an elevation of glutathione S-transferase P1 (hGSTP1) protein expression in human leucocytes of healthy volunteers. Thomas Hofmann, Ute Liegibel, Peter Winterhalter, Achim Bub, Gerhard Rechkemmer, Beatrice L. Pool-Zobel; <i>Mol. Nutr. Food Res. 2006, 50, 1191 – 1200</i> .....	44
2.3 Publikation III: Modulation of detoxification enzymes by watercress – <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> investigations in human peripheral blood cells. Thomas Hofmann, Anja Kuhnert, Antje Schubert, Chris Gill, Ian R. Rowland, Beatrice L. Pool-Zobel, Michael Glej; <i>Eur J Nutr. 2009 Jul 28 [Epub ahead of print]</i> .....	55
<b>3 Weitere Ergebnisse.....</b>	<b>65</b>
3.1 Untersuchungen zur metabolischen Aktivität .....	65
3.2 Genexpression in peripheren mononukleären Blutzellen und Kolonozyten der identischen Individuen .....	66

---

3.3	Genexpressionsänderungen in peripheren mononukleären Blutzellen nach Mehrfruchtsaft-Intervention .....	68
3.4	Weitere publizierte Daten.....	70
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>71</b>
4.1	Das Primärzellmodell (grundlegende <i>in vitro</i> -Untersuchungen).....	71
4.1.1	Zellkultur.....	71
4.1.2	Inter- und intraindividuelle Variationen der Genexpression in peripheren mononukleären Blutzellen .....	72
4.1.3	Erfassung der <i>in vitro</i> -Modulierbarkeit der Genexpression in peripheren mononukleären Blutzellen .....	74
4.2	Modulation von Entgiftungsenzymen durch Wasserkresse und Polyphenole ( <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i> ) .....	76
4.2.1	Wasserkresse, Isothiocyanate und Phenethylisothiocyanat .....	76
4.2.2	Polyphenole.....	79
4.3	Kritische Bewertung von Biomarkerergebnissen.....	81
4.4	Zusammenfassende Schlussfolgerungen .....	82
4.5	Ausblick.....	83
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>85</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>88</b>
<b>7</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>100</b>
7.1	Liste der mittels DNA-Microarray untersuchten Gene (HS11 GEArray Q „Human Drug Metabolism Gene Array“).....	100
7.2	Liste der mittels DNA-Microarray untersuchten Gene (HS12 GEArray Q “Human Stress and Toxicity Pathway Finder Gene Array”).....	102
7.3	Konstitutiv exprimierte Gene (HS11 und HS12).....	104
	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>105</b>
	<b>Publikationen.....</b>	<b>106</b>
	<b>Danksagung.....</b>	<b>108</b>
	<b>Eigenständigkeitserklärung .....</b>	<b>109</b>

**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

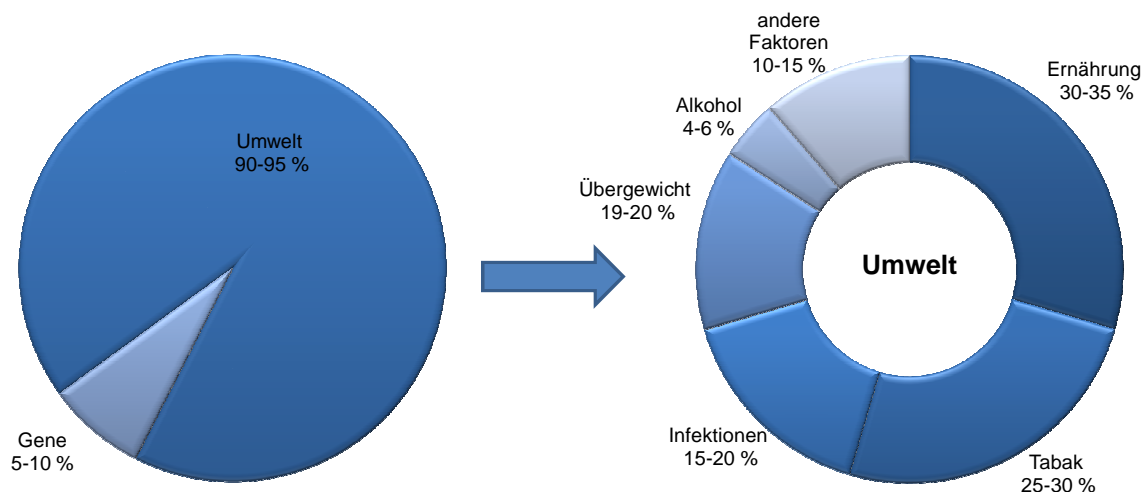
ARE	Antioxidative Response Element
AhR	Arylhydrokarbon-Rezeptor
CV	Variationskoeffizient
CYP	Cytochrom-P450 abhängige Monooxygenasen (EC 1.14.14.1)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (EC 1.2.1.12)
GPX	Glutathionperoxidasen (EC 1.11.1.9)
GPX1	zytosolische Glutathionperoxidase
GSH	Glutathion
GST	Glutathion S-Transferasen (EC 2.5.1.19)
HT29	Humane epitheliale Kolonkarzinomzelllinie (Adenokarzinom)
ITCs	Isothiocyanate
MHC	Major Histocompatibility Complex
mRNA	messenger RNA
n	Anzahl der Wiederholungen
Nrf2	NF-E2-related factor 2
p	Signifikanzniveau
PBL	periphere Blut-Leukozyten
PBMC	periphere mononukleäre Blutzellen
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEITC	Phenethylisothiocyanat
PHA	Phytohaemagglutinin
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale RNA
SEM	Standardfehler
SD	Standardabweichung
SOD	Superoxid-Dismutasen (EC 1.15.1.1)
SOD1	Superoxid-Dismutase, Kupfer und Zink abhängig
SOD2	Superoxid-Dismutase, Mangan abhängig
STA	surrogate tissue analysis
UDP	Uridinphosphat
UGT	UDP-Glucuronosyltransferasen (EC 2.4.1.17)
WCRF	World Cancer Research Fund

# 1 EINLEITUNG

Während sich die Ernährungsforschung in früheren Jahren meist mit der Nährstoff-Grundversorgung oder mit der Ernährung im Krankheitsfall befasst hat, liegt der Fokus der modernen Ernährungsmedizin oft darauf, die individuelle Gesundheit und Leistung zu erhalten oder zu verbessern und Krankheiten zu verhindern. Basis für diese Forschung ist der wissenschaftliche Beweis der Prävention und Protektion, die Identifizierung der biologisch aktiven Verbindungen und das Verständnis der molekularen Mechanismen.

## 1.1 KREBS UND ERNÄHRUNG

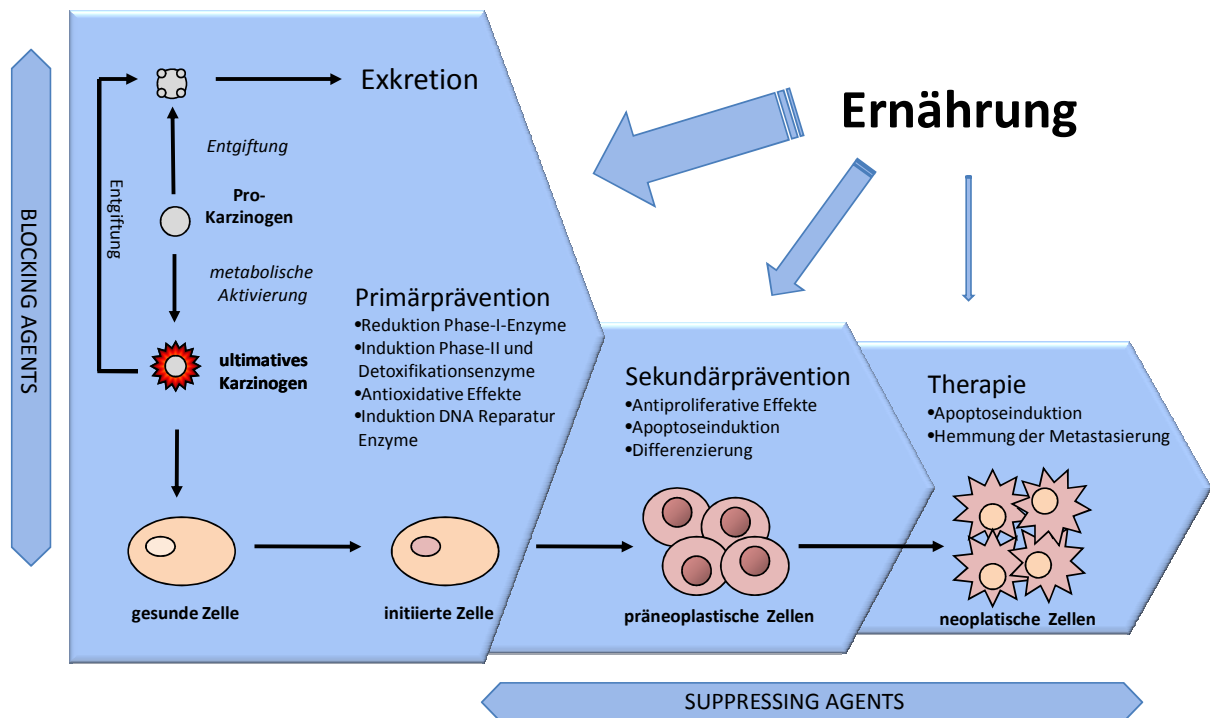
Weltweit starben 2007 fast acht Millionen Menschen an Krebs und somit mehr als an Tuberkulose, Aids und Malaria zusammen (World Health Organization, 2007). Als Auslöser dieser Krankheit gelten sowohl endogene Faktoren wie angeborene Mutationen, pathogene Hormonspiegel oder der Immunstatus als auch exogene/erworbene Faktoren wie Rauchen, Ernährung, Strahlenexposition oder Infektionen (Anand *et al.*, 2008). Vor allem die Ernährung und der Tabakkonsum spielen mit jeweils circa 30 % der exogenen Faktoren eine wichtige Rolle bei der Tumorgenese (Abbildung 1).



**Abbildung 1: Rolle der Umwelt und der individuellen genetischen Prädisposition bei der Krebsentstehung. Prozentuale Verteilung der verschiedenen Umweltfaktoren (Anand *et al.*, 2008).**

Etwa ein Drittel aller Krebserkrankungen könnten nach Schätzungen der „World Health Organization“ vor allem durch Einschränken von Rauchen, Alkoholkonsum und falscher Ernährung sowie durch gesteigerte körperliche Aktivität vermieden werden. Ein weiteres Drittel könnte durch frühe Diagnose und adäquate Therapie geheilt werden (World Health Organization, 2007). Auch wenn diese Zahlen nur Schätzungen darstellen, belegen sie doch die Relevanz von Umwelt- bzw. Lifestyle-Faktoren in der Krebsprävention.

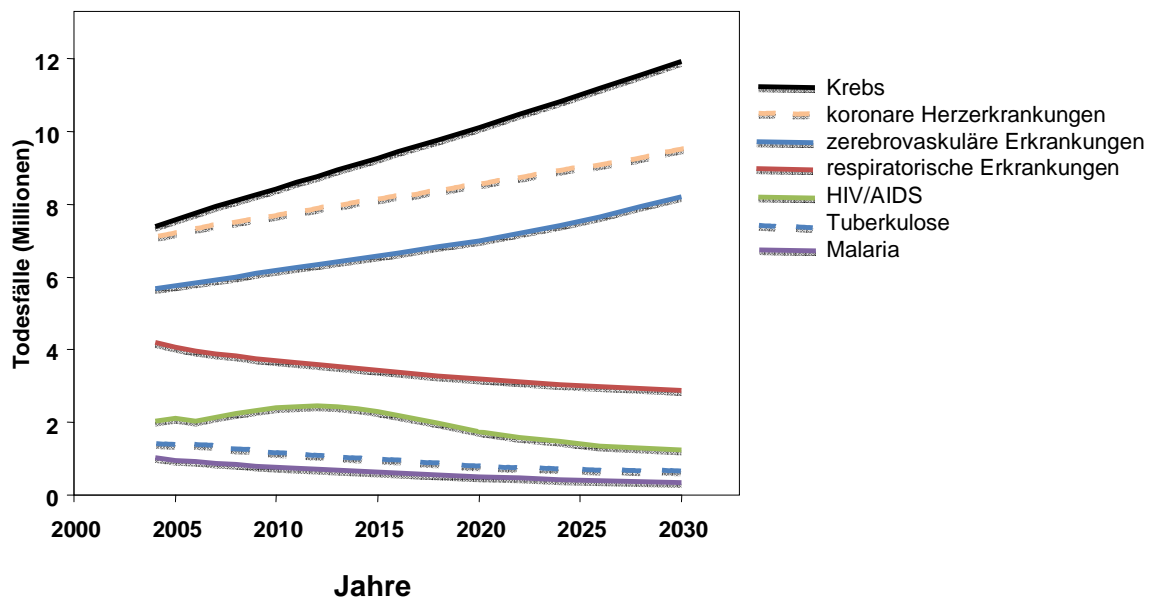
Die so genannte „Western Style Diet“, geprägt durch einen zu hohen Fleischverzehr, einen zu hohen Konsum an gesättigten Fettsäuren und einen zu geringen Verzehr an Obst, Gemüse und Getreideprodukten, gilt als einer der wesentlichen Risikofaktoren für viele Zivilisationskrankheiten, zu denen auch Krebs gehört (Willett, 2008). Neben dem „Zuviel“ an schädlichen Substanzen ist wahrscheinlich vor allem der Mangel an protektiven Substanzen von Bedeutung. Der Entstehung von Krebserkrankungen kann somit neben der Vermeidung der Exposition mit kanzerogenen Stoffen auch durch eine gesteigerte Aufnahme protektiver Substanzen entgegengewirkt werden (Surh, 2003). Diese Aufnahme von natürlichen oder pharmakologischen Substanzen, welche die Entwicklung von invasivem Krebs verhindern können, wird als Chemoprävention bezeichnet (Hong & Sporn, 1997; Wattenberg, 1985). Chemopräventive Substanzen sollen entweder die Initiation gesunder Zellen blockieren und/oder eine weitere Promotion entarteter Zellen vermeiden. Der Krebsinitiation kann durch so genannte „Blocking Agents“ entgegengewirkt werden. Diese Substanzen können antioxidative Eigenschaften aufweisen, reaktive Metabolite abfangen, DNA-Schäden verhindern oder die Reparatur einer bereits eingetretenen DNA-Schädigung fördern. Im Mittelpunkt dieser Primärprävention stehen gesunde, nicht initiierte Zellen (Abbildung 2). Existieren bereits entartete Zellen oder präneoplastische Läsionen, kann deren Zellwachstum und Überleben durch so genannte „Suppressing Agents“ eingeschränkt werden. „Suppressing Agents“ verhindern hauptsächlich die Entartung von Zellen mit bereits geschädigter DNA, unterdrücken das Wachstum von Krebszellen und fördern deren Apoptose. Diese Eigenschaften werden als Mechanismen der Sekundärprävention bezeichnet.



**Abbildung 2: Einfluss der Ernährung auf die verschiedenen Stufen der Karzinogenese.** Dargestellt ist der Verlauf der Karzinogenese mit der Transformation einer normalen, gesunden Zelle durch ein Karzinogen zur initiierten Zelle. Diese Zellen verändern sich in der Tumorpromotion zu präneoplastischen Zellen und in der Progression zu neoplastischen Zellen. Die Ernährung kann auf unterschiedlichen Stufen dieses Prozesses Einfluss nehmen. Modifiziert nach Wattenberg (1985) und Surh (2003).

Trotz rasanter Fortschritte der Forschung und innovativer Therapieansätze in den letzten Jahren, stellt Krebs nach den koronaren Herzerkrankungen noch immer die zweithäufigste Todesursache dar. Während die Mortalitätsrate für koronare Herzerkrankungen in den letzten Jahren immer weiter zurückgeht, ist dies für Krebs nicht der Fall (Jemal *et al.*, 2005). Es wird sogar davon ausgegangen, dass die Zahl der Krebstoten von 7,4 Millionen (2004) in den nächsten Jahren um 60 % auf 11,8 Millionen (2030) steigen wird (Abbildung 3) (Mathers & Loncar, 2006). Zur möglichen Verringerung der Krebsinzidenz werden im aktuellen Bericht des „World Cancer Research Fund“ acht Empfehlungen für die Gesundheit der Bevölkerung formuliert, welche einen Beitrag zur Prävention und Kontrolle darstellen sollen.





**Abbildung 3: Vorrasschätzungen für verschiedene Todesursachen im Zeitraum von 2004 bis 2030. Modifiziert nach Mathers & Loncar (2006).**

Eine dieser Empfehlungen befürwortet, den Energiebedarf überwiegend durch pflanzliche Lebensmittel zu decken. Dies wird durch die Tatsache begründet, dass die meisten tumorprotektiven Kostformen aus pflanzlicher Nahrung bestehen (World Cancer Research Fund, 2007). Unklar ist jedoch, welche Bestandteile der pflanzlichen Kost (Vitamine, Ballaststoffe, Polyphenole oder andere Inhaltsstoffe) einen protektiven Einfluss haben. Es wird davon ausgegangen, dass der reichliche Verzehr von Obst und Gemüse wahrscheinlich vor Mundhöhlenkrebs, vor Magenkrebs und Dickdarmkrebs schützt. Als gesichert gilt nach aktueller Datenlage, dass vermehrtes Körperfett das Risiko für Speiseröhrenkrebs, Brustkrebs, Pankreaskrebs, Krebs des Dick- und Enddarms, Endometriumkarzinom und Nierenzellkrebs erhöht. Alkoholkonsum fördert das Risiko von Krebs der Mundhöhle, des Rachenraums und des Kehlkopfes; auch die Wahrscheinlichkeit, an Speiseröhren- oder Brustkrebs zu erkranken, erhöht sich mit zunehmendem Alkoholkonsum. Bei anderen Tumorarten, wie Leukämie bei Kindern oder dem Prostatakarzinom, werden anhand der momentanen Datenlage zurzeit keine sicheren Beweise für einen Einfluss der täglich konsumierten Lebensmittel auf die Krebsentstehung gesehen.

Untersuchungen der vorliegenden Arbeit zur Assoziation zwischen Ernährung und Krebserkrankungen basieren im Wesentlichen auf drei „Substanzklassen“, welche nachfolgend charakterisiert werden.

### 1.1.1 BALLASTSTOFFE

Der Zusammenhang zwischen Ballaststoffen und einer Krebsreduktion vor allem im Bereich des Dickdarms ist umstritten (Ferguson & Harris, 2003). Einige große Studien belegen diesen Zusammenhang eindeutig (Bingham *et al.*, 2003), während andere Studien keine signifikante Verringerung des Risikos feststellen konnten (Fuchs *et al.*, 1999) oder nach Berücksichtigung weiterer Risikofaktoren, wie etwa dem Genuss von rotem Fleisch, keine Hinweise mehr fanden (Park *et al.*, 2005). Ballaststoffe sind pflanzliche Inhaltsstoffe, die den menschlichen Dünndarm passieren und unverdaut in den Dickdarm gelangen (Ferguson *et al.*, 2001). Dort werden sie von der mikrobiellen Darmflora ganz oder teilweise abgebaut, wobei unter anderem kurzkettige Fettsäuren wie Acetat, Propionat und Butyrat entstehen. Vor allem Butyrat zeigte *in vitro* chemopräventive Wirkungen auf Krebszellen wie Induktion der Apoptose, Inhibierung der Proliferation und Förderung der Differenzierung (Comalada *et al.*, 2006; Sengupta *et al.*, 2006). Butyrat gilt als potenter Histondeazetylasehemmer und es existiert ein „butyrate-response-element“ in den Promotorregionen einiger Gene (Davie, 2003). Somit kann Butyrat Einfluss auf die Expression verschiedener Gene nehmen und ist unter anderem in der Lage, Proteine der Biotransformation (z.B. Phase-II-Enzyme) zu induzieren (Sauer *et al.*, 2007a).

### 1.1.2 GLUCOSINOLATE

Senfölglykoside oder auch Glucosinolate sind schwefel- und stickstoffhaltige chemische Verbindungen, die im pflanzlichen Sekundärstoffwechsel aus Aminosäuren und Glucose gebildet werden. Bisher wurden rund 115 verschiedene Glucosinolate identifiziert, welche sich nur im Aglykon-Rest unterscheiden. Dieser Rest ist immer über ein Schwefelatom an den Zuckerteil gebunden (Hayes *et al.*, 2008). Glucosinolate kommen vorwiegend in Pflanzen der Familie *Brassicaceae* (Kreuzblütengewächse) vor und geben Gemüse wie Rettich, Senf, Kohl und verschiedenen Kressearten den etwas bitteren, charakteristischen Geschmack. Glucosinolate besitzen antiinflammatorisches (Heiss *et al.*, 2001) und

antibakterielles Potential (Haristoy *et al.*, 2005). Darüber hinaus zeigen epidemiologische Studien eine inverse Korrelation zwischen der Aufnahme und dem Risiko für Darmkrebs sowie anderer Tumorarten (Giovannucci *et al.*, 2003; London *et al.*, 2000; van Poppel *et al.*, 1999). Innerhalb der Chemoprävention sind sie in der Lage, auf mehreren Stufen der Karzinogenese zu wirken. Bereits transformierte Zellen können im Zellwachstum durch Zellzyklusarrest (Visanji *et al.*, 2004) und durch Apoptoseinduktion (Pullar *et al.*, 2004) gehemmt werden. Darüber hinaus werden Phase-I-Enzyme meist reduziert und Phase-II-Enzyme induziert (Pool-Zobel *et al.*, 2005; Talalay & Fahey, 2001). Diese Enzyminduktion basiert oft auf der Aktivierung der Transkriptionsfaktoren Aryl-hydrocarbon-Rezeptor (AhR) oder NF-E2-related factor-2 (Nrf2) (Nioi *et al.*, 2003).

### **1.1.3 POLYPHENOLE**

Polyphenole stellen keine einheitliche Stoffgruppe dar. Die Gemeinsamkeit besteht darin, dass ihre chemische Struktur auf dem kleinsten und namensgebenden Vertreter, dem Phenol aufbaut. Polyphenole sind aromatische Verbindungen, welche zwei oder mehr direkt an den aromatischen Ring gebundene Hydroxylgruppen enthalten und werden ebenso wie die Glucosinolate zu den sekundären Pflanzenstoffen gerechnet. Auch dieser Substanzklasse wird ein chemopräventives Potential zugesprochen (Rossi *et al.*, 2006). In experimentellen Studien zeigten Polyphenole Auswirkungen auf die Initiation, Promotion und Progression von Krebs (Ramos, 2008; Yang *et al.*, 2001). Polyphenole fungieren als wichtige Elemente der Signaltransduktion mit Auswirkungen auf die Zellproliferation, Differentiation, Apoptose, Angiogenese and Metastasierung (Fresco *et al.*, 2006; Ramos, 2008). Aufgrund der Vielfältigkeit der Polyphenole sind die molekularen Mechanismen und Wirkungsweisen zum größten Teil sehr strukturspezifisch.

## 1.2 BIOMARKER

Gelangen toxische Substanzen oder Nahrungsinhaltsstoffe in den Körper oder entstehen Erkrankungen, verändert sich der Stoffwechsel. Manche Stoffe werden in stärkerem Maße gebildet als bisher, andere weniger stark, manche entstehen nur im Krankheitsfall. Solche Veränderungen können gemessen werden und geben Hinweise auf bestimmte Erkrankungen, auf bestehende Risiken oder auf Auswirkungen einer Behandlung. Diese Parameter, deren Messung eine Aussage über den normalen Gesundheitszustand, Krankheit, Behandlung oder veränderte Lifestyle-Faktoren erlauben, werden Biomarker genannt. Unter einem Biomarker versteht man somit „einen objektiv messbaren und auswertbaren Indikator, der Auskunft über einen normalen biologischen Prozess, einen pathologischen Prozess oder aber auch über den Verlauf einer therapeutischen Maßnahme gibt“ (Biomarkers Definitions Working Group, 2001). Um den Einfluss exogener Faktoren auf einen Organismus näher zu charakterisieren, wird neben Tier- und epidemiologischen Studien vor allem der Untersuchung von Biomarkern eine zentrale Bedeutung beigemessen. Biomarker stellen somit biologische Parameter dar, mit deren Hilfe es ermöglicht wird, Risikofaktoren zu erfassen und einzuschätzen, protektive Mechanismen der Ernährung zu identifizieren und aufzuklären sowie bestimmte Risikogruppen der Bevölkerung zu kennzeichnen.

Nach Branca *et al.* können dabei verschiedene Biomarkertypen unterschieden werden (Branca *et al.*, 2001). Biomarker, welche Informationen zur Exposition gegenüber einem Xenobiotikum und der möglichen Effekte auf ein Individuum oder eine Gruppe liefern, werden als **Biomarker der Exposition** bezeichnet. In der Ernährungsforschung gelten ebenso die Erhöhung von protektiven Faktoren und Verringerung von Risikofaktoren als Biomarker der Exposition. Unter **Biomarker des Effekts** versteht man direkte Auswirkungen der Exposition auf den Stoffwechsel, aber auch auf Strukturen und Funktionen im Organismus. Die **Biomarker der Empfindlichkeit** berücksichtigen die unterschiedliche Suszeptibilität des einzelnen Individuums, welche z.B. auf Alter, Geschlecht, genetische Prädispositionen oder immunologischen Status beruhen kann. Ebenso kann die Expression bestimmter Marker wie Onkogenen und Tumorsuppressorgenen als Biomarker der Empfindlichkeit bezeichnet werden und ein erhöhtes/vermindertes Krebsrisiko signalisieren.

Aus den Definitionen der Biomarker wird deutlich, dass deren Klassifikation von der zugrunde liegenden biologischen oder medizinischen Sichtweise abhängig ist. So können DNA-Modifikationen als Biomarker für das Risiko von Krebserkrankungen sowohl als Marker der Exposition oder auch als Marker des biologischen Effekts aufgefasst werden.

### **1.2.1 NACHTEILE VON BIOMARKER-UNTERSUCHUNGEN**

Während eine Unterscheidung zwischen gesunden und kranken Individuen mittels Biomarkern recht einfach ist (Achiron & Gurevich, 2006; Burczynski *et al.*, 2005; Han *et al.*, 2008), sollen in der Ernährungsforschung oft Differenzen zwischen einem gesunden Individuum und einem noch etwas gesünderen Individuum detektiert werden. Diese Unterschiede sind meist gering und der biologisch/medizinische Nutzen der Veränderung der Biomarker für den Einzelnen schwer zu beantworten.

In der Krebsforschung ist das Ziel der Biomarkerforschung die Identifizierung von Stoffen bzw. Prozessen, die in die Krebsentstehung involviert sind, sowie Parameter zu erkennen, welche chemoprotektiv der Entstehung maligner Erkrankungen entgegenwirken. Hierbei besteht ebenso das Problem, dass die Veränderungen von Biomarkern, welche mit der Krebsprävention assoziiert sind, wie Verringerung von DNA-Schäden, für den Einzelnen oft keinen unmittelbaren kurzfristigen Nutzen haben. Da die Krebsentstehung einen sehr langwierigen Prozess darstellt, kann dieser Nutzen erst Jahre später ersichtlich werden. Darüber hinaus kann eine Intervention einige Biomarker günstig beeinflussen, aber andere, welche nicht gemessen werden, in eine für das Krebsgeschehen negative Richtung. Es besteht demnach eine hohe Notwendigkeit, möglichst prädiktive, methodisch reproduzierbare Biomarker zu entwickeln und zu validieren, um Ernährungsfaktoren mit chemopräventiven Eigenschaften zu identifizieren.

### **1.2.2 AUSWAHL DES GEWEBES FÜR BIOMARKERUNTERSUCHUNGEN**

Neben der eigentlichen Überlegung, welcher Biomarker für eine Fragestellung zu untersuchen ist, ist ebenso die Überlegung entscheidend, in welchem Gewebe der Marker gemessen werden soll. Für Ernährungsstudien ist es eher unüblich bis fast unmöglich, Biopsien aus einem Zielgewebe wie Leber oder Lunge von humanen

Spendern zu erhalten. Meist spielen praktische und ethische Probleme eine wichtige Rolle. Die Gewinnung von humanen Primärzellen stellt einen invasiven Eingriff dar und die erhaltenen Zellen stehen meist nur in limitierter Menge zur Verfügung. Biomarker können daher grob in zwei Gruppen untergliedert werden, welche vor allem für die Praktikabilität eine enorme Relevanz besitzen: Die eine Gruppe stellen Biomarker dar, welche invasiver Eingriffe erfordert, die andere Gruppe kann durch nicht-invasive Methoden ermittelt werden. Zu den verwendeten Zellen, welche invasiv gewonnen werden müssen, gehören hauptsächlich Biopsien des Darms, der Leber oder der Brust. Aufgrund verschiedener Restriktionen wie der Infektionsmöglichkeit, der geringeren Anzahl an Probanden und der ethischen Studienfreigabe sind Untersuchungen in Biopsien sehr selten (Tijhuis *et al.*, 2007; Wark *et al.*, 2004). Um die Beziehungen zwischen der Ernährung und einer Darmkrebsprävention zu verstehen, können beispielsweise Untersuchungen an Kolonzellen aus Biopsien durchgeführt werden (Wark *et al.*, 2004). Ist eine Verwendung von Darmzellen aus genannten Gründen nicht möglich, muss nach einem Ersatz gesucht werden. Ein Beispiel hierfür sind die Fäzes oder deren wässrige Phase, das Fäzeswasser. Dies stellt eine leicht und nicht-invasive zu gewinnende Körperflüssigkeit dar, welche möglicherweise wichtige Informationen über die Vorgänge im Darm preisgibt (Klinder *et al.*, 2004; Monleon *et al.*, 2008).

Wie aus diesem Beispiel ersichtlich wird, dienen verschiedene Körperflüssigkeiten oder Körperkompartimente als so genanntes Surrogat-Gewebe (aus dem Lateinischen *surrogatum* = Ersatz), in welchem verschiedene Biomarker gemessen werden können. Eine Auflistung von möglichen Surrogaten ist in Tabelle 1 ersichtlich.

**Tabelle 1: Surrogat-Gewebe, welche mit nicht-invasiven Methoden gewonnen werden können. Modifiziert nach Rockett *et al.* (2004).**

<b>Surrogat-Gewebe</b>	<b>Messparameter</b>	<b>Potentielle Spender</b>
Blutzellen	DNA, RNA, Protein, Metabolite, Schwermetalle	Jeder
Mundschleimhautzellen	DNA, RNA, Protein	Jeder
Nabelschnurblut	DNA, RNA, Protein	postpartale Frauen
Kolostrum (Vormilch)	DNA, RNA, Protein	postpartale Frauen
Cerumen (Ohrwachs)	Protein	Jeder
Haarschaft	DNA, RNA, Protein, Metabolite, Schwermetalle	Jeder
Haarfollikel	DNA, RNA, Protein	Jeder
Mekonium (Kindspech)	DNA, RNA, Protein	Neugeborene
Muttermich	DNA, RNA, Protein	postpartale Frauen
Nägel	DNA, Protein, Metabolite, Schwermetalle	Jeder
Nasenspülung	DNA, RNA, Protein	Jeder
Plazenta	DNA, RNA, Protein	postpartale Frauen
Speichel	DNA, RNA, Protein	Jeder
Sperma	DNA, RNA, Protein	Männer
Haut	DNA, RNA, Protein	Jeder
Sputum	DNA, RNA, Protein	Jeder
Fäzes	DNA, RNA, Protein	Jeder
Tränennasengangssekret	DNA, RNA, Protein	Jeder
Endocervicale Epithelzellen	DNA, RNA, Protein	Frauen
Vaginalepithel	DNA, RNA, Protein	Frauen
Urin	DNA, RNA, Protein, Metabolite, Schwermetalle	Jeder

Zu beachten ist, dass viele Surrogat-Gewebe lediglich Informationen über einzelne Organe/Körperkompartimente geben können. So wird Sperma vor allem als Surrogat-Gewebe für die Testis oder Prostata herangezogen, und kann nur eingeschränkte Informationen über Vorgänge z.B. in der Lunge bereitstellen.

### 1.3 BLUT UND BLUTZELLEN ALS SURROGAT-GEWEBE

Blut transportiert auf dem Weg durch den Körper Sauerstoff, Nährstoffe und entsorgt Zellabfälle. Es ist verantwortlich für die Synthese von Immunfaktoren und deren Transport an den Wirkort. Blutzellen interagieren somit mit anderen Körperzellen und reagieren als erste auf Veränderungen im Körper oder auf Krankheiten (Liew *et al.*, 2006). Die zellulären Bestandteile des Blutes werden drei Gruppen zugerechnet. Die mengenmäßig größte Gruppe stellen die roten Blutkörperchen (**Erythrozyten**) dar, welche den Sauerstoff von der Lunge in die Gewebe befördern und die für den Abtransport der in den Zellen entstehenden Kohlensäure sorgen. Die weißen Blutkörperchen (**Leukozyten**) wehren Krankheitserreger ab und beseitigen abgestorbene Zellen. Sie sorgen dafür, dass der Körper sich gegen Krankheitserreger immunisieren kann. Die dritte Gruppe sind die Blutplättchen (**Thrombozyten**), welche die Blutgerinnung unterstützen.

Für Biomarkeruntersuchungen wird meist eine Zellfraktionen aus Vollblut oder aus einem Leukozytenkonzentrat (Buffy-Coat) mittels Dichtegradientenzentrifugation unter Verwendung eines synthetischen Saccharose-Polymers isoliert (Boyum, 1968). Die Bezeichnung der resultierenden mononukleären Zellen ist uneinheitlich. Es werden unter anderem die Begriffe Lymphozyten (Hoelzl *et al.*, 2008a), periphere Blut-Leukozyten (PBL) (Pavanello *et al.*, 2008) oder periphere mononukleäre Blutzellen (PBMC) (Zimmerer *et al.*, 2008) verwendet. Da es sich um eine Mischung aus Lymphozyten und Monozyten handelt, ist der Begriff PBMC eine exaktere Bezeichnung der verwendeten Zellen und wird daher in der weiteren Arbeit verwendet.

Zur Erfassung protektiver Mechanismen auf der Stufe der Krebs-Primärprävention, wird die Bestimmung von Biomarkern wenn möglich in gesundem humanem Probenmaterial durchgeführt. Dieses sollte sich auf nicht oder nur minimal invasivem Weg gewinnen lassen. Unter diesen Voraussetzungen stellt die Verwendung von PBMC eine denkbar ideale Möglichkeit für die Untersuchung von Biomarkern mit Auswirkungen auf den gesamten Körper dar. Die Verwendung der Zellen beruht auf der Annahme, dass diese Veränderungen im Körper nach dem so genannten „Sentinel Prinzip“ anzeigen (Liew *et al.*, 2006). Nach diesem Prinzip fungieren PBMC auf ihren Weg durch den Körper als Wächter und besitzen die Eigenschaft, Veränderungen im Körper zur Diagnose/Prognose darzustellen (Liew *et al.*, 2006) oder Aufschluss über Effekte in schwer zugänglichem Gewebe zu geben (Rockett *et al.*, 2004). In ihnen wird ein ideales Surrogat-Gewebe gesehen, da sie einfach verfügbar sind und einen großen Pool an Informationen in Form von DNA-Modifikationen, Gentranskripten, Proteinen und weiteren funktionellen Parametern besitzen. Eine der ersten Veröffentlichungen über die Verwendung von PBMC als Ersatzzellen wurde von Nesnow *et al.* schon vor über 15 Jahren publiziert. In diesen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass sich induzierte DNA-Addukte in Leber und Lunge im temporären Verlauf sehr denen in Blutzellen gleichen (Nesnow *et al.*, 1993). Wenig später konnten Duthie *et al.* auch die biologische Reagibilität durch eine Messung der Verringerung von DNA-Schäden mittels Antioxidantien zeigen (Duthie *et al.*, 1996). Die Beeinflussbarkeit unterschiedlichster DNA-Veränderungen durch Lifestyle-Faktoren stellt bis heute noch einen der am häufigsten gemessenen Biomarker in PBMC dar. Aber auch für



neuere Biomarker, wie die Veränderung chemopräventiv wirksamer Enzyme auf Aktivitäts- oder Expressionsebene, gewinnen PBMC zunehmend an Bedeutung.

### 1.3.1 PHYSIOLOGISCHE FUNKTIONEN VON PERIPHEREN MONONUKLEÄREN BLUTZELLEN

Nach ihren spezifischen, physiologischen Aufgaben können PBMC in vier Gruppen unterteilt werden:

- **T-Zellen oder T-Lymphozyten** spielen in der spezifischen Immunantwort eine zentrale Rolle. T-Zellen können mit Hilfe spezieller Rezeptoren auf ihrer Oberfläche so genannte Antigene erfassen, bei denen es sich in der Regel um körperfremde Stoffe handelt. Sie erkennen keine ungebundenen Antigene, sondern nur solche, die ihnen typischerweise infizierte Zellen mittels Proteinkomplexen (Haupthistokompatibilitätskomplex MHC) auf der Oberfläche von B-Lymphozyten präsentieren (Janeway *et al.*, 2002; Kuby *et al.*, 2006).
- **B-Zellen oder B-Lymphozyten** zirkulieren als antigen-naive B-Lymphozyten (reife B-Zellen, ohne bisherigen Kontakt mit einem Antigen) im Blut und den lymphatischen Organen. Nach einer Aktivierung, z.B. durch T-Zellen oder durch Kreuzvernetzung von B-Zell-Rezeptoren, sind sie in der Lage, gegen körperfremde Antigene gerichtete Antikörper zu produzieren. Erst wenn ein Antigen an den B-Zell-Rezeptor bindet, beginnt der Prozess der Aktivierung. Das Antigen wird vom B-Lymphozyten aufgenommen, zerlegt und zusammen mit MHC-Klasse-II-Molekülen wieder als Komplex auf der Zelloberfläche exprimiert. Dieser Komplex kann von einer T-Helfer-Zelle erkannt werden, die daraufhin Zytokine produziert, welche den B-Lymphozyten schließlich aktivieren (Janeway *et al.*, 2002; Kuby *et al.*, 2006).
- **Natürliche Killerzellen (NK-Zellen)** sind wichtig in der Abwehr von viralen Infektionen und Tumoren. Morphologisch sind sie den Lymphozyten sehr ähnlich, jedoch größer und granuliert. NK-Zellen erkennen den Unterschied zwischen normalen und infizierten/malignen Zellen bzw. fremden Erregern durch das Fehlen von Proteinen des Haupthistokompatibilitätskomplexes an der Oberfläche der betroffenen Zellen (Janeway *et al.*, 2002; Kuby *et al.*, 2006).

- **Monozyten** zählen zu den mononukleären Phagozyten und sind neben den neutrophilen Granulozyten die zweite wichtige Population phagozytierender Zellen. Sie sind die Vorläufer der unter anderem in den Geweben lokalisierten Makrophagen und zählen mit einem Durchmesser von 5–20 µm zu den größten Zellen der PBMC-Fraktion (Janeway *et al.*, 2002; Kuby *et al.*, 2006).

### 1.3.2 GENEXPRESSIONSPROFILE IN PERIPHEREN MONONUKLEÄREN BLUTZELLEN

Ernährungsbezogene Untersuchungen in den so genannten Surrogat-Geweben ist kein neues Konzept. Mit aktuellen molekularbiologischen Verfahren können aber durch die simultane Analyse von tausenden von Genen, eine Vielzahl an wichtigen Informationen und ein besseres Verständnis der zellulären Veränderungen erbracht werden. Als Konsequenz der neuen Techniken haben sich in der Ernährungsforschung zwei Disziplinen „Nutrigenetics“ und „Nutrigenomics“ entwickelt. Im Nutrigenetics-Bereich wird die Frage beantwortet, wie Ernährung und die genetische Disposition des Individuums, z.B. Polymorphismen oder epigenetische Unterschiede, in Wechselwirkung miteinander treten. Der Bereich Nutrigenomics erforscht, welchen Einfluss die Ernährung auf die Gen- bzw. Proteinexpression und auf den Metabolismus hat. Auch für diese beiden Bereiche werden PBMC als ein ideales Surrogat-Gewebe angesehen, da sie einen großen Pool an Informationen in Form von Gentranskripten tragen und auch auf Veränderungen der Makro- und Mikroumgebung mittels Veränderungen in diesen Gentranskripten reagieren (Liew *et al.*, 2006).

Eine der ersten Genomicsuntersuchungen in PBMC wurde von Burczynski *et al.* durchgeführt. Hierbei waren Genexpressionsprofile eindeutig mit dem Krankheitsverlauf von malignen Nierenkrebs assoziiert (Burczynski *et al.*, 2005). Weitere Genexpressionsuntersuchungen in PBMC wurden bisher unter anderem zur Bestimmung der basalen Variationen in gesunden Probanden (Eady *et al.*, 2005; Whitney *et al.*, 2003), zur Ermittlung der Unterschiede zwischen Gesunden und Krebspatienten (Twine *et al.*, 2003) oder zur Bestimmung des Einflusses von Bakterien auf den Menschen verwendet (Boldrick *et al.*, 2002). Der Fokus liegt in aktuellen Untersuchungen meist auf der Untersuchung und Bewertung der unterschiedlichen Genexpressionsmuster bei Erkrankungen wie Multiple Sklerose, Krebs oder koronaren Herzerkrankungen (Achiron & Gurevich, 2006; Burczynski

*et al.*, 2005). Untersuchungen von Han *et al.* konnten zeigen, dass die Veränderung von nur fünf Genen in PBMC einen sensitiven Biomarker für eine Darmkrebserkrankung darstellt (Han *et al.*, 2008). Somit ist eine Datenbank von Genexpressionsprofilen aus PBMC denkbar, welche zur Früherkennung von Risikogruppen oder von schon existierenden Erkrankungen beitragen kann. Auch Medikamente wie z.B. Atorvastatin, ein  $\beta$ -Hydroxy- $\beta$ -Methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase-Inhibitor regulieren vor einer Veränderung im Lipidprofil, die Genexpression in PBMC (Wibaut-Berlaimont *et al.*, 2005). Aufgrund bisheriger Studien sind transkriptionelle Veränderungen in PBMC durch Krankheiten (Burczynski *et al.*, 2005), Unterernährung (Gonzalez *et al.*, 2006) oder Medikamente (Wibaut-Berlaimont *et al.*, 2005) sicher. Im Falle einer möglichen Modulation der Genexpression durch die Ernährung ist die Datenlage mit diesen Blutzellen sehr begrenzt. Bekannt ist z.B. die COX-2 Modulation durch Quercetin (de Pascual-Teresa *et al.*, 2004), die Aktivierung des "Nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$ " (PPAR $\alpha$ ) durch Nahrungskarenz (Bouwens *et al.*, 2007) oder die Modulation von Sirtuinen (regulierende Proteine mit Einfluss auf das Altern, Apoptose und Stressresistenz) durch Kalorienrestriktion (Crujeiras *et al.*, 2008). Neben den *in vivo*-Untersuchungen werden PBMC ebenso für *in vitro*-Untersuchungen verwendet. So wurden z.B. *in vitro*-Modulationen der Genexpression im PBMC durch Tabak bzw. Rauchinhaltsstoffe (Lampe *et al.*, 2004; van Leeuwen *et al.*, 2005), oder durch Schwarzteeextrakte gezeigt (Neyestani *et al.*, 2008). Eine wichtige Basis für die Einschätzung der Ergebnisse ist hierbei der Vergleich der *in vitro* erhaltenen Daten mit Daten aus *in vivo*-Studien. Auch hier ist die Datenlage bisher sehr gering. Nach einer Alpha-Interferon-Immunotherapie zeigten Melanompatienten vergleichbare transkriptionelle Veränderungen in PBMC wie sie zuvor nach einer *in vitro*-Stimulation mit Alpha-Interferon in diesen Zellen zu sehen waren (Zimmerer *et al.*, 2008). Auch eine Mischung chinesischer Phytopharmaka zeigte *in vitro* und *in vivo* ähnliche immunomodulatorische Eigenschaften (Leung *et al.*, 2008).

Durch die Möglichkeit, in kürzester Zeit Ergebnisse für die Gesamtheit aller humanen Gene zu erhalten, werden Veränderungen der Genexpression in unterschiedlichen Geweben in den letzten Jahren sehr häufig untersucht. Hierbei

sollte hinterfragt werden, ob die detektierten Modulationen auch physiologische Auswirkungen besitzen. Es wird meist davon ausgegangen, dass die veränderte Expression von Gentranskripten zu einer funktionellen Konsequenz führt. Eine Tatsache, welche nicht immer zutreffen muss (Gomi & Matsuo, 2002; Niu *et al.*, 1998). In Studien mit PBMC existiert zusätzlich die Problematik, dass auch nach Erfüllung dieser Bedingung noch kein medizinischer Effekt für das Individuum im Zielgewebe zwangsläufig ist. Der notwendige Schritt ist somit, herauszufinden, ob entsprechende Veränderungen auch im eigentlichen Zielgewebe wie Leber, Darm oder Brust messbar sind. Erste Untersuchungen von Rockett *et al.* (Rockett *et al.*, 2002) zeigten, dass ein Grossteil der untersuchten Gene in PBMC und in Uteruszellen koexprimiert sind und auch einige Gene durch 17- $\beta$  Estradiol in den beiden Geweben koreguliert werden.

### **1.3.3 MECHANISMEN DER CHEMOPRÄVENTION IN PERIPHEREN MONONUKLEÄREN BLUTZELLEN**

Untersuchungen der letzten Jahre haben gezeigt, dass chromosomale Aberrationen, Mikronuklei und DNA-Schäden in PBMC eine gute Vorhersage für ein Krebsrisiko geben (Boffetta *et al.*, 2007; Bonassi *et al.*, 2007; Hagmar *et al.*, 2004; Tang *et al.*, 2001). Dies bestätigt die Hypothese, dass sich mit einer erhöhten DNA-Schädigung die Wahrscheinlichkeit für Mutationen in kritischen Zielzellen und -genen erhöht. Aus dieser Tatsache ableitend, werden aktuell häufig basale DNA-Schäden und deren Verringerung durch Nahrungsinhaltsstoffe *in vitro* und *in vivo* untersucht (Bub *et al.*, 2003; Gill *et al.*, 2007; Hoelzl *et al.*, 2008a; Weisel *et al.*, 2006). Wissenschaftliche Belege, welche einen eindeutigen Zusammenhang zwischen der Reduktion von DNA-Schäden in PBMC und der Reduktion des Krebsrisikos gezeigt haben, existieren bisher nicht. Neben der Modulation von DNA-Schäden können Faktoren der Ernährung auch auf Expression wichtiger Biotransformationsenzyme in PBMC Einfluss nehmen. Als protektive Mechanismen werden hierbei die Reduktion von Phase-I-Enzymen und die Induktion von Phase-II-Enzymen gesehen. So wurde durch hohe Dosen Epigallocatechingallate eine signifikante Steigerung der GST-Aktivität sowie des GSTP-Proteingehaltes gezeigt (Chow *et al.*, 2007). Weitere Beispiele für ernährungsbezogene, mutmaßlich chemopräventive Effekte wie die Steigerung

der Telomeraseaktivität nach Ernährungsumstellung (Ornish *et al.*, 2008), Modulation der Interleukin-Sekretion durch pro- und präbiotische Produkte (Roller *et al.*, 2007) oder Veränderung von Immunparametern durch Tomateninhaltsstoffe (Riso *et al.*, 2006) wurden ebenso in PBMC nachgewiesen. Mit der Verwendung von humanen PBMC werden Nahrungsinhaltsstoffe oder Ernährungsformen vor allem auf Effekte der Primärprävention hin untersucht. Für Untersuchungen der Sekundärprävention, wie die Induktion der Apoptose, ist diese Art von Zellen eher ungeeignet, da hier entartete Zellen eingesetzt werden sollten.

#### 1.4 PROBLEMSTELLUNG UND ZIELE DER ARBEIT

Untersuchungen mit Tumorzellen können nur begrenzte Rückschlüsse auf Mechanismen in gesunden, nicht-transformierten Zellen geben (Samoylenko *et al.*, 2008). Es ergibt sich die Notwendigkeit der Verwendung von Primärzellen zur Untersuchung von chemopräventiven Eigenschaften. Sind geeignete Primärzellen aus einem spezifischen Zielgewebe der Krebserkrankung nicht verfügbar, finden oft PBMC als Surrogat-Gewebe Einsatz. Zur Untersuchung der Eignung und Praktikabilität von PBMC in Zellkultur und für Interventionsstudien wurden folgende Fragestellungen bearbeitet:

##### **Charakterisierung und Testung der Eignung von PBMC in Zellkultur:**

- Untersucht wurden die Zellpopulationen, welche bei *in vitro*-Studien mit PBMC verwendet werden (**Publikation I**).
- Unterschiedliche Zellkulturbedingungen, wie die Verwendung einer mitogenen Stimulierung oder der Einsatz von kryokonservierten Zellen für *in vitro*-Untersuchungen wurden getestet (**Publikation I**).
- Unterschiede in der interindividuellen und intraindividuellen Variation der Genexpression von Entgiftungsenzyme in PBMC wurden ermittelt und mit einem Zielgewebe (Kolon) verglichen (**Publikation I, weitere Ergebnisse**).
- Weiterhin wurde die Möglichkeit ermittelt, die Genexpression von Enzymen der Biotransformation und Entgiftung in PBMC *in vitro* durch Nahrungsinhaltsstoffe/metabolite zu modulieren (**Publikation I, II, III**).

- Besteht die Möglichkeit die Modulation des Biomarkers DNA-Schäden in PBMC mittels Genexpressionsveränderungen zu erklären (**Publikation II, III**)?

#### **Einfluss von Polyphenolen (*in vitro*) und Interventionen mit Mehrfruchtsäften auf Entgiftungsenzyme:**

- Es sollten chemopräventive Eigenschaften von Polyphenolen untersucht werden und die Frage beantwortet werden, ob es möglich ist, von *in vitro*-Modulationen auf Veränderungen *in vivo* zu schließen (**Publikation II, weitere Ergebnisse**).

#### **Einfluss von Inhaltsstoffen der Wasserkresse (*in vitro*) und einer Intervention mit Wasserkresse auf Entgiftungsenzyme:**

- Abschließend sollte das chemopräventive Potential der Wasserkresse analysiert werden. Wiederum wurde die Möglichkeit der Übertragbarkeit von Ergebnissen aus Zellkultur auf die *in vivo*-Situation getestet (**Publikation III**).
- Der Einfluss von GST-Polymorphismen (*GSTM1 und GSTT1*) auf die Induktion von Entgiftungsenzymen wurde untersucht (**Publikation III**).

## 2 PUBLIKATIONEN

### 2.1 PUBLIKATION I: USE OF GENE EXPRESSION PROFILES IN HUMAN PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELLS AS BIOMARKER FOR NUTRITIONAL *IN VITRO* AND *IN VIVO* INVESTIGATIONS. Thomas Hofmann, Stefanie Klenow, Anke Borowicki, Chris Gill, Beatrice L. Pool-Zobel, Michael Glej; *Eingereicht bei Genes and Nutrition*

Ziel der Arbeit war es, die Möglichkeit der Modulation der Genexpression *in vitro* in PBMC und somit eine Eignung dieser Zellen als Primärzellmodell zu überprüfen. Hierfür wurden die basalen Variabilitäten der individuellen Genexpression in PBMC und die mögliche Modulation durch Nahrungsinhaltsstoffe ermittelt. Die Ergebnisse wurden mit Genexpressionsprofilen einer humanen Darmkrebszelllinie (HT29) als Standard verglichen.

PBMC und HT29 Zellen wurden mit potenziell chemopräventiven Substanzen (Chrysin und Butyrat) behandelt und die Auswirkungen auf die Genexpression bestimmt. Es zeigte sich, dass relevante Enzyme der Biotransformation wie *GSTT2* und *GSTM2* durch Butyrat sowohl in PBMC als auch in HT29 Zellen induziert wurden. Die Blutzellen reagierten im Vergleich weniger empfindlich und mit höheren individuellen Unterschieden. PBMC stellen somit ein viel versprechendes Zellmodell dar, um Mechanismen der primären Chemoprävention zu erforschen und die identifizierten modulierten Gene sind möglicherweise wichtige Biomarkergene für die Untersuchung von biologischen Effekten in humanen Interventionsstudien.

Eigenanteil:

- Planung der *in vitro*-Untersuchungen und Verfassung des Manuskriptes
- PBMC-Isolation, -Zellkultur und -Inkubation
- RNA-Isolation und Genexpressionsanalyse mit Datenauswertung (Real-Time-PCR, DNA-Microarray), Interpretation und Darstellung
- Bestimmung der GST-Polymorphismen
- Statistische Auswertung

**Gene expression profiles in human peripheral blood mononuclear cells as biomarkers for nutritional *in vitro* and *in vivo* investigations**

THOMAS HOFMANN<sup>1</sup>, STEFANIE KLENOW<sup>1</sup>, ANKE BOROWICKI<sup>1</sup>, CHRIS GILL<sup>2</sup>, BEATRICE L. POOL-ZOBEL<sup>1</sup>, MICHAEL GLEI<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute of Nutrition, Friedrich-Schiller-University Jena, Dornburger Str. 24, 07743 Jena, Germany

<sup>2</sup>Northern Ireland Centre for Diet and Health (NICHE), Centre for Molecular Biosciences (CMB), Faculty of Life and Health Sciences, University of Ulster, Coleraine, Northern Ireland BT52 1SA

**Correspondence:** Thomas Hofmann, Department of Nutritional Toxicology, Institute of Nutrition, Dornburger Str. 24, 07743 Jena, Germany. Fax: + 49 3641 949672.

Email: [th.hofmann@googlemail.com](mailto:th.hofmann@googlemail.com)



## **Abstract**

Identification of chemopreventive substances may be achieved by measuring biological endpoints in human cells *in vitro*. Since generally only tumour cells are available for such investigations, our aim was to test the applicability of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) as an *in vitro* primary cell model since they possibly best mimic the human *in vivo* situation and are relatively easy available. Cell culture conditions were refined, and the basal variation of gene expression related to drug metabolism and to stress response was determined. Results were compared with profiles of an established human colon cell line (HT29) as standard. For biomarker development of nutritional effects, PBMC and HT29 cells were treated with potentially chemopreventive substances (chrysin and butyrate) and gene expression was determined. Key results were that relevant stress response genes, like *glutathione S-transferase T2 (GSTT2)* and *GSTM2* were modulated by butyrate in PBMC as in HT29 cells, but the blood cells were less sensitive and responded with high individual differences. We conclude that these cells may serve as a surrogate tissue in dietary investigations and the identified differentially expressed genes have the potential to become marker genes for population studies on biological effects.

## **Keywords:**

Biomarker, butyrate, gene expression, human peripheral blood mononuclear cells, HT29 cells

## **Abbreviations:**

CAT – catalase; COX-2 - cyclooxygenase-2; CV - coefficient of variation; GSTM2 - glutathione S-transferase M2; GSTP1 - glutathione S-transferase P1; GSTT2 - glutathione S-transferase T2; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - hydrogen peroxide; PBMC - peripheral blood mononuclear cells; PHA - phytohemagglutinine; ppm - parts per million; SD - standard deviation; SOD2 - superoxide dismutase 2, mitochondrial; UGT1A1- UDP glucuronosyltransferase 1 family, polypeptide A1.

## Introduction

A number of recent reports are showing that the latest technologies of genomics and proteomics have initiated a new era of biomarker development and many researchers are further developing the methods for cancer detection, treatment and prevention (Han et al. 2008; Veeriah et al. 2008). Different biomarker applications are based on blood cells like PBMC, since they are obtained less invasively than biopsies and are suitable to measure systemic effects. Moreover, PBMC are used as surrogate tissues that may mimic effects occurring in remote target tissues of exposure (Pool-Zobel et al. 2004; Rockett et al. 2004). *In vitro*, these cells can be used as human primary cell models (Glei et al. 2002; Glei and Pool-Zobel 2005). For this, PBMC are normally isolated from leucocyte enriched human blood preparations (buffy coats) and then treated with test substances over different periods before measuring distinct endpoints such as DNA damage. PBMC also present suitable cells to analyse chemoprotective potentials of dietary food ingredients as has been shown *in vivo* after dietary interventions with fruit juices or water cress (Gill et al. 2007; Weisel et al. 2006). In order to develop techniques for the evaluation of health effects *in vitro* further, it is necessary to assess the question how experimental conditions influence the selected parameters and how PBMC react to different stimuli in comparison to other target cells, like a colon cancer cell line. For this approach, relevant genes related to stress response and drug metabolism were selected, namely *GSTP1*, *GSTT2*, *GSTM2*, *UDP glucuronosyltransferase 1 family, polypeptide A1 (UGT1A1)*, *catalase (CAT)*, *superoxide dismutase 2 (SOD2)*, and *cyclooxygenase-2 (COX-2)*. The protein products of these genes are linked to oxidative stress and to carcinogenesis. Expression levels of these genes have been shown to be altered in human cells by dietary compounds and metabolites such as butyrate and the flavonoid chrysin. Butyrate, formed by gut fermentation of dietary fibre (Ebert et al. 2003; Pool-Zobel et al. 2005a; Sauer et al. 2007), is believed to act as a potential chemopreventive agent (Sengupta et al. 2006). Luminal concentration of butyrate in humans is found to range from 11-25 mM and concentrations in human portal veins are 1000-fold lower and further decrease in the venous serum (Hamer et al. 2008). Butyrate (10 mM) treatment of primary colonocytes has been shown to modulate stress-related genes (Sauer et al. 2007). Gene expression of *CAT* was induced, while *COX-2* was reduced in colon cancer cells through histone deacetylases inhibition (Tong et al. 2004). In addition, incubation of human colon cells of different transformation state with butyrate induced *GSTT2*, *GSTP1*, and *UGT1A1* (Pool-Zobel et al. 2005b). Also *GSTM2* was strongly induced by 4 mM butyrate in HT29 carcinoma cells (Ebert et al. 2003). PBMC were incubated with butyrate concentrations that reflect physiological concentrations for colonocytes but not for PBMC in order to test their suitability as surrogate tissue. Chrysin (5,7-dihydroxyflavone) is an inhibitor of the enzyme aromatase, which

converts androgens to oestrogens, and a potent inducer of UGT1A1 catalytic activity in primary human hepatocytes, the human hepatoma cell line HepG2, and the human intestinal cell line Caco-2 (Galijatovic et al. 2001; Smith et al. 2005).

In this study, we focused amongst others on phase II enzymes like GSTs. These enzymes may be of importance in cancer development and therapy and they can be modulated by dietary factors (Hayes et al. 2005). They catalyze nucleophilic attack by reduced glutathione (GSH) on nonpolar compounds that contain an electrophilic carbon, nitrogen, or sulphur atom (Pool-Zobel et al. 2005a). The different isoenzymes show diverse substrate specificities and are influenced by both intrinsic (GST polymorphisms) and extrinsic factors (consumption of fruits and vegetables) (Wark et al. 2004).

The first aim of this study was to investigate the applicability of gene expression in PBMC as biomarker for *in vivo* and *in vitro* investigations. In particular, it was of practical importance to determine how cryopreservation and thawing of isolated PBMC affects survival, viability and responsiveness to different treatments when measuring gene expression as biological endpoint. Normally, isolated human PBMC do not proliferate in cell culture. For this, phytohemagglutinine (PHA), a lectin extract from the kidney bean (*Phaseolus vulgaris*), is often used *in vitro* to stimulate growth of PBMC (Hammarstrom et al. 1982; Reed et al. 1986). Here we investigated how PHA, which may improve the suitability of PBMC as surrogate tissue by inducing proliferation, affects parameters of gene expression. The second objective consisted of investigating patterns of gene expression of important drug metabolism and stress response enzymes and their modulation by nutritional factors. To this end, we used cDNA array and real-time PCR technology in the cellular model that maybe best mimics the human *in vivo* situation (thus quiescent PBMC) and compared the results with an established cancer cell line (HT29). Knowledge about the effects and comparison of both cell types might aid in validating the potential of using gene expression profiles of PBMC as biomarkers for human *in vivo* as well as *in vitro* studies, which could also be used on a large scale, i.e. during clinical trails or intervention studies.

## **Material and Methods**

### *Test substances*

PHA (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) was diluted in Milli-Q water to obtain a stock solution of 5 mg/ml and was further diluted in cell culture medium to yield a working solution of 10 µg/ml. Butyrate (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) was directly diluted in cell culture medium to reach the concentrations 4 and 10 mM. For

chrysin (Sigma, Deisenhofen, Germany) a stock solution (10 mM) in DMSO was prepared and further diluted in cell culture medium to reach a concentration of 10  $\mu$ M. The final DMSO-concentration was 0.1 %.

#### *Cell culture of PBMC and HT29*

A fraction of mononuclear cells was isolated from several anonymous buffy coat preparations by gradient centrifugation using HISTOPAQUE<sup>®</sup>-1077 (Sigma, Deisenhofen, Germany) as described earlier (Boyum 1968; Gleis et al. 2002). All blood donors gave their informed consent. Cells were used either directly after isolation, kept in cell culture medium (PBMC medium: RPMI 1640 medium (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Germany) with 10 % heat-inactivated fetal calf serum, 1% penicillin/streptomycin (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Germany) and 1 % L-glutamine (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Germany)) over night prior to incubation or were cryopreserved at -140 °C (deep freezer QC 10140, Nunc, Wiesbaden, Germany). These cells were thawed rapidly in a water bath at 37 °C prior to each experiment.

For gene expression investigations over different time periods, a sample subset from a study by Gill et al. (Gill et al. 2007) was used. We analysed three time points, namely the start of the intervention, after an eight week control phase, where the subjects were asked to maintain their habitual diet, and again after a seven week washout phase, without any restrictions for the subjects. Collection of blood samples and isolation of PBMC were performed as previously described in the original study (Gill et al. 2007).

The human colon adenocarcinoma cell line HT29 is derived from a moderately differentiated, grade II adenocarcinoma of the rectosigmoid colon. These cells were obtained from the American Tissue Culture Collection (ATCC HTB-38) and maintained as a subconfluent monolayer culture in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; containing 4500 mg/l glucose and 58 mg/l L-glutamine; Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Germany), supplemented with 10 % fetal calf serum (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Germany) at 37 °C in a humidified incubator (5 % CO<sub>2</sub>, 95 % humidity).

#### *Treatment of PBMC and HT29 cells*

The number of PBMC was adjusted to 4x10<sup>6</sup> cells / ml and cells were incubated with the test substances for 24 h in 25 cm<sup>2</sup> cell culture flasks. Cell number and viability were determined before and after treatment of PBMC using a trypan blue solution (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Germany) in a hemacytometer. HT29 cells were seeded in 25 cm<sup>2</sup> cell culture flasks (4x10<sup>6</sup> cells) and incubated 24 h later with the test substances for additional 24 h.

### *Cytofluorometry*

The expression of CD3, CD4, CD8, CD14, CD19, CD20, CD28, and CD56 was measured in PBMC (isolated from different buffy coats) by FACSCalibur® using CellQuest Pro Software (BDBiosciences, Heidelberg, Germany) and standard procedures. Antibodies were labeled with fluorescein isothiocyanate (FITC) or phycoerythrin (PE) and were obtained from different sources (CD3 and CD14 (Immunotech, Marseille, France), CD4 and CD8 (Beckman Coulter, Marseille, France), CD19 (BDBiosciences, Heidelberg, Germany), CD20 and CD28 (Serotec Düsseldorf, Germany), CD56 (Biozol, Eching, Germany)).

### *RNA Isolation*

Total RNA from PBMC and HT29 cells was isolated using RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany), dissolved in 50 µl RNase free water and stored at -20 °C. RNA quantification was done spectrophotometrically (Eppendorf BioPhotometer, Hamburg, Germany) or using a NanoDrop ND-1000 photometer (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, United States) and either checked for integrity of the ribosomal RNA using formaldehyde denaturing RNA gel electrophoresis or Agilent Bioanalyzer 2100 and RNA 6000 Nano LabChip Kit (Agilent Technologies, Palo Alto, United States). The RNA Integrity Numbers (RINs) for the samples were obtained. Only RNA samples with RIN values of seven, or higher, were used for the analysis.

### *Real-time PCR analysis*

Expression of mRNA was assessed by two-step SYBR Green I relative real-time PCR (iCycler iQ system, Bio-Rad GmbH München, Germany). Briefly, total RNA was converted into first-strand cDNA using SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Germany) according to manufacturer's protocol. Using oligo(dT) leads to specific transcriptions of mRNA. The PCR amplification reactions contained 2 µl of first-strand cDNA mixed with 12.5 µl of iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad GmbH München, Germany, master mixture: 2x mix containing SYBR Green I dye, hot-start iTaq DNA polymerase, optimized buffer, and dNTPs qualified for quantitative PCR), 2.5 pmol of each of the specific primer pairs in a final reaction volume of 25 µl. All reactions were performed in duplicate. The PCR reaction profile consisted with initial denaturation of 2 min at 95 °C, 40 cycles of 30 s at 94 °C denaturing, 30 s at 60 °C annealing, 40 s at 72 °C extension and followed by final extension step of 10 min at 72 °C. Cumulative fluorescence was measured at the end of the extension phase of each cycle. Product-specific amplification was confirmed by melting curve analysis. Gene-specific primer sequences used

for the quantification can be seen in Table I. Confirmation of the gene specificity of primer nucleotides was performed using the NCBI-BLASTN search program. Gene expression of all genes calculated based on the housekeeping gene GAPDH ( $2^{-Ct_{\text{target gene}}}/2^{-Ct_{\text{GAPDH}}}$ ) and expressed as parts per million (ppm). An external control was used to analyse the effects of PHA on the expression of GAPDH.

#### *cDNA array*

Hybridization was performed on 112 sites (three blanks, three negative reference spots, 10 housekeeping genes and 96 human genes related to drug metabolism) on two different cDNA gene macroarrays (Human Drug Metabolism Gene Array HS11 and Human Stress&Toxicity Gene Array HS12, SuperArray Bioscience Corporation, Frederick, MD, United States), as we have described before (Veeriah et al. 2008) according to the manufacturer's protocol. Spot intensities of the target genes were based on the signal intensities for GAPDH.

#### *Polymorphisms*

Cryopreserved lymphocytes were used to isolate DNA with the QIAamp® DNA Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) as described in the manufacturer's manual. A polymerase chain reaction (PCR) method was used to detect the presence or absence of the *GSTM1* and *GSTT1* genes for every blood donor using original procedures (Bell et al. 1993; Pemble et al. 1994). A fragment of the  $\beta$ -globin gene was co-amplified as internal positive control in the PCR reaction.

#### *Statistics*

Data were expressed as mean with standard deviation (SD) or single data points. The Prism software version 4.01 (Graph Pad, San Diego, United States) was used for two-sided paired and unpaired t-test, one-way ANOVA with Bonferroni's multiple comparison test with selected pairs, and two-way ANOVA with Bonferroni posttests.

## Results

### *Characterisation and suitable cell culture conditions for PBMC*

The two main subpopulations in PBMC, isolated from different buffy coats with a mean viability of  $90\pm 9\%$  ( $n=6$ ), were lymphocytes (76 %) and monocytes (15 %) (Table II). The CD expression of the isolated blood cells is summarized in Table II.

For first experiments, PBMC were divided into two groups. One was treated directly after isolation and the other was first frozen for storage, thawed and then processed in identical fashion. Viability detected with trypan blue exclusion was not different between the buffy coats. The recovery of the cells after thawing was only  $66\pm 15\%$  ( $p=0.002$ ), but viability of the remaining cells was not reduced. Freshly isolated and thawed PBMC ( $4\times 10^6$  cells / ml), were treated for 24 h with medium and PHA (10  $\mu\text{g/ml}$ ) and table III shows the effects on different biological parameters. There were significantly reduced numbers of thawed PBMC in comparison to fresh PBMC after the 24 h incubation period ( $43\pm 15\%$  calculated to the respective fresh PBMC). Viability of cryopreserved PBMC was reduced significantly in comparison to fresh PBMC. Treatment with PHA significantly reduced *GSTM2* and *CAT* gene expression in fresh and cryopreserved PBMC (Table III). In continuative experiments, we tested the reliability of *GAPDH* as housekeeping gene in the target cells. Down regulation of *CAT* and *GSTM2* was based on a significant up-regulation (4.5 fold in fresh PBMC, 2.4 fold in cryopreserved cells) of *GAPDH* after PHA treatment ( $n=3$ ). So this effect was also more pronounced in fresh PBMC than in cryopreserved PBMC.

### *Basal gene expression in PBMC and HT29 based on two different platforms*

Basal gene expression of selected target genes of drug metabolism and stress response in PBMC were compared with HT29 cells using two platforms, namely cDNA array and real-time PCR (Figure 1). HT29 were used as a standard to determine if variations are based on the individual blood donors or are technical variations. Lower variation of gene expression data in PBMC using cDNA array (Figure 1 A) may reflect the lower sensitivity of this particular cDNA technique in comparison to real-time PCR for which high inter-individual differences were detectable (Figure 1 B). For *UGT1A1* high inter-individual variations (coefficient of variation (CV) 243 %) were measured, for some donors *UGT1A1* was hardly detectable. Beside this gene, all other genes were expressed in every blood donor. *GSTP1* and *CAT* were expressed at comparable levels in both, PBMC and HT29 cells. *COX-2* was the only gene with distinctly higher expression levels in primary PBMC than in HT29 colon carcinoma cells. According to cDNA array, *GSTM2* was not expressed in HT29 cells. Real-time PCR investigations also showed quite low mRNA amounts for *GSTM2*.

#### *Changes in individual basal gene expression over time*

For several genes high variations in gene expression in PBMC could be detected (Figure 1 B). In order to test whether these variations are just snap-shots or if they are specific for individuals, we analysed basal gene expression profiles for ten subjects after three different time points, namely at a starting point (week zero), after eight weeks and again after 15 weeks. The results for three genes (*UGT1A1*, *SOD2* and *GSTP1*) can be seen in Figure 2. For all genes, subjects with a low expression of a certain gene retained this low expression and people with a high expression showed a comparable high expression during the different time points, too.

#### *Modulation of gene expression in HT29 and PBMC after incubation with butyrate and chrysin*

In analogy to previous studies (Sauer et al. 2007) we incubated both cell types with 4 mM and 10 mM butyrate. These concentrations are physiological for the colon cells and are non-toxic for both cells types (data not shown). After 24 h relevant stress response genes like *GSTT2* and *GSTM2* were significantly modulated in the same direction in HT29 cells and in PBMC (Figure 3.1 and 3.2). Butyrate (10 mM) significantly increased *GSTT2* and *GSTM2* gene expression in both cell types with much stronger effects on HT29. PBMC seemed to be less sensitive compared to colon cells and showed high variations from donor to donor. Chrysin, which is considered to be a potent *UGT1A1* inducer, showed a significant effect on *GSTM2* expression, but no significant induction of *UGT1A1*, only a similar trend (fold change in PBMC 3.5, in HT29 1.5) could be detected in both cell types.

#### *GSTM1 and T1 genotypes*

Nullpolymorphisms (*GSTM1\*0* and *GSTT1\*0*) of all blood donors (n=8) used for the *in vitro* experiments were analysed to possibly explain individual responses. The frequencies of *GSTM1* and *GSTT1* null genotypes were 0.5 and 0.25, respectively. One donor was negative for both enzymes (*GSTM1\*0* and *GSTT1\*0*). The stratification of subjects with different genotypes revealed no differences for *in vitro* experiments.



## Discussion

The so-called surrogate tissue analysis is not a new concept, but using new DNA and RNA techniques could bring a multiplicity of important information and a better understanding of cellular pathways. Only a few studies in the recent years looked at gene expression profiles in human blood cells, with a focus on different diseases like multiple sclerosis, cancer or coronary heart disease (Achiron and Gurevich 2006; Burczynski et al. 2005). Nutritional related *ex vivo* transcriptomic modulations in human PBMC are not often investigated, with a few exceptions like studies on *COX-2* modulation by quercetin (de Pascual-Teresa et al. 2004) or the activation of the nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  (PPAR $\alpha$ ) (Bouwens et al. 2007). Our data help to define the extent and nature of the normal variability in gene expression in human blood cells and the feasibility of modulated gene expression *in vitro*. In this study, PBMC are used as a primary cell model and are relatively easy obtained, reflects individual differences and, in addition, give information for the use as potentially target cells for further *in vivo* studies.

For the reason of practicability, PBMC obtained *ex vivo* are often cryopreserved until use. These cryopreserved PBMC are suitable and accepted biomarkers, e.g. to analyse effects of intrinsic and extrinsic factors on oxidative DNA damage (Piperakis et al. 1998; Schmezer et al. 2001). Since modulation of gene expression was the endpoint in this study, we investigated how storage and the mitotic stimulation affect the responsiveness of these cells. The lectin PHA was included in this study because this stimulation could enhance the explanatory power of PBMC as surrogate tissue studying effects of chemoprotective substances that might interfere with the cell cycle. But PHA is also used for other reasons like detecting DNA damage in PBMC, because the ability of mammalian cells to remove DNA damage is correlated with cell activity (Kaminskas and Li 1992; Vollberg et al. 1984). On the other hand, PHA possibly superposes effects of or interferes with the test substance. In our study, PHA significantly up-regulated the housekeeping gene *GAPDH* by a factor of five after 24 h incubation, a modulation which was also found by Vereninov et al. in proliferating PBMC (Vereninov et al. 2001). Especially the regulation of housekeeping genes seems to be inappropriate for *in vitro* gene expression studies with PBMC. Significant induction of *GAPDH* by PHA was lower in cryopreserved PBMC, which indicates less responsiveness of cryopreserved PBMC to substances that modulate gene expression. Taken the results together, it seems to be advisable to use unfrozen and unstimulated PBMC for *in vitro* cell culture experiments.

We measured the expression of seven important drug metabolism and stress response genes simultaneously with two different platforms in PBMC and in the colon cancer cell line HT29. The measurement of basal expression in PBMC has been performed without any previous induction. All investigated genes were expressed in each

individual, with the exception of *UGT1A1* in one donor. Thus, these blood cells fulfil one important qualification to be considered as a suitable surrogate tissue, which may indicate the status of cellular detoxification systems in humans and the possible modulation by food ingredients. The differences between individual donors were higher compared to HT29 (Figure 1). Since the colon cancer cells are derived from one clone and should have a stable gene expression, we used them as reference to make statements possible about the individual differences in PBMC. In the blood cells particularly high variations could be detected for *UGT1A1* (CV 243 %) and for *GSTT2* (CV 261 %). For *UGT1A1* these high variations may be caused by the numerous polymorphisms in the *UGT1A1* gene (Costa 2006). The most common polymorphism in Caucasian populations is a TA insertion in the TA(TA)<sub>6</sub>TAA sequence in the promoter region, which is responsible for a decreased transcription rate (Raijmakers et al. 2000). The baseline gene expression level in PBMC could be also of particular importance for nutritional interventions. One hypothesis, which is supported by studies by Chow et al., is that differential effects on activity of detoxifying enzymes are based on baseline enzyme level (Chow et al. 2007). In addition, it is interesting, that basal gene expression seems to be quite conserved in individuals, since the expression levels of three investigated genes showed just minimal intra-individual but high inter-individual changes. Our data suggest the hypothesis that there are no individuals with a general low baseline detoxification capacity at all; rather every individual has a specific pattern for different detoxification enzymes.

Beside the basal expression of the investigated genes, another requirement for biomarker development is the responsiveness of cells to *in vivo* / *in vitro* stimuli. After incubation with 10 mM butyrate, there was a significant up-regulation of *GSTT2* and *GSTM2* in both cell types detectable. *GSTM2* catalyses the detoxification of oxidized metabolites (*o*-quinones) of catecholamines and may serve as an antioxidant system preventing degenerative cellular processes (Baez et al. 1997). The observation that *GSTM2* mRNA was not detectable in untreated HT29 cells is in line with observation of Ebert et al. who could neither detect *GSTM2* mRNA nor *GSTM2* protein in unstimulated HT29 cells (Ebert et al. 2003). *GSTT2* has peroxidase activity towards t-butyl hydroperoxide and most pronounced against cumene hydroperoxide, whereas there is no detectable activity towards H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Hiratsuka et al. 1997; Hussey and Hayes 1992; Tan and Board 1996). *GSTT2* polymorphisms are associated with colorectal cancer risk (Jang et al. 2007) and *GSTT2* protein levels can be enhanced in rat colon by administration of acetyl salicylic acid, which has been shown to reduce rat colon cancer risk (Van Lieshout et al. 1998). Therefore, the enhanced levels of *GSTT2* and *GSTM2* products possibly result in an elevated detoxification of peroxides or other oxidized metabolites. This suggests a better protection of butyrate-treated cells during situations of metabolic and oxidative stress. It remains to

be elucidated, whether the typical expression patterns may afford chemoresistance of the cells to appropriate substrates, some of which may be cancer risk factors. On one hand, an induction of GSTs in primary cells seems straightforward and favourable since this should result in an enhanced detoxification of risk factors. In tumour cells like HT29 on the other hand, GST induction could counteract cancer chemotherapy by causing resistance to therapeutic agents, thereby enhancing the survival of transformed cells. *GSTP1* is one of the main extrahepatic GSTs and is markedly expressed in PBMC, where it may serve as a biomarker for induction of phase II enzymes by dietary intervention (Pool-Zobel et al. 1998). The decrease of *GSTP1* gene expression in PBMC is possibly specific for these cells, since other studies also reported a reduction of *GSTP1* on mRNA and protein level after fruit or vegetable consumption (Hofmann et al. 2006; Persson et al. 2000).

To our knowledge, this is the first study on PBMC, which shows that phase II enzymes can be modulated in unstimulated cells by food metabolites like butyrate *in vitro*. This indicates that PBMC react *in vitro* to physiological stimuli, which is a necessary prerequisite for the development of gene expression as a suited biomarker. One important question for the future is the involved mechanism, which is critical for regulation of these enzymes. Some GST show an antioxidant/electrophile-responsive element (ARE/ERE) with the nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2) which can act on the ARE element and Nrf2 is important for the expression of many GSTs (Chanas et al. 2002). Thimmulappa et al. could show an Nrf2-dependent induction of antioxidative genes in PBMC by triterpenoids. Whether Nrf2 and/or ARE are important for the induction of GSTs by butyrate in PBMC is not known and is an important question for further studies.

In humans, the glucuronidation of small lipophilic agents is catalyzed by the UGTs in the endoplasmic reticulum. This metabolic pathway leads to the formation of water-soluble metabolites originating from normal dietary processes, cellular catabolism, or exposure to drugs and xenobiotics. A polymorphism in the promoter region of the *UGT1A1* gene with seven instead of six thymine adenine (TA) repeats is responsible for the activity of this enzyme (Raijmakers et al. 2000). In a study by Hu et al. an over 200-fold inter-individual variability was observed in both the glucuronidation and covalent binding of toxic metabolites in human PBMC (Hu and Wells 2004). Similar to these huge differences we could also detect enormous variations in the modulation of gene expression after incubation with butyrate. Four of six blood donors showed a strong induction of *UGT1A1* in PBMC. In addition, the flavonoid chrysin, which is a potent UGT1A1 inducer in many colon cell lines and liver cells (Galijatovic et al. 2001), had modulatory effects on gene expression in PBMC of just a few blood donors.

Gene expression analyses in PBMC reflected huge differences in inducibility of selected enzymes by the different food factors, indicating a possible subject-specific nutrient response, a hypothesis which is also concluded by other authors (Bouwens et al. 2008). The differences were quite obviously much higher compared to cell culture cells like HT29. This could not be explained until now by analysis of different polymorphisms (e.g. *GSTT1*, *GSTM1*). The number of blood donors, which have to be investigated for *in vivo* experiments, should be higher than the number of cell culture experiments. In addition, it will be important to find out the reasons for the different modulation patterns in the individual blood donor.

In this study, PBMC were used as surrogate target cells for effects that may also occur in well-established cell culture models as well as in the target organs *in vivo*. Since nearly all investigated drug metabolism and biotransformation enzymes are expressed on mRNA-level in PBMC and some genes could be modulated by food ingredients, PBMC seem to be a suitable tool for *in vitro* and *ex vivo* gene expression investigations. This hypothesis is also supported by a study from van Baarsen et al. which could show that responses of *in vitro* stimulated PBMC isolated prior to treatment are consistent with those of the *ex vivo* results (van Baarsen et al. 2008). A critical question is whether these effects in PBMC at gene expression level are comparable to that in the target organs. Liew et al could show that approximately 80 % of genes expressed in many tissues like brain, liver, lung or stomach were also found expressed in blood cells (Liew et al. 2006), which is a first criteria of being a successful surrogate tissue. Also preliminary investigations from our group (data not shown) with cDNA-arrays showed that there is a significant correlation between gene expression of PBMC as surrogate and primary colonocytes as target tissue of the same donor (mean  $r_{\text{pearson}}=0.78$ ).

In summary, our study demonstrates that nutritional food ingredients modulate gene expression in human PBMC *in vitro* and that this *ex/in vitro* method is a suitable nutrigenomics biomarker approach. Furthermore, the identified differentially expressed genes could become marker genes for population studies on biological effects of an intervention in humans. The question that needs to be elucidated in the future is whether the genes of stress response and drug metabolism can be modulated by nutrition *in vivo*, if the modulation is associated with antigenotoxic effects and if the changes in the blood cells reflect changes that occur in the specific target tissue.

## **Acknowledgments**

We acknowledge Prof. Gertrud Maria Hänsch and Birgit Prior, Institute for Immunology, University Heidelberg, Germany for analytical assistance.

## **Declaration of interest**

Declaration of interest: The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

## **References**

- Achiron A and Gurevich M (2006) Peripheral blood gene expression signature mirrors central nervous system disease: the model of multiple sclerosis. *Autoimmun Rev* 5: 517-522
- Baez s, Segura-Aguilar J, Widersten M, Johansson AS, 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 (Pt 1): 25-28
- Bell DA, Taylor JA, Paulson DF, Robertson CN, Mohler JL, Lucier GW (1993) Genetic risk and carcinogen exposure: A common inherited defect of the carcinogen-metabolism gene glutathione S-transferase M1 (GSTM1) that increases susceptibility to bladder cancer. *J Natl Cancer Inst* 85: 1159-1164
- Bouwens M, Afman LA, Muller M (2008) Activation of peroxisome proliferator-activated receptor alpha in human peripheral blood mononuclear cells reveals an individual gene expression profile response. *BMC Genomics* 9: 262
- Bouwens M, Afman LA, Muller M (2007) Fasting induces changes in peripheral blood mononuclear cell gene expression profiles related to increases in fatty acid beta-oxidation: functional role of peroxisome proliferator activated receptor alpha in human peripheral blood mononuclear cells. *Am J Clin Nutr* 86: 1515-1523
- Boyum A (1968) Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. *Scand J Clin Lab Invest* 97: 77-89
- Burczynski ME, Twine NC, Dukart G, Marshall B, Hidalgo M, Stadler WM, Logan T, Dutcher J, Hudes G, Trepicchio WL, Strahs A, Immermann F, Slonim DK, Dorner AJ (2005) Transcriptional profiles in peripheral blood mononuclear cells prognostic of clinical outcomes in patients with advanced renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 11: 1181-1189
- Chanas SA, Jiang Q, McMahon M, McWalter GK, McLellan LI, Elcombe CR, Henderson CJ, Wolf CR, Moffat GJ, Itoh K, Yamamoto M, Hayes JD (2002) Loss of the Nrf2 transcription factor causes a marked reduction in constitutive and inducible expression of the glutathione S-transferase Gsta1, Gsta2, Gstm1, Gstm2, Gstm3 and Gstm4 genes in the livers of male and female mice. *Biochem J* 365: 405-416
- Chow HH, Hakim IA, Vining DR, Crowell JA, Tome ME, Ranger-Moore J, Cordova CA, Mikhael DM, Briehl MM, Alberts DS (2007) Modulation of human glutathione s-transferases by polyphenon e intervention. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 16: 1662-1666
- Costa E (2006) Hematologically important mutations: bilirubin UDP-glucuronosyltransferase gene mutations in Gilbert and Crigler-Najjar syndromes. *Blood Cells Mol Dis* 36: 77-80

- de Pascual-Teresa S, Johnston KL, DuPont MS, O'Leary KA, Needs PW, Morgan LM, Clifford MN, Bao Y, Williamson G (2004) Quercetin metabolites downregulate cyclooxygenase-2 transcription in human lymphocytes ex vivo but not in vivo. *J Nutr* 134: 552-557
- Ebert MN, Klinder A, Schäferhenrich A, Peters WHM, Sendt W, Scheele J, Pool-Zobel BL (2003) Expression of glutathione S-transferases (GST) in human colon cells and inducibility of GSTM2 by butyrate. *Carcinogenesis* 24: 1637-1644
- Galijatovic A, Otake Y, Walle UK, Walle T (2001) Induction of UDP-glucuronosyltransferase UGT1A1 by the flavonoid chrysin in Caco-2 cells--potential role in carcinogen bioinactivation. *Pharm Res* 18: 374-379
- Gill CI, Haldar S, Boyd LA, Bennett R, Whiteford J, Butler M, Pearson JR, Bradbury I, Rowland IR (2007) Watercress supplementation in diet reduces lymphocyte DNA damage and alters blood antioxidant status in healthy adults. *Am J Clin Nutr* 85: 504-510
- Glei M, Liegibel UM, Ebert MN, Böhm V, Pool-Zobel BL (2002)  $\beta$ -Carotene reduces bleomycin-induced genetic damage in human lymphocytes. *Toxicology and Applied Pharmacology* 179: 65-73
- Glei M and Pool-Zobel BL (2005) The main catechin of green tea, (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG), reduces bleomycin-induced DNA damage in human leucocytes. *Toxicol In Vitro* 20: 295-300
- Hamer HM, Jonkers D, Venema K, Vanhoutvin S, Troost FJ, Brummer RJ (2008) Review article: the role of butyrate on colonic function. *Aliment Pharmacol Ther* 27: 104-119
- Hammarstrom S, Hammarstrom ML, Sundblad G, Arnarp J, Lonngren J (1982) Mitogenic leucoagglutinin from *Phaseolus vulgaris* binds to a pentasaccharide unit in N-acetyllactosamine-type glycoprotein glycans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79: 1611-1615
- Han M, Liew CT, Zhang HW, Chao S, Zheng R, Yip KT, Song ZY, Li HM, Geng XP, Zhu LX, Lin JJ, Marshall KW, Liew CC (2008) Novel blood-based, five-gene biomarker set for the detection of colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 14: 455-460
- Hayes JD, Flanagan JU, Jowsey IR (2005) Glutathione transferases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 45: 51-88
- Hiratsuka A, Nishijima T, Okuda H, Ogura K, Watabe T (1997) Rat liver theta-class glutathione S-transferases T1-1 and T2-2: their chromatographic, electrophoretic, immunochemical, and functional properties. *Anal Biochem* 252: 229-237
- Hofmann T, Liegibel U, Winterhalter P, Bub A, Rechkemmer G, Pool-Zobel BL (2006) Intervention with polyphenol-rich fruit juices results in an elevation of glutathione S-transferase P1 (hGSTP1) protein expression in human leucocytes of healthy volunteers. *Mol Nutr Food Res* 50: 1191-1200
- Hu Z and Wells PG (2004) Human interindividual variation in lymphocyte UDP-glucuronosyltransferases as a determinant of in vitro benzo[a]pyrene covalent binding and cytotoxicity. *Toxicol Sci* 78: 32-40
- Hussey AJ and Hayes JD (1992) Characterization of a human class-Theta glutathione S-transferase with activity towards 1-menaphthyl sulphate. *Biochem J* 286 (Pt 3): 929-935
- Jang SG, Kim IJ, Kang HC, Park HW, Ahn SA, Yoon HJ, Kim K, Shin HR, Lee JS, Park JG (2007) GSTT2 promoter polymorphisms and colorectal cancer risk. *BMC Cancer* 7: 16
- Kaminskas E and Li JC (1992) Repair of DNA damage induced by oxygen radicals in human non-proliferating and proliferating lymphocytes. *Mutat Res* 274: 103-110
- Liew CC, Ma J, Tang HC, Zheng R, Dempsey AA (2006) The peripheral blood transcriptome dynamically reflects system wide biology: a potential diagnostic tool. *J Lab Clin Med* 147: 126-132

- Pemble S, Schroeder KR, Spencer SR, Meyer DJ, Hallier E, Bolt HM, Ketterer B, Taylor JB (1994) Human glutathione S-transferase theta (GSTT1): cDNA cloning and the characterization of a genetic polymorphism. *Biochem J* 300: 271-276
- Persson I, He L, Fang C, Normen L, Rylander R (2000) Influence of vegetables on the expression of GSTP1 in humans--a pilot intervention study (Sweden). *Cancer Causes Control* 11: 359-361
- Piperakis SM, Visvardis EE, Sagnou M, Tassiou AM (1998) Effects of smoking and aging on oxidative DNA damage of human lymphocytes. *Carcinogenesis* 19: 695-698
- Pool-Zobel B, Veeriah S, Bohmer FD (2005a) Modulation of xenobiotic metabolising enzymes by anticarcinogens--focus on glutathione S-transferases and their role as targets of dietary chemoprevention in colorectal carcinogenesis. *Mutat Res* 591: 74-92
- Pool-Zobel BL, Bub A, Liegibel UM, Treptow-van Lishaut S, Rechkemmer G (1998) Mechanisms by which Vegetable Consumption Reduces Genetic Damage in Humans. *Canc Epid Biom Prev* 7: 891-899
- Pool-Zobel BL, Dornacher I, Lambertz R, Knoll M, Seitz HK (2004) Genetic damage and repair in human rectal cells for biomonitoring: sex differences, effects of alcohol exposure, and susceptibilities in comparison to peripheral blood lymphocytes. *Mutat Res* 551: 127-134
- Pool-Zobel BL, Selvaraju V, Sauer J, Kautenburger T, Kiefer J, Richter KK, Soom M, Wolf S (2005b) Butyrate may enhance toxicological defence in primary, adenoma and tumor human colon cells by favourably modulating expression of glutathione S-transferases genes, an approach in nutrigenomics. *Carcinogenesis* 26: 1064-1076
- Raijmakers MT, Jansen PL, Steegers EA, Peters WH (2000) Association of human liver bilirubin UDP-glucuronyltransferase activity with a polymorphism in the promoter region of the UGT1A1 gene. *J Hepatol* 33: 348-351
- Reed JC, Alpers JD, Nowell PC, Hoover RG (1986) Sequential expression of protooncogenes during lectin-stimulated mitogenesis of normal human lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83: 3982-3986
- Rockett JC, Burczynski ME, Fornace AJ, Herrmann PC, Krawetz SA, Dix DJ (2004) Surrogate tissue analysis: monitoring toxicant exposure and health status of inaccessible tissues through the analysis of accessible tissues and cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 194: 189-199
- Sauer J, Richter KK, Pool-Zobel BL (2007) Physiological concentrations of butyrate favorably modulate genes of oxidative and metabolic stress in primary human colon cells. *J Nutr Biochem* 18: 736-745
- Schmezer P, Rajae-Behbahani N, Risch A, Thiel S, Rittgen W, Drings P, Dienemann H, Kayser KW, Schulz V, Bartsch H (2001) Rapid screening assay for mutagen sensitivity and DNA repair capacity in human peripheral blood lymphocytes. *Mutagenesis* 16: 25-30
- Sengupta S, Muir JG, Gibson PR (2006) Does butyrate protect from colorectal cancer? *J Gastroenterol Hepatol* 21: 209-218
- Smith CM, Graham RA, Krol WL, Silver IS, Negishi M, Wang H, Lecluyse EL (2005) Differential UGT1A1 induction by chrysin in primary human hepatocytes and HepG2 Cells. *J Pharmacol Exp Ther* 315: 1256-1264
- Tan KL and Board PG (1996) Purification and characterization of a recombinant human Theta-class glutathione transferase (GSTT2-2). *Biochem J* 315 ( Pt 3): 727-732
- Tong X, Yin L, Giardina C (2004) Butyrate suppresses Cox-2 activation in colon cancer cells through HDAC inhibition. *Biochem Biophys Res Commun* 317: 463-471

- van Baarsen LG, Vosslander S, Tijssen M, Baggen JM, van de V, Killestein J, van der Pouw Kraan TC, Polman CH, Verweij CL (2008) Pharmacogenomics of interferon-beta therapy in multiple sclerosis: baseline IFN signature determines pharmacological differences between patients. *PLoS ONE* 3: e1927
- Van Lieshout EM, Tiemessen DM, Roelofs HM, Peters WH (1998) Nonsteroidal anti-inflammatory drugs enhance glutathione S-transferase theta levels in rat colon. *Biochim Biophys Acta* 1381: 305-311
- Veeriah S, Miene C, Habermann N, Hofmann T, Klenow S, Sauer J, Bohmer F, Wolf S, Pool-Zobel BL (2008) Apple polyphenols modulate expression of selected genes related to toxicological defence and stress response in human colon adenoma cells. *Int J Cancer* 122: 2647-2655
- Vereninov AA, Vassilieva IO, Yurinskaya VE, Matveev VV, Glushankova LN, Lang F, Matskevitch JA (2001) Differential transcription of ion transporters, NHE1, ATP1B1, NKCC1 in human peripheral blood lymphocytes activated to proliferation. *Cell Physiol Biochem* 11: 19-26
- Vollberg TM, Lee KA, Sirover MA (1984) Positive correlation between the extent of cell proliferation and the regulation of base excision repair. *Cancer Res* 44: 2377-2381
- Wark PA, Grubben MJ, Peters WH, Nagengast FM, Kampman E, Kok FJ, van 't V (2004) Habitual consumption of fruits and vegetables: associations with human rectal glutathione S-transferase. *Carcinogenesis* 25: 2135-2142
- Weisel T, Baum M, Eisenbrand G, Dietrich H, Will F, Stockis JP, Kulling S, Rufer C, Johannes C, Janzowski C (2006) An anthocyanin/polyphenolic-rich fruit juice reduces oxidative DNA damage and increases glutathione level in healthy probands. *Biotechnol J* 1: 388-397



**Table I:**

Primer sequences for real-time PCR analysis

<b>Gene</b>	<b>Sequence</b>	<b>Product (bp)</b>	
<i>CAT</i>	forward	5'-TGG ACA AGT ACA ATG CTG AG-3'	144
	reverse	5'-TTA CAC GGA TGA ACG CTA AG-3'	
<i>COX-2</i>	forward	5'-TCC TCC TGT GCC TGA TGA TTG C-3'	170
	reverse	5'-ACT GAT GCG TGA AGT GCT GGG-3'	
<i>GAPDH</i>	forward	5'-ACC CAC TCC TCC ACC TTT GAC-3'	110
	reverse	5'-TCC ACC ACC CTG TTG CTG TAG-3'	
<i>GSTM2</i>	forward	5'-AGC CGT ATG CAG CTG GCC AAA C-3'	149
	reverse	5'-GGA CAA AGG TGA TCT TGT CCC CA-3'	
<i>GSTP</i>	forward	5'-CTG CGC ATG CTG CTG GCA GAT C-3'	149
	reverse	5'-TTG GAC TGG TAC AGG GTG AGG TC-3'	
<i>GSTT2</i>	forward	5'-TGA CAC TGG CTG ATC TCA TGG CC-3'	142
	reverse	5'-GCC TCC TGG CAT AGC TCA GCA C-3'	
<i>UGT1A1</i>	forward	5'-TCA TGC TGA CGG ACC CTT TC-3'	145
	reverse	5'-CTG GGC ACG TAG GAG AAT GG-3'	
<i>SOD2</i>	forward	5'-GCC CTG GAA CCT CAC ATC AAC-3'	111
	reverse	5'-CAA CGC CTC CTG GTA CTT CTC-3'	

**Table II**

FACS analysis and Cluster of Differentiation (CD) expression in PBMC isolated from different buffy coats (n=3)

<b>Cells</b>	<b>mean (%)</b>	<b>SD</b>	<b>mean (%)</b>	<b>SD</b>
Lymphocytes	75.6	4.0		
	CD3		71.0	1.8
	CD4		41.7	17.2
	CD8		33.1	14.9
	CD19		10.8	2.6
	CD20		8.7	0.4
	CD28		48,4	21.0
	CD56		21.8	17.3
Monocytes	15.4	4.5		
Granulocytes	9.0	8.1		

**Table III**

Effects of treatment for 24 h with PHA (10 µg/ml) on cell number, viability, and relative gene expression of *GSTM2* and *CAT* (based on *GAPDH*) in freshly isolated PBMC and cryopreserved PBMC. Statistical analysis was performed with one-way ANOVA and Bonferroni's multiple comparison test with selected pairs and differences between fresh and cryopreserved cells were tested with two-way ANOVA, same letters indicate significant differences, n=3

		cell number [10 <sup>6</sup> /ml]		viability [%]		relative gene expression			
		mean	SD	mean	SD	<i>GSTM2</i>		<i>CAT</i>	
		mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD
fresh	medium control	3.97 <sup>a</sup>	1.05	96 <sup>c</sup>	2	1.00 <sup>e</sup>	0.00	1.00 <sup>g</sup>	0.00
	PHA	3.56 <sup>b</sup>	0.51	94 <sup>d</sup>	4	0.44 <sup>e</sup>	0.09	0.18 <sup>g</sup>	0.01
cryopreserved	medium control	1.83 <sup>a</sup>	0.67	82 <sup>c</sup>	9	1.00 <sup>f</sup>	0.00	1.00 <sup>h</sup>	0.00
	PHA	1.26 <sup>b</sup>	0.20	71 <sup>d</sup>	3	0.41 <sup>f</sup>	0.19	0.24 <sup>h</sup>	0.06

Figure 1: Relative gene expression (based on expression of house keeping gene GAPDH [ppm]) of target genes in untreated cells in two different platforms: A – cDNA array, B – real-time PCR. Basal gene expression in PBMC (filled characters) was characterised by high individual variation whereas HT29 cells (open characters) demonstrated low variability. Variation was detected more sensitive in real-time PCR experiments. *GSTM2* was not detectable in HT29 cells using cDNA array.

Figure 2: Real-time PCR analysis of selected genes that were investigated in PBMC. Shown are the basal gene expression profiles for 10 subjects after three different time points, namely at a starting point (week zero), after eight weeks and again after 15 weeks. *GAPDH* (housekeeping gene) was used as internal reference control (gene expression related to *GAPDH* [ppm]).

Figure 3.1 and 3.2: Real-time PCR analysis of selected genes that were investigated in PBMC (left side) and HT29 cells (right side). Shown are effects of butyrate and chrysin after 24 h incubation on the expression levels of *CAT*, *SOD2*, *COX-2*, *UGT1A1*, *GSTP1*, *GSTT2* and *GSTM2*. The modulations of mRNA levels were obtained by comparing the treatment groups to the medium controls and calculating the fold changes. *GAPDH* (housekeeping gene) was used as internal reference control (gene expression related to *GAPDH* [ppm]). Significant differences to the controls were calculated by a one-way ANOVA with Bonferroni's post-test (\*\*\* $p < 0.001$ , \*\* $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$ ,  $n = 4-7$  for PBMC and  $n = 3-4$  for HT29).

Figure 1:

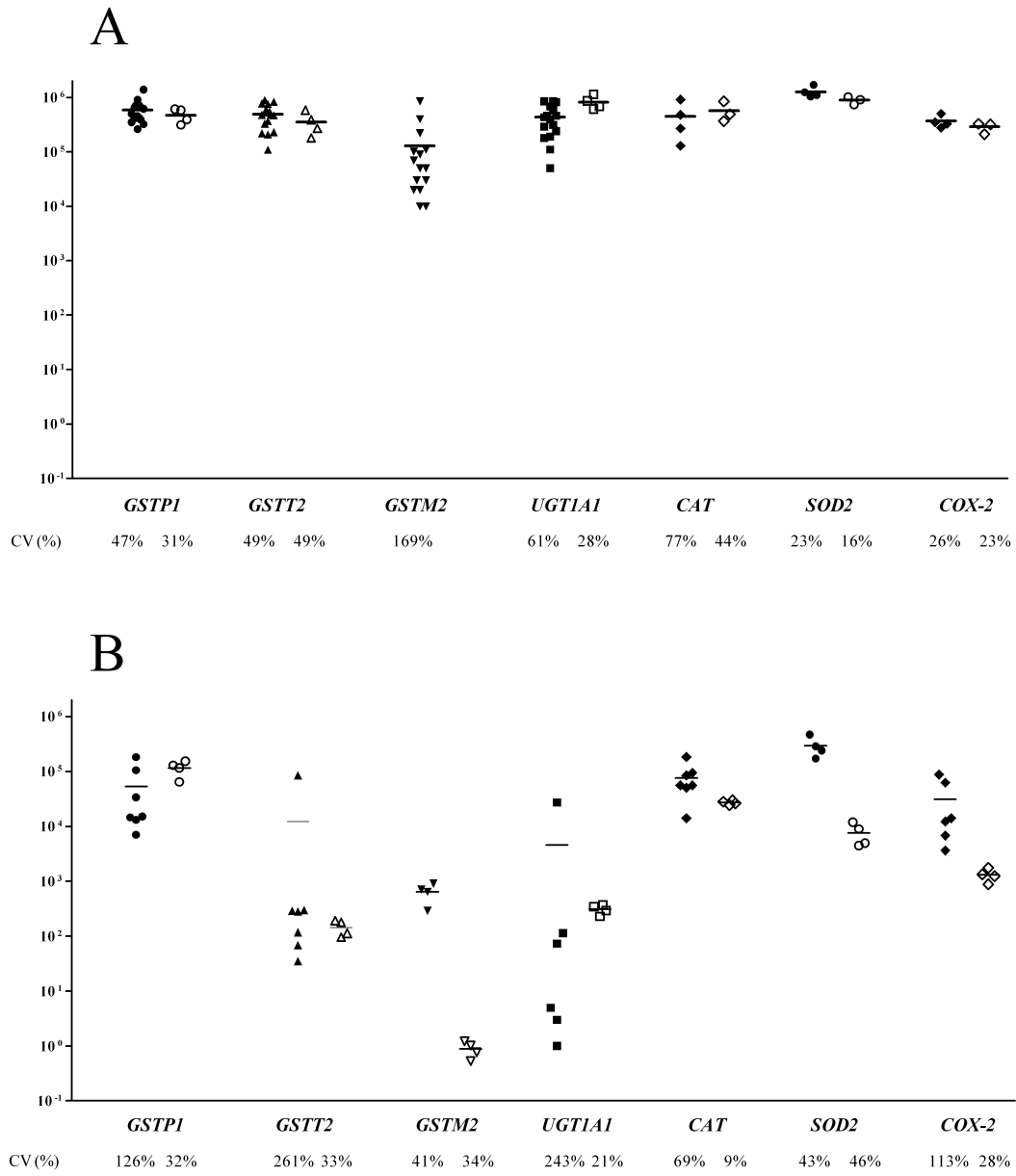


Figure 2:

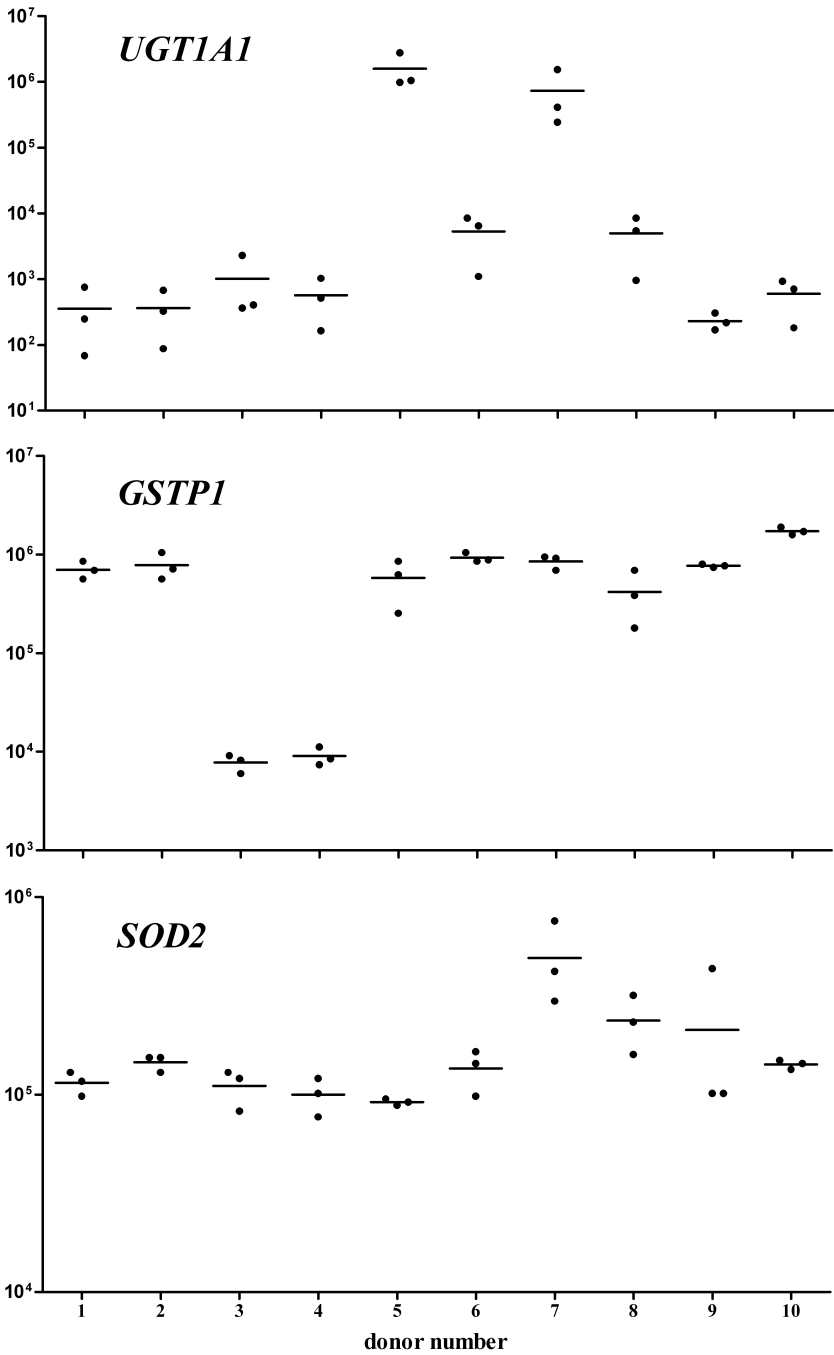


Figure 3.1:

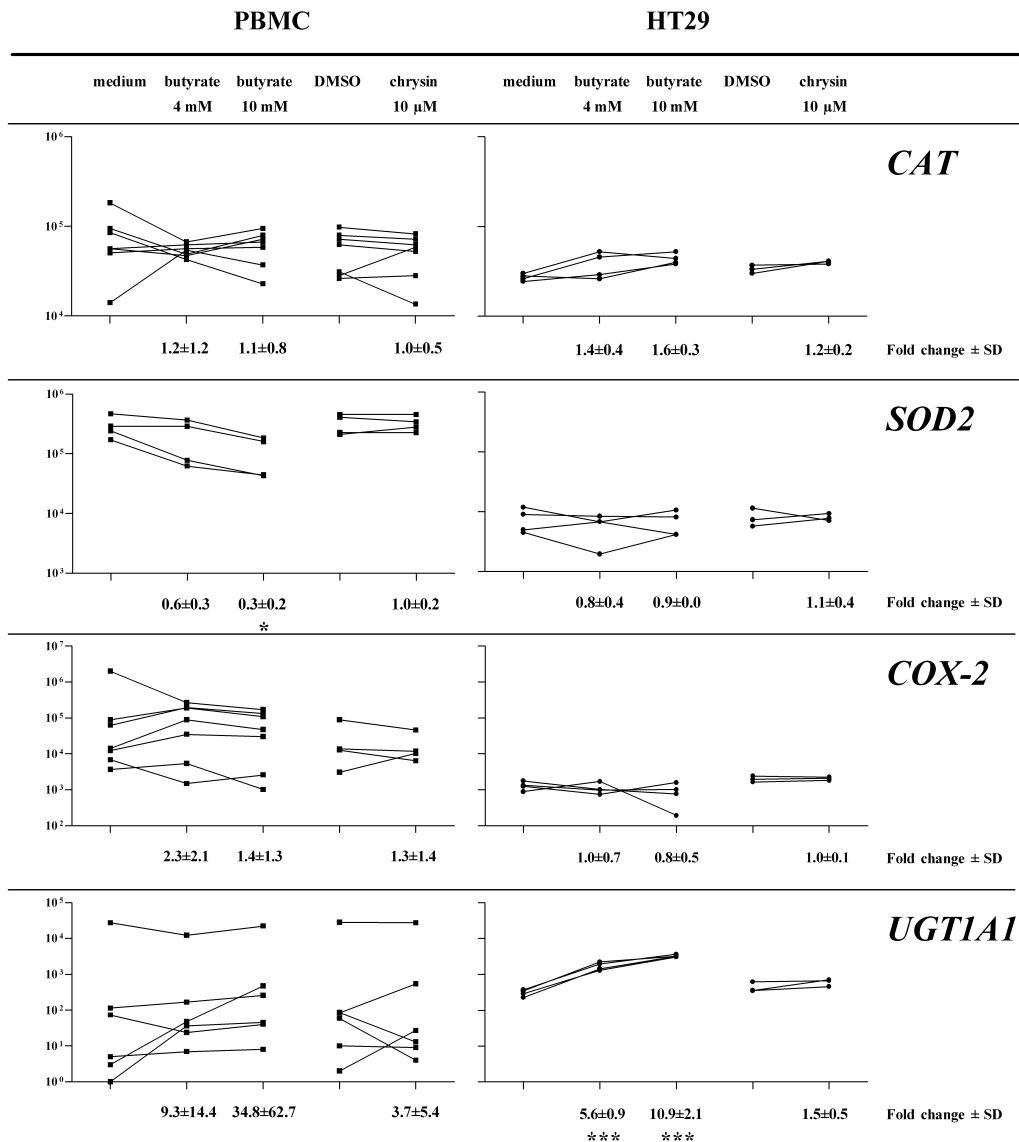
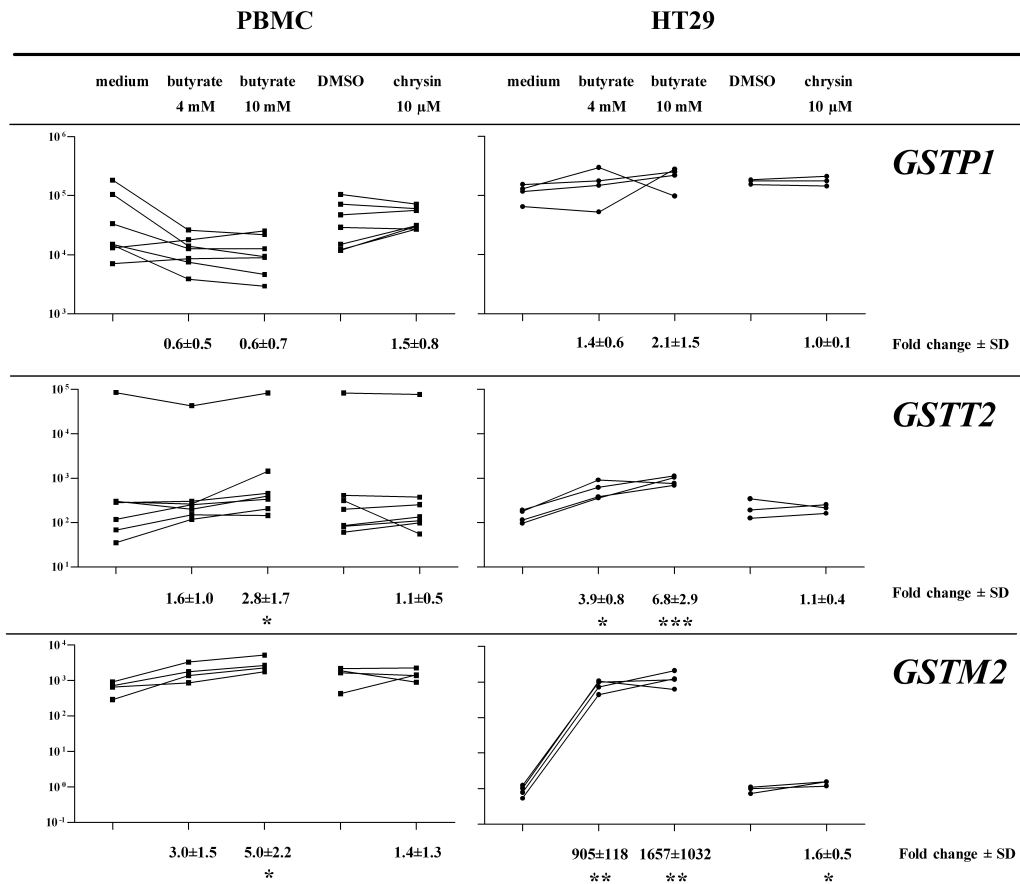


Figure 3.2





**2.2 PUBLIKATION II: INTERVENTION WITH POLYPHENOL-RICH FRUIT JUICES RESULTS IN AN ELEVATION OF GLUTATHIONE S-TRANSFERASE P1 (HGSTP1) PROTEIN EXPRESSION IN HUMAN LEUCOCYTES OF HEALTHY VOLUNTEERS.** Thomas Hofmann, Ute Liegibel, Peter Winterhalter, Achim Bub, Gerhard Rechkemmer, Beatrice L. Pool-Zobel; *Mol. Nutr. Food Res.* 2006, 50, 1191 – 1200

Polyphenole gelten als antikarzinogen. Ihr chemopräventives Potential umfasst die Hemmung von Phase-I-Enzymen und die Aktivierung von Phase-II-Enzymen. In der vorliegenden Arbeit wurden Untersuchungen durchgeführt, welche eine Modulation von Biotransformationsenzymen durch Polyphenole *in vitro* und *in vivo* zeigen sollten. Hierfür wurden die GSTP1-Proteinexpression und GST-Polymorphismen in PBMC aus einer humanen Mehrfruchtsaft-Interventionsstudie bestimmt. Die Originalstudie zeigte eine Reduktion der oxidativen DNA-Schäden in PBMC (Bub *et al.*, 2003). Diese DNA-Schäden wurden in Abhängigkeit von GST-Polymorphismen neu ausgewertet. Darüber hinaus wurde die *in vitro*-Modulierbarkeit der Expression von 96 Biotransformationsgenen durch eine Behandlung mit Polyphenolmischungen bestimmt. PBMC der Interventionsstudie zeigten signifikant regulierte GSTP1-Proteinkonzentrationen. GSTP1-Proteinkonzentrationen und DNA-Schäden korrelierten invers, aber ohne Unterschied zwischen den GST-Genotypen. Die *in vitro*-Behandlung der Zellen führte nicht zu einer signifikanten Modulation der GST-Expression oder GST-Aktivität. Die Untersuchungen zeigten somit, dass Polyphenole *in vitro* und *in vivo* die Expression verschiedener Biotransformationsenzyme unterschiedlich modulieren. Ein chemopräventiver Schutzeffekt der Polyphenole ist nicht zwangsläufig abzuleiten und bedarf weiterer Untersuchungen.

Eigenanteil:

- Planung und Verfassung des Manuskriptes
- PBMC-Isolation, -Zellkultur und -Inkubation
- RNA-Isolation und Genexpressionsanalyse mit Datenauswertung (DNA-Microarray), Interpretation und Darstellung
- Toxikologische Bewertung der Testsubstanzen

# Intervention with polyphenol-rich fruit juices results in an elevation of glutathione *S*-transferase P1 (hGSTP1) protein expression in human leucocytes of healthy volunteers

Thomas Hofmann<sup>1</sup>, Ute Liegibel<sup>1</sup>, Peter Winterhalter<sup>2</sup>, Achim Bub<sup>3</sup>, Gerhard Rechkemmer<sup>4</sup> and Beatrice Louise Pool-Zobel<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Nutritional Toxicology, Institute for Nutrition, Friedrich Schiller University of Jena, Jena, Germany

<sup>2</sup> Institute of Food Chemistry, Technical University of Braunschweig, Braunschweig, Germany

<sup>3</sup> Institute of Nutritional Physiology, Federal Research Centre for Nutrition and Food, Karlsruhe, Germany

<sup>4</sup> Chair of Biofunctionality of Food, Department of Food and Nutrition, Life and Food Science Center Weihenstephan, Technical University of Munich, Freising-Weihenstephan, Germany

Polyphenols are probably antigenotoxic on account of their antioxidant activities and might alter phase I and II enzymes in a way that results in chemoprotection. We investigated the hypothesis that polyphenols enhance expression of glutathione *S*-transferases (GSTs), which increases carcinogen detoxification and thereby provides protection against oxidative stress. HGSTP1 protein expression and GST polymorphisms were determined in leucocytes obtained during an intervention study with healthy subjects consuming two fruit juices in an 8 wk trial (polyphenol-free run in phase, juice intervention phase, washout phase, second juice intervention phase, each treatment regime lasted for 2 wk). The study had originally shown that juice intervention significantly reduced oxidative DNA damage in leucocytes at week 8 (Bub, A., Watzl, B., Blockhaus, M., Briviba, K. *et al.*, *J. Nutr. Biochem.* 2003, 14, 90–98). We reanalysed the levels of DNA damage based on GST genotypes. We also treated leucocytes *in vitro* with mixtures of polyphenols and determined cytotoxicity and expression of 96 genes related to drug metabolism. Key results with leucocytes of the intervention study were that the initial content of hGSTP1 protein was first suppressed at weeks 4 and 6. At week 8, however, hGSTP1 protein expression was significantly increased. HGSTP1 protein levels and DNA damage were inversely correlated ( $p = 0.005$ ), but there was no difference for cells obtained from subjects with *hGSTM1\*1* and *hGSTM1\*0* genotypes, nor was there any difference between cells from subjects consuming the two different juices. The treatment of leucocytes with polyphenol mixtures *in vitro* did not result in modulated GST gene expression or total GST activity, but in an up-regulation of other biotransformation enzymes (*e.g.*, members of the cytochrom P450 and the sulphotransferase family). In conclusion, *in vitro* treatment of leucocytes led to a modulated mRNA expression of selected genes, not directly related to oxidative defence systems. *In vivo*, however, we observed a delayed enhancement of hGSTP1, which could be associated with an initial repression of oxidative DNA damage in leucocytes from human subjects, consuming juices with high levels of polyphenols.

**Keywords:** Biomarker / Detoxification / Flavonoids / Phase II enzymes / Polyphenols

Received: April 3, 2006; revised: September 14, 2006; accepted: September 17, 2006

## 1 Introduction

Polyphenols are the major phytochemicals in fruits and vegetables [1] and may exert their effects *via* antioxidant

properties [2]. A variety of studies has shown that polyphenols, such as flavonoids, have antioxidative activities *in vitro* [3, 4]. In cellular systems, they have been reported to have abundant biological activities related to chemoprotec-

**Correspondence:** Professor Dr. Beatrice L. Pool-Zobel, Director of the Institute for Nutrition, Department of Nutritional Toxicology, Friedrich Schiller University of Jena, 07743 Jena, Germany

**E-mail:** b8pobe@uni-jena.de

**Fax:** +49-3641-949672

**Abbreviations:** Cy-3-O-g, cyanidin-3-O-glucoside; EGCG, (–)-epigallocatechin gallate; GST, glutathione *S*-transferase; UGT, UDP-glucuronosyltransferase

tive potentials. In particular, cell-based studies have shown that selected polyphenolic compounds affect signal transduction pathways, leading to inhibition of cell growth and transformation, enhanced apoptosis, reduced invasive behaviour and slowed angiogenesis. It is speculated that mechanisms of this type may be responsible for the anticarcinogenic activities that have, for instance, been shown for polyphenols such as curcumin, genistein and quercetin, as reviewed by Lambert *et al.* [5]. Whereas these aforementioned cellular effects probably contribute to secondary cancer prevention by retarding progression of tumorigenesis, additional mechanisms are important for primary cancer prevention [6]. These include blocking activities which directly or indirectly prevent chemical carcinogens from inducing mutations and thus cancer initiation or further progression [7]. Polyphenols, such as quercetin and myricetin, have also been shown to be active in this context, resulting in antigenotoxic effects in cellular systems [8, 9]. Similar effects have since been detected in humans *in vivo* after dietary intervention with polyphenol-rich fruit juices [10].

A straightforward explanation for the observed antigenotoxic properties could be that the polyphenols scavenge the reactive oxygen species which cause DNA damage and are thought to have a pivotal role for cancer causation [11]. Polyphenols, however, might also indirectly prevent DNA damage by altering phase I and II enzymes in a way that results in chemoprevention [12]. For example, several polyphenols, known to have anticarcinogenic activities in experimental systems, were able to modulate the activity of gastrointestinal UDP-glucuronosyltransferase (UGTs, EC 2.4.1.17) enzymes. The authors concluded that an induction of gastrointestinal UGT enzyme activity may contribute to a better detoxification of potentially carcinogenic compounds and subsequently to the prevention of gastrointestinal cancer [13].

Next to UGTs also glutathione *S*-transferases (GSTs, EC 2.5.1.18) are important phase II enzymes with detoxifying potential [14]. In rats dietary polyphenols (ellagic acid, flavone, coumarin and alpha-angelicalactone) have been shown to selectively enhance members of the GST detoxification system in the oesophagus, stomach and in the pancreas [15]. In humans, GST isoforms are also localized in different tissues with organ-specific expression patterns [16]. They constitute a complex supergene family that collectively metabolizes chemotherapeutic drugs, carcinogens and environmental pollutants, and play a protective pivotal role against xenobiotics, as has been reviewed in the past [17, 18]. Their levels of expression can have profound effects on susceptibility to chemical insult, with overexpression resulting in resistance and underexpression enhancing susceptibility [19, 20]. Human GSTs are characterized as cytosolic (Alpha, Mu, Pi, Sigma, Theta, Zeta and Omega), mitochondrial (Kappa), and microsomal enzymes,

which are membrane-associated proteins in eicosanoid glutathione metabolism (MAPEG) [17, 21]. Null genotypes for hGSTM1 and hGSTT1 occur in frequencies of approximately 50 and 20–50% of the population, respectively. They are important genotypes with potentially high impact on the metabolic capacity of the respective subjects, since they result in absence of the respective enzymes. The primary hypothesis has been that individuals with the GST-null genotypes are at higher risk for cancer because of a reduced capacity to eliminate activated carcinogens [22, 23]. Two linked polymorphisms were described in the *hGSTP1* gene, one in codon 105 and one in codon 114, of which the polymorph variant of codon 105 modifies the enzyme's specific activity [24]. HGSTP1 is also one of the main extrahepatic GSTs and is markedly expressed in peripheral leucocytes, where it may serve as a biomarker for induction of phase II enzymes by dietary intervention [25].

In the following study we were interested in understanding whether polyphenols act by the mechanisms of altering phase II metabolism and whether this could be a reason why DNA damage is reduced by polyphenols in human leucocytes as observed previously [10]. The intervention study had been performed in healthy male subjects consuming two fruit juices, one rich in anthocyanidins and the other in green tea catechins. The study had shown us that juice intervention had no effect on single DNA strand breaks, but significantly reduced oxidative DNA damage in leucocytes. This was associated with an enhanced antioxidant status and stimulated immune cell functions, although the intervention for 2 wk did not result in elevated plasma polyphenols in subjects after overnight fasting. Using the remaining biological samples (cryopreserved peripheral leucocytes) of this previous study, the present study determined hGSTP1 expression and GST polymorphism to assess the effects of these parameters on oxidative damage. We also intended to more closely investigate the expression of genes related to biotransformation in peripheral leucocytes treated with the polyphenols of the fruit juices. Two individual mixtures of the components composed according to the two original juices [10] were prepared and investigated for different biological activities in leucocytes *in vitro*. In particular, we assessed the effects of the polyphenol mixtures on expression of genes related to drug metabolism *in vitro*.

## 2 Materials and methods

### 2.1 *Ex vivo* determinations

#### 2.1.1 Study design and diet

The randomized, crossover study has been described in detail before [10]. It was divided into five periods each lasting 2 wk: weeks 1–2, run-in period, weeks 3–4, consumption of juice A or B (330 mL/day), weeks 5–6 washout per-

iod, weeks 7–8 consumption of juice B or A (330 mL/day) and weeks 9–10 washout period. The juices contained a mixture of apple, mango and orange juice. In addition, juice A (76% w/w water) was rich in anthocyanin-providing aronia, blueberries and boysenberries, while juice B (78% w/w water) contained flavanol-rich green tea, apricot and lime. During the 10-wk-study period the subjects were instructed to exclude polyphenol-rich foods from their diet. Each subject was his/her own control, since well-designed placebo-fruit juices (not containing polyphenols [26]) were not available at the time the study was performed. The study enrolled a total of 27 non-smoking men (mean age 35 years) with normal body weight (mean BMI 24 kg/m<sup>2</sup>). It was approved by the Medical Ethical Committee of the Landesärztekammer Baden-Württemberg. All participants gave their written consent.

### 2.1.2 Isolation of peripheral blood leucocytes

Samples used for the determinations described in this work were derived from the subjects immediately after the first run in phase (week 2), after the first intervention phase (week 4), after the first washout phase (week 6) and after the second intervention phase (week 8). The indicated time points were selected to cover the whole range of the intervention study. HGSTP1 protein determinations could not be performed for other time points, due to limiting quantities of the biological material. Leucocytes were isolated and frozen as described before [27]. Only 24 of the 27 subjects delivered sufficient amounts of leucocytes to perform the determinations described here. DNA damage was determined in fresh leucocytes immediately after they were available. HGSTP1 proteins were determined in batches, namely by simultaneously analysing all time points of each individual.

### 2.1.3 GST genotyping

Cryopreserved leucocytes ( $6 \times 10^6$  cells) were used to isolate DNA with the QIAamp DNA Mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) as described in the manufacturer's manual. A multiplex PCR method was used to detect the presence or absence of the *hGSTM1* and *hGSTT1* genes [22, 28] using primers from MWG Biotech AG (Ebersberg, Germany) with the sequences and procedures as described in detail previously [25]. A fragment of the  $\beta$ -globin gene was coamplified as internal positive control in the PCR reaction.

### 2.1.4 DNA damage

DNA damage (single-strand breaks and oxidized DNA bases) was determined in fresh leucocytes immediately after isolation and followed the procedure as described in the original study [10, 29].

### 2.1.5 Glutathione S-transferase P1 (hGSTP1) protein and total protein

An ELISA kit was used to determine hGSTP1 in microtiter plates (HEPKIT-Pi, Biotrin, Sinsheim-Reihen, Germany), using a 1:4 dilution of the cytosol (corresponding to  $2\text{--}3 \times 10^5$  cells). The test procedure is based on the sequential addition of sample, antibody-enzyme conjugate and substrate to microassay wells coated with anti-hGSTP1 IgG. The resultant colour intensity is proportional to the amount of hGSTP1. The assay range is 3.12–100  $\mu\text{g/L}$ . The photometric detection of the coloured product was performed at 450 nm using 630 nm as reference (Microplate Reader Tmax, MWG-Biotech; Software: Softmax Version 2.34). Total protein content was measured using the method by Bradford with BSA as standard protein [30].

## 2.2 *In vitro* determinations

### 2.2.1 Test chemicals

(+)-Catechin, (–)-epicatechin, (–)-epigallocatechin, (–)-epigallocatechin gallate (EGCG), quercetin, rutin, quercitrin, myricitrin, kampferol, hesperidin, naringenin, gallic acid, protocatechinic acid, gentisic acid, chlorogenic acid, caffeic acid and phloridzin had been purified by HPLC (~90–99%) by the supplier and all were obtained from Sigma-Aldrich Chemie (Munich, Germany). Isoquercitrin was from Fluka (Taufkirchen, Germany), eriodictyol was from Roth (Karlsruhe, Germany) and ferulic acid was from ICN (Eschwege, Germany).

Cyanidin-3-*O*-glucoside (Cy-3-*O*-g) was isolated from the pale of black currants. In a first step anthocyanins were extracted with methanol/acetic acid (19:1) and concentrated with an Amberlite XAD-7 column. Afterwards Cy-3-*O*-g was isolated from the extract with high-speed counter-current chromatography (HSCCC) [31]. The procyanidin mixture consisted of 69.1% procyanidin B2, 20.0% procyanidin B3 and 10.9% oligomere procyanidins and was isolated by the gentle separation technique of countercurrent chromatography (CCC).

### 2.2.2 Preparation of polyphenol mixtures that simulated the fruit juices

The polyphenol mixtures were prepared using concentrations, that simulated contents of the complex fruit juices of the *in vivo* intervention study (Table 1) [10]. For this, the 22 ingredients (solid powder) were mixed in the predetermined ratio and stored at  $-20^\circ\text{C}$ . The dry mixtures were dissolved in DMSO stock solutions (40 mM in DMSO), which contained the molar concentrations of the identified major polyphenols as previously identified in the natural fruit juices [10]. To assess biological activities in leucocytes, stock solutions were appropriately diluted and added to the cell culture medium yielding concentrations based on the

**Table 1.** Chemical composition of polyphenol mixtures (in  $\mu\text{M}$ ) mimicking fruit juices (in  $\text{mg/L}$ ) of the *in vivo* intervention study [10]

Chemical	Mixture A concentration			Mixture B concentration		
	Juice A $\text{mg/L}$	$\mu\text{M}$	$\mu\text{M}$ at 40 $\mu\text{M}$ Cy-3-O-g	Juice B $\text{mg/L}$	$\mu\text{M}$	$\mu\text{M}$ at 40 $\mu\text{M}$ EGCG
(+)-Catechin	10	34.5	3.2	15	51.7	6.1
(-)-Epicatechin	22	75.8	7	33	113.7	13.4
(-)-Epigallo-catechin	0	0	0	5	16.3	1.9
EGCG	0	0	0	155	338.2	40
Procyanidins	35	60.5	5.6	27	46.7	5.5
Cy-3-O-g	210	433.2	40	0	0	0
Quercetin	5	16.5	1.5	1	3.3	0.4
Rutin	9	14.7	1.4	4	6.6	0.8
Isoquercitrin	37	79.7	7.4	0	0	0
Quercitrin	15	33.5	3.1	3	6.7	0.8
Myricetrin	7	22	2	0	0	0
Kampferol	4	14	1.3	0	0	0
Hesperidin	13	21.3	2	47	77	9.1
Eriodictyol	28	97.1	9	40	138.8	16.4
Naringenin	26	95.5	8.8	16	58.8	7
Gallic acid	14	82.3	7.6	10	58.8	7
Protocatechuic acid	44	285.5	26.4	0	0	0
Gentisic acid	41	266	24.6	270	1751.8	207.2
Chlorogenic acid	157	443.1	40.9	30	84.7	10
Caffeic acid	23	127.7	11.8	6	44.3	5.2
Ferulic acid	10	51.5	4.8	1	5.2	0.6
Phloridzin	4	9.2	0.8	2	4.6	0.5
Total amounts	714	2263.6	209	665	2807.2	332

Mixture A was prepared according to an anthocyanidins-rich juice, mixture B contained ingredients simulating a green tea/isoflavonoid-rich juice.

molar concentration of Cy-3-O-g (mixture A) and EGCG (mixture B). The highest DMSO concentration in the cell cultures was  $\leq 0.1\%$ .

### 2.2.3 *In vitro* culture of peripheral blood leucocytes

Peripheral blood leucocytes were isolated from an enriched cell preparation (Buffy coats obtained from whole blood of one blood donor), cryopreserved and genotyped for *hGSTT1* and *hGSTM1* polymorphisms as described above. In order to perform the *in vitro* experiments, the cells were thawed rapidly to avoid toxic impacts of the freezing medium and were washed once with PBS before using them in cell culture. We used and refined our previously described methods for long-term *in vitro* culture of peripheral human leucocytes [27]. The *in vitro* investigations were performed to assess putative mechanisms, using established and characterized *in vitro* cell culture techniques. Since the maximal exposure duration is self-evidently shorter than *in vivo* we included higher concentrations to have comparable doses (which are a function of both exposure times and of concentrations). We also included concentrations as those found in the plasma of subjects consuming polyphenols.

### 2.3 Parameters of toxicity

Cell integrity of the treated leucocytes was assessed with the CellTiter-Blue™ assay (Promega, Mannheim, Germany), a method which can be used for nonadherent cell suspensions, such as leucocytes, to estimate the number of viable cells. The CellTiter-Blue™ assay was used to study the effects of polyphenol mixtures on cell viability. This assay uses the dye resazurin that only viable cells reduce into the highly fluorescent resorufin. The assay was carried out in 96-well microtiter plates with fluorescence measurements (Tecan, Spectra Fluor Plus, Austria, Em/Ex 520/595 nm) at different time points, namely after 0–72 h.

Other types of cytotoxic effects of the polyphenol mixtures were investigated using the trypan blue exclusion assay, which measures the effects on membrane integrity. For the *in vitro* analysis, leucocytes were incubated in 96-well-plates with the two polyphenol mixtures for 0–72 h. Cells were stained with trypan blue, counted and checked for trypan blue staining (dead cells) or exclusion (viable cells) in a haemocytometer.

The ‘Comet Assay’, which reveals DNA damage on a single cell level, was performed, according to our described proce-

dures [27]. Leucocytes (final concentration  $2 \times 10^6$  cells/mL) were incubated with different concentration of polyphenols. One group of cells was treated with  $H_2O_2$  (75  $\mu$ M, 5 min), as the positive control.

### 2.3.1 Gene expression with c-DNA array

Leucocytes were precultured in T25 cell culture flasks for 24 h before treatment. Cells were harvested, centrifuged and fresh medium with the polyphenol mixtures was added to the cells ( $2 \times 10^6$  cells/mL). After 24 h cells were again harvested, centrifuged and the resulting cell pellets were washed twice with equal volumes of PBS. Total cellular RNA was isolated using RNeasy mini kit (Qiagen). Prior to *in vitro* reverse transcription steps the integrity of the isolated total RNA was checked by agarose formaldehyde denaturing gel electrophoresis. Two arrays each were used for RNA isolated from leucocytes of two independently reproduced experiments each consisting of a medium control, DMSO control and four treatment groups. Hybridization was performed on 112 sites (3 blanks, 3 negative reference spots, 10 household genes and 96 human genes related to drug metabolism) on cDNA gene macroarrays (GEArray Q Series Human Drug Metabolism Gene Array HS11, SuperArray® Bioscience Corporation, Frederick, MD, USA), as we have described before [32] according to the manufacturer's protocol. A detailed gene list is available on the company's website (<http://www.superarray.com/>). Raw data were normalized between 0 and 100% expression, where the signals of the means of the negative controls (areas without spotted gene sequences or with genes not expressed in human cells) equalled 0% and the means of the signals all spotted household genes were fixed to equal 100%.

### 2.3.2 Total GST activity measurements

Cells were treated with the polyphenol mixtures in different concentrations for 6 and 24 h and cytosol was obtained as described earlier [19]. Total GST activity in the cytosol was determined spectrophotometrically at 340 nm using 1 mM 1-chloro-2,4-dinitrobenzene and 1 mM glutathione as substrates at a temperature of 30°C [33].

### 2.3.3 Statistical analysis

The evaluation of all data was based on individual or mean values with cells from 24 human individuals or for the *in vitro* experiments from at least three independently reproduced experiments (one exception were the c-DNA arrays with  $n = 2$ ). The Prism software version 4.01 (Graph Pad, San Diego, USA) was used for establishing two-sided significance levels using paired or unpaired *t*-tests, with and without Welch's corrections for unequal and equal variances, respectively. Two- and one-way ANOVA with Bonferroni's post-test were used, as appropriate, and as indicated in the results sections. Treatment-related effects were considered statistically significant at  $p < 0.05$ .

## 3 Results

### 3.1 *Ex vivo* determinations

Leucocytes were available from 24 of the total 27 subjects that had originally participated in the intervention study [10]. Of these 12 consumed juice A and 12 consumed juice B in the first intervention phase and then switched to juice B/A in the second intervention phase. There were 17 subjects with *hGSTM1\*1*, 7 subjects with *hGSTM1\*0* genotypes and 17% were *hGSTT1\*0* carriers. Altogether, the numbers of subjects in these subgroups of polymorphisms were too small to assess possible differences in susceptibility. That is why we only aimed to discriminate some selected biological effects in drinkers of juices A and B, or of subsets with the *hGSTM1\*1* and *hGSTM1\*0* genotypes.

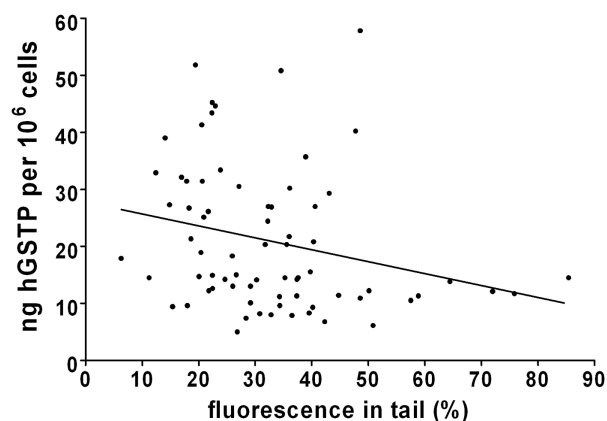
Table 2 shows the degrees of DNA damage and the levels of hGSTP1 protein expression in all 24 subjects or in the subgroups, it shows these two responses depending on the type of the consumed fruit juice or on the genotype. Since polyphenols may induce additional proteins other than hGSTP1, we chose to present the data as ' $\mu$ g hGSTP1 protein per  $10^6$  cells' since we have previously found this to be a more valid demonstration of inducibility than ' $\mu$ g hGSTP1 per total protein' [34]. It was apparent that there is a significant reduction of DNA damage in the leucocytes of all 24 donors after the second phase of intervention with the fruit juice, as had also been reported previously [10]. There were no differences between subjects just consuming juice A or B. There were also no differences between subjects with *hGSTM1\*1* and *hGSTM1\*0* genotypes. The only reason for the lacking significance of the results at week 8 in the *hGSTM1\*0* genotypes (after the second phase of the fruit juice intervention) was probably the limited number of subjects in this group (*hGSTM1\*0*,  $n = 7$ ; *hGSTM1\*1*,  $n = 17$ ).

hGSTP1 protein expression was relatively higher before the fruit juice intervention than after the first 2 wk of treatment and after the 2 wk wash out period (Table 2). It seemed as if both interventions resulted in an inhibition of hGSTP1 in the peripheral blood leucocytes for all subjects taken together. There were no differences of response between the two juice interventions. There were also no apparent differences when comparing the subgroups with the different genotypes, but again the limited number of samples from subjects with *hGSTM1\*0* genotype may be the reason for the lacking significance of the hGSTP1 increase at week 8. Altogether, the results point to an induction of hGSTP1 in peripheral leucocytes of subjects treated with the two fruit juices. This induction seemed to reflect an enhanced recovery of hGSTP1 protein subsequent to its initial inhibition following week 4 (after the first 2 wk of intervention with fruit juice) and week 6 (after the first wash out period). To see if there is any connection between DNA damage and hGSTP1 protein, we correlated hGSTP1

**Table 2.** DNA damage, expressed as '% fluorescence in tail'

Time point (week)	Parameter	Juice A			Juice B			All		<i>hGSTM1*1</i>		<i>hGSTM1*0</i>				
		Mean	SEM		Mean	SEM		Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM			
2	DNA damage	48	6		43	7.3		45	4.7		48	5.7	39	7.9		
4		41	6.7	n.s.	32	3.4	n.s.	37	3.8	n.s.	38	5.1	32	4.6	n.s.	
6		36	3.8	n.s.	34	4.4	n.s.	35	2.8	n.s.	35	3.8	35	3.4	n.s.	
8		26	2.8	$p = 0.0039$	27	3.4	$p = 0.0074$	27	2.1	$p = 0.0011$	26	2.7	$p = 0.0025$	29	3.4	n.s.
2	hGSTP1 ng/10 <sup>6</sup> cells	23	2.5		24	2.1		23	1.6		21	1.6	28	3.3		
4		14	2	$p = 0.0110$	15	1.5	$p = 0.0002$	15	1.2	$p < 0.0001$	15	1.5	$p = 0.0063$	13	2.2	$p = 0.0030$
6		14	2.2	$p = 0.0105$	15	2.1	$p = 0.0006$	15	1.5	$p = 0.0002$	12	1.4	$p = 0.0002$	19	3.5	n.s.
8		34	2.9	$p = 0.0106$ $p < 0.0001$	34	3.9	$p = 0.0341$ $p = 0.0004$	34	2.4	$p = 0.0009$ $p < 0.0001$	35	2.5	$p < 0.0001$ $p < 0.0001$	30	5.6	n.s.

Shown are mean values of endonuclease sensitive sites (consisting of DNA strand breaks, oxidized pyrimidines and other lesions) as determined using the comet assay with endonuclease III [54]). Total protein levels were  $8 \pm 1.2$  and  $7 \pm 0.8$   $\mu\text{g}/10^6$  cells for the volunteers consuming juices A and B, respectively. There was a significant increase of total protein ( $10 \pm 1.2$ ) in the cells of *hGSTM1\*1* genotypes, which was not considered to be of biological significance. Significant differences were assessed with unpaired *t*-test with Welch's correction for unequal variances. Numbers of volunteers were  $n = 12$  for juices A and B,  $n = 17$  for *hGSTM1\*1* and  $n = 7$  for *hGSTM1\*0*.



**Figure 1.** Individual strand breaks and oxidized pyrimidine bases versus hGSTP1 for all subjects ( $n = 24$ ) and time points, which are significantly different from week 2, namely weeks 4, 6 and 8 ( $n = 72$ ). The correlation (Spearman) is significant with  $p = 0.005$ .

levels against DNA damage using data from all time points that were significantly different from week 2, namely weeks 4, 6 and 8 ( $n = 72$ ). Figure 1 shows that hGSTP1 levels and DNA damage were inversely correlated with a  $p$ -value of 0.005.

### 3.2 *In vitro* determinations

*In vitro* determinations with isolated human peripheral blood leucocytes and with polyphenols mixtures, mimicking the composition of the fruit juices, were carried out to enhance our understanding of effects of polyphenols in these types of target cells. For this, however, we first needed to determine noncytotoxic concentration ranges. For all investigations the *hGSTT1* and *hGSTM1* polymorphisms were determined (13% *hGSTT1\*0* and 61% *hGSTM1\*0*), but due to small sample sizes we could not see any differ-

ences between the subgroups for the *in vitro* determinations.

Cell integrity of the leucocytes, treated with different concentrations of polyphenols, was assessed with the CellTiter-Blue™ assay. Solutions were prepared and added in amounts delivering concentrations of 0.1–40  $\mu\text{M}$  Cy-3-*O*-g or 0.1–40  $\mu\text{M}$  EGCG to the final solution ('Cy-3-*O*-g equivalents' or 'EGCG equivalents'), respectively, for mixtures A and B. The total polyphenol concentration available at, e.g., 40  $\mu\text{M}$  'equivalents' is shown in Table 1. Table 3 shows that cell viabilities decreased significantly by at the highest employed concentration of polyphenol mixture B (40  $\mu\text{M}$  EGCG-equivalents) and after the longest incubation periods (48 and 72 h). In comparison to mixture B, mixture A had a lower impact on cell viability.

Cytotoxic effects of the polyphenol mixtures were additionally directly investigated using the trypan blue exclusion assay, which measures the effects on membrane integrity. For the *in vitro* analysis, leucocytes were incubated with the two polyphenol mixtures and cell viability was measured as described in Section 2. After 2 h of incubation, the cells of the medium control had a viability of  $95 \pm 2\%$  and the cells of the DMSO control had a viability of  $92 \pm 3\%$ . These values were retained for up to 72 h of *in vitro* incubation, after which  $92 \pm 3\%$  viability was scored in the medium control and  $89 \pm 3\%$  in the DMSO control. Neither of the polyphenols had an effect on viability either, since even at the highest concentrations (40  $\mu\text{M}$  equivalents) and longest durations of treatment (72 h) with mixtures A and B, cells were still viable at  $91 \pm 4$  and  $87 \pm 2\%$ , respectively.

DNA damage was determined as a sensitive marker of toxic effects reflecting the loss of DNA integrity. Leucocytes were incubated for 1 or 24 h at 37°C with different concentration of polyphenols, yielding 0.1–40  $\mu\text{M}$  equivalents of Cy-3-*O*-g (mixture A) and EGCG (mixture B). There were

**Table 3.** Cell integrity, as measured using CellTiter-Blue™ assay, of human leucocytes after incubation with two polyphenol mixtures ( $n = 3$ )

	μM equivalents of reference compound	Duration of <i>in vitro</i> treatment											
		1 h		2 h		12 h		24 h		48 h		72 h	
		Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
Medium		100	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0
DMSO		121	25	98	4	102	11	107	7	112	22	97	0
Mixture A <sup>a)</sup>	0.1	110	12	100	5	102	8	112	17	112	13	99	9
	1	103	8	100	6	104	9	113	6	106	4	109	6
	5	103	7	102	3	101	3	110	9	102	4	103	3
	10	108	12	107	13	101	10	110	11	101	1	105	3
	20	106	8	94	5	102	13	103	8	102	3	102	7
	40	104	12	98	3	98	8	97	5	90	4	79	25
Mixture B <sup>b)</sup>	0.1	85	5	97	6	101	5	106	8	98	2	99	2
	1	96	8	102	5	102	8	109	9	98	2	98	2
	5	108	10	105	16	101	13	106	10	100	3	99	3
	10	102	6	103	4	97	7	104	7	94	8	92	7
	20	106	6	102	7	103	7	100	12	81	14	80	29
	40	114	22	98	7	96	16	79	20	44	42	34	44

Concentrations were calculated for equivalents of Cy-3-*O*-g (mixture A) and EGCG (mixture B) in μM.

a) Reference compound was of Cy-3-*O*-g.

b) Reference compound was EGCG. The results were not significantly different from each other (one-way ANOVA with Dunnett's multiple comparison post-test) with the exception of mixture B 40 μM for 48 h and 72 h ( $p < 0.01$ ).

no compound or time related increases of DNA damage (data not shown).

On the basis of the cytotoxicity measurements we were able to choose nontoxic but physiologically relevant concentrations for the gene expression analysis, which is an important requirement prior to assessing functional effects *in vitro* [35].

### 3.2.1 Gene expression with c-DNA array

To study functional effects, peripheral leucocytes were incubated for 24 h with 0.1 and 1 μM equivalents of Cy-3-*O*-g (mixture A) and EGCG (mixture B), equalling 0.52 and 0.83 μM or 5.2 and 8.3 μM total polyphenols for mixtures A and B, respectively (see Table 1). These incubation conditions and concentrations were noncytotoxic, as demonstrated above and are within the maximum plasma concentrations attained after a polyphenol-rich meal, (0.1–10 μM) [36]. Leucocytes expressed a number of genes related to drug metabolism. Of the 96 genes spotted on the membrane, 58 were expressed according to our guidelines (see Section 2). These included 11 of the 12 members of the GST family (*hGSTA2*, *hGSTA3*, *hGSTA4*, *hGSTM2*, *hGSTM3*, *hGSTM5*, *hGSTP1*, *hGSTT1*, *hGSTT2*, *hMGST2* and *hMGST3*) and three of the five spotted UGTs (*UGT1A1*, *UGT1A4* and *UGT2B10*), but only 9 of the 24 CYPs (*CYP2C9*, *CYP2C19*, *CYP2F1*, *CYP3A4*, *CYP3A5*, *CYP3A7*, *CYP4F3*, *CYP20A1* and *CYPOR*). On the basis of our gene-array results, *hGSTP1* is by far the major isoenzyme of all investigated *hGSTs*. Fold changes over the fac-

tor of 2, compared to the DMSO-control, were considered as regulated [32]. After incubation with mixture B (1 μM EGCG equivalents) seven genes (*ABCC2*, *CYP2F1*, *CYP3A4*, *CYP3A5*, *NNMT*, *SULT1C2* and *SULT2A1*) meets this criteria (Table 4). The *hGSTs* and *UGTs* spotted on the membrane gave sufficient signals to indicate that they were well expressed (see Supplementary Material), but the polyphenols only tended to up-regulate these genes.

### 3.2.2 Enzyme activity measurements

Freshly isolated leucocytes were used for these determinations, since our previous studies had shown that there was a loss of *hGSTP1* protein and of GST activity in cryopreserved cells [27]. Table 5 shows the enzyme activities in peripheral leucocytes incubated for 6 and 24 h with 0.1, 1, 10 and 40 μM equivalents of Cy-3-*O*-g (mixture A) and EGCG (mixture B). Neither of the polyphenol mixtures had an influence on GST activity. There was also no effect of the two mixtures on total protein content.

## 4 Discussion

Polyphenols inhibit DNA damage *in vivo* [10], although there are some studies with vegetable and fruits that do not show this association [37]. As has been discussed in detail, discrepancies could be due to type of polyphenols used during the intervention, the food matrix and bioavailability, dose and time point of analysis [38]. The present study how-



**Table 4.** Modulation of gene expression for genes related to drug metabolism in human leucocytes after incubation (24 h) with different polyphenol mixtures

Symbol	GeneBank	Description	Medium		DMSO		Mixture A 0.1 $\mu\text{M}^a$			Mixture A 1 $\mu\text{M}^a$			Mixture B 0.1 $\mu\text{M}^b$			Mixture B 1 $\mu\text{M}^b$		
			Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Fold change	Mean	SD	Fold change	Mean	SD	Fold change	Mean	SD	Fold change
ABCC2	NM_000392	ATP-binding cassette, subfamily C, member 2	48.7	50.2	51.6	57.3	38.7	64.0	0.8	72.3	88.2	1.4	66.4	68.5	1.3	119.2	127.3	<b>2.3</b>
CYP2F1	NM_000774	Cytochrome P450, family 2, subfamily F, polypeptide 1	32.4	16.7	24.6	17.6	13.4	12.2	0.5	22.6	1.7	0.9	36.2	30.5	1.5	51.8	17.7	<b>2.1</b>
CYP3A4	NM_017460	Cytochrome P450, family 3, subfamily A, polypeptide 4	7.9	1.8	7.8	3.0	4.4	2.8	0.6	9.9	6.4	1.3	13.6	3.3	1.7	17.8	9.4	<b>2.3</b>
CYP3A5	NM_000777	Cytochrome P450, family 3, subfamily A, polypeptide 5	5.8	2.5	5.8	6.5	5.3	4.0	0.9	7.7	5.4	1.3	8.4	4.2	1.5	14.8	11.7	<b>2.5</b>
MGST3	NM_004528	Microsomal GST 3	14.5	0.6	22.6	15.4	19.7	18.2	0.9	8.3	4.5	<b>0.4</b>	11.6	19.4	0.5	16.1	26.1	0.7
NNMT	NM_006169	Nicotinamide <i>N</i> -methyltransferase	45.3	22.2	36.5	5.6	27.7	3.5	0.8	47.0	3.5	1.3	45.8	6.6	1.3	73.8	3.0	<b>2.0</b>
SULT1C2	NM_006588	Sulphotransferase family, cytosolic, 1C, member 2	5.7	3.6	4.1	0.3	4.2	1.0	1.0	5.5	0.1	1.3	5.1	0.7	1.2	10.0	0.5	<b>2.4</b>
SULT2A1	NM_003167	Sulphotransferase family, cytosolic, 2A, member 1	5.6	2.6	4.1	0.9	5.7	2.2	1.4	6.4	2.4	1.5	5.5	0.1	1.3	9.9	3.7	<b>2.4</b>

a) Reference compound was Cy-3-*O*-g.

b) Reference compound was EGCG. The data are mean values  $\pm$  SD; fold changes were calculated to the DMSO control; fold changes below 0.5 and over 2 are marked bold;  $n = 2$ .

**Table 5.** Total GST enzyme activity (nM/min/ $10 \times 10^6$  cells) detected in peripheral blood leucocytes incubated with polyphenols mixtures for 6 and 24 h

	$\mu\text{M}$ equivalents of reference compound	Duration of <i>in vitro</i> treatment			
		6 h		24 h	
		Mean	SD	Mean	SD
		nmol/min/ $10 \times 10^6$ cells			
Medium		1.6	0.6	2.3	0.9
DMSO		3.1	0.6	2.5	1.2
Mixture A <sup>a)</sup>	0.1	2.4	0.9	2.5	0.6
	1	2.3	1	2.4	1
	10	3	0	2.6	0.6
	40			3.1	1.8
Mixture B <sup>b)</sup>	0.1	3	0.7	2.4	0.5
	1	2.6	0.4	3	1.1
	10	3.1	0.2	3	1.2
	40			2.3	0.6

a) Reference compound was Cy-3-*O*-g.

b) Reference compound was EGCG. The data are mean values  $\pm$  SD;  $n = 3$  for 6 h and  $n = 3$ –6 for 24 h duration of treatment. The results were not significantly different from each other (one-way ANOVA with Dunnett's multiple comparison post-test).

ever was based on a specific intervention trial. The outcome of the study was that the consumption of two fruit juices providing 236 and 226 mg/day polyphenols resulted in improved antioxidant status, reduced level of oxidative DNA damage and enhanced immune functions with no differences between the two juices [10]. Postintervention measurement of oxidized DNA bases revealed a similar level of oxidized DNA bases as compared to baseline, when subjects were neither receiving fruit juice supplementation

nor consuming a low-polyphenol diet. This may indicate that juice consumption was related to the reduction in DNA damage. The mechanisms however are not clear since both juices with totally different compositions (anthocyanin vs. green tea (catechins)) show identical results. This could mean that it was not the action of polyphenols thus was causing the effects but the fruit juice consumption itself. Even though the effects cannot be attributed to specific compounds of the juices, the findings are in line with our previous studies on the protective activities of vegetable juices using a similar set of biomarkers [29]. In another human intervention study with diabetic subjects the intake of polyphenol-rich food (110 mg/day) for 14 days also significantly reduced DNA damage in leucocytes [39], and other studies, *e.g.*, an human intervention study performed with red mixed berry juice showing these types of associations as well [26]. Here we were interested in determining whether a modulated state of chemoprotection reflected by an enhancement of toxicological defence systems, such as GSTs, contributes to these effects of reduced DNA damage.

We have previously determined that reduced genetic DNA damage in leucocytes may be due to the enhancement of cytosolic hGSTP1 by tomato and carrot juices [25]. In the present study, we now found that hGSTP1 is first suppressed in leucocytes obtained after the initial 2-wk intervention with the fruit juices. The suppression is still apparent after the first washout period. After another 2-wk period of intervention with the other fruit juice, however, hGSTP1 is then significantly induced. This confirms the previous observations on the time delay between the intake of polyphenols and other measurable and beneficial changes of

physiological functions [10]. The time point, at which hGSTP1 induction is significant, is the same as the time point of significant inhibition of oxidative DNA damage. This could suggest a causal relationship, at least for week 8 when the measurements were made. Before that there are no significant effects on DNA damage, but markedly reduced hGSTP1 levels. There was also a significant correlation ( $p = 0.005$ ) between hGSTP1 protein levels and oxidative DNA damage, which agrees well with other studies showing that increased hGSTP1 values were accompanied by a reduction of DNA damage in human leucocytes [40]. The immediate decrease of hGSTP1 protein expression is probably not due to the direct toxicity of the fruit juice polyphenols, since our *in vitro* studies do not indicate a particular vulnerability of the peripheral leucocytes after polyphenol incubation. However, also a treatment of K562 leukemia cells with the natural compound curcumin leads also to an inhibition of the hGSTP1 protein *via* AP-1 and NF $\kappa$ B transcription factors [41]. It is possible that this reduction is specific for human blood cells like leucocytes since also Persson *et al.* [42] reported a reduction of hGSTP1 on mRNA and protein level after 250 g of additional mixed vegetables *per day*.

As recommended previously for performing *in vitro* studies with polyphenols, our functional studies were carried out at concentrations within the range of the maximum concentrations that have been detected in plasma of human volunteers consuming a polyphenol-rich meal. These levels are reported to be in the range of 0.1–10  $\mu$ M [35]. For example, plasma EGCG levels were 0.17  $\mu$ M [43] or 0.72  $\mu$ M in humans consuming green tea solids (dissolved in water) [44]. We have previously shown that GST protein expression, namely hGSTT1, is inhibited by butyrate [45]. This observation in human colon adenoma cells was attributed to an enhanced degradation of *hGSTT1* mRNA thus reducing protein expression. Whether or not this could be a mechanism, by which the fruit juices first reduced hGSTP1 expression *in vivo* is not known, and the results of our *in vitro* investigations performed here do not support the mechanism.

Hepatic GSTs have been shown to be induced by carcinogenic xenobiotics, which however is not necessarily involved with a chemopreventive benefit [46]. Alternatively antioxidants or other anticarcinogenic xenobiotics may induce GSTs, which enables experimental animals to better tolerate exposure to carcinogens [47, 48]. Recent analysis for *GST* polymorphisms revealed heterogeneous associations indicating that the *GST* genotype could be associated with increases in cancer risks or that there were no associations, depending on tissue, on exposure situations and on coupling of polymorphisms for other genes [49–52].

The new findings presented here showed that oxidative DNA damage in response to polyphenol-rich fruit juices

were not different in *hGSTM1\*1* and *hGSTM1\*0* subjects. This is different from another study by our group where we did observe more leucocyte DNA damage in *hGSTM1\*0* than in *hGSTM1\*1* subjects ( $12.3 \pm 4.6$  vs.  $9.4 \pm 2.9$ ,  $p < 0.05$ ) after intervention with bread rich in prebiotics  $\pm$  antioxidants [53]. In the present study, the total levels of endonuclease III sites were higher, probably a reflection of higher activity of the batch of endonuclease III used in these studies, which was from a different source.

We have also recently shown that the continuous presence of EGCG can reduce radical induced DNA damage in primary leucocytes [27]. On the basis of the experimental protocol we were able to conclude that this is possibly due to a combination of different mechanisms. For one, it was hypothesized that EGCG may favourably modulate expression of antioxidative systems as could occur during the 18 h pretreatment and secondly it was concluded that EGCG could scavenge free radicals. Ellagic acid, ferulic acid, Brussels sprouts, quercetin,  $\alpha$ -angelicalactone, tannic acid, coumarin, fumaric acid, curcumin and flavone, separately, and combinations of  $\alpha$ -angelicalactone and flavone given to rats in the diet increased either hepatic or intestinal (proximal, mid and distal small intestine and colon) UGT enzyme activities, or both [13]. In the present study, we had addressed the question of whether UGTs could also be induced in peripheral leucocytes by polyphenols mixtures that were composed to mimic the fruit juices of the *in vivo* study. The original aim was to elucidate whether the specific polyphenols from fruit juice could contribute to mechanisms resembling chemopreventive activities. Since effects, however, were not found it will be necessary in the future to investigate also the whole juice (up to the limits of toxicity) and to identify additional components with similar biological activities in leucocytes, as well as in hepatocytes and in gastrointestinal cells.

In conclusion, here we have presented new *in vivo* evidence showing a modulated content of hGSTP1 protein in peripheral leucocytes from human subjects who had been consuming fruit juices with high levels of polyphenols. Interestingly, polyphenol mixtures that we composed to mimic the polyphenol concentrations in the juices did not modulate GSTs on mRNA and on enzyme activity level *in vitro*. They did not inhibit nor enhance expression of genes related to this group of enzymes. This could either be due to the *in vitro* situation, which is not able to mimic the delayed response observed *in vivo* (*e.g.*, 24 h exposure vs. 8 wk), or to the mixture of polyphenols, which may not contain the (as yet unidentified) key ingredients responsible for the effects on hGSTP1 by the complex whole fruit juice *in vivo*.

*The in vivo study was supported by a grant from Unilever-Bestfoods, Heilbronn, Germany. The in vitro studies on*

effects of polyphenols were supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (grant no. Po 284 9-1/9-2).

## 5 References

- [1] Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Remesy, C., Jimenez, L., *Am. J. Clin. Nutr.* 2004, 79, 727–747.
- [2] Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., Bolwell, P. G., Bramley, P. M., Pridham, J. B., *Free Radic. Res.* 1995, 22, 375–383.
- [3] Chen, Z. Y., Chan, P. T., Ho, K. Y., Fung, K. P., Wang, J., *Chem. Phys. Lipids* 1996, 79, 157–163.
- [4] Cao, G., Sofic, E., Prior, R. L., *Free Radic. Biol. Med.* 1997, 22, 749–760.
- [5] Lambert, J. D., Hong, J., Yang, G. Y., Liao, J., Yang, C. S., *Am. J. Clin. Nutr.* 2005, 81, 284S–291S.
- [6] Johnson, I. T., Williamson, G., Musk, S. R. R., *Nutr. Res. Rev.* 1994, 7, 175–204.
- [7] Wattenberg, L. W., *Cancer Res* 1992, 52, 2085s–2091s.
- [8] Duthie, S. J., Johnson, W., Dobson, V. L., *Mutat. Res.* 1997, 390, 141–151.
- [9] Duthie, S. J., Collins, A. R., Duthie, G. G., Dobson, V. L., *Mutat. Res.* 1997, 393, 223–231.
- [10] Bub, A., Watzl, B., Blockhaus, M., Briviba, K. *et al.*, *J. Nutr. Biochem.* 2003, 14, 90–98.
- [11] Hussain, S. P., Hofseth, L. J., Harris, C. C., *Nat. Rev. Cancer* 2003, 3, 276–285.
- [12] Surh, Y.-J., *Nat. Rev. Cancer* 2003, 3, 768–780.
- [13] van der Logt, E. M. J., Roelofs, H. M. J., Nagengast, F. M., Peters, W. H. M., *Carcinogenesis* 2003, 24, 10, 1651–1656.
- [14] Pool-Zobel, B., Veeriah, S., Bohmer, F. D., *Mutat. Res.* 2005, 591, 74–92.
- [15] Nijhoff, W. A., Peters, W. H. M., *Carcinogenesis* 1994, 15, 1769–1772.
- [16] Awasthi, Y. C., Sharma, R., Singhal, S. S., *Int. J. Biochem.* 1994, 26, 295–308.
- [17] Hayes, J. D., Pulford, D. J., *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 1995, 30, 445–460.
- [18] Beckett, G. J., Hayes, J. D., *Adv. Clin. Chem.* 1993, 30, 282–380.
- [19] Ebert, M. N., Beyer-Sehlmeyer, G., Liegibel, U. M., Kautenburger, T. *et al.*, *Nutr. Cancer* 2001, 41, 156–164.
- [20] Knoll, N., Ruhe, C., Veeriah, S., Sauer, J. *et al.*, *Toxicol. Sci.* 2005, 86, 27–35.
- [21] Hayes, J. D., Flanagan, J. U., Jowsey, I. R., *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2005, 45, 51–88.
- [22] Bell, D. A., Taylor, J. A., Paulson, D. F., Robertson, C. N. *et al.*, *J. Natl. Cancer Inst.* 1993, 85, 1159–1164.
- [23] Board, P. G., *FEBS Lett.* 1981, 135, 12–14.
- [24] Watson, M. A., Stewart, R. K., Smith, G. B., Massey, T. E., Bell, D. A., *Carcinogenesis* 1998, 19, 275–280.
- [25] Pool-Zobel, B. L., Bub, A., Liegibel, U. M., Treptow-van Lishaut, S., Rechkemmer, G., *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 1998, 7, 891–899.
- [26] Weisel, T., Baum, M., Eisenbrand, G., Dietrich, H. *et al.*, *Biotechnol. J.* 2006, 1, 388–397.
- [27] Gleib, M., Pool-Zobel, B. L., *Toxicol. In Vitro* 2005, 20, 295–300.
- [28] Pemble, S., Schroeder, K. R., Spencer, S. R., Meyer, D. J. *et al.*, *Biochem. J.* 1994, 300, 271–276.
- [29] Pool-Zobel, B. L., Bub, A., Müller, H., Wollowski, I., Rechkemmer, G., *Carcinogenesis* 1997, 18, 1847–1850.
- [30] Bradford, M. M., *Anal. Biochem.* 1976, 72, 248–254.
- [31] Schwarz, M., Hillebrand, S., Habben, S., Degenhardt, A., Winterhalter, P., *Biochem. Eng. J.* 2003, 14, 179–189.
- [32] Pool-Zobel, B. L., Selvaraju, V., Sauer, J., Kautenburger, T. *et al.*, *Carcinogenesis* 2005, 26, 1064–1076.
- [33] Habig, W. H., Pabst, M. J., Jakoby, W. B., *J. Biol. Chem.* 1974, 249, 7130–7139.
- [34] Treptow-van Lishaut, S., Rechkemmer, G., Rowland, I. R., Dolara, P., Pool-Zobel, B. L., *Eur. J. Nutr.* 1999, 38, 76–83.
- [35] Kroon, P. A., Clifford, M. N., Crozier, A., Day, A. J. *et al.*, *Am. J. Clin. Nutr.* 2004, 80, 15–21.
- [36] Manach, C., Williamson, G., Morand, C., Scalbert, A., Remesy, C., *Am. J. Clin. Nutr.* 2005, 81, 230S–242S.
- [37] Moller, P., Loft, S., Alftan, G., Freese, R., *Mutat. Res.* 2004, 551, 119–126.
- [38] Moller, P., Loft, S., *Am. J. Clin. Nutr.* 2002, 76, 303–310.
- [39] Lean, M. E. J., Noroozi, M., Kelly, I., Burns, J. *et al.*, *Diabetes* 1999, 48, 176–181.
- [40] Steinkellner, H., Hoelzl, C., Uhl, M., Cavin, C. *et al.*, *Mutat. Res.* 2005, 591, 264–275.
- [41] Duvoix, A., Morceau, F., Delhalle, S., Schmitz, M. *et al.*, *Biochem. Pharmacol.* 2003, 66, 1475–1483.
- [42] Persson, I., He, L., Fang, C., Normen, L., Rylander, R., *Cancer Causes Control* 2000, 11, 359–361.
- [43] Lee, M. J., Maliakal, P., Chen, L., Meng, X. *et al.*, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2002, 11, 1025–1032.
- [44] Yang, C. S., Chen, L., Lee, M. J., Balentine, D. *et al.*, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 1998, 7, 351–354.
- [45] Kautenburger, T., Beyer-Sehlmeyer, G., Festag, G., Haag, N. *et al.*, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 2005, 131, 692–700.
- [46] Talalay, P., Fahey, J. W., Holtzclaw, W. D., Prester, T., Zhang, Y., *Toxicol. Lett.* 1995, 82–83, 173–179.
- [47] Hayes, J. D., McLeod, R., Ellis, E. M., Pulford, D. J. *et al.*, *IARC Sci. Publ.* 1996, 139, 175–187.
- [48] Roebuck, B. D., Liu, Y. L., Rogers, A. R., Groopman, J. D., Kensler, T. W., *Cancer Res.* 1991, 51, 5501–5506.
- [49] Zheng, T., Holford, T. R., Zahm, S. H., Otieno, M. *et al.*, *Br. J. Cancer* 2003, 88, 68–62.
- [50] Ntais, C., Polycarpou, A., Ioannidis, J. P., *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2005, 14, 176–181.
- [51] Kampman, E., Slattery, M. L., Bigler, J., Leppert, M. *et al.*, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 1999, 8, 15–24.
- [52] Benhamou, S., Lee, W. J., Alexandrie, A. K., Boffetta, P. *et al.*, *Carcinogenesis* 2002, 23, 1343–1350.
- [53] Gleib, M., Habermann, N., Osswald, K., Seidel, C. *et al.*, *Biomarkers* 2005, 10, 203–217.
- [54] Collins, A. R., Duthie, S. J., Dobson, V. L., *Carcinogenesis* 1995, 14, 1733–1735.

**2.3 PUBLIKATION III: MODULATION OF DETOXIFICATION ENZYMES BY WATERCRESS – *IN VITRO* AND *IN VIVO* INVESTIGATIONS IN HUMAN PERIPHERAL BLOOD CELLS.** Thomas Hofmann, Anja Kuhnert, Antje Schubert, Chris Gill, Ian R. Rowland, Beatrice L. Pool-Zobel, Michael Gleis; *Eur J Nutr.* 2009 Jul 28 [Epub ahead of print]

In Publikation III wurden chemopräventive Eigenschaften der Wasserkresse, einem Mitglied der Familie der Kreuzblütengewächse, *in vitro* und *in vivo* untersucht. *In vitro* wurden PBMC mit einem Wasserkresseextrakt und mit einem Hauptinhaltsstoff der Wasserkresse, Phenethylisothiocyanat (PEITC), inkubiert. Ergebnisse einer humanen Interventionsstudie, wie die Aktivität der Enzyme SOD und GPX in roten Blutzellen, wurde in Abhängigkeit der GST-Genotypen neu ausgewertet. Nach *in vitro*-Inkubation von PBMC mit dem Wasserkresseextrakt oder PEITC zeigten sich signifikant erhöhte Genexpressionswerte für die Enzyme *GPX1* und *SOD2* und eine gesteigerte *SOD2*-Aktivität. Aufgrund hoher individueller Schwankungen zeigte die Wasserkresseintervention keine signifikanten Effekte auf die Genexpression in PBMC. Jedoch reagierten Blutzellen *in vivo* mit einer Zunahme der GPX- und der SOD-Aktivität in *GSTM1\*0*, aber nicht in *GSTM1\*1* Individuen. Die Studie zeigte, dass Wasserkresse in der Lage ist, Enzyme der Entgiftung wie SOD und GPX1 in Blutzellen *in vitro* und *in vivo* in Abhängigkeit der *GSTM1*-Genotypen zu modulieren. Eine Verbesserung der Entgiftungskapazität könnte demnach zu den chemopräventiven Eigenschaften von Inhaltsstoffen der Wasserkresse in einem Großteil der Bevölkerung beitragen.

Eigenanteil:

- Planung der Untersuchungen und Verfassung des Manuskriptes
- PBMC-Isolation und Zellkultur, RNA-Isolation, Genexpressionsuntersuchungen (Real-Time-PCR)
- Bestimmung der Polymorphismen für *in vitro*- und *in vivo*-Arbeiten
- Statistische Auswertung

# Modulation of detoxification enzymes by watercress: in vitro and in vivo investigations in human peripheral blood cells

Thomas Hofmann · A. Kuhnert · A. Schubert ·  
C. Gill · I. R. Rowland · B. L. Pool-Zobel ·  
M. Glei

Received: 3 March 2009 / Accepted: 2 July 2009  
© Springer-Verlag 2009

## Abstract

**Background** Epidemiological studies indicate that consumption of cruciferous vegetables (CV) can reduce the risk of cancer. Supposed mechanisms are partly the inhibition of phase I and the induction of phase II enzymes.

**Aim** The aim of this study was to investigate in vitro and in vivo effects of watercress (WC), a member of the CV family, on chemopreventive parameters using human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) as surrogate cells. We investigated the hypothesis that WC reduces cancer risk by inducing detoxification enzymes in a genotype-dependent manner.

**Methods** In vitro gene expression and enzyme activity experiments used PBMC incubated with a crude extract from fresh watercress (WCE, 0.1–10 µL/mL with 8.2 g WC per 1 mL extract) or with one main key compound phenethyl isothiocyanate (PEITC, 1–10 µM). From an in vivo perspective, gene expression and glutathione S-transferase (GST) polymorphisms were determined in PBMC obtained from a human intervention study in which

subjects consumed 85 g WC per day for 8 weeks. The influence of WC consumption on gene expression was determined for detoxification enzymes such as superoxide dismutase 2 (SOD2) and glutathione peroxidase 1 (GPX1), whilst the SOD and GPX activities in red blood cells were also analysed with respect to GST genotypes.

**Results** In vitro exposure of PBMC to WCE or PEITC (24 h) increased gene expression for both detoxification enzymes GPX1 (5.5-fold, 1 µL/mL WCE, 3.7-fold 1 µM PEITC) and SOD2 (12.1-fold, 10 µL/mL WCE, 7.3-fold, 10 µM PEITC), and increased SOD2 activity (1.9-fold, 10 µL/mL WCE). The WC intervention had no significant effect on in vivo PBMC gene expression, as high individual variations were observed. However, a small but significant increase in GPX ( $p = 0.025$ ) and SOD enzyme activity ( $p = 0.054$ ) in red blood cells was observed in *GSTM1\*0*, but not in *GSTM1\*1* individuals, whilst the *GSTT1* genotype had no impact.

**Conclusion** The results indicate that WC is able to modulate the enzymes SOD and GPX in blood cells in vitro and in vivo, and suggest that the capacity of moderate intake of CV to induce detoxification is dependent in part on the *GSTM1* genotype.

T. Hofmann (✉) · A. Kuhnert · A. Schubert ·  
B. L. Pool-Zobel · M. Glei  
Department of Nutritional Toxicology, Institute of Nutrition,  
Friedrich Schiller University Jena, Dornburger Str. 24,  
07743 Jena, Germany  
e-mail: th.hofmann@gmail.com

C. Gill  
Faculty of Life and Health Sciences,  
Northern Ireland Centre for Diet and Health (NICHE),  
Centre for Molecular Biosciences (CMB), University of Ulster,  
Coleraine BT52 1SA, Northern Ireland, UK

I. R. Rowland  
Department of Food Biosciences,  
University of Reading, Reading RG6 6AP, UK

**Keywords** Chemoprevention · Gene expression ·  
Enzyme activity · Detoxification enzymes · Watercress

## Introduction

A diet high in cruciferous vegetables (CV) is associated in a number of epidemiological studies with a reduced cancer risk at a number of sites including colon, lung, lymphatic system and possibly prostate [11, 20, 25, 44, 50]. Glucosinolates are sulphur compounds with one group derived

from glucose, which occur mainly in the plants of the family Cruciferae. Approximately, 115 different glucosinolates have been identified to date, which differ only in the chemical composition of the aglucone [16]. Smell, taste, as well as the biological effects of the cruciferous plants, are determined mainly by the active by-products of glucosinolates, e.g. isothiocyanates (ITCs), thiocyanates and nitriles [22]. These are released by hydrolysis of the glucoside by a  $\beta$ -thioglucosidase (myrosinase) found in vacuoles of CV and which is liberated by mechanical treatment (cutting or mastication) of the plant tissue. In humans, ITCs are metabolized primarily through the mercapturic acid pathway. GSTs facilitate the conjugation of ITC to glutathione and these glutathione conjugates are further metabolized to mercapturic acids by the sequential activity of  $\gamma$ -glutamyl-transpeptidase, cysteinylglycinase and *N*-acetyltransferase [20]. ITCs and their metabolites show anti-inflammatory activity [19], antibacterial activity [15] and especially cancer-preventive properties, where they are able to influence multiple stages of carcinogenesis. In addition to effects such as the inhibition of the cell growth by cell cycle arrest [45] and the induction of apoptosis [33], ITCs also influence the initiation stage through inhibition of phase I enzymes and induction of phase II enzymes [32, 40].

One important member of the CV and an excellent source for glucosinolates and other bioactive phytochemicals [28] is watercress (WC) (*Nasturtium officinale* or *Rorippa nasturtium-aquaticum*). Its main glucosinolate, gluconasturtiin, is formed via secondary metabolism of the plant from the amino acid phenylalanine and is converted by the myrosinase to phenethyl isothiocyanate (PEITC). The consumption of 57 g WC leads to a release of at least 12–15 mg PEITC measured in the urine [9]. PEITC has been reported to have several anti-carcinogenic effects including the inhibition of phase I enzymes and/or the activation of phase II enzymes [8]. For example, in the rat liver and colon, PEITC leads to an induction of the total GST activity [14, 43], such as the induction of the quinone reductase by 7-methylsulfinylheptyl-ITC and 8-methylsulfinyloctyl-ITC [35].

Human intervention studies that investigate the physiological effects of high WC consumption are rare. In pilot studies with smokers by Hecht et al. [17, 18], interventions with WC led to a higher excretion of the tobacco-specific lung carcinogen 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol and other nicotine-metabolites such as cotinine and 7-hydroxycotinine. The higher excretion of these carcinogens and their metabolites could be attributed to a reduction of cytochrome P450 enzymes or to an induction of UDP glucuronosyltransferases (UGT). Recent investigations by Gill et al. [10] reported that a supplementation with 85 g WC per day for 8 weeks was associated with a

reduced level of basal and hydrogen peroxide-induced DNA damage in lymphocytes.

Many studies show that cancer risk reduction by nutritional factor may be linked to specific polymorphisms. For CV, different authors examined the interaction between vegetable intake and *GST* polymorphisms in relation to cancer risk. The protective effect of CV seems to be more pronounced in individuals with a genetic null polymorphism of *GSTM1* and/or *GSTT1* [6, 25, 36]. Because GSTs are involved in the conjugation of ITCs and the rapid excretion in urine, the results suggest that individuals could profit by the absence of certain GST enzyme activities, as this would result in longer circulation of the ITCs in the body. In turn, this could allow further chemical interaction of ITC metabolites with signalling peptides and also enhance the protective effects in vivo [24, 41].

Biomarkers have considerable potential in aiding the understanding of the relationship between diet and disease or health [5]. A number of recent reports show that the latest technologies of genomics have initiated a new era of biomarker development, also for cancer detection, treatment and prevention. Here, different biomarker applications are based on blood cells such as peripheral blood mononuclear cells (PBMC), since they are obtained less invasively than biopsies and can be used as surrogate tissues that may mimic effects occurring in remote target tissues of exposure [34]. In vitro, the cells can be used as a human primary cell model, which, maybe, best mimics the human physiological conditions.

The aim of this study was to investigate in vitro and in vivo effects of WC and one of its main key compounds, PEITC, on chemopreventive parameters in human blood cells as surrogate tissue for target organs, which require more invasive sampling methods [34]. Within the primary prevention of cancers in humans, the modulation of detoxification enzymes by a high consumption of WC could be quite important. In vitro, we investigated the expression of key genes related to biotransformation and detoxification [*GPX1*, *SOD2*, catalase (*CAT*), glutathione *S*-transferase M1 (*GSTM1*), glutathione *S*-transferase P1 (*GSTP1*), UDP glucuronosyltransferase 1A1 (*UGT1A1*)] in PBMC treated with a crude WCE and PEITC. For in vivo investigations, we used biological samples (cryo-preserved PBMC) from a previously reported human intervention study with WC [10] and analysed the expression profiles of the aforementioned genes. Additionally, we determined *GST* polymorphisms to assess the link between these genetic factors and the induction of SOD and GPX enzyme activity by a WC intervention. These two enzymes could provide mechanistic explanations for the reported reduction of DNA damage in PBMC after WC consumption.

## Materials and methods

### Test substances (in vitro)

Phenethyl isothiocyanate (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Germany) was diluted in ethanol to yield a stock solution of 100 mM and was further diluted in cell culture medium to yield the working solutions of 1 and 10  $\mu$ M. The final ethanol concentration in the two PEITC working solutions was 0.01%.

### Preparation of the watercress extract (in vitro)

The WCE used in the in vitro study was produced as described by Boyd et al. [3]. Briefly, fresh WC was chopped into pieces, homogenized in a Cookworks juice maker machine for 10 min at 4 °C; subsequently the juices were centrifuged (9,000g, 10 min, 4 °C), and the supernatant was decanted, filter sterilized (0.45  $\mu$ m and then 0.22  $\mu$ m) and aliquoted. This single batch preparation with a concentration of 8.2 g WC per 1 mL extract was stored at -70 °C and used for all experiments.

### Preparation of PBMC and cell culture (in vitro)

A fraction of mononuclear cells was isolated from several anonymous buffy coat preparations by gradient centrifugation using HISTOPAQUE<sup>®</sup>-1077 (Sigma, Deisenhofen, Germany) as described earlier [12]. Cells were kept in cell culture medium [RPMI 1640 medium (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Germany) with 10% heat-inactivated FCS, 1% penicillin/streptomycin and 1% L-glutamine (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Germany)] overnight, prior to incubation. Since SOD2 is manganese dependent, we added a “Trace Element Mix” (PromoCell, Heidelberg, Germany) with manganese ( $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 0.17  $\mu$ g/L) for measuring SOD2 activity. For all experiments, the cell number was adjusted to  $4 \times 10^6$  cells/mL and PBMC (mean viability 95%) were then incubated with the test substances.

### Cytotoxicity (in vitro)

Cell numbers and viabilities were determined before and after treatment of PBMC using a trypan blue solution (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Germany). Cell integrity of the treated PBMC was assessed with the CellTiter-Blue<sup>™</sup> assay (Promega, Mannheim, Germany) to estimate the number of viable cells. This assay uses the dye resazurin that only viable cells reduce into the highly fluorescent resorufin. The assay was carried out in 96-well microtiter plates with fluorescence measurements (Tecan,

Spectra Fluor Plus, Austria, Em/Ex 520/595 nm) at different time points, namely after 2–72 h.

### RNA isolation

Total RNA from PBMC was isolated using RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany), dissolved in 50  $\mu$ L RNase free water and stored at -20 °C. RNA quantification was done spectrophotometrically (Eppendorf BioPhotometer, Hamburg, Germany) and formaldehyde denaturing RNA gel electrophoresis (1.5%) was used to check the integrity of the ribosomal RNA and for DNA contamination before proceeding with real-time PCR.

### Real-time PCR analysis (in vitro and in vivo)

Gene expression of *CAT*, *GPX1*, *GSTA4*, *GSTP1*, *SOD2*, *UGT1A1* and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) was assessed by two-step SYBR Green I relative real-time PCR (iCycler iQ system, Bio-Rad GmbH, Munich, Germany). Briefly, total RNA (1  $\mu$ g for in vitro and 0.25–1  $\mu$ g for in vivo experiments) was converted into first-strand cDNA using SuperScript<sup>™</sup> First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Germany). Using oligo(dT) leads to specific transcriptions of mRNA. The PCR amplification reactions contained 2  $\mu$ L of first-strand cDNA mixed with 12.5  $\mu$ L of iQ<sup>™</sup> SYBR<sup>®</sup> Green Supermix (Bio-Rad GmbH, Munich, Germany) master mixture (2 $\times$  mix containing SYBR Green I, iTaq DNA polymerase, reaction buffer, deoxynucleotide triphosphate mix, 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 20 nM fluorescein and stabilizers) and 10 pmol stock of each of the specific primers in a final reaction volume of 25  $\mu$ L. All reactions were performed in duplicate and product-specific amplification was confirmed by melting curve analysis. The fluorescence threshold value ( $C_T$ ) was calculated using the iCycler iQ optical v3.0a system software. The relative quantification of mRNA expression was calculated with the comparative  $\Delta\Delta C_T$  ( $\Delta\Delta C_T = \Delta C_{T\text{control}} - \Delta C_{T\text{experiment}}$ ) method. For normalization,  $\Delta C_T$  values were calculated by subtracting the average of the  $C_T$  value in the control for the reference gene from the average of the  $C_T$  value for the target gene and subtracting the average of the  $C_T$  value in the treated sample of the reference gene (*GAPDH*) from the target gene. Then, the difference between the  $\Delta C_T$  values of control and treatment ( $\Delta\Delta C_T$ ) was calculated. The fold change was calculated according to the efficiency method ( $\Delta\Delta C_T$  method) where it is assumed that the PCR efficiency is 100% [30, 31]. The coefficients of variation for genes reported in this paper were 0.9% for *GAPDH*, 1.0% for *SOD2* and 1.1% for *GPX1*. Gene-specific primer sequences used for the quantification can be seen in Table 1.



**Table 1** Primer sequences (F forward, R reverse) for real-time PCR, primers designed by using PerlPrimer v1.1 software

Gene name	Locus ID	Primer sequences 5'–3'	Amplicon size (bp)
<i>CAT</i>	MN_001752	F TGG ACA AGT ACA ATG CTG AG	144
		R TTA CAC GGA TGA ACG CTA AG	
<i>GPX1</i>	MN_000581	F GAC TAC ACC CAG ATG AAC GA	133
		R ACG TAC TTG AGG GAA TTC AG	
<i>GSTA4</i>	MN_001512	F CCG GAT GGA GTC CGT GAG ATG G	131
		R CCA TGG GCA CTT GTT GGA ACA GC	
<i>GSTP1</i>	MN_000854	F CTG CGC ATG CTG CTG GCA GAT C	149
		R TTG GAC TGG TAC AGG GTG AGG TC	
<i>SOD2</i>	MN_000636	F GCC CTG GAA CCT CAC ATC AAC	111
		R CAA CGC CTC CTG GTA CTT CTC	
<i>UGT1A1</i>	MN_000463	F TCA TGC TGA CGG ACC CTT TC	145
		R CTG GGC ACG TAG GAG AAT GG	
<i>GAPDH</i>	MN_002046	F ACC CAC TCC TCC ACC TTT GAC	110
		R TCC ACC ACC CTG TTG CTG TAG	

Primer pairs were verified by normal PCR with gene-specific amplicon

#### Measurement of total protein and of SOD2 activity in PBMC (in vitro)

In vitro changes of the SOD2 activity in PBMC were measured with the Calbiochem® Superoxide Dismutase Assay Kit II (Merck Chemicals Ltd, Darmstadt, Germany), which utilizes a tetrazolium salt for the detection of superoxide radicals generated by xanthine oxidase and hypoxanthine. The addition of 3 mM potassium cyanide to the assay inhibits both SOD1 and SOD3, resulting in the detection of only SOD2 activity. Total protein content was measured using the method by Bradford with bovine serum albumin as standard protein [4].

#### Polymorphisms (in vitro and in vivo)

Null polymorphisms for *GSTM1* and *GSTT1* were determined by multiplex PCR using original procedures [2, 29].

#### Study design (in vivo)

The study was a single blind randomized crossover trial in 60 subjects as described in detail by Gill et al. [10]. The study received approval of an independent ethical committee and subjects gave their informed consent to participate. Briefly, during the first phase of the study, the volunteers were randomly assigned to either the treatment (WC supplemented) or control group. During the treatment phase, the subjects consumed one portion (85 g) of raw WC daily for 8 weeks in addition to their normal diet. During the control phase (8 weeks), the subjects were asked to maintain their habitual diet. The control and the treatment phases were separated by a 7-week washout phase. The WC used for this intervention study was a commercially available product produced by Vitacress Ltd

(Southampton, UK). The subjects were supplied with fresh WC (85 g bag/day) during the supplementation phase. Fasting blood samples were collected before and after each phase (week 0, week 8, week 15 and week 23). PBMC were isolated by using Histopaques-1077, according to the manufacturer's instructions (Sigma Diagnostics, St Louis, MO, USA). Red cell concentrate (RCC) and plasma samples were also prepared.

#### GPX and SOD activity in red blood cell (in vivo)

Measurements of GPX and SOD activity in RCC were performed by Gill et al. [10] using two commercial kits (RANSEL kit for GPX and RANSOD kit for SOD; Randox Laboratories Ltd, Crumlin, CO Antrim, UK) according to the manufacturer's instructions.

#### Statistics (in vivo and in vitro)

The Prism software version 5.01 (Graph Pad, San Diego, USA) was used for two-sided paired and unpaired *t* test and one-way or two-way ANOVA with Bonferroni's multiple comparison test with selected pairs.

## Results

#### Cytotoxicity of the test substances

Effects of WCE on isolated PBMC were investigated in vitro. Therefore, we first needed to establish non-cytotoxic concentration ranges. The concentrations of 10 and 50 µL/mL of WCE caused significant time and concentration-dependent reduction of metabolic activity in PBMC (Table 2). The highest concentration at which there were



**Table 2** Effects of treatment with the watercress extract on cell viability measured with CTB ( $n = 6$ ) and with trypan blue ( $n = 4$ )

	0.1 $\mu\text{L/mL}$ WCE			1 $\mu\text{L/mL}$ WCE			5 $\mu\text{L/mL}$ WCE			10 $\mu\text{L/mL}$ WCE			50 $\mu\text{L/mL}$ WCE											
	Trypan blue		CTB	Trypan blue		CTB	Trypan blue		CTB	Trypan blue		CTB	Trypan blue		CTB									
	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM								
Control	89	4	99	2	90	5	96	1	90	4	99	1	90	4	103	3	89	5	111	3	91	4		
2 h	100	0	89	4	99	2	90	5	96	1	90	4	99	1	90	4	99	2	91	4	99	2	91	4
24 h	100	0	92	3	102	1	102	2	93	3	99	2	91	4	97	3	90	3	47	3***	89	4	89	4
48 h	100	0	92	2	104	5	102	6	88	4	99	5	91	3	82	5**	89	4	6	5***	85	5	85	5
72 h	100	0	89	3	102	3	95	4	88	3	78	5***	89	2	58	11***	85	3	2	11***	74	3*	74	3*

For CTB, the controls without test substance (left column) were set at 100%. Statistical analysis was performed with two-way ANOVA and Bonferroni's post-test, \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$

negligible changes in viability (trypan blue) after 72 h was 10  $\mu\text{L/mL}$  WCE. After 24 h, the time period which was used for further experiments, no cytotoxic effects could be observed at 0.1, 1 and 10  $\mu\text{L/mL}$ .

Modulation of gene expression in vitro

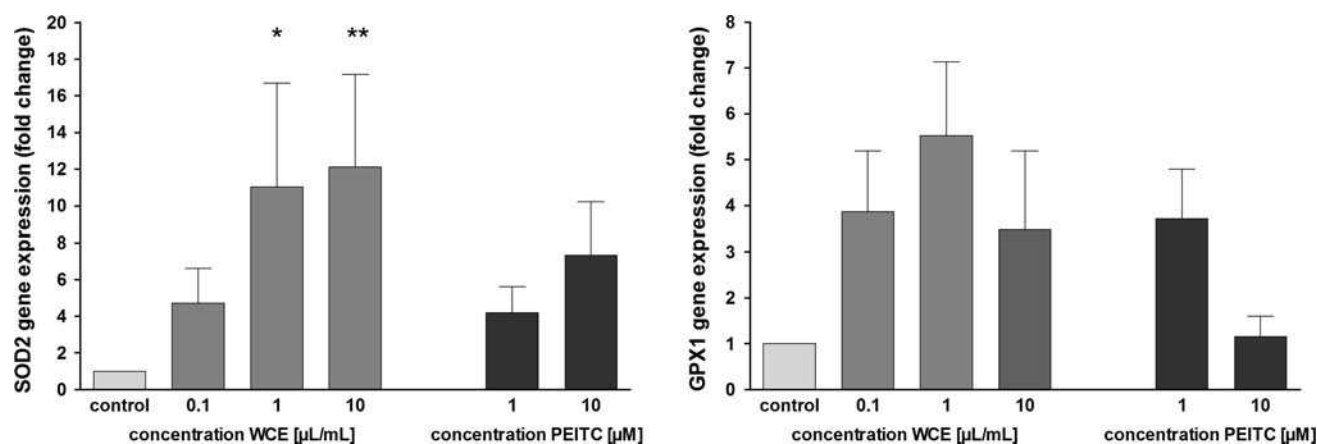
Peripheral blood mononuclear cells were exposed (24 h) to non-toxic concentrations of WCE (0.1, 1, 10  $\mu\text{L/mL}$ ) and PEITC (1 and 10  $\mu\text{M}$ ). Each independent incubation was performed with PBMC from a different donor. According to the investigations of Kassie et al. [21] the highest concentration of the WCE (10  $\mu\text{L/mL}$ ) is equivalent to roughly 1.5  $\mu\text{M}$  PEITC. Incubation of cells with WCE and with PEITC resulted in a dose-dependent increase of *SOD2* gene expression, which was significant for 1  $\mu\text{L/mL}$  WCE (10-fold,  $p < 0.05$ ) and 10  $\mu\text{L/mL}$  WCE (12-fold,  $p < 0.01$ ) of the extract (Fig. 1). Furthermore, PEITC increased *SOD2* up to sevenfold compared to the control, but without reaching significance. *GPX1* could be modulated, but due to the high interindividual differences, the results did not reach statistical significance. For *CAT*, *GSTP1*, *GSTA4* and *UGT1A1*, no changes in gene expression could be detected after treatments (data not shown).

In vitro SOD2 activity

Peripheral blood mononuclear cells showed a basal SOD2 activity of 110 mU/mg protein. After PBMC incubation with the WCE, a dose-dependent increase of SOD2 activity could be detected (Fig. 2). The highest induction (mean fold change 1.96,  $n = 4$ ) could be seen after incubation with 10  $\mu\text{L/mL}$  WCE and an incubation time of 24 h. For PEITC, no regulatory changes in enzyme activity could be observed.

In vivo gene expression

In vitro exposure of PBMC resulted in up-regulation of candidate genes; however, the effect of WC consumption on PBMC expression in vivo was more varied. Gene expression investigations in PBMC were performed from a randomly selected subset ( $n = 10$ ) of all male subjects as a pilot study. The results showed high inter-individual variations for all genes investigated (*CAT*, *GPX1*, *GSTA4*, *GSTP1*, *SOD2*, *UGT1A1*), though intra-individual variation of expression during the course of the study was small. The gene expression profiles for *SOD2* and *GPX1* for the control and the intervention period are shown in Fig. 3. The WC intervention had no significant effect on the expression of all genes, neither when subjects were evaluated as subgroups according to GST genotypes (*GSTM1\*0* and



**Fig. 1** Changes in gene expression related to *GAPDH* as reference gene for *SOD2* and *GPX1* in PBMC after treatment (24 h) with a watercress extract and with PEITC measured with real-time PCR;

mean  $\pm$  SEM;  $n = 5$ . Statistical analysis was performed with one-way-ANOVA/Bonferroni post-test, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$

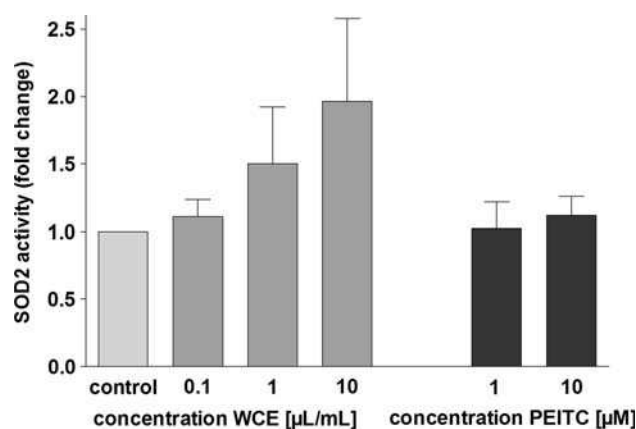
*GSTT1\*0*) nor to smoking behaviour. On this account, we refrained from analysing the whole study population.

#### GPX and SOD activity in red blood cells

As Gill et al. [10] already demonstrated, there were no changes of GPX and SOD activities in red blood cells in response to the WC intervention in the total population. We determined *GSTM1* and *GSTT1* polymorphisms and subdivided the original data. Out of 60 subjects, 44 had the *GSTM1\*0* genotype (73%), seven the *GSTT1\*0* genotype (12%) and six subjects were null for both enzymes (10%). Figure 4 summarizes GPX and SOD activities in RCC of totals (already published by Gill et al.) and subgroups. Interestingly, there was a significant up-regulation of the GPX activity ( $p = 0.025$ ) in *GSTM1\*0* individuals. The same trend was also detectable for SOD activity ( $p = 0.054$ ). For *GSTM1\*1* individuals, a non-significant trend for decreased SOD and GPX activities after WC intervention could be detected. This result is unclear and needs further investigations.

#### Discussion

In many cell culture experiments and studies in animals, a variety of plant-food constituents have been identified as inducers of phase II enzymes and as potential chemopreventive agents. For WC, it has been reported that constituents from this plant reduced oxidative DNA damage in blood cells and also lowered levels of DNA damage induced by genotoxic agents [3, 10]. In this present study, we have demonstrated that blood cells respond in vitro as well as in vivo to active substances within WC. This resulted in the activation of an apparent oxidative stress

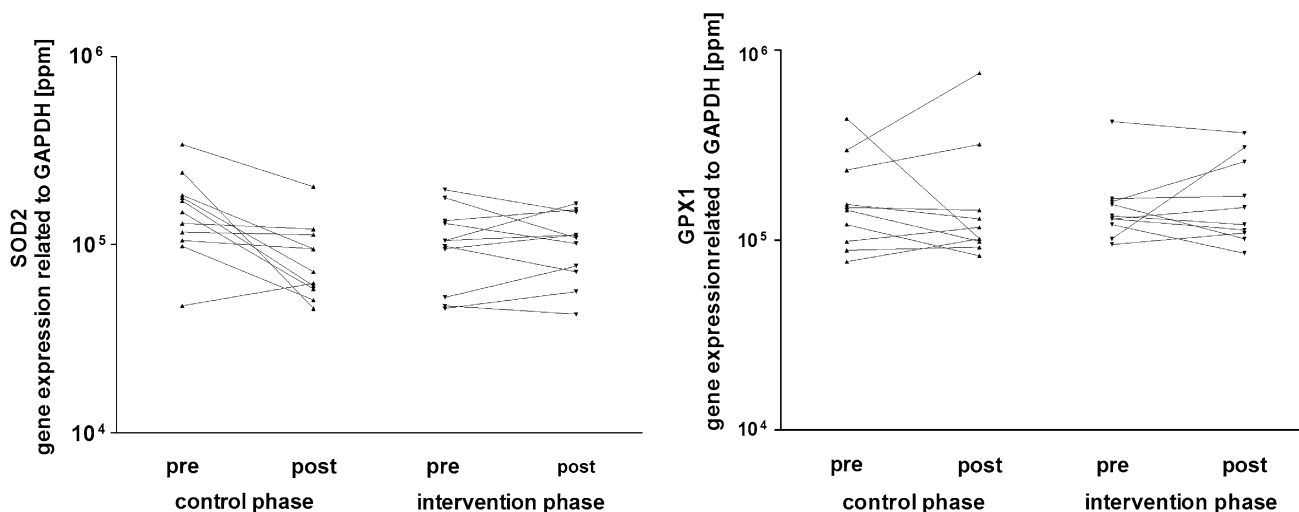


**Fig. 2** Changes in SOD2 enzyme activity in PBMC after treatment (24 h) with a watercress extract and with PEITC; mean  $\pm$  SEM;  $n = 4$

response involving up-regulation of GPX and SOD expression, which could also be an explanation for the reported modulations in DNA damage.

High concentrations (50  $\mu\text{L/mL}$ ) of WCE strongly suppressed the metabolic activity measured with the cell titre-blue assay in PBMC almost to undetectable levels. Notably, only slight reductions in viability measured with trypan blue at high WCE concentrations were seen and no reduction in cell number could be detected. The highest concentration of the WCE appears not to be physiological for blood cells and was not used for further experiments.

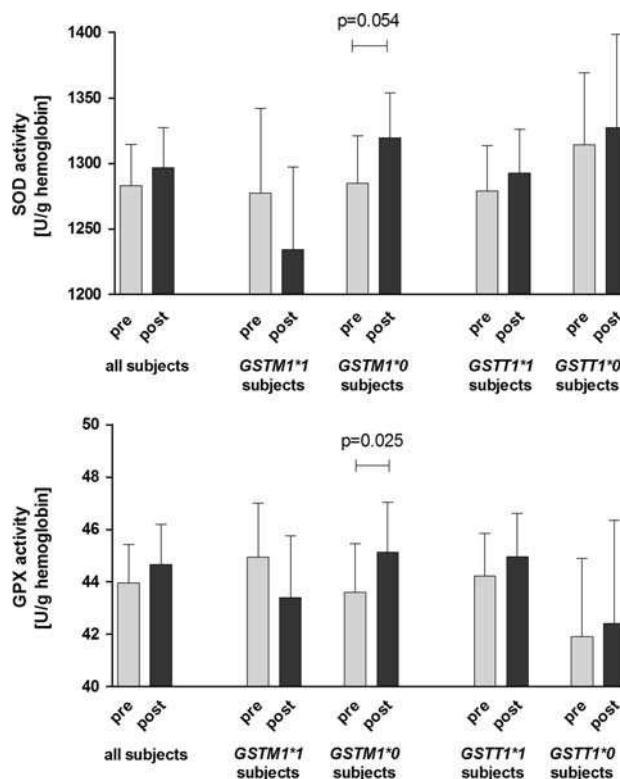
In vitro, important detoxification enzymes such as *SOD2* and *GPX1* were highly up-regulated by the WCE and also by PEITC in our study. Mitochondrial SOD2 is a homotetramer containing one manganese atom per subunit and is indispensable to life [26]. SOD2 is often considered as one of the most effective antioxidant enzymes that has anti-tumour activity [1, 42]. Furthermore, SOD2 should not only be regarded as an antioxidative enzyme, but also as a



**Fig. 3** Changes in gene expression for *SOD2* and *GPX1* in PBMC after a watercress intervention [10] measured with real-time PCR; shown is a randomly selected subset of donors;  $n = 10$

key enzyme involved in the maintenance of the cellular redox state and thereby in the biological status of cells and tissues [7]. In several studies, low activity and expression of SOD2 is linked to tumour development and phenotype [38, 39, 47]. The expression of SOD2 is also inducible by many dietary factors such as alcohol, retinoic acid and alpha-tocopherol and is mediated by nuclear factor NF-kappaB [48]. The *SOD2* up-regulation in this study showed high variation between the individual blood donors which ranged from a 1.4- to a 32.0-fold induction, which could in part be due to differences in genetic polymorphisms. Further investigations for SOD2 on protein level (immunoblot, data not shown) and on activity level revealed only slight changes. The WCE increased SOD2 activity almost two-fold, whilst PEITC had no impact. This may be due to the potential influence of further bioactive WC constituents such as quercetin glycosides or hydroxycinnamic acids [3]. Discrepancies between the mRNA and protein levels of the SODs have also been reported by others, where the mRNA induction did not correspond to the augmentation of the protein level or of the enzyme activity [13, 27]. All results were explained by a translational block for the synthesis of SOD2. In contrast to these findings, Yazdanparast et al. [49] observed in vivo that a treatment of hypercholesterolaemic rats, with a WCE, significantly enhanced SOD activities in liver tissues; van Lieshout et al. [43] reported a GPX induction by PEITC in rats. This result is comparable to our findings, since the lower PEITC concentration (1  $\mu\text{M}$ ), which can be reached after WC ingestion, induced *GPX1* gene expression 3.7-fold.

In our experiments, we investigated the hypothesis: whether there is a link between *GST* polymorphisms and the induction of SOD and GPX in vivo. GSTs are involved in the conjugation of the bioactive compounds such as the



**Fig. 4** Changes in enzyme activity for SOD and GPX in red blood cells after a watercress intervention [10]; mean  $\pm$  SEM from all subjects ( $n = 60$ ) and subjects subdivided for *GST* polymorphisms (*GSTM1*\*0  $n = 44$ , *GSTM1*\*1  $n = 16$ , *GSTT1*\*0  $n = 7$ , *GSTT1*\*1  $n = 53$ ). Statistical analysis was performed with two-tailed, paired *t* test. The GPX and the SOD results were standardized to red cell concentrate hemoglobin concentration, and the final results were expressed in U/g hemoglobin

ITCs in CV, and several studies have examined the relationship between CV intake and *GST* polymorphisms. Based on the current understanding, individuals with *GST*

null genotypes, especially with the *GSTM1\*0* genotype, conjugate ITCs less readily and excrete bioactive compounds more slowly. Thus, these subjects should have greater amounts at tissue level, with a potentially greater benefit for the individual. But the data are still controversial, since epidemiological studies tend to support this hypothesis by finding the greatest risk reduction in CV consumers with the null or less active *GST* genotypes [25, 51], whilst other studies found a greater risk reduction amongst subjects with the most active or expressed genotypes [37, 46]. In this study, we have seen in vivo an up-regulation of detoxification enzymes only in *GSTM1\*0* subjects. It is most likely that this marginal enzyme activity induction of SOD or GPX in blood cells has minor chemopreventive effects. However, the consequence for other tissues is not clear, since effects in blood cells could be smaller than in other tissues. Lampe et al. [23] also reported just slightly elevated GST $\alpha$  activity after brassica vegetable diets by 26% and total GST activity by 7% in the *GSTM1\*0* individuals, particularly women. The higher effects compared to our study could be explained by the more tightly controlled basal diet (vegetable free) and a supplementation at a much higher level.

In summary, our study demonstrates that an extract from WC modulates gene expression in human PBMC in vitro and that this is also reflected in a modulation of enzyme activity in vivo, particularly in individuals with the *GSTM1\*0* genotype. Questions for further studies will be to elucidate whether this modulation of SOD and GPX enzyme activity by CV is directly associated with anti-genotoxic effects and if the changes in the blood cells reflect changes that occur in other target tissues.

**Acknowledgments** The watercress intervention study was supported by Vitacress Ltd, Geest Plc, and the Watercress Company.

## References

- Behrend L, Henderson G, Zwacka RM (2003) Reactive oxygen species in oncogenic transformation. *Biochem Soc Trans* 31:1441–1444
- Bell DA, Taylor JA, Paulson DF, Robertson CN, Mohler JL, Lucier GW (1993) Genetic risk and carcinogen exposure: a common inherited defect of the carcinogen-metabolism gene glutathione *S*-transferase M1 (*GSTM1*) that increases susceptibility to bladder cancer. *J Natl Cancer Inst* 85:1159–1164
- Boyd LA, McCann MJ, Hashim Y, Bennett RN, Gill CI, Rowland IR (2006) Assessment of the anti-genotoxic, anti-proliferative, and anti-metastatic potential of crude watercress extract in human colon cancer cells. *Nutr Cancer* 55:232–241
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254
- Branca F, Hanley AB, Pool-Zobel BL, Verhagen H (2001) Biomarkers in disease and health. *Br J Nutr* 86:S55–S92
- Brennan P, Hsu CC, Moullan N, Szeszenia-Dabrowska N, Lisowska J, Zaridze D, Rudnai P, Fabianova E, Mates D, Bencko V, Foretova L, Janout V, Gemignani F, Chabrier A, Hall J, Hung RJ, Boffetta P, Canzian F (2005) Effect of cruciferous vegetables on lung cancer in patients stratified by genetic status: a Mendelian randomisation approach. *Lancet* 366:1558–1560
- Buettner GR, Ng CF, Wang M, Rodgers VG, Schafer FQ (2006) A new paradigm: manganese superoxide dismutase influences the production of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in cells and thereby their biological state. *Free Radic Biol Med* 41:1338–1350
- Canistro D, Croce CD, Iori R, Barillari J, Bronzetti G, Poi G, Cini M, Caltavuturo L, Perocco P, Paolini M (2004) Genetic and metabolic effects of gluconasturtiin, a glucosinolate derived from Cruciferae. *Mutat Res* 545:23–35
- Chung FL, Morse MA, Ekland KI, Lewis J (1992) Quantitation of human uptake of the anticarcinogen phenethyl isothiocyanate after a watercress meal. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1:383–388
- Gill CI, Haldar S, Boyd LA, Bennett R, Whiteford J, Butler M, Pearson JR, Bradbury I, Rowland IR (2007) Watercress supplementation in diet reduces lymphocyte DNA damage and alters blood antioxidant status in healthy adults. *Am J Clin Nutr* 85:504–510
- Giovannucci E, Rimm EB, Liu Y, Stampfer MJ, Willett WC (2003) A prospective study of cruciferous vegetables and prostate cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 12:1403–1409
- Glei M, Liegibel UM, Ebert MN, Böhm V, Pool-Zobel BL (2002)  $\beta$ -Carotene reduces bleomycin-induced genetic damage in human lymphocytes. *Toxicol Appl Pharmacol* 179:65–73
- Gomi F, Matsuo M (2002) Effects of 60% oxygen inhalation on the survival and antioxidant enzyme activities of young and old rats. *Mech Ageing Dev* 123:1295–1304
- Guo Z, Smith TJ, Wang E, Sadrieh N, Ma Q, Thomas PE, Yang CS (1992) Effects of phenethyl isothiocyanate, a carcinogenesis inhibitor, on xenobiotic-metabolizing enzymes and nitrosamine metabolism in rats. *Carcinogenesis* 13:2205–2210
- Haristoy X, Fahey JW, Scholtus I, Lozniewski A (2005) Evaluation of the antimicrobial effects of several isothiocyanates on *Helicobacter pylori*. *Planta Med* 71:326–330
- Hayes JD, Kelleher MO, Eggleston IM (2008) The cancer chemopreventive actions of phytochemicals derived from glucosinolates. *Eur J Nutr* 47(suppl 2):73–88
- Hecht SS, Carmella SG, Murphy SE (1999) Effects of watercress consumption on urinary metabolites of nicotine in smokers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 8:907–913
- Hecht SS, Chung FL, Richie JP Jr, Akerkar SA, Borukhova A, Skowronski L, Carmella SG (1995) Effects of watercress consumption on metabolism of a tobacco-specific lung carcinogen in smokers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 4:877–884
- Heiss E, Herhaus C, Klimo K, Bartsch H, Gerhauser C (2001) Nuclear factor kappa B is a molecular target for sulfuraphane-mediated anti-inflammatory mechanisms. *J Biol Chem* 276:32008–32015
- Higdon JV, Delage B, Williams DE, Dashwood RH (2007) Cruciferous vegetables and human cancer risk: epidemiologic evidence and mechanistic basis. *Pharmacol Res* 55:224–236
- Kassie F, Laky B, Gminski R, Mersch-Sundermann V, Scharf G, Lhoste E, Kansmuller S (2003) Effects of garden and water cress juices and their constituents, benzyl and phenethyl isothiocyanates, towards benzo(a)pyrene-induced DNA damage: a model study with the single cell gel electrophoresis/Hep G2 assay. *Chem Biol Interact* 142:285–296
- Keck AS, Finley JW (2004) Cruciferous vegetables: cancer protective mechanisms of glucosinolate hydrolysis products and selenium. *Integr Cancer Ther* 3:5–12



23. Lampe JW, Chen C, Li S, Prunty J, Grate MT, Meehan DE, Barale KV, Da Dightman, Feng ZPJD (2000) Modulation of human glutathione *S*-transferases by botanically defined vegetable diets. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 9:787–793
24. Lampe JW, Peterson S (2002) Brassica, biotransformation and cancer risk: genetic polymorphisms alter the preventive effects of cruciferous vegetables. *J Nutr* 132:2991–2994
25. London SJ, Yuan JM, Chung FL, Gao YT, Coetzee GA, Ross RK, Yu MC (2000) Isothiocyanates, glutathione *S*-transferase M1 and T1 polymorphisms, and lung-cancer risk: a prospective study of men in Shanghai, China. *Lancet* 356:724–729
26. Mates JM, Perez-Gomez C, Nunez de Castro I (1999) Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin Biochem* 32:595–603
27. Niu CS, Chang CK, Lin LS, Jou SB, Kuo DH, Liao SS, Cheng JT (1998) Modification of superoxide dismutase (SOD) mRNA and activity by a transient hypoxic stress in cultured glial cells. *Neurosci Lett* 251:145–148
28. Palaniswamy UR, McAvoy RJ, Bible BB, Stuart JD (2003) Ontogenic variations of ascorbic acid and phenethyl isothiocyanate concentrations in watercress (*Nasturtium officinale* R.Br.) leaves. *J Agric Food Chem* 51:5504–5509
29. Pemble S, Schroeder KR, Spencer SR, Meyer DJ, Hallier E, Bolt HM, Ketterer B, Taylor JB (1994) Human glutathione *S*-transferase theta (GSTT1): cDNA cloning and the characterization of a genetic polymorphism. *Biochem J* 300:271–276
30. Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29:e45
31. Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L (2002) Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res* 30:e36
32. Pool-Zobel B, Veeriah S, Bohmer FD (2005) Modulation of xenobiotic metabolising enzymes by anticarcinogens: focus on glutathione *S*-transferases and their role as targets of dietary chemoprevention in colorectal carcinogenesis 1. *Mutat Res* 591:74–92
33. Pullar JM, Thomson SJ, King MJ, Turnbull CI, Midwinter RG, Hampton MB (2004) The chemopreventive agent phenethyl isothiocyanate sensitizes cells to Fas-mediated apoptosis. *Carcinogenesis* 25:765–772
34. Rockett JC, Burczynski ME, Fornace AJ, Herrmann PC, Krawetz SA, Dix DJ (2004) Surrogate tissue analysis: monitoring toxicant exposure and health status of inaccessible tissues through the analysis of accessible tissues and cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 194:189–199
35. Rose P, Faulkner K, Williamson G, Mithen R (2000) 7-Methylsulfinylheptyl and 8-methylsulfinyloctyl isothiocyanates from watercress are potent inducers of phase II enzymes. *Carcinogenesis* 21:1983–1988
36. Seow A, Yuan JM, Sun CL, Van Den Berg D, Lee HP, Yu MC (2002) Dietary isothiocyanates, glutathione *S*-transferase polymorphisms and colorectal cancer risk in the Singapore Chinese Health Study. *Carcinogenesis* 23:2055–2061
37. Spitz MR, Duphorne CM, Detry MA, Pillow PC, Amos CI, Lei L, Andrade M, Gu X, Hong WK, Wu X (2000) Dietary intake of isothiocyanates: evidence of a joint effect with glutathione *S*-transferase polymorphisms in lung cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 9:1017–1020
38. St Clair D (2004) Manganese superoxide dismutase: genetic variation and regulation. *J Nutr* 134:3190S–3191S
39. St Clair DK, Holland JC (1991) Complementary DNA encoding human colon cancer manganese superoxide dismutase and the expression of its gene in human cells. *Cancer Res* 51:939–943
40. Talalay P, Fahey JW (2001) Phytochemicals from cruciferous plants protect against cancer by modulating carcinogen metabolism. *J Nutr* 131:3027S–3033S
41. Traka M, Gasper AV, Melchini A, Bacon JR, Needs PW, Frost V, Chantry A, Jones AM, Ortori CA, Barrett DA, Ball RY, Mills RD, Mithen RF (2008) Broccoli consumption interacts with GSTM1 to perturb oncogenic signalling pathways in the prostate. *PLoS ONE* 3:e2568
42. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M (2006) Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact* 160:1–40
43. van Lieshout EMM, Peters WHM, Jansen JB (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
44. van Poppel G, Verhoeven DT, Verhagen H, Goldbohm RA (1999) Brassica vegetables and cancer prevention. *Epidemiology and mechanisms. Adv Exp Med Biol* 472:159–168
45. Visanji JM, Duthie SJ, Pirie L, Thompson DG, Padfield PJ (2004) Dietary isothiocyanates inhibit Caco-2 cell proliferation and induce G2/M phase cell cycle arrest, DNA damage, and G2/M checkpoint activation. *J Nutr* 134:3121–3126
46. Wang LI, Giovannucci EL, Hunter D, Neuberg D, Su L, Christiani DC (2004) Dietary intake of cruciferous vegetables, Glutathione *S*-transferase (GST) polymorphisms and lung cancer risk in a Caucasian population. *Cancer Causes Control* 15:977–985
47. Xu Y, Krishnan A, Wan XS, Majima H, Yeh CC, Ludewig G, Kasarskis EJ, St Clair DK (1999) Mutations in the promoter reveal a cause for the reduced expression of the human manganese superoxide dismutase gene in cancer cells. *Oncogene* 18:93–102
48. Xu Y, Porntadavity S, St Clair DK (2002) Transcriptional regulation of the human manganese superoxide dismutase gene: the role of specificity protein 1 (Sp1) and activating protein-2 (AP-2). *Biochem J* 362:401–412
49. Yazdanparast R, Bahramikia S, Ardestani A (2008) *Nasturtium officinale* reduces oxidative stress and enhances antioxidant capacity in hypercholesterolaemic rats. *Chem Biol Interact* 172:176–184
50. Zhang SM, Hunter DJ, Rosner BA, Giovannucci EL, Colditz GA, Speizer FE, Willett WC (2000) Intakes of fruits, vegetables, and related nutrients and the risk of non-Hodgkin's lymphoma among women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 9:477–485
51. Zhao B, Seow A, Lee EJ, Poh WT, Teh M, Eng P, Wang YT, Tan WC, Yu MC, Lee HP (2001) Dietary isothiocyanates, glutathione *S*-transferase-M1, -T1 polymorphisms and lung cancer risk among Chinese women in Singapore. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 10:1063–1067

### 3 WEITERE ERGEBNISSE

#### 3.1 UNTERSUCHUNGEN ZUR METABOLISCHEN AKTIVITÄT

Untersuchungen der Vitalität bzw. metabolischen Aktivität von PBMC in Zellkultur wurden zur Abschätzung der möglichen Inkubationszeiträume durchgeführt. Die Bestimmung der metabolischen Aktivität von kultivierten PBMC wurde mittels des „CellTiter-Blue® Cell Viability Assay“ (Promega, Mannheim, Germany) durchgeführt (Klenow *et al.*, 2008). Nach Zugabe des CellTiter-Blue® Reagenz setzen metabolisch aktive Zellen Resazurin in den fluoreszenten Farbstoff Resorufin um. Sterbende Zellen hingegen verlieren innerhalb kurzer Zeit ihre metabolische Aktivität und erzeugen somit kein fluoreszentes Signal. PBMC waren über den gemessenen Zeitraum von 96 h metabolisch aktiv und somit vital (Abbildung 4). Parallel zu diesen Versuchen wurden die Zellen mit Phytohaemagglutinin (PHA, 10 µg/ml) inkubiert, um die Reagibilität der PBMC unter den verwendeten Zellkulturbedingungen zu testen. Hierbei konnten signifikante Unterschiede zu unbehandelten Zellen nach 96 h festgestellt werden. Die metabolische Aktivität wurde nach dieser Zeitspanne um das bis zu 2,1-fache gesteigert (Abbildung 4).

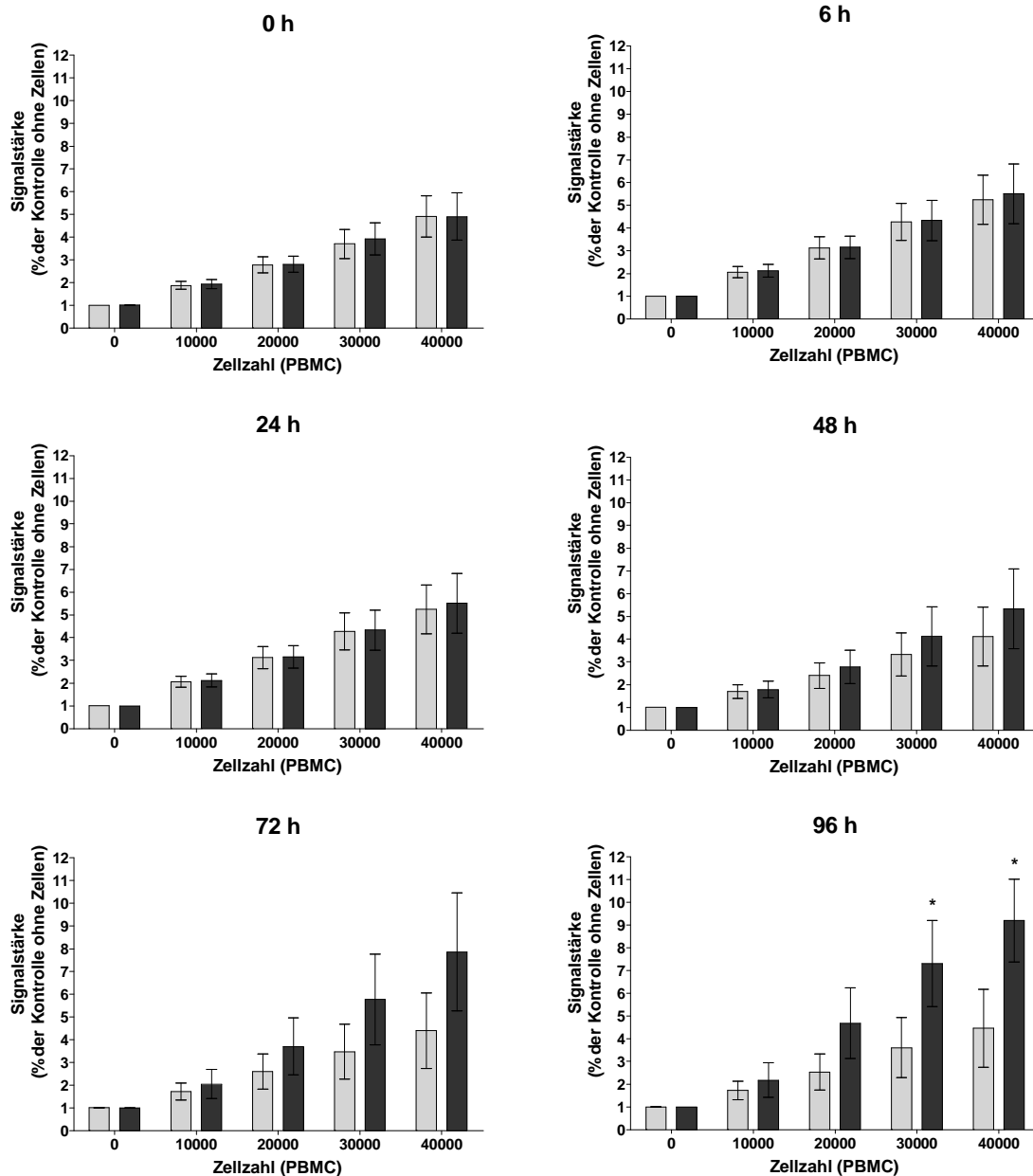
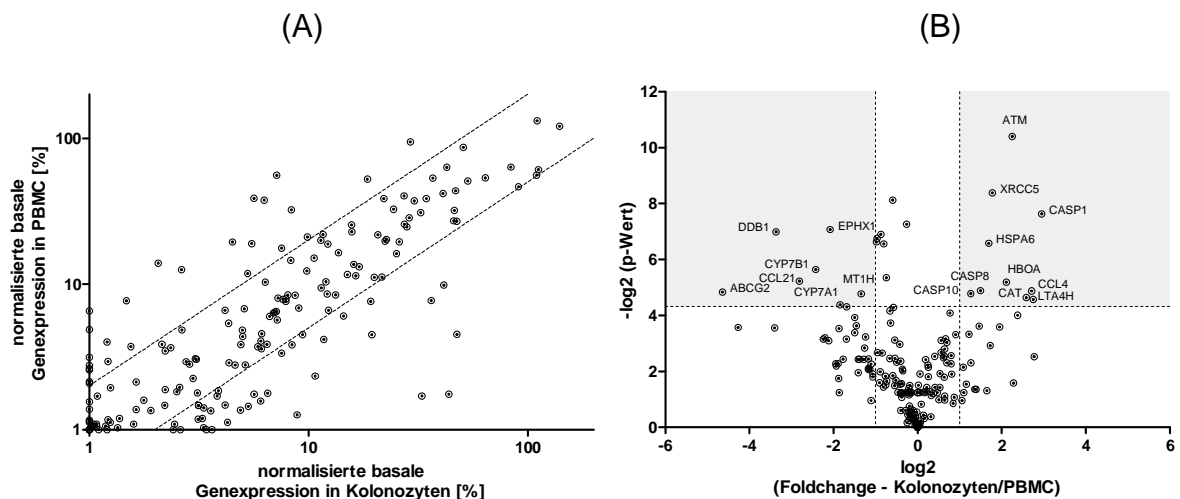


Abbildung 4: Metabolische Aktivität in PBMC in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer und von der Zellzahl zum Zeitpunkt der Aussaat. Dargestellt ist der Effekt in unstimulierten (hellgrau) und mit PHA (10 µg/ml) stimulierten (dunkelgrau) Zellen. Mittelwert ± SEM, n=3, gepaarter t-Test, \* p<0,05.

### 3.2 GENEXPRESSION IN PERIPHEREN MONONUKLEÄREN BLUTZELLEN UND KOLONOZYTEN DER IDENTISCHEN INDIVIDUEN

Zum Vergleich der basalen Genexpression in PBMC mit einem potentiellen Zielgewebe erfolgten Untersuchungen mit Kolonepithelzellen der identischen

Probanden (n=3). Hierfür wurden primären Darmzellen aus gesunden humanem Kolongewebe (Schaeferhenrich *et al.*, 2003) und gleichzeitig PBMC aus Vollblut isoliert. Die Untersuchung der Genexpression erfolgte mittels unterschiedlicher DNA-Microarrays des Herstellers Superarray/SABiosciences™ („HS11 GEArray Q series Human Drug Metabolism Gene Array“ und „HS12 GEArray Q series Human Stress and Toxicity Pathway Finder GeneArray“). Eine komplette Auflistung der untersuchten Gene ist im Anhang dieser Arbeit zu finden. Legt man Kriterien des Herstellers für exprimierte Gene (1,5-facher Wert des Mittelwerts der Signale der Negativ-Kontrollen (ein Blank ohne cDNA-Fragmente und das bakterielle Plasmid pUC18)) zugrunde, waren 78 % der gespotteten Gene in PBMC und 81 % in Kolonzellen nachweisbar.



**Abbildung 5: Expressionsuntersuchungen von 192 Genen der Biotransformation und Entgiftung in PBMC und in Kolonozyten der identischen Spender (n=3). Daten wurden global (auf alle analysierten Gene) normalisiert.**

**(A) Expressionsuntersuchungen im Streudiagramm. Gestrichelte Linien zeigen einen zweifachen Unterschied in der Expression an.**

**(B) Expressionsuntersuchungen im Volcano-Plot. Gestrichelte, vertikale Linien zeigen einen zweifachen Unterschied in der Expression und horizontale Linien das Signifikanzniveau  $p < 0,05$  an (ungepaarter t-Test).**

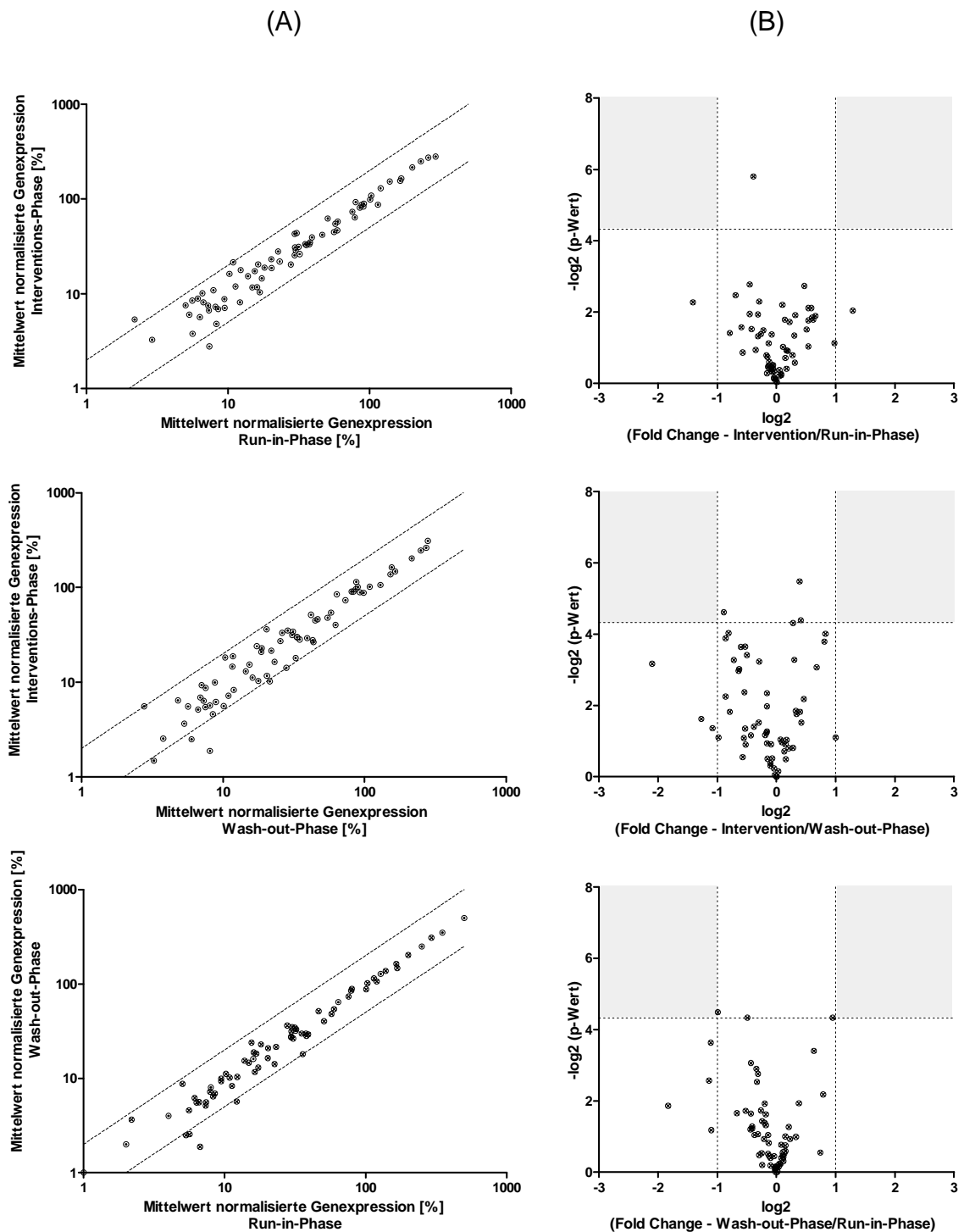
Die Variationen der einzelnen Gene zeigten sich in den beiden Geweben nicht unterschiedlich. Der Variationskoeffizient (CV) der exprimierten Gene betrug im Durchschnitt in PBMC 39,7 % und in Kolonzellen 39,5 %. Weiterhin sollte in diesen Untersuchungen getestet werden, ob intraindividuelle Zusammenhänge der basalen Genexpressionswerte in diesen beiden Geweben existieren. Die intraindividuelle Korrelation (Pearson) bei 192 Genen zwischen den PBMC und



Kolonozyten war signifikant ( $p < 0,0001$ ) mit  $r_{\text{pearson}} = 0,78$  ( $n = 3$ , Abbildung 5 (A)), wie auch die interindividuelle Korrelation zwischen den einzelnen Spendern ( $p < 0,0001$ ) mit  $r_{\text{pearson}} = 0,77$  ( $n = 6$ ). Legt man für DNA-Microarrayuntersuchungen übliche wissenschaftliche Kriterien (Maouche *et al.*, 2008; Shi *et al.*, 2006), wie einen „Fold Change“  $> 2$  und einen nicht sehr stringenten Signifikanzwert ( $p < 0,05$ ) zugrunde, waren zehn Gene (5,2 %) stärker exprimiert in PBMC (HBOA, LTA4H, ATM, CASP1, CASP8, CASP10, CAT, HSP6, CCL4, XRCC5) und sieben Gene (3,6 %) in Kolonozyten (ABCG2, EPHX1, CYP7A1, CYP7B1, DDB1, MT1H, CCL21) (Abbildung 5 (B)).

### **3.3 GENEXPRESSIONSÄNDERUNGEN IN PERIPHEREN MONONUKLEÄREN BLUTZELLEN NACH MEHRFRUCHTSAFT-INTERVENTION**

Mittels Genexpressionsuntersuchungen wurden Effekte einer Mehrfruchtsaftstudie (Weisel *et al.*, 2006) in PBMC von humanen Teilnehmern analysiert. In dieser Studie absolvierten 18 männliche Probanden eine neunwöchige Interventionsstudie zur Bestimmung der Auswirkungen eines flavonoid- und anthocyanreichen Fruchtsafts auf unterschiedliche Blutparameter. In den Wochen 1 und 2 erfolgte eine Run-in-Phase. In den Wochen 3 bis 6 konsumierten die Studienteilnehmer täglich 700 ml Fruchtsaft und in den Wochen 7 bis 9 erfolgte eine Wash-out-Phase. Weitere Angaben zur Studie und zu den konsumierten Säften sind in einer Veröffentlichung von Weisel *et al.* zu finden (Weisel *et al.*, 2006). Im Rahmen dieser Dissertation wurden die Auswirkungen der Saft-Intervention auf die Genexpression in PBMC untersucht. Aufgrund geringer RNA-Konzentration wurden acht Studienteilnehmer ausgewählt und analysiert. Hierfür wurde aus jeder der drei Studienphasen ein Zeitpunkt gewählt. Für die Run-in-Phase wurde Woche 2, für die Intervention Woche 6 und für die Wash-out-Phase wurde Woche 9 ausgewählt. Die Analyse der Genexpression erfolgte mittels DNA-Microarrays (HS11 GEArray Q series Human Drug Metabolism Gene Array) der Firma Superarray/SABiosciences™. Ergebnisse der Untersuchungen sind in Abbildung 6 (A) zu sehen. Legt man analog zu 3.2 dieselben Kriterien („Fold Change“  $> 2$  und  $p < 0,05$ ) zugrunde, zeigte sich keines der untersuchten Gene durch die Intervention als reguliert (Abbildung 6 (B)).



**Abbildung 6:** Untersuchungen zur Änderung der Expression von 96 Genen der Biotransformation und Entgiftung in PBMC humaner Studienteilnehmer (n=8) nach Konsum eines Mehrfruchtsaftes mittels DNA-Microarrays (n=24) der Firma Superarray/SABiosciences™. Die Normalisierung erfolgte auf vier konstitutiv exprimierte Gene (genauere Angaben siehe Anhang 7.3.)

(A) Expressionsuntersuchungen dargestellt im Streudiagramm. Gestrichelte Linien zeigen einen zweifachen Unterschied in der Expression an.

(B) Expressionsuntersuchungen dargestellt im Volcano-Plot. Gestrichelte, vertikale Linien zeigen einen zweifachen Unterschied in der Expression und horizontale Linien das Signifikanzniveau  $p < 0,05$  an (gepaarter t-Test).

### **3.4 WEITERE PUBLIZIERTE DATEN**

Während der Arbeiten zur vorliegenden Dissertation wurden auch andere Untersuchungen, welche nicht in einem engen fachlichen Zusammenhang mit der Dissertation stehen und somit nicht durch eine übergeordnete Fragestellung verbunden sind, durchgeführt und publiziert. Einige Publikationen behandeln die *in vitro*-Fermentation von Lebensmittel. Diese ist ein geeignetes Hilfsmittel für die Analyse von Nahrungsmittelinhaltsstoffen hinsichtlich ihrer physiologischen Effekte im Dickdarm. Es wurden die chemopräventive Eigenschaften von Ballaststoffen (Glei *et al.*, 2006; Hofmann *et al.*, 2008) und Polyphenolen und ihre Auswirkung auf Darmkrebszellen (Bellion *et al.*, 2008; Veeriah *et al.*, 2007; Veeriah *et al.*, 2008) untersucht. Darüber hinaus wurden Unterschiede im Genexpressionsprofil von gesunden und malignen humanen Kolonozyten ermittelt (Radeva *et al.*, 2008).

## 4 DISKUSSION

### 4.1 DAS PRIMÄRZELLMODELL

#### (GRUNDLEGENDE *IN VITRO*-UNTERSUCHUNGEN)

Grundlegende *in vitro*-Untersuchungen wurden zur Charakterisierung der verwendeten Zellen durchgeführt und um die Praktikabilität und Eignung von PBMC für Genexpressionsuntersuchungen in Zellkultur zu testen.

##### 4.1.1 ZELLKULTUR

Zur Charakterisierung der mittels Dichtegradientenzentrifugation gewonnenen Zellen wurden die Zellfraktionen durchflusszytometrisch bestimmt (**Publikation I**). Hierbei zeigte sich, dass die *in vitro*-PBMC-Kultur nicht immer frei von zellulären Verunreinigungen wie Eosinophilen (4,1 %  $\pm$  3,6 %) und Granulozyten (4,9 %  $\pm$  4,5 %) war. Mit über 90 % stellten PBMC aber dennoch den Hauptanteil der Zellen dar. Mittels weiterer Trennverfahren wie magnetisch aktivierter Zellsortierung oder Durchflusszytometer mit Zellsorter könnte die „Reinheit“ der Zellfraktionen zusätzlich verbessert werden (Miltenyi *et al.*, 1990). Diese Auftrennung der Zellfraktionen und anschließende Untersuchungen der Genexpression in einzelnen Unterfraktionen ist ohne Frage interessant, gehen aber vom Gedanken der einfachen Biomarkeruntersuchungen in Surrogat-Gewebe weg, hin zu spezifischeren Fragestellungen. Auch haben Studien gezeigt, dass Änderungen in der Genexpression in T-Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten vergleichbar waren (Aydemir *et al.*, 2006). Darüber hinaus ist eine schnelle und einfache Probenaufarbeitung, wie es mit der Dichtegradientenzentrifugation möglich ist, für Interventionsstudien mit einer großen Teilnehmerzahl wichtig und kann ohne weitere Reinigungsschritte durchgeführt werden.

PBMC befinden sich in Zellkultur in einem Ruhezustand, sind metabolisch wenig aktiv, proliferieren nicht und sind somit fast alle in derselben Phase des Zellzyklus (G<sub>0</sub>). PHA, ein Phytolektin aus der roten Feuerbohne (*Phaseolus vulgaris*), besitzt zellagglutinierende und mitogene Eigenschaften und wird deshalb oft in der Lymphozytenzellkultur eingesetzt (Hammarstrom *et al.*, 1982). Es besteht aus einer Familie von fünf Isolektinen, welche als Tetramere vorliegen. Die Untereinheit Typ L hat eine hohe Affinität für Lymphozytenoberflächenrezeptoren

und ist verantwortlich für die mitogene Eigenschaft der Isolektine. Die Induktion der Proliferation ist ein Ergebnis, welches in der Literatur seit geraumer Zeit beschrieben wurde (Nowell, 1960). Auch in der vorliegenden Arbeit konnte die metabolische Aktivität der PBMC mittels PHA (10 µg/ml) nach 96 h signifikant im Vergleich zu nicht stimulierten Zellen gesteigert werden (**Weitere Ergebnisse**). Durch diese Stimulation konnte eine korrekte Zellisolation gezeigt werden, da nur Lymphozyten auf das Lektin reagieren, und somit auch die Reagibilität der Zellen in Zellkultur. Ebenso war zu erkennen, dass auch unstimulierte Zellen bis 96 h nach Gewinnung keine signifikante Abnahme der metabolischen Aktivität aufwiesen und unter den beschriebenen Bedingungen über einen Zeitraum von mindestens vier Tagen kultiviert werden können.

#### **4.1.2 INTER- UND INTRAINDIVIDUELLE VARIATIONEN DER GENEXPRESSION IN PERIPHEREN MONONUKLEÄREN BLUTZELLEN**

Den Fokus dieser Arbeit stellte die Untersuchung von Genexpressionsprofilen in PBMC dar. Beginnend wurde hierfür die basale, nicht stimulierte Genexpression in gesunden humanen Spendern mittels DNA-Microarrays und Real-Time-PCR untersucht. In den Untersuchungen mit DNA-Microarrays zeigte sich, dass von 192 Genen der Entgiftung und Biotransformation 78 % auf mRNA-Ebene detektierbar waren. Daneben zeigten sich in DNA-Microarray-Untersuchungen nur geringe Unterschiede zwischen den einzelnen Spendern. Untersuchungen von Whitney belegen dies (Whitney *et al.*, 2003). Ein anderes Bild mit sehr hohen individuellen Variationen war bei Real-Time-PCR-Untersuchungen der basale Expression in PBMC zu erkennen. Beide Methoden unterschieden sich stark zueinander (**Publikation I**). Es ist anzunehmen, dass der dynamische Bereich hier um ein Vielfaches größer ist und somit Real-Time-PCR Untersuchungen eher die tatsächlichen Gegebenheiten widerspiegeln. Somit sollten Daten, welche aus DNA-Microarray-Untersuchungen erhalten wurden, nur mit Werten verglichen werden, welche mit derselben Plattform gewonnen wurden. Eine Bewertung der basalen Genexpression muss daher immer im Blinkwinkel der verwendeten Methode erfolgen.

Zur weiteren Einschätzung der basalen Genexpression wurden Untersuchungen (Real-Time-PCR) über einen Zeitraum von mehreren Wochen mit zehn Probanden

durchgeführt. Intraindividuell waren nur geringe Schwankungen zu detektieren, die interindividuellen Unterschiede waren hingegen immens (**Publikation I**). Vor allem für *UGT1A1* (CV 243 %) und *GSTT2* (CV 261 %) zeigten sich hohe Variationen. In Bezug auf *UGT1A1* könnten diese Unterschiede auf einem der über 50 verschiedenen genetischen Varianten in den Promotoren und den kodierenden Regionen beruhen (Costa, 2006; Kadakol *et al.*, 2000). Der häufigste Polymorphismus (*UGT1A1\*28*) in der kaukasischen Bevölkerung (*UGT1A1\*28* 6/7 43 %, *UGT1A1\*28* 7/7 11 %) ist eine TA-Insertion in die TA(TA)<sub>6</sub>TAA Sequenz des Promotors (Lin *et al.*, 2006), welche auch für eine verringerte Transkriptionsrate verantwortlich ist (Raijmakers *et al.*, 2000). Auch für *GSTT2* sind Polymorphismen in der Literatur beschrieben (Jang *et al.*, 2007). Über deren Auswirkungen hinsichtlich der Transkriptionshöhe sind aber noch keine Daten verfügbar.

Die Höhe der basalen Genexpression kann eine wichtige Bedeutung für Interventionsstudien besitzen. In einigen Arbeiten wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Induzierbarkeit von Entgiftungsenzymen abhängig von der basalen Expression ist (Chow *et al.*, 2007). Demnach kann eine gute Enzymausstattung nicht weiter verbessert werden, während die Kapazität von Individuen mit einer geringen oder verminderten Aktivität von Entgiftungsenzymen sehr wohl gesteigert werden kann. Gründe für die hohen individuellen Schwankungen können kurzfristig die Einnahme von Medikamenten, Tageszeit der Blutabnahme oder längerfristig Ernährungsfaktoren und der Lebenswandel des Einzelnen sowie die genetisch definierte Ausstattung oder auch das Geschlecht und das Alter sein (Kaput *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2007; Whitney *et al.*, 2003). Bei der Bewertung von Genexpressionsuntersuchungen sollte hierbei bedacht werden, dass niedrige mRNA-Konzentrationen nicht zwangsläufig eine niedrige Proteinkonzentration oder Enzymaktivität nach sich ziehen.

Zum Vergleich der Genexpression mit dem Zielgewebe Darm wurden Kolonozyten und PBMC derselben Spender (n=3) isoliert. Dabei ergab sich eine signifikante Korrelation zwischen den beiden Geweben ( $r_{\text{pearson}}=0,78$ ). Hieraus kann nicht auf vergleichbare Reaktion in beiden Geweben geschlossen werden, aber die untersuchten Gene sind in beiden Zellarten koexprimiert und somit wurde eine Basis für die Verwendung von PBMC als Surrogatgewebe gelegt. Für

aussagekräftigere Ergebnisse, die die Vergleichbarkeit der beiden Gewebe zulassen, müsste ein größeres Probandenkollektiv und die Reaktion auf unterschiedliche Stimuli untersucht werden.

#### 4.1.3 ERFASSUNG DER *IN VITRO*-MODULIERBARKEIT DER GENEXPRESSION IN PERIPHEREN MONONUKLEÄREN BLUTZELLEN

Zur Untersuchung von manchen Biomarkern in PBMC muss der Zellkultur PHA wegen seiner mitogenen und zellaktivierenden Eigenschaften zugesetzt werden. Dies ermöglicht Zellzyklusuntersuchungen (Kuo *et al.*, 2002) oder eine Erfassung von Mikrokernen (Fenech, 2000). Eigene Studien zeigen, dass hierbei das häufig verwendete Referenzgen Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) moduliert wird. Nach einer Behandlung (24 h) von PBMC konnte eine signifikante Hochregulation von GAPDH um das Fünffache festgestellt werden (**Publikation I**). Eine ähnliche Modulation wurde auch von anderen Arbeitsgruppen in proliferierenden PBMC gefunden (Bas *et al.*, 2004; Vereninov *et al.*, 2001). Dies stellt bei halb-quantitativen Untersuchungen mittels Real-Time-PCR ein Problem dar, da Ergebnisse auf ein konstitutiv exprimiertes Gen, häufig GAPDH, bezogen werden müssen. Effekte, welche nach einer zusätzlichen Behandlung mit PHA gefunden werden, können demnach auf die Behandlung oder auf eine Beeinflussung der Steigerung des Referenzgens zurückzuführen sein. Demnach scheint es für *in vitro*-Genexpressionsuntersuchungen in PBMC angebracht, unstimulierte Zellen zu verwenden, welche auch den physiologischen Bedingungen entsprechen. Alternativ kann eine Normalisierung auf die Expression z.B. der 18S rRNA durchgeführt werden (Bas *et al.*, 2004).

Für die Verwendung des Biomarkers Genexpression ist die Reagibilität der Zellen auf physiologische *in vitro*-Stimuli eine wichtige Voraussetzung. In vergleichenden Untersuchungen, welche mit der Kolonkrebszelllinie HT29 durchgeführt wurden, zeigte eine Behandlung mit dem Darmfermentationsprodukt Butyrat (10 mM, 24 h) eine signifikante Hochregulation der GST-Isoenzyme T2 und M2 in beiden Zelltypen (**Publikation I**). GSTT2 besitzt eine Peroxidaseaktivität gegen t-Butyl-Hydroperoxide, vor allem Cumenhydroperoxid und auch gegen physiologische vorkommende Peroxide der Arachidonsäure, wie Arachidonsäure-15-Hydroperoxid (Hiratsuka *et al.*, 1997; Hussey & Hayes, 1992; Tan & Board, 1996).

Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNP) in GSTT2-Promotoren sind darüber hinaus mit einer Erhöhung des Darmkrebsrisikos assoziiert (Jang *et al.*, 2007). GSTM2 katalysiert die Entgiftung von oxidierten Katecholaminmetaboliten (o-Quinone) und bietet Schutz vor degenerativen zellulären Prozessen (Baez *et al.*, 1997). Aus diesen Gründen führen erhöhte GSTT2 und GSTM2-Proteingehalte mit großer Wahrscheinlichkeit zu einer verbesserten Entgiftungskapazität von Peroxiden und/oder oxidierten Stoffwechselmetaboliten und wahrscheinlich zu einem verbesserten zellulären Schutz. Aufgrund dieser Untersuchungen kann ein erhöhter Ballaststoffverzehr und damit verbunden erhöhte physiologische Konzentrationen von Butyrat in gesunden Zellen (Primärzellen) mit einem chemopräventiven Schutz gleichgesetzt werden. Aber auch HT29-Darmkrebszellen zeigten eine erhöhte GST-Expression, was zu einer erhöhten Resistenz gegenüber Chemotherapeutika führen kann, und als negativ bewertet werden muss. Sauer *et al.* demonstrierten ebenfalls eine Hochregulation der GSTT2 um das 2,9-fache in primären Kolonozyten nach einer Behandlung mit 10 mM Butyrat (Sauer *et al.*, 2007b). Auch in nicht darmassoziierten Zellen wie vaskulären Muskelzellen konnte Butyrat unterschiedliche GST-Isoenzyme induzieren (Ranganna *et al.*, 2007). Somit lassen sich für diese unterschiedlichen Zelltypen vergleichbare Induktionsmechanismen für GSTs nach Butyratbehandlung vermuten. Mögliche Ansatzpunkte könnten hierbei die Transkriptionsfaktoren Nrf2 für GSTM2 und PPAR $\alpha$  für GSTT2 sein (Knight *et al.*, 2008). Weitere molekularbiologische Grundlagen der durch Butyrat vermittelten Genexpressionsänderungen sind in mehreren Arbeiten publiziert (Hamer *et al.*, 2008; Pool-Zobel *et al.*, 2005).

Die gezeigten *in vitro*-Ergebnisse sind bedeutend für die Einschätzung der Eignung von PBMC als Biomarkerzellen. PBMC können für einige *in vitro*-Experimente als artifizielles Bindeglied zwischen Kulturzellen (z.B. HT29) und Primärzellen wie Kolonozyten gesehen werden. Untersuchungen können erst in Kulturzellen durchgeführt werden. Da die Übertragbarkeit auf gesunde Primärzellen aber nicht gegeben sein muss, kann diese mit PBMC getestet werden. Sind auch hier Effekte ermittelbar, können Untersuchungen in schwer verfügbaren Primärzellen unternommen werden.



## 4.2 MODULATION VON ENTGIFTUNGSENZYMEN DURCH WASSERKRESSE UND POLYPHENOLE (*IN VITRO* UND *IN VIVO*)

Die *in vitro*-Untersuchungen in PBMC dienten zwei grundlegenden Zielen: 1) Der genaueren Beleuchtung von zuvor gewonnenen *in vivo*-Ergebnissen und 2) der Bestimmung von Genen, welche anschließend in Interventionsstudien als Biomarker dienen sollten. Basis für die Bewertung der Daten war es, Ergebnisse aus Zellkultur und Ergebnisse aus *in vivo*-Untersuchungen zu vergleichen.

### 4.2.1 WASSERKRESSE, ISOTHIOCYANATE UND PHENETHYLISOTHIOCYANAT

In *in vitro*-Untersuchungen waren sowohl ein Extrakt aus der Wasserkresse als auch ein Hauptwirkstoff der Kresse, PEITC, in der Lage, wichtige Entgiftungsenzyme wie *SOD2* und *GPX1* um ein Vielfaches in PBMC zu induzieren (**Publikation III**). Superoxid-Dismutasen wandeln zwei Superoxidanionen in Wasserstoffperoxid um, das anschließend durch die Katalase oder Peroxidasen abgebaut werden kann. *SOD2* ist essentiell, gilt als eines der effektivsten antioxidativ wirksamen Enzyme und wird darüber hinaus als Tumorsuppressorgen bezeichnet (Behrend *et al.*, 2005; Mates & Sanchez-Jimenez, 1999; Zhao *et al.*, 2002). Eine niedrige Aktivität und Expression war in einigen Studien mit höheren DNA-Schäden und mit einem erhöhten Krebsrisiko assoziiert (Van *et al.*, 2003). In Krebszellen führte eine gesteigerte Aktivität zu einer erhöhten Migrationsfähigkeit und zu einer gesteigerten Invasivität (Connor *et al.*, 2007). Somit ist die gezeigte Erhöhung in Primärzellen als chemopräventiv zu beurteilen. Die Hochregulation auf Genexpressionsebene zeigte enorme individuelle Unterschiede. Die Werte variierten individuell nach einer 24 h Inkubation von einer 1,4-fachen bis zu einer 32,0-fachen Induktion. Mögliche Erklärungsversuche für derartige Unterschiede sind bisher spekulativ. Eine Rolle können Polymorphismen im Gen selbst (Johnson *et al.*, 2008) oder in Genen (Cytochrom-P450-Enzyme, GST-Enzyme), welche für die Aktivierung bzw. Inaktivierung (Seow *et al.*, 2005) der bioaktiven Substanzen verantwortlich sind, spielen. Ebenso sind Veränderungen in Transkriptionsfaktoren, welche für die Induktion der beiden Gene mitverantwortlich sind, wie Nrf2 (Marzec *et al.*, 2007; Taylor *et al.*, 2008), NF-kappaB (Murley *et al.*, 2004; Xu *et al.*, 2002) oder an DNA-

Bindestellen der Transkriptionsfaktoren wie im „Antioxative-Responsive-Element“ beschrieben (Wang *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2007).

Weiterführende Untersuchungen zur Modulation des SOD2-Proteingehaltes und der Enzymaktivität durch den Wasserkresseextrakt und PEITC zeigten nur geringe Veränderungen (**Publikation III**). Über Unterschiede in der Reaktion zwischen SOD2-mRNA und Proteinkonzentration wurden schon von einigen Arbeitsgruppen berichtet. Gomi & Matsuo beschrieben, dass eine sauerstoffabhängige Induktion der SOD1 und SOD2-mRNA nicht mit der Proteinmenge und Enzymaktivität korrespondierten (Gomi & Matsuo, 2002) und eine transkriptionelle Induktion durch Lipopolysaccharide in Astrozyten von Ratten war nicht mit einer gesteigerten Enzymaktivität assoziiert (Niu *et al.*, 1998). Diese Ergebnisse wurden mit einem translationalen Block auf dem Weg zur SOD2 Proteinsynthese erklärt.

Die selenabhängigen Glutathione-Peroxidasen sind eines der wichtigsten antioxidativen Enzymsysteme für die Entgiftung von reaktiven Sauerstoffspezies. Vor allem Hydroperoxide wie Wasserstoffperoxid und Lipidhydroperoxide werden durch die GPX mit Hilfe von Glutathion zu unschädlichen Verbindungen abgebaut. Die zytosolische GPX (GPX1) wird als ein kausaler Faktor in der Krebsentwicklung gesehen (Papp *et al.*, 2007). So wurde ein „Loss of heterozygosity“ des GPX1-Locus in malignen Erkrankungen unterschiedlicher Gewebe wie Lunge, Brust oder Kolon detektiert (Hu *et al.*, 2005; Hu & Diamond, 2003). Eine verminderte GPX1-Aktivität in Blutzellen ist durch die geringere antioxidative Kapazität mit dem Krebsgeschehen z.B. in der Prostata assoziiert (Arsova-Sarafinovska *et al.*, 2009). PEITC in einer physiologischen Konzentration (1 µM), welche nach Verzehr von Wasserkresse (100 g) im Plasma erreicht werden kann (Ji & Morris, 2003), war in der Lage die GPX1 um das 3,7-fache in PBMC zu induzieren (**Publikation III**). Eine GPX1-Induktion durch PEITC konnte ebenso von van Lieshout *et al.* in unterschiedlichen Geweben von Ratten detektiert werden (van Lieshout *et al.*, 1996). Auch weitere Ergebnisse sprechen dafür, dass die *in vitro* gefundenen Ergebnisse auch auf die *in vivo*-Situation übertragen werden können. So konnte in einer Studie von Yazdanparast *et al.* eine Steigerung der SOD-Aktivität durch Wasserkresseverzehr in Ratten mit Hypercholesterinämie gezeigt werden (Yazdanparast *et al.*, 2008). Auch konnte eine Erhöhung der SOD2-Proteinmenge in PBMC nach fünftägigen kontrollierten Verzehr von Rosenkohl (Hoelzl *et al.*,

2008b) oder in der Leber nach Brokkoliverzehr (Vang *et al.*, 1995) festgestellt werden. Beide Lebensmittel enthalten mit Wasserkresse vergleichbare bioaktive Substanzen.

Die Induzierbarkeit von Entgiftungsenzymen kann in Abhängigkeit von GST-Polymorphismen variieren. Aus diesem Grund wurde in **Publikation III** der mögliche Zusammenhang zwischen GST-Polymorphismen und einer Induktion der SOD und/oder GPX-Enzymaktivität untersucht. GSTs konjugieren manche der effektiven Substanzen der Brassicaceae-Familie und zahlreiche Studien untersuchten das chemopräventive Potential eines Verzehrs von Gemüse der Gattung Brassicaceae in Abhängigkeit der GST-Polymorphismen (Seow *et al.*, 2002; Steck *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2004). Nach aktueller Datenlage profitieren Individuen mit einem GST-Null-Genotypen (speziell der *GSTM1\*0* Genotyp) stärker von einem erhöhten Verzehr von Isothiocyanaten. Aufgrund der fehlenden Stoffwechsellenzyme werden die Isothiocyanate langsamer ausgeschieden und können daraufhin länger im Organismus zirkulieren und höhere Gewebekonzentrationen erreichen (Bianchini & Vainio, 2004; Lampe, 2007; Reszka *et al.*, 2006). Viele epidemiologische Studien unterstützen diese Hypothese und fanden den größeren Schutzeffekt der *Brassicaceae* bei Individuen mit den Null- oder wenig aktiven *GST*-Genotyp (London *et al.*, 2000; Zhao *et al.*, 2001). Allerdings gibt es auch einige gegenteilige Studien, welche größere Effekte bei Personen mit einem positiven oder aktiveren Genotyp fanden (Spitz *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2004). In eigenen Untersuchungen (**Publikation III**) führte eine Intervention mit Wasserkresse nur in *GSTM1\*0* Individuen zu einer gesteigerten Enzym-Aktivität der SOD und der GPX. Chemopräventive Effekte durch diese marginalen Veränderungen der Enzymaktivität sind schwer vorhersagbar. Hierfür müssten zuvor noch die Wirkungen in den wirklichen Zielgeweben wie Leber oder Kolon untersucht werden. In diesen Geweben, welche im Vergleich zu PBMC metabolisch aktiver sind, könnten die Effekte durchaus höher ausfallen. Lampe *et al.* konnten ebenfalls nur eine marginale Steigerungen der Gesamt-GST-Aktivität im Serum um 7 % und der GSTM-Aktivität in PBMC um 18 % nach Verzehr verschiedener *Bassicaceae*-Gemüsesorten in *GSTM1\*0* Individuen verzeichnen (Lampe *et al.*, 2000). Im Vergleich zu der in **Publikation III** durchgeführten Studie

verzehrten die Teilnehmer eine wesentlich größere Menge an Gemüse (436 g) und konsumierten eine Kontrolldiät, welche frei von Obst und Gemüse war.

Eine Inkubation der Zellen mit einem Wasserkresseextrakt führte *in vitro* zu den höchsten in dieser Arbeit detektierten Modulationen im Genexpressionsprofil von PBMC (**Publikation III**). Die *in vitro*-Effekte in PBMC konnten auf Genexpressionsebene *in vivo* nicht reproduziert werden. Eine Intervention mit 85 g Wasserkresse täglich führte zu keinen signifikanten Veränderungen der Genexpression für die Gene *SOD2* und *GPX1* in PBMC. Hierbei sind die unterschiedlichen Zeiträume (24 h im Vergleich zu 8 Wochen) zu bedenken. Der Vergleich einer 24 h Inkubation mit einer mehrwöchigen Intervention ist disputabel. So könnte sich die Expression *in vivo* sehr wohl auch nach 24 h ändern, aber nach einer achtwöchigen Intervention erreicht das Niveau wieder Ursprungswerte.

#### 4.2.2 POLYPHENOLE

Der Verzehr von polyphenolreichen Fruchtsäften führte zu einer signifikanten Reduktion von DNA-Schäden (Bub *et al.*, 2003) und zu einer signifikanten Modulation der GSTP1-Proteinmenge in PBMC (**Publikation II**). GSTP1 ist involviert in die Entgiftung verschiedener Karzinogene wie Benzo[a]pyren-7,8-diol-9,10-epoxid und anderer Diol-Epoxide der polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe (Hengstler *et al.*, 1998). Es ist eines der wichtigsten extrahepatischen GSTs und stark exprimiert in PBMC, weshalb es schon in mehreren Studien als Biomarker für die Induktion von Phase-II-Enzymen durch Ernährungsfaktoren diente (Persson *et al.*, 2000; Steinkellner *et al.*, 2005). Hierbei ist die Datenlage jedoch uneinheitlich. Neben einer signifikanten Steigerung z.B. nach Kaffeekonsum (Steinkellner *et al.*, 2005) konnte ebenso eine Reduktion auf RNA- und auf Protein-Ebene nach Obst- oder Gemüseverzehr detektiert werden (Persson *et al.*, 2000). Auch in **Publikation II** wurde gezeigt, dass der Konsum von polyphenolreichen Säften zu einer Modulation der GSTP1-Proteinmenge geführt hat. Nach zweiwöchiger Intervention zeigte sich zunächst eine signifikante Verringerung der Proteinkonzentration, während nach sechs Wochen eine signifikante Hochregulation zu messen war. Zum besseren Verständnis dieser widersprüchlichen Ergebnisse wurden *in vitro*-Untersuchungen mit Polyphenolmischungen durchgeführt, welche die ursprünglichen Säfte

substituieren sollten. Hierbei zeigten sich in PBMC keine signifikanten Veränderungen in der *GST*-Genexpression oder in der *GST*-Gesamtaktivität (**Publikation II**). Dafür können mehrere Erklärungsansätze herangezogen werden: Die Mischungen, welche für die *in vitro*-Untersuchungen verwendet wurden, enthielten 22 unterschiedliche Polyphenole und somit nicht alle bioaktiven Substanzen eines Fruchtsaftes. Somit ist es möglich, dass dieses Gemisch nicht die aktiven Substanzen beinhaltet, welche für die *GSTP1*-Modulation und/oder die Verringerung der DNA-Schäden verantwortlich waren. Auch die in den Fruchtsäften enthaltenden Karotinoide könnten Auswirkungen auf die DNA-Schäden oder die Expression von Enzymen besitzen (Lorenzo *et al.*, 2008). Ebenso könnte eine nicht detektierbare *GSTP1*-Modulation durch die Testsubstanzen *in vitro* aufgrund der Zellkulturbedingungen (geringe Stabilität, fehlende Metabolisierung und/oder Aktivierung) oder einer nicht vergleichbaren Inkubationszeit (24 h versus mehrere Wochen) erklärt werden. Es sollte auch in Betracht gezogen werden, dass die signifikante Modulation durch die Intervention nicht durch eine Placebogruppe verifiziert wurde und somit möglicherweise durch unbekannte „confounding factors“ induziert wurde.

Mittels RNA-Proben aus einer weiteren humane Interventionsstudie (Weisel *et al.*, 2006) wurde in dieser Arbeit die Auswirkung der Supplementation (700 ml anthocyan- und polyphenolreicher Mehrfruchtsaft täglich) auf die Genexpression in PBMC untersucht. Die Analyse von 96 Genen der Biotransformation und Entgiftung ergab, dass keines der untersuchten Gene durch die Intervention als moduliert zu bezeichnen war (**weitere Ergebnisse**). Der hohe Konsum von Polyphenolen war nicht mit Veränderungen der Genexpression in PBMC assoziiert. Erwähnt werden sollte, dass nur acht Studienteilnehmer der 18 Probanden aufgrund der benötigten RNA-Qualität und Quantität untersucht werden konnten. Bei Analyse des gesamten Probandenkollektivs könnten zusätzlich Effekte zu Tage treten. Somit war es nicht möglich, die von Weisel *et al.* gezeigte signifikante Reduktion der DNA-Schäden in PBMC in Folge des Saftkonsums mittels Veränderungen im Genexpressionsprofil in diesen Zellen zu erklären. Ein chemopräventiver Schutzeffekt der Fruchtsaftintervention ist durch die gezeigten Ergebnisse nicht abzuleiten und bedarf weiterer Untersuchungen. Zusätzliche Enzyme, welche sich nicht unter den untersuchten 96 Gene befanden,

wie die  $\gamma$ -Glutamylcystein-Synthetase ( $\gamma$ -GCS), angedeutet durch erhöhte Glutathionwerte in der Originalstudie (Weisel *et al.*, 2006), könnten hierbei eine wichtige physiologische Rolle spielen.

### 4.3 KRITISCHE BEWERTUNG VON BIOMARKERERGEBNISSEN

Die Verwendung von Primärzellen oder Biopsieproben ist aufgrund der eingeschränkten Verfügbarkeit für Biomarkermessungen in humanen Interventionsstudien oft problematisch. *In vitro*-Arbeiten basieren oft auf Untersuchungen mit Zelllinien. Diese Zellen sind meist kanzerösen Ursprungs oder sind mit geeigneten Verfahren immortalisiert worden. Eine Übertragung der Ergebnisse auf gesundes Zielgewebe und damit auf die Primärprävention von Krankheiten ist problematisch. Als mögliche Antwort auf diese Probleme wird die Verwendung von nicht invasiv verfügbaren Surrogat-Geweben gesehen. Ergebnisse, welche aus Biomarkeruntersuchungen mittels Surrogat-Gewebe gewonnen werden, benötigen eine kritische Einschätzung, da sie nicht direkt mit dem Krankheitsgeschehen oder dem Zielgewebe verbunden sind.

In der möglichen Prävention von Krankheiten ist eine Ernährungsform bzw. Ernährungssupplementation nur dann einer anderen überlegen, wenn sie Krankheiten verhindert/hinauszögert, heilt oder Symptome lindert. Nicht aber wenn sie nur Biomarker oder sonstige Laborwerte beeinflusst. Die aus *in vitro*- und *in vivo*-Untersuchungen erhaltenen Daten in der vorliegenden Arbeit liefern nur Hinweise auf eine mögliche Beeinflussung des Krankheitsgeschehens bzw. der Chemoprävention. Für die eventuell fehlende Übertragbarkeit der analysierten Biomarker existieren viele Ursachen. So müssen Veränderungen in PBMC *in vitro*, *ex vivo* und *in vivo* nicht übereinstimmen (de Pascual-Teresa *et al.*, 2004). Dies konnte auch in dieser vorliegenden Arbeit festgestellt werden (**Publikation II**). Es besteht auch die Eventualität, dass es keine kausalen Zusammenhänge zwischen dem Biomarker (z.B. Steigerung einer Enzymaktivität) und der Krankheitsentstehung gibt. Für die Validierung der Biomarker in dieser Arbeit (**Publikation I, II und III**) müssten die beschriebenen Modulationen der Entgiftungsenzyme kausal mit einer Reduktion von DNA-Schäden bzw. Zellschäden verbunden sein. Diese Reduktion sollte eine geringere Anzahl von Mutationen nach sich ziehen und somit das Risiko einer Zellentartung und einer

Krebsentstehung verringern. Auch wenn die Induktion bestimmter Enzyme zur Primärprävention als wissenschaftlicher Konsens gilt (Chen & Kong, 2005; Talalay *et al.*, 1995), ist die Übertragbarkeit auf andere Gewebe und der chemopräventive Nutzen einer Enzyminduktion noch nicht gesichert.

#### 4.4 ZUSAMMENFASSENDE SCHLUSSFOLGERUNGEN

Aus den in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen lassen sich folgende Schlussfolgerungen ableiten:

- PBMC sind über einen langen Zeitraum (96 h) *in vitro* lebensfähig und metabolisch aktiv. Somit sind sie prinzipiell für kurz- bis mittelfristige *in vitro*-Untersuchungen geeignet.
- Ein Großteil (78 %) der untersuchten 192 Enzyme der Biotransformation und Entgiftung ist in PBMC exprimiert und die basale Genexpression von PBMC und Kolonozyten als Zielgewebe korrelierte signifikant ( $r_{\text{pearson}}=0,78$ ). PBMC stellen daher mit großer Wahrscheinlichkeit ein geeignetes Surrogat-Gewebe dar, welches auch den zellulären Entgiftungsstatus des Körpers reflektieren kann.
- Die *in vitro*-Induzierbarkeit der Genexpression in PBMC nach Inkubation mit Nahrungsinhaltstoffen variiert zwischen Individuen um ein Vielfaches. Die Gründe für die unterschiedlichen Reaktionen sind bisher unklar. Keine Erklärung konnte durch die Analyse von Polymorphismen (z.B. *GSTT1*, *GSTM1*) gefunden werden.
- PBMC und HT29-Zellen zeigten nach einer Inkubation mit Butyrat (10 mM, 24 h) eine signifikante Hochregulierung der GST-Isoenzyme *T2* und *M2*. Diese Zielgene sind in Primärzellen mit chemoprotektiven Effekten assoziiert. Erhöhter Ballaststoffverzehr könnte vor oxidativem Stress oder genotoxischen Substanzen schützen.
- Eine Intervention mit polyphenolreichen Fruchtsäften führte zugleich zu einer signifikanten Verringerung als auch zu einer signifikanten Steigerung der GSTP1-Proteinkonzentration nach unterschiedlichen Zeiträumen. Ein chemopräventives Potential kann dadurch nicht zwangsläufig abgeleitet werden.

- Mit isolierten Polyphenolen hergestellte Mischungen, welche die Säfte substituieren und Ergebnisse der Interventionsstudie erklären sollten, hatten *in vitro* keine signifikanten Einflüsse auf die GST-Genexpression oder Aktivität.
- Eine Intervention mit einem anthocyan-/polyphenolreichen Fruchtsaft mit einer hohen Flavonoid/Polyphenol-Konzentration hat nach DNA-Microarray-Untersuchungen keinen Einfluss auf 96 Gene der Biotransformation und Entgiftung in PBMC.
- In Untersuchungen zur SOD-Enzymaktivität konnten *in vitro* gefundene Effekte mit einem Wasserkresseextrakt auch auf die *in vivo*-Situation nach einer Intervention mit Wasserkresse auf Individuen mit einem *GSTM1\*0*-Genotyp übertragen werden. Ein Verzehr von Glucosinolaten, wie in der Wasserkresse enthalten, könnte somit zur primären Chemoprävention in einem Großteil der Bevölkerung ( $\approx 50\%$ ) beitragen.
- Anhand der Daten von zwei Interventionsstudien ist eine direkte Übertragung der Ergebnisse von *in vivo* auf *in vitro* oder umgekehrt teilweise möglich, wie die Daten in **Publikation III** zeigen, aber auch oft problematisch (**Publikation II**).

#### 4.5 AUSBLICK

Individuen besitzen aufgrund genetischer Variationen eine große Bandbreite an Möglichkeiten auf exogene Stimuli wie Ernährungsinterventionen oder medikamentöse Behandlungen zu reagieren. Immer leistungsfähigere Technologien zur Bestimmung von Genen und Genprodukten führen zu einem besseren Verständnis der individuellen Reaktionen und zu einem neuen Konzept der personalisierten Behandlung, wobei Biomarker einen großen Anteil haben. Die Entdeckung und Validierung von Biomarkern für humane Interventionsstudien oder auch klinische Untersuchungen kann durch die Verwendung von relevanten Surrogat-Geweben beschleunigt und erleichtert werden. Hierbei spielen Genexpressionsuntersuchungen im PBMC eine wichtige Rolle in der Prävention und Früherkennung von Krankheiten sowie der Bestimmung des persönlichen Krebsrisiko (Han *et al.*, 2008; Liew *et al.*, 2006). In der Krebsforschung stellen PBMC sowohl für *in vitro*- als auch *in vivo*-Untersuchungen ein viel



versprechendes Zellmodell dar, um Mechanismen der primären Chemoprävention durch Lebensmittel zu beleuchten. Mit den Untersuchungen in dieser Arbeit wurde eine Basis für derartige Untersuchungen gelegt und die Reagibilität dieses Zellmodells gezeigt. Die individuellen Schwankungen waren oft zu groß und/oder die Probandenanzahl zu gering um signifikante Ergebnisse zu erzielen. Somit sollte für zukünftige Untersuchungen die Anzahl der Spender erhöht werden, um trotz individueller Variationen Tendenzen ableiten zu können. Darüber hinaus ist es in weiteren Nutrigenetics-Untersuchungen mit einem größeren Probandenkollektiv notwendig herauszufinden, welche molekularbiologischen Unterschiede für die individuellen Variationen verantwortlich sind. Zur Validierung der *in vitro*-Ergebnisse sollten ausgewählte Parameter zugleich in der Primärzellkultur als auch *in vivo* in PBMC der identischen Spender durchgeführt werden. Als wichtiger Ansatz sollte die Erfassung des Einfluss der Testsubstanzen sowohl auf Transkriptions- als auch auf Translationsebene und weiterer funktionellen Konsequenzen in Zielgeweben stehen. Nur dieser direkte Vergleich und somit die Übertragung der Ergebnisse auf Zielgewebe kann die Frage der Eignung von PBMC als Surrogat-Gewebe beantworten.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

**Einleitung:** Eine Steigerung der Genexpression von Entgiftungsenzymen wird in der Krebsforschung als chemopräventiver Mechanismus gesehen. Zur Untersuchung derartiger Effekte ist es oft nicht möglich, Primärzellen von humanen Spendern aus dem Zielgewebe der Erkrankung zu erhalten. Ein viel versprechender Ansatz zur Lösung dieses Problems ist die Verwendung von Surrogat-Geweben. Hierbei stellen periphere mononukleäre Blutzellen (PBMC) aufgrund der einfachen, nicht-invasiven Gewinnung die am häufigsten verwendete Zellart dar.

**Zielstellung:** Das Ziel dieser Arbeit war, die Eignung von Genexpressionsprofilen in PBMC als Biomarker für die Verwendung *in vitro* und in humanen Interventionsstudien zu untersuchen. Basis für die Interpretation der Daten und somit der Bewertung der Zellen als Surrogat-Gewebe war ein Vergleich der Ergebnisse aus *in vitro*- und *in vivo*-Untersuchungen. Darüber hinaus sollte das chemopräventive Potential der Testsubstanzen abgeschätzt werden

**Methoden:** Die Isolation der PBMC für *in vitro*- und *in vivo*-Untersuchungen erfolgte durch Dichtegradientenzentrifugation. Gesamt-RNA wurde isoliert, um mittels DNA-Microarrays und Real-Time-PCR die basale Genexpression und den Einfluss verschiedener Stimuli (Extrakt aus der Wasserkresse, verschiedene Polyphenolmischungen, Butyrat) auf translationaler Ebene zu untersuchen. Vergleichende Analysen wurden mit der Kolonkarzinomzelllinie HT29 durchgeführt. Unter Verwendung humaner Blutzellen aus Interventionsstudien mit Wasserkresse und Fruchtsäften wurden Untersuchungen zum Einfluss auf Genexpression, Proteinexpression und Enzymaktivität durchgeführt.

**Ergebnisse:** Genexpressionsuntersuchungen (DNA-Microarray) ergaben, dass PBMC einen großen Teil (78 %) der analysierten Entgiftungsenzyme (n=192) exprimieren und die Höhe der Expression signifikant mit der Expression in humanen Kolonozyten korreliert. *In vitro* war Butyrat in der Lage, die beiden GST-Isoenzyme *T2* und *M2* sowohl in PBMC als auch in HT29 zu induzieren. Eine Vergleichbarkeit von *in vitro*- und *in vivo*-Ergebnissen wurde in Untersuchungen mit Wasserkresse festgestellt. Sowohl ein Extrakt aus der Wasserkresse als auch eine Intervention erhöhten die Genexpression (*in vitro*) und Aktivität (*in vivo*) der

Enzyme SOD und GPX. *In vivo* war dies nur bei Individuen mit dem Genotyp *GSTM1\*0* nachweisbar. Polyphenole beeinflussten *in vitro* und *in vivo* Enzyme der Entgiftung auf Transkriptionsebene nicht signifikant. Auf Proteinebene modulierte eine Fruchtsaftintervention die GSTP1-Konzentration.

**Schlussfolgerungen:** PBMC stellen ein viel versprechendes Zellmodell und eine wichtige Quelle für Biomarkeruntersuchungen dar. Die nachgewiesene Steigerung von Entgiftungssystemen durch Butyrat und sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe könnte die Zellen vor genotoxischen Substanzen und oxidativem Stress schützen und so eine Möglichkeit der Primärprävention in der Ernährung darstellen. Eine Übertragbarkeit der in der Zellkultur gewonnenen Ergebnisse auf die *in vivo*-Situation ist in Abhängigkeit der Testsubstanzen möglich. In weiterführenden Studien sollten unterschiedliche Zielgewebe zusätzlich untersucht werden.

## ABSTRACT

**Introduction:** In the field of cancer research the modulation of gene expression profiles which are related to cellular detoxification is considered as an important mechanism of chemoprevention. For the analysis of such effects it is often impossible to obtain primary cells from human donors of the target tissue of disease. A promising approach to solve this problem is the use of surrogate tissues. Due to the easy, non-invasive possibility to obtain peripheral blood mononuclear cells (PBMC), these cells are the most often used surrogate tissue.

**Aims:** The aim of this work was to examine the suitability of gene expression profiles in PBMC for *in vitro* investigations and for human intervention studies. As an important perspective for the interpretation and thus the validation of the cells as surrogate tissue the results from *in vitro* and *in vivo* investigations should be compared and evaluated. Furthermore, the chemopreventive potential of the test substances should be characterized.

**Methods:** PBMC for *in vitro* and *in vivo* investigations were isolated by density gradient centrifugation. Total-RNA was isolated to analyse the basal gene expression and the influence of different stimuli (polyphenol mixtures, watercress extract, and butyrate) on gene expression by DNA-microarrays and real-time-PCR.

Comparative studies were carried out with the colon carcinoma cell line HT29. Human test materials from intervention studies with watercress and fruit juices were used to analyse the influence on gene expression, protein expression and enzyme activity.

**Results:** Gene expression investigations (DNA-microarray) in PBMC showed that PBMC express a bulk (78 %) of the analysed detoxification enzymes (n=192) and that the expression levels correlated significantly with these of human colonocytes. *In vitro*, butyrate induced GST-isoenzymes *T2* and *M2* in PBMC as well as in HT29-cells. *In vitro*- and *in vivo* results were comparable in investigations with watercress. An extract from watercress as well as an intervention increased the gene expression (*in vitro*) and activity (*in vivo*) of the enzymes SOD and GPX. *In vivo* this was only observable in individuals with a *GSTM1\*0* genotype. Polyphenols could not influence different detoxification enzymes on transcriptional level, neither *in vitro* nor *in vivo*. On protein level an intervention with fruit juices modulated the GSTP1-concentration.

**Conclusion:** Primary blood cells represent a promising cell model and an important source for biomarker investigations. The increase of detoxification systems by butyrate and other secondary plant materials could protect the cells against genotoxic substances and oxidative stress and thus implicate effects of the primary prevention by the nutrition. The transferability of results from cell culture to the *in vivo* situation is - depending on the test substances - possible. In further studies different target tissues should be investigated additionally.

## 6 LITERATURVERZEICHNIS

- Achiron A, Gurevich M (2006) Peripheral blood gene expression signature mirrors central nervous system disease: the model of multiple sclerosis. *Autoimmun Rev* **5**; (8), 517-522.
- Anand P, Kunnumakkara AB, Sundaram C, Harikumar KB, Tharakan ST, Lai OS *et al.* (2008) Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes. *Pharm Res* **25**; (9), 2097-2116.
- Arsova-Sarafinovska Z, Matevska N, Eken A, Petrovski D, Banev S, Dzikova S *et al.* (2009) Glutathione peroxidase 1 (GPX1) genetic polymorphism, erythrocyte GPX activity, and prostate cancer risk. *Int Urol Nephrol* **41**; (1), 63-70.
- Aydemir TB, Blanchard RK, Cousins RJ (2006) Zinc supplementation of young men alters metallothionein, zinc transporter, and cytokine gene expression in leukocyte populations. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**; (6), 1699-1704.
- Baez S, Segura-Aguilar J, Widersten M, Johansson AS, 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 (Pt 1)**; 25-28.
- Bas A, Forsberg G, Hammarstrom S, Hammarstrom ML (2004) Utility of the housekeeping genes 18S rRNA, beta-actin and glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase for normalization in real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction analysis of gene expression in human T lymphocytes. *Scand J Immunol* **59**; (6), 566-573.
- Behrend L, Mohr A, Dick T, Zwacka RM (2005) Manganese superoxide dismutase induces p53-dependent senescence in colorectal cancer cells. *Mol Cell Biol* **25**; (17), 7758-7769.
- Bellion P, Hofmann T, Pool-Zobel BL, Will F, Dietrich H, Knaup B *et al.* (2008) Antioxidant effectiveness of phenolic apple juice extracts and their gut fermentation products in the human colon carcinoma cell line caco-2. *J Agric Food Chem* **56**; (15), 6310-6317.
- Bianchini F, Vainio H (2004) Isothiocyanates in cancer prevention. *Drug Metab Rev* **36**; (3-4), 655-667.
- Bingham SA, Day NE, Luen R, Ferari P, Slimani N, Norat T *et al.* (2003) Dietary fibre in food and protection against colorectal cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC): an observational study. *The Lancet* **361**; 1496-1501.
- Biomarkers Definitions Working Group (2001) Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther* **69**; (3), 89-95.
- Boffetta P, van der Hel O, Norppa H, Fabianova E, Fucic A, Gundy S *et al.* (2007) Chromosomal aberrations and cancer risk: results of a cohort study from Central Europe. *Am J Epidemiol* **165**; (1), 36-43.

- Boldrick JC, Alizadeh AA, Diehn M, Dudoit S, Liu CL, Belcher CE *et al.* (2002) Stereotyped and specific gene expression programs in human innate immune responses to bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**; (2), 972-977.
- Bonassi S, Znaor A, Ceppi M, Lando C, Chang WP, Holland N *et al.* (2007) An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. *Carcinogenesis* **28**; (3), 625-631.
- Bouwens M, Afman LA, Muller M (2007) Fasting induces changes in peripheral blood mononuclear cell gene expression profiles related to increases in fatty acid beta-oxidation: functional role of peroxisome proliferator activated receptor alpha in human peripheral blood mononuclear cells. *Am J Clin Nutr* **86**; (5), 1515-1523.
- Boyum A (1968) Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. *Scand J Clin Lab Invest* **21**; 77.
- Branca F, Hanley AB, Pool-Zobel BL, Verhagen H (2001) Biomarkers in Disease and Health. *Br J Nutr* **86**; (Supplement 1), S55-S92.
- Bub A, Watzl B, Blockhaus M, Briviba K, Liegibel UM, Müller H *et al.* (2003) Fruit juice consumption modulates antioxidative status, immune status and DNA damage. *J Nutr Biochem* **14**; (90), 98 .
- Burczynski ME, Twine NC, Dukart G, Marshall B, Hidalgo M, Stadler WM *et al.* (2005) Transcriptional profiles in peripheral blood mononuclear cells prognostic of clinical outcomes in patients with advanced renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* **11**; (3), 1181-1189.
- Chen C, Kong AN (2005) Dietary cancer-chemopreventive compounds: from signaling and gene expression to pharmacological effects. *Trends Pharmacol Sci* **26**; (6), 318-326.
- Chow HH, Hakim IA, Vining DR, Crowell JA, Tome ME, Ranger-Moore J *et al.* (2007) Modulation of human glutathione s-transferases by polyphenon e intervention. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **16**; (8), 1662-1666.
- Comalada M, Bailon E, de HO, Lara-Villoslada F, Xaus J, Zarzuelo A *et al.* (2006) The effects of short-chain fatty acids on colon epithelial proliferation and survival depend on the cellular phenotype. *J Cancer Res Clin Oncol* **132**; (8), 487-497.
- Connor KM, Hempel N, Nelson KK, Dabiri G, Gamarra A, Belarmino J *et al.* (2007) Manganese superoxide dismutase enhances the invasive and migratory activity of tumor cells. *Cancer Res* **67**; (21), 10260-10267.
- Costa E (2006) Hematologically important mutations: bilirubin UDP-glucuronosyltransferase gene mutations in Gilbert and Crigler-Najjar syndromes. *Blood Cells Mol Dis* **36**; (1), 77-80.
- Crujeiras AB, Parra D, Milagro FI, Goyenechea E, Larrarte E, Margareto J *et al.* (2008) Differential Expression of Oxidative Stress and Inflammation Related Genes in Peripheral Blood Mononuclear Cells in Response to a Low-Calorie Diet: A Nutrigenomics Study. *OMICS* **12**; (4), 251-261.

- Davie JR (2003) Inhibition of histone deacetylase activity by butyrate. *J Nutr* **133**; (7 Suppl), 2485S-2493S.
- de Pascual-Teresa S, Johnston KL, DuPont MS, O'Leary KA, Needs PW, Morgan LM *et al.* (2004) Quercetin metabolites downregulate cyclooxygenase-2 transcription in human lymphocytes *ex vivo* but not *in vivo*. *J Nutr* **134**; (3), 552-557.
- Duthie SJ, Ma A, Ross MA, Collins AR (1996) Antioxidant supplementation decreases oxidative DNA damage in human lymphocytes. *Cancer Res* **56**; 1291-1295.
- Eady JJ, Wortley GM, Wormstone YM, Hughes JC, Astley SB, Foxall RJ *et al.* (2005) Variation in gene expression profiles of peripheral blood mononuclear cells from healthy volunteers. *Physiol Genomics* **22**; (3), 402-411.
- Fenech M (2000) The *in vitro* micronucleus technique. *Mutat Res* **455**; (1-2), 81-95.
- Ferguson LR, Chavan RR, Harris PJ (2001) Changing concepts of dietary fiber: Implications for carcinogenesis. *Nutr Canc* **39**; 155-169.
- Ferguson LR, Harris PJ (2003) The dietary fibre debate: more food for thought. *Lancet* **361**; (9368), 1487-1488.
- Fresco P, Borges F, Diniz C, Marques MP (2006) New insights on the anticancer properties of dietary polyphenols. *Med Res Rev* **26**; (6), 747-766.
- Fuchs CS, Giovannucci E, Colditz GA, Hunter DJ, Stampfer MJ, Rosner B *et al.* (1999) Dietary fiber and the risk of colorectal cancer and adenoma in women. *N Engl J Med* **340**; 169-176.
- Gill CI, Haldar S, Boyd LA, Bennett R, Whiteford J, Butler M *et al.* (2007) Watercress supplementation in diet reduces lymphocyte DNA damage and alters blood antioxidant status in healthy adults. *Am J Clin Nutr* **85**; (2), 504-510.
- Giovannucci E, Rimm EB, Liu Y, Stampfer MJ, Willett WC (2003) A prospective study of cruciferous vegetables and prostate cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **12**; (12), 1403-1409.
- Glei M, Hofmann T, Kuster K, Hollmann J, Lindhauer MG, Pool-Zobel BL (2006) Both wheat (*Triticum aestivum*) bran arabinoxylans and gut flora-mediated fermentation products protect human colon cells from genotoxic activities of 4-hydroxynonenal and hydrogen peroxide. *J Agric Food Chem* **54**; (6), 2088-2095.
- Gomi F, Matsuo M (2002) Effects of 60% oxygen inhalation on the survival and antioxidant enzyme activities of young and old rats. *Mech Ageing Dev* **123**; (10), 1295-1304.
- Gonzalez C, Gonzalez H, Rodriguez L, Cortes L, Najera O, Hernandez-Hernandez F *et al.* (2006) Differential gene expression in lymphocytes from malnourished children. *Cell Biol Int* **30**; (7), 610-614.
- Hagmar L, Stromberg U, Bonassi S, Hansteen IL, Knudsen LE, Lindholm C *et al.* (2004) Impact of types of lymphocyte chromosomal aberrations on human cancer risk: results from Nordic and Italian cohorts. *Cancer Res* **64**; (6), 2258-2263.

- Hamer HM, Jonkers D, Venema K, Vanhoutvin S, Troost FJ, Brummer RJ (2008) Review article: the role of butyrate on colonic function. *Aliment Pharmacol Ther* **27**; (2), 104-119.
- Hammarstrom S, Hammarstrom ML, Sundblad G, Arnarp J, Lonngren J (1982) Mitogenic leukoagglutinin from *Phaseolus vulgaris* binds to a pentasaccharide unit in N-acetyllactosamine-type glycoprotein glycans. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**; (5), 1611-1615.
- Han M, Liew CT, Zhang HW, Chao S, Zheng R, Yip KT *et al.* (2008) Novel blood-based, five-gene biomarker set for the detection of colorectal cancer. *Clin Cancer Res* **14**; (2), 455-460.
- Haristoy X, Fahey JW, Scholtus I, Lozniewski A (2005) Evaluation of the antimicrobial effects of several isothiocyanates on *Helicobacter pylori*. *Planta Med* **71**; (4), 326-330.
- Hayes JD, Kelleher MO, Eggleston IM (2008) The cancer chemopreventive actions of phytochemicals derived from glucosinolates. *Eur J Nutr* **47 Suppl 2**; 73-88.
- Heiss E, Herhaus C, Klimo K, Bartsch H, Gerhauser C (2001) Nuclear factor kappa B is a molecular target for sulforaphane-mediated anti-inflammatory mechanisms. *J Biol Chem* **276**; (34), 32008-32015.
- Hengstler JG, Arand M, Herrero ME, Oesch F (1998) Polymorphisms of N-acetyltransferases, glutathione S-transferases, microsomal epoxide hydrolase and sulfotransferases: influence on cancer susceptibility. *Recent Results Cancer Res* **154**; 47-85.
- Hiratsuka A, Nishijima T, Okuda H, Ogura K, Watabe T (1997) Rat liver theta-class glutathione S-transferases T1-1 and T2-2: their chromatographic, electrophoretic, immunochemical, and functional properties. *Anal Biochem* **252**; (2), 229-237.
- Hoelzl C, Glatt H, Meini W, Sontag G, Haidinger G, Kundi M *et al.* (2008a) Consumption of Brussels sprouts protects peripheral human lymphocytes against 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) and oxidative DNA-damage: results of a controlled human intervention trial. *Mol Nutr Food Res* **52**; (3), 330-341.
- Hoelzl C, Lorenz O, Haudek V, Gundacker N, Knasmuller S, Gerner C (2008b) Proteome alterations induced in human white blood cells by consumption of Brussels sprouts: Results of a pilot intervention study. *Proteomics Clinical Applications* **2**; (1), 108-117.
- Hofmann T, Weber A, Sauer J, Glei M, Pool-Zobel BL (2008) Formation of tumour promoting and tumour inhibitory products during gut flora mediated fermentation of inulin and wheat bran. *J Clin Biochem Nutr* **43**; (Supple), 1-5.
- Hong WK, Sporn MB (1997) Recent advances in chemoprevention of cancer. *Science* **278**; 1073-1078.
- Hu Y, Benya RV, Carroll RE, Diamond AM (2005) Allelic loss of the gene for the GPX1 selenium-containing protein is a common event in cancer. *J Nutr* **135**; (12 Suppl), 3021S-3024S.



- Hu YJ, Diamond AM (2003) Role of glutathione peroxidase 1 in breast cancer: loss of heterozygosity and allelic differences in the response to selenium. *Cancer Res* **63**; (12), 3347-3351.
- Hussey AJ, Hayes JD (1992) Characterization of a human class-Theta glutathione S-transferase with activity towards 1-menaphthyl sulphate. *Biochem J* **286**; (Pt 3), 929-935.
- Janeway C, Travers P, Walport M, Shlomchik M (2002) Immunologie. 5. ed. Heidelberg; Spektrum Akademischer Verlag.
- Jang SG, Kim IJ, Kang HC, Park HW, Ahn SA, Yoon HJ *et al.* (2007) GSTT2 promoter polymorphisms and colorectal cancer risk. *BMC Cancer* **7**; 16.
- Jemal A, Murray T, Ward E, Samuels A, Tiwari RC, Ghafoor A *et al.* (2005) Cancer statistics, 2005. *CA Cancer J Clin* **55**; (1), 10-30.
- Ji Y, Morris ME (2003) Determination of phenethyl isothiocyanate in human plasma and urine by ammonia derivatization and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Biochem* **323**; (1), 39-47.
- Johnson AD, Zhang Y, Papp AC, Pinsonneault JK, Lim JE, Saffen D *et al.* (2008) Polymorphisms affecting gene transcription and mRNA processing in pharmacogenetic candidate genes: detection through allelic expression imbalance in human target tissues. *Pharmacogenet Genomics* **18**; (9), 781-791.
- Kadakol A, Ghosh SS, Sappal BS, Sharma G, Chowdhury JR, Chowdhury NR (2000) Genetic lesions of bilirubin uridine-diphosphoglucuronate glucuronosyltransferase (UGT1A1) causing Crigler-Najjar and Gilbert syndromes: correlation of genotype to phenotype. *Hum Mutat* **16**; (4), 297-306.
- Kaput J, Ordovas JM, Ferguson L, van OB, Rodriguez RL, Allen L *et al.* (2005) The case for strategic international alliances to harness nutritional genomics for public and personal health. *Br J Nutr* **94**; (5), 623-632.
- Kim SJ, Dix DJ, Thompson KE, Murrell RN, Schmid JE, Gallagher JE *et al.* (2007) Effects of storage, RNA extraction, genechip type, and donor sex on gene expression profiling of human whole blood. *Clin Chem* **53**; (6), 1038-1045.
- Klenow S, Glei M, Haber B, Owen R, Pool-Zobel BL (2008) Carob fibre compounds modulate parameters of cell growth differently in human HT29 colon adenocarcinoma cells than in LT97 colon adenoma cells. *Food Chem Toxicol* **46**; (4), 1389-1397.
- Klinder A, Forster A, Caderni G, Femia AP, Pool-Zobel BL (2004) Fecal water genotoxicity is predictive of tumor-preventive activities by inulin-like oligofructoses, probiotics (*Lactobacillus rhamnosus* and *Bifidobacterium lactis*), and their synbiotic combination. *Nutr Cancer* **49**; (2), 144-155.
- Knight TR, Choudhuri S, Klaassen CD (2008) Induction of hepatic glutathione S-transferases in male mice by prototypes of various classes of microsomal enzyme inducers. *Toxicol Sci* **106**; (2), 329-338.

- Kuby J, Goldsby RA, Kindt TJ, Osborne BA (2006) Immunology: International edition. 6 ed. Hampshire; Palgrave Macmillan.
- Kuo YC, Huang YL, Chen CC, Lin YS, Chuang KA, Tsai WJ (2002) Cell cycle progression and cytokine gene expression of human peripheral blood mononuclear cells modulated by *Agaricus blazei*. *J Lab Clin Med* **140**; (3), 176-187.
- Lampe JW (2007) Diet, genetic polymorphisms, detoxification, and health risks. *Altern Ther Health Med* **13**; (2), S108-S111.
- Lampe JW, Chen C, Li S, Prunty J, Grate MT, Meehan DE *et al.* (2000) Modulation of human glutathione *S*-transferases by botanically defined vegetable diets. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **9**; 787-793.
- Lampe JW, Stepaniants SB, Mao M, Radich JP, Dai H, Linsley PS *et al.* (2004) Signatures of environmental exposures using peripheral leukocyte gene expression: tobacco smoke. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **13**; (3), 445-453.
- Leung TF, Wong KY, Wong CK, Fung KP, Lam CW, Fok TF *et al.* (2008) In vitro and clinical immunomodulatory effects of a novel Pentaherbs concoction for atopic dermatitis. *Br J Dermatol* **158**; (6), 1216-1223.
- Liew CC, Ma J, Tang HC, Zheng R, Dempsey AA (2006) The peripheral blood transcriptome dynamically reflects system wide biology: a potential diagnostic tool. *J Lab Clin Med* **147**; (3), 126-132.
- Lin JP, O'Donnell CJ, Schwaiger JP, Cupples LA, Lingenhel A, Hunt SC *et al.* (2006) Association between the UGT1A1\*28 allele, bilirubin levels, and coronary heart disease in the Framingham Heart Study. *Circulation* **114**; (14), 1476-1481.
- London SJ, Yuan JM, Chung FL, Gao YT, Coetzee GA, Ross RK *et al.* (2000) Isothiocyanates, glutathione *S*-transferase M1 and T1 polymorphisms, and lung-cancer risk: a prospective study of men in Shanghai, China. *Lancet* **356**; (9231), 724-729.
- Lorenzo Y, Azqueta A, Luna L, Bonilla F, Dominguez G, Collins AR (2008) The carotenoid {beta}-cryptoxanthin stimulates the repair of DNA oxidation damage in addition to acting as an antioxidant in human cells. *Carcinogenesis* **30**; (2), 308-314.
- Maouche S, Poirier O, Godefroy T, Olaso R, Gut I, Collet JP *et al.* (2008) Performance comparison of two microarray platforms to assess differential gene expression in human monocyte and macrophage cells. *BMC Genomics* **9**; 302.
- Marzec JM, Christie JD, Reddy SP, Jedlicka AE, Vuong H, Lancken PN *et al.* (2007) Functional polymorphisms in the transcription factor NRF2 in humans increase the risk of acute lung injury. *FASEB J* **21**; (9), 2237-2246.
- Mates JM, Sanchez-Jimenez F (1999) Antioxidant enzymes and their implications in pathophysiological processes. *Front Biosci* **4**; D339-D345.
- Mathers CD, Loncar D (2006) Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. *PLoS Med* **3**; (11), e442.

- Miltenyi S, Muller W, Weichel W, Radbruch A (1990) High gradient magnetic cell separation with MACS. *Cytometry* **11**; (2), 231-238.
- Monleon D, Morales JM, Barrasa A, Lopez JA, Vazquez C, Celda B (2008) Metabolite profiling of fecal water extracts from human colorectal cancer. *NMR Biomed* **22**; (3), 342-348.
- Murley JS, Kataoka Y, Cao D, Li JJ, Oberley LW, Grdina DJ (2004) Delayed radioprotection by NFkappaB-mediated induction of Sod2 (MnSOD) in SA-NH tumor cells after exposure to clinically used thiol-containing drugs. *Radiat Res* **162**; (5), 536-546.
- Nesnow S, Ross J, Nelson G, Holden K, Erexson G, Kligerman A *et al.* (1993) Quantitative and temporal relationships between DNA adduct formation in target and surrogate tissues: implications for biomonitoring. *Environ Health Perspect* **101 Suppl 3**; 37-42.
- Neyestani TR, Gharavi A, Kalayi A (2008) Selective effects of tea extract and its phenolic compounds on human peripheral blood mononuclear cell cytokine secretions. *Int J Food Sci Nutr* **4**; 1-10.
- Nioi P, McMahon M, Itoh K, Yamamoto M, Hayes JD (2003) Identification of a novel Nrf2-regulated antioxidant response element (ARE) in the mouse NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 gene: reassessment of the ARE consensus sequence. *Biochem J* **374**; (Pt 2), 337-348.
- Niu CS, Chang CK, Lin LS, Jou SB, Kuo DH, Liao SS *et al.* (1998) Modification of superoxide dismutase (SOD) mRNA and activity by a transient hypoxic stress in cultured glial cells. *Neurosci Lett* **251**; (3), 145-148.
- Nowell PC (1960) Phytohemagglutinin: an initiator of mitosis in cultures of normal human leukocytes. *Cancer Res* **20**; 462-466.
- Ornish D, Lin J, Daubenmier J, Weidner G, Epel E, Kemp C *et al.* (2008) Increased telomerase activity and comprehensive lifestyle changes: a pilot study. *Lancet Oncol* **9**; (11), 1048-1057.
- Papp LV, Lu J, Holmgren A, Khanna KK (2007) From selenium to selenoproteins: synthesis, identity, and their role in human health. *Antioxid Redox Signal* **9**; (7), 775-806.
- Park Y, Hunter DJ, Spiegelman D, Bergkvist L, Berrino F, van den Brandt PA *et al.* (2005) Dietary fiber intake and risk of colorectal cancer: a pooled analysis of prospective cohort studies. *JAMA* **294**; (22), 2849-2857.
- Pavanello S, Kapka L, Siwinska E, Mielzynska D, Bolognesi C, Clonfero E (2008) Micronuclei related to anti-B[a]PDE-DNA adduct in peripheral blood lymphocytes of heavily polycyclic aromatic hydrocarbon-exposed nonsmoking coke-oven workers and controls. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **17**; (10), 2795-2799.
- Persson I, He L, Fang C, Normen L, Rylander R (2000) Influence of vegetables on the expression of GSTP1 in humans--a pilot intervention study (Sweden). *Cancer Causes Control* **11**; (4), 359-361.

- Pool-Zobel B, Veeriah S, Bohmer FD (2005) Modulation of xenobiotic metabolising enzymes by anticarcinogens-focus on glutathione S-transferases and their role as targets of dietary chemoprevention in colorectal carcinogenesis. *Mutat Res* **591**; (1-2), 74-92.
- Pullar JM, Thomson SJ, King MJ, Turnbull CI, Midwinter RG, Hampton MB (2004) The chemopreventive agent phenethyl isothiocyanate sensitizes cells to Fas-mediated apoptosis. *Carcinogenesis* **25**; (5), 765-772.
- Radeva M, Hofmann T, Altenberg B, Mothes H, Richter KK, Pool-Zobel B *et al.* (2008) The database dbEST correctly predicts gene expression in colon cancer patients. *Curr Pharm Biotechnol* **9**; (6), 510-515.
- Raijmakers MT, Jansen PL, Steegers EA, Peters WH (2000) Association of human liver bilirubin UDP-glucuronyltransferase activity with a polymorphism in the promoter region of the UGT1A1 gene. *J Hepatol* **33**; (3), 348-351.
- Ramos S (2008) Cancer chemoprevention and chemotherapy: dietary polyphenols and signalling pathways. *Mol Nutr Food Res* **52**; (5), 507-526.
- Ranganna K, Mathew OP, Yatsu FM, Yousefipour Z, Hayes BE, Milton SG (2007) Involvement of glutathione/glutathione S-transferase antioxidant system in butyrate-inhibited vascular smooth muscle cell proliferation. *FEBS J* **274**; (22), 5962-5978.
- Reszka E, Wasowicz W, Gromadzinska J (2006) Genetic polymorphism of xenobiotic metabolising enzymes, diet and cancer susceptibility. *Br J Nutr* **96**; (4), 609-619.
- Riso P, Visioli F, Grande S, Guarnieri S, Gardana C, Simonetti P *et al.* (2006) Effect of a tomato-based drink on markers of inflammation, immunomodulation, and oxidative stress. *J Agric Food Chem* **54**; (7), 2563-2566.
- Rockett JC, Burczynski ME, Fornace AJ, Herrmann PC, Krawetz SA, Dix DJ (2004) Surrogate tissue analysis: monitoring toxicant exposure and health status of inaccessible tissues through the analysis of accessible tissues and cells. *Toxicol Appl Pharmacol* **194**; (2), 189-199.
- Rockett JC, Kavlock RJ, Lambright CR, Parks LG, Schmid JE, Wilson VS *et al.* (2002) DNA arrays to monitor gene expression in rat blood and uterus following 17beta-estradiol exposure: biomonitoring environmental effects using surrogate tissues. *Toxicol Sci* **69**; (1), 49-59.
- Roller M, Clune Y, Collins K, Rechkemmer G, Watzl B (2007) Consumption of prebiotic inulin enriched with oligofructose in combination with the probiotics *Lactobacillus rhamnosus* and *Bifidobacterium lactis* has minor effects on selected immune parameters in polypectomised and colon cancer patients. *Br J Nutr* **97**; (4), 676-684.
- Rossi M, Negri E, Talamini R, Bosetti C, Parpinel M, Gnagnarella P *et al.* (2006) Flavonoids and colorectal cancer in Italy. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **15**; (8), 1555-1558.
- Samoylenko A, Dimova EY, Horbach T, Teplyuk N, Immenschuh S, Kietzmann T (2008) Opposite expression of the antioxidant heme oxygenase-1 in primary cells and tumor cells: regulation by interaction of USF-2 and Fra-1. *Antioxid Redox Signal* **10**; (7), 1163-1174.

- Sauer J, Richter KK, Pool-Zobel BL (2007a) Physiological concentrations of butyrate favorably modulate genes of oxidative and metabolic stress in primary human colon cells. *J Nutr Biochem* **18**; (11), 736-745.
- Sauer J, Richter KK, Pool-Zobel BL (2007b) Products formed during fermentation of the prebiotic inulin with human gut flora enhance expression of biotransformation genes in human primary colon cells. *Br J Nutr* **97**; (5), 928-937.
- Schaeferhenrich A, Sendt W, Scheele J, Kuechler A, Liehr T, Claussen U *et al.* (2003) Putative colon cancer risk factors damage global DNA and TP53 in primary human colon cells isolated from surgical samples. *Food Chem Toxicol* **41**; (5), 655-664.
- Sengupta S, Muir JG, Gibson PR (2006) Does butyrate protect from colorectal cancer? *J Gastroenterol Hepatol* **21**; (1 Pt 2), 209-218.
- Seow A, Vainio H, Yu MC (2005) Effect of glutathione-S-transferase polymorphisms on the cancer preventive potential of isothiocyanates: an epidemiological perspective. *Mutat Res* **592**; (1-2), 58-67.
- Seow A, Yuan JM, Sun CL, Van Den Berg D, Lee HP, Yu MC (2002) Dietary isothiocyanates, glutathione S-transferase polymorphisms and colorectal cancer risk in the Singapore Chinese Health Study. *Carcinogenesis* **23**; (12), 2055-2061.
- Shi L, Reid LH, Jones WD, Shippy R, Warrington JA, Baker SC *et al.* (2006) The MicroArray Quality Control (MAQC) project shows inter- and intraplatform reproducibility of gene expression measurements. *Nat Biotechnol* **24**; (9), 1151-1161.
- Spitz MR, Duphorne CM, Detry MA, Pillow PC, Amos CI, Lei L *et al.* (2000) Dietary intake of isothiocyanates: evidence of a joint effect with glutathione S-transferase polymorphisms in lung cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **9**; (10), 1017-1020.
- Steck SE, Gaudet MM, Britton JA, Teitelbaum SL, Terry MB, Neugut AI *et al.* (2007) Interactions among GSTM1, GSTT1 and GSTP1 polymorphisms, cruciferous vegetable intake and breast cancer risk. *Carcinogenesis* **28**; (9), 1954-1959.
- Steinkellner H, Hoelzl C, Uhl M, Cavin C, Haidinger G, Gsur A *et al.* (2005) Coffee consumption induces GSTP in plasma and protects lymphocytes against (+/-)-anti-benzo[a]pyrene-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxide induced DNA-damage: results of controlled human intervention trials. *Mutat Res* **591**; (1-2), 264-275.
- Surh YJ (2003) Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nat Rev Cancer* **3**; (10), 768-780.
- Talalay P, Fahey JW (2001) Phytochemicals from cruciferous plants protect against cancer by modulating carcinogen metabolism. *J Nutr* **131**; (11 Suppl), 3027S-3033S.
- Talalay P, Fahey JW, Holtzclaw WD, Prestera T, Zhang Y (1995) Chemoprotection against cancer by phase 2 enzyme induction. *Toxicol Lett* **82-83**; 173-179.
- Tan KL, Board PG (1996) Purification and characterization of a recombinant human Theta-class glutathione transferase (GSTT2-2). *Biochem J* **315**; (Pt 3), 727-732.

- Tang D, Phillips DH, Stampfer M, Mooney LA, Hsu Y, Cho S *et al.* (2001) Association between carcinogen-DNA adducts in white blood cells and lung cancer risk in the physicians health study. *Cancer Res* **61**; (18), 6708-6712.
- Taylor RC, Acquah-Mensah G, Singhal M, Malhotra D, Biswal S (2008) Network inference algorithms elucidate Nrf2 regulation of mouse lung oxidative stress. *PLoS Comput Biol* **4**; (8), e1000166.
- Tijhuis MJ, Visker MH, Aarts JM, Peters WH, Roelofs HM, den Camp LO *et al.* (2007) Glutathione S-transferase phenotypes in relation to genetic variation and fruit and vegetable consumption in an endoscopy-based population. *Carcinogenesis* **28**; (4), 848-857.
- Twine NC, Stover JA, Marshall B, Dukart G, Hidalgo M, Stadler W *et al.* (2003) Disease-associated expression profiles in peripheral blood mononuclear cells from patients with advanced renal cell carcinoma. *Cancer Res* **63**; (18), 6069-6075.
- van Leeuwen DM, Gottschalk RW, van Herwijnen MH, Moonen EJ, Kleinjans JC, van Delft JH (2005) Differential gene expression in human peripheral blood mononuclear cells induced by cigarette smoke and its constituents. *Toxicol Sci* **86**; (1), 200-210.
- van Lieshout EM, Peters WH, Jansen JB (1996) Effect of oltipraz, alpha-tocopherol, beta-carotene and phenethylisothiocyanate on rat oesophageal, gastric, colonic and hepatic glutathione, glutathione S-transferase and peroxidase. *Carcinogenesis* **17**; (7), 1439-1445.
- van Poppel G, Verhoeven DT, Verhagen H, Goldbohm RA (1999) Brassica vegetables and cancer prevention. Epidemiology and mechanisms. *Adv Exp Med Biol* **472**; 159-168.
- Van RH, Ikeno Y, Hamilton M, Pahlavani M, Wolf N, Thorpe SR *et al.* (2003) Life-long reduction in MnSOD activity results in increased DNA damage and higher incidence of cancer but does not accelerate aging. *Physiol Genomics* **16**; (1), 29-37.
- Vang O, Rasmussen BF, Sorensen H, Clausen J, Andersen O (1995) Effects of Dietary Broccoli on Antioxidant Enzymes. *Clinical Chemistry* **41**; (12B), 1910-1911.
- Veeriah S, Hofmann T, Gleis M, Dietrich H, Will F, Schreier P *et al.* (2007) Apple polyphenols and products formed in the gut differently inhibit survival of human cell lines derived from colon adenoma (LT97) and carcinoma (HT29). *J Agric Food Chem* **55**; (8), 2892-2900.
- Veeriah S, Miene C, Habermann N, Hofmann T, Klenow S, Sauer J *et al.* (2008) Apple polyphenols modulate expression of selected genes related to toxicological defence and stress response in human colon adenoma cells. *Int J Cancer* **122**; (12), 2647-2655.
- Vereninov AA, Vassilieva IO, Yurinskaya VE, Matveev VV, Glushankova LN, Lang F *et al.* (2001) Differential transcription of ion transporters, NHE1, ATP1B1, NKCC1 in human peripheral blood lymphocytes activated to proliferation. *Cell Physiol Biochem* **11**; (1), 19-26.

- Visanji JM, Duthie SJ, Pirie L, Thompson DG, Padfield PJ (2004) Dietary isothiocyanates inhibit Caco-2 cell proliferation and induce G2/M phase cell cycle arrest, DNA damage, and G2/M checkpoint activation. *J Nutr* **134**; (11), 3121-3126.
- Wang LI, Giovannucci EL, Hunter D, Neubergh D, Su L, Christiani DC (2004) Dietary intake of Cruciferous vegetables, Glutathione S-transferase (GST) polymorphisms and lung cancer risk in a Caucasian population. *Cancer Causes Control* **15**; (10), 977-985.
- Wang X, Tomso DJ, Chorley BN, Cho HY, Cheung VG, Kleeberger SR *et al.* (2007) Identification of polymorphic antioxidant response elements in the human genome. *Hum Mol Genet* **16**; (10), 1188-1200.
- Wang X, Tomso DJ, Liu X, Bell DA (2005) Single nucleotide polymorphism in transcriptional regulatory regions and expression of environmentally responsive genes. *Toxicol Appl Pharmacol* **207**; (2 Suppl), 84-90.
- Wark PA, Grubben MJ, Peters WH, Nagengast FM, Kampman E, Kok FJ *et al.* (2004) Habitual consumption of fruits and vegetables: associations with human rectal glutathione S-transferase. *Carcinogenesis* **25**; (11), 2135-2142.
- Wattenberg LW (1985) Chemoprevention of cancer. *Cancer Res* **45**; (1), 1-8.
- Weisel T, Baum M, Eisenbrand G, Dietrich H, Will F, Stockis JP *et al.* (2006) An anthocyanin/polyphenolic-rich fruit juice reduces oxidative DNA damage and increases glutathione level in healthy probands. *Biotechnology Journal* **1**; (4), 388-397.
- Whitney AR, Diehn M, Popper SJ, Alizadeh AA, Boldrick JC, Relman DA *et al.* (2003) Individuality and variation in gene expression patterns in human blood. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**; (4), 1896-1901.
- Wibaut-Berlaimont V, Randi AM, Mandryko V, Lunnon MW, Haskard DO, Naoumova RP (2005) Atorvastatin affects leukocyte gene expression in dyslipidemia patients: in vivo regulation of hemostasis, inflammation and apoptosis. *J Thromb Haemost* **3**; (4), 677-685.
- Willett WC (2008) Overview and perspective in human nutrition. *Asia Pac J Clin Nutr* **17 Suppl 1**; 1-4.
- World Cancer Research Fund (2007) World Cancer Research Fund / American Institute for Cancer Research. Food, Nutrition, Physical Activity, and the Prevention of Cancer: A Global Perspective. *Washington, DC: AICR*.
- World Health Organization (2007) The World Health Organization's Fight Against Cancer: Strategies That Prevent, Cure and Care. *WHO Library Cataloguing-in-Publication Data*.
- Xu Y, Porntadavity S, St Clair DK (2002) Transcriptional regulation of the human manganese superoxide dismutase gene: the role of specificity protein 1 (Sp1) and activating protein-2 (AP-2). *Biochem J* **362**; (Pt 2), 401-412.
- Yang CS, Landau JM, Huang MT, Newmark HL (2001) Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. *Annu Rev Nutr* **21**; 381-406.

- Yazdanparast R, Bahramikia S, Ardestani A (2008) Nasturtium officinale reduces oxidative stress and enhances antioxidant capacity in hypercholesterolaemic rats. *Chem Biol Interact* **172**; (3), 176-184.
- Zhao B, Seow A, Lee EJ, Poh WT, Teh M, Eng P *et al.* (2001) Dietary isothiocyanates, glutathione S-transferase -M1, -T1 polymorphisms and lung cancer risk among Chinese women in Singapore. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **10**; (10), 1063-1067.
- Zhao Y, Oberley TD, Chaiswing L, Lin SM, Epstein CJ, Huang TT *et al.* (2002) Manganese superoxide dismutase deficiency enhances cell turnover via tumor promoter-induced alterations in AP-1 and p53-mediated pathways in a skin cancer model. *Oncogene* **21**; (24), 3836-3846.
- Zimmerer JM, Lesinski GB, Ruppert AS, Radmacher MD, Noble C, Kendra K *et al.* (2008) Gene expression profiling reveals similarities between the in vitro and in vivo responses of immune effector cells to IFN-alpha. *Clin Cancer Res* **14**; (18), 5900-5906.



## 7 ANHANG

### 7.1 LISTE DER MITTELS DNA-MICROARRAY UNTERSUCHTEN GENE (HS11 GEARRAY Q „HUMAN DRUG METABOLISM GENE ARRAY“)

Symbol	GeneBank	Beschreibung
ABCB1	NM_000927	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1
ABCB4	NM_000443	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 4
ABCC1	NM_004996	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 1
ABCC2	NM_000392	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 2
ABCC3	NM_003786	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 3
ABCC5	NM_005688	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 5
ABCG2	NM_004827	ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 2
ACAT1	NM_000019	Acetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1 (acetoacetyl Coenzyme A thiolase)
ACAT2	NM_005891	Acetyl-Coenzyme A acetyltransferase 2 (acetoacetyl Coenzyme A thiolase)
CHAT	NM_020985	Choline acetyltransferase
CHST1	NM_003654	Carbohydrate (keratan sulfate Gal-6) sulfotransferase 1
CHST2	NM_004267	Carbohydrate (N-acetylglucosamine-6-O) sulfotransferase 2
CHST3	NM_004273	Carbohydrate (chondroitin 6) sulfotransferase 3
CHST4	NM_005769	Carbohydrate (N-acetylglucosamine 6-O) sulfotransferase 4
CHST5	NM_012126	Carbohydrate (N-acetylglucosamine 6-O) sulfotransferase 5
CHST6	NM_021615	Carbohydrate (N-acetylglucosamine 6-O) sulfotransferase 6
CHST7	NM_019886	Carbohydrate (N-acetylglucosamine 6-O) sulfotransferase 7
CHST8	NM_022467	Carbohydrate (N-acetylgalactosamine 4-O) sulfotransferase 8
COMT	NM_000754	Catechol-O-methyltransferase
Crat	NM_000755	Carnitine acetyltransferase
GAL3ST1	NM_004861	Galactose-3-O-sulfotransferase 1
CYP11A1	NM_000781	Cytochrome P450, family 11, subfamily A, polypeptide 1
CYP1A1	NM_000499	Cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide 1
CYP1B1	NM_000104	Cytochrome P450, family 1, subfamily B, polypeptide 1
CYP24A1	NM_000782	Cytochrome P450, family 24, subfamily A, polypeptide 1
CYP2A6	NM_000762	Cytochrome P450, family 2, subfamily A, polypeptide 6
CYP2B6	NM_000767	Cytochrome P450, family 2, subfamily B, polypeptide 6
CYP2C19	NM_000769	Cytochrome P450, family 2, subfamily C, polypeptide 19
CYP2C8	NM_000770	Cytochrome P450, family 2, subfamily C, polypeptide 8
CYP2C9	NM_000771	Cytochrome P450, family 2, subfamily C, polypeptide 9
CYP2D6	NM_000106	Cytochrome P450, family 2, subfamily D, polypeptide 6
CYP2E1	NM_000773	Cytochrome P450, family 2, subfamily E, polypeptide 1
CYP2F1	NM_000774	Cytochrome P450, family 2, subfamily F, polypeptide 1
CYP3A4	NM_017460	Cytochrome P450, family 3, subfamily A, polypeptide 4
CYP3A5	NM_000777	Cytochrome P450, family 3, subfamily A, polypeptide 5
CYP3A7	NM_000765	Cytochrome P450, family 3, subfamily A, polypeptide 7
CYP4A11	NM_000778	Cytochrome P450, family 4, subfamily A, polypeptide 11
CYP4B1	NM_000779	Cytochrome P450, family 4, subfamily B, polypeptide 1
CYP4F3	NM_000896	Cytochrome P450, family 4, subfamily F, polypeptide 3
CYP7A1	NM_000780	Cytochrome P450, family 7, subfamily A, polypeptide 1
CYP7B1	NM_004820	Cytochrome P450, family 7, subfamily B, polypeptide 1
CYP8B1	NM_004391	Cytochrome P450, family 8, subfamily B, polypeptide 1
DLAT	NM_001931	Dihydrolipoamide S-acetyltransferase
EPHX1	NM_000120	Hypothetical gene supported by AK124699
EPHX2	NM_001979	Epoxide hydrolase 2, cytoplasmic

Symbol	GeneBank	Beschreibung
GSTA1	NM_145740	Glutathione S-transferase A1
GSTA3	NM_000847	Glutathione S-transferase A3
GSTA4	NM_001512	Glutathione S-transferase A4
GSTM2	NM_000848	Glutathione S-transferase M2 (muscle)
GSTM3	NM_000849	Glutathione S-transferase M3 (brain)
GSTM5	NM_000851	Glutathione S-transferase M5
GSTP1	NM_000852	Glutathione S-transferase pi
GSTT1	NM_000853	Glutathione S-transferase theta 1
GSTT2	NM_000854	Glutathione S-transferase theta 2
HAT1	NM_003642	Histone acetyltransferase 1
MYST2	NM_007067	MYST histone acetyltransferase 2
CHST10	NM_004854	Carbohydrate sulfotransferase 10
HNMT	NM_006895	Histamine N-methyltransferase
ABHD1	NM_032604	Abhydrolase domain containing 1
NAT5	NM_016100	N-acetyltransferase 5 (ARD1 homolog, <i>S. cerevisiae</i> )
CYP20A1	NM_020674	Cytochrome P450, family 20, subfamily A, polypeptide 1
LTA4H	NM_000895	Leukotriene A4 hydrolase
MGST1	NM_020300	Microsomal glutathione S-transferase 1
MGST2	NM_002413	Microsomal glutathione S-transferase 2
MGST3	NM_004528	Microsomal glutathione S-transferase 3
MYST4	NM_012330	MYST histone acetyltransferase (monocytic leukemia) 4
MT1A	NM_005946	Metallothionein 1A (functional)
MT1E	MN_175617	Metallothionein 1E (functional)
MT1G	NM_005950	Metallothionein 1G
MT1H	NM_005951	Metallothionein 1H
MT1L	MN_001447	Metallothionein 1L
MT2A	NM_005953	Metallothionein 2A
MT3	NM_005954	Metallothionein 3 (growth inhibitory factor (neurotrophic))
MT1X	NM_005952	Metallothionein 1X
NAT1	NM_000662	N-acetyltransferase 1 (arylamine N-acetyltransferase)
NNMT	NM_006169	Nicotinamide N-methyltransferase
CYP26B1	NM_019885	Cytochrome P450, family 26, subfamily B, polypeptide 1
POR	NM_000941	P450 (cytochrome) oxidoreductase
SULT1E1	NM_005420	Sulfotransferase family 1E, estrogen-preferring, member 1
SULT1A1	NM_001055	Sulfotransferase family, cytosolic, 1A, phenol-preferring, member 1
SULT1A2	NM_001054	Sulfotransferase family, cytosolic, 1A, phenol-preferring, member 2
SULT1B1	NM_014465	Sulfotransferase family, cytosolic, 1B, member 1
SULT1C1	NM_001056	Sulfotransferase family, cytosolic, 1C, member 1
SULT1C2	NM_006588	Sulfotransferase family, cytosolic, 1C, member 2
SULT2A1	NM_003167	Sulfotransferase family, cytosolic, 2A, member 1
SULT2B1	NM_004605	Sulfotransferase family, cytosolic, 2B, member 1
SULT4A1	NM_014351	Sulfotransferase family 4A, member 1
TBXAS1	NM_001061	Thromboxane A synthase 1 (platelet, cytochrome P450)
TPMT	NM_000367	Thiopurine S-methyltransferase
TPST1	NM_003596	Tyrosylprotein sulfotransferase 1
TPST2	NM_003595	Tyrosylprotein sulfotransferase 2
UGT1A1	NM_000463	UDP glycosyltransferase 1 family, polypeptide A1
UGT2A1	NM_006798	UDP glycosyltransferase 2 family, polypeptide A1
UGT1A4	NM_007120	UDP glucuronosyltransferase 1 family, polypeptide A4
UGT2B10	NM_001075	UDP glycosyltransferase 2 family, polypeptide B10
UGT2B4	NM_021139	UDP glycosyltransferase 2 family, polypeptide B4

## 7.2 LISTE DER MITTELS DNA-MICROARRAY UNTERSUCHTEN GENE (HS12 GEARRAY Q “HUMAN STRESS AND TOXICITY PATHWAY FINDER GENE ARRAY”)

Symbol	GeneBank	Beschreibung
Annexin A5	NM_001154	Annexin V
ATM	NM_000051	Ataxia telangiectasia mutated (includes complementation groups A, C and D)
BAX	NM_004324	BCL2-associated X protein
BCL2L1	NM_138578	BCL2-like 1
BCL2L2	NM_004050	BCL2-like 2
CASP1	NM_033292	Caspase 1, apoptosis-related cysteine protease
CASP10	NM_001230	Caspase 10, apoptosis-related cysteine protease
CASP8	NM_001228	Caspase 8, apoptosis-related cysteine protease
CAT	NM_001752	Catalase
CCNC	NM_005190	Cyclin C
CCND1	NM_053056	Cyclin D1 (PRAD1
CCNG1	NM_004060	Cyclin G1
CDKN1A	NM_000389	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1)
CHEK2	NM_007194	CHK2 checkpoint homolog (S. pombe)
CRYAB	NM_001885	Crystallin, alpha B
CSF2	NM_000758	Colony stimulating factor 2 (granulocyte-macrophage)
CYP1A1	NM_000499	Cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide 1
CYP1B1	NM_000104	Cytochrome P450, family 1, subfamily B, polypeptide 1
CYP2E1	NM_000773	Cytochrome P450, family 2, subfamily E, polypeptide 1
CYP7A1	NM_000780	Cytochrome P450, family 7, subfamily A, polypeptide 1
CYP7B1	NM_004820	Cytochrome P450, family 7, subfamily B, polypeptide 1
DDB1	NM_001923	Damage-specific DNA binding protein 1, 127kDa
DDIT3	NM_004083	DNA-damage-inducible transcript 3
DNAJA1	NM_001539	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily A, member 1
DNAJB4	NM_007034	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 4
E2F1	NM_005225	E2F transcription factor 1
EGR1	NM_001964	Early growth response 1
EPHX2	NM_001979	Epoxide hydrolase 2, cytoplasmic
ERCC1	NM_001983	Excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, group 1
ERCC3	NM_000122	Excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, group 3
ERCC4	NM_005236	Excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, group 4
ERCC5	NM_000123	Excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, group 5
FMO1	NM_002021	Flavin containing monooxygenase 1
FMO5	NM_001461	Flavin containing monooxygenase 5
GADD45A	NM_001924	Growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha
GADD45B	NM_015675	Growth arrest and DNA-damage-inducible, beta
GPX1	NM_000581	Glutathione peroxidase 1
GSR	NM_000637	Glutathione reductase
GSTM3	NM_000849	Glutathione S-transferase M3 (brain)
HMOX1	NM_002133	Heme oxygenase (decycling) 1
HMOX2	NM_002134	Heme oxygenase (decycling) 2
HSF1	NM_005526	Heat shock transcription factor 1
HSPH1	NM_006644	Heat shock 105kDa/110kDa protein 1
HSPA1A	NM_005345	Heat shock 70kDa protein 1A
HSPA1B	NM_005346	Heat shock 70kDa protein 1B
HSPA1L	NM_005527	Heat shock 70kDa protein 1-like
HSPA2	NM_021979	Heat shock 70kDa protein 2

Symbol	GeneBank	Beschreibung
HSPA4	NM_002154	Heat shock 70kDa protein 4
HSPA5	NM_005347	Heat shock 70kDa protein 5 (glucose-regulated protein, 78kDa)
HSPA6	NM_002155	Heat shock 70kDa protein 6 (HSP70B')
HSPA8	NM_006597	Heat shock 70kDa protein 8
HSPA9B	NM_004134	Heat shock 70kDa protein 9B (mortalin-2)
HSPB1	NM_001540	Heat shock 27kDa protein 1
HSPCA	NM_005348	Heat shock 90kDa protein 1, alpha
HSPCB	NM_007355	Heat shock 90kDa protein 1, beta
HSPD1	NM_002156	Heat shock 60kDa protein 1 (chaperonin)
HSPE1	NM_002157	Heat shock 10kDa protein 1 (chaperonin 10)
IGFBP6	NM_002178	Insulin-like growth factor binding protein 6
IL18	NM_001562	Interleukin 18 (interferon-gamma-inducing factor)
IL1A	NM_000575	Interleukin 1, alpha
IL1B	NM_000576	Interleukin 1, beta
IL6	NM_000600	Interleukin 6 (interferon, beta 2)
LTA	NM_000595	Lymphotoxin alpha (TNF superfamily, member 1)
MDM2	NM_002392	Mdm2, transformed 3T3 cell double minute 2, p53 binding protein (mouse)
MIF	NM_002415	Macrophage migration inhibitory factor (glycosylation-inhibiting factor)
MT1A	NM_005946	Metallothionein 1A (functional)
MT1H	NM_005951	Metallothionein 1H
MT2A	NM_005953	Metallothionein 2A
NFKB1	NM_003998	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer (p105)
NFKBIA	NM_020529	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer inhibitor, alpha
iNOS	MN_000625	Homo sapiens inducible nitric oxide synthase (iNOS) mRNA, complete cds
PCNA	NM_182649	Proliferating cell nuclear antigen
GDF15	NM_004864	Growth differentiation factor 15
POR	NM_000941	P450 (cytochrome) oxidoreductase
PTGS2	NM_000963	Prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (cyclooxygenase)
RAD23A	NM_005053	RAD23 homolog A (S. cerevisiae)
RAD50	NM_005732	RAD50 homolog (S. cerevisiae)
CCL21	NM_002989	Chemokine (C-C motif) ligand 21
CCL3	NM_002983	Chemokine (C-C motif) ligand 3
CCL4	NM_002984	Chemokine (C-C motif) ligand 4
CXCL10	NM_001565	Chemokine (C-X-C motif) ligand 10
SERPINE1	NM_000602	Serine (or cysteine) proteinase inhibitor (plasminogen activator inhibitor 1)
SOD1	NM_000454	Superoxide dismutase 1, soluble (amyotrophic lateral sclerosis 1 (adult))
SOD2	NM_000636	Superoxide dismutase 2, mitochondrial
TNF	NM_000594	Tumor necrosis factor (TNF superfamily, member 2)
TNFRSF1A	NM_001065	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1A
TNFSF10	NM_003810	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10
TNFSF6	NM_000639	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 6
TP53	NM_000546	Tumor protein p53 (Li-Fraumeni syndrome)
TRADD	NM_003789	TNFRSF1A-associated via death domain
UGT1A9	NM_021027	UDP glycosyltransferase 1 family, polypeptide A9
UNG	NM_003362	Uracil-DNA glycosylase
XRCC1	NM_006297	X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 1
XRCC2	NM_005431	X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 2
XRCC4	NM_003401	X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 4
XRCC5	NM_021141	X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 5

### 7.3 KONSTITUTIV EXPRIMIERTE GENE (HS11 UND HS12)

<b>Symbol</b>	<b>GeneBank</b>	<b>Beschreibung</b>
GAPDH	NM_002046	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
PPIA	NM_021130	Homo sapiens peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A)
RPL13A	NM_012423	Ribosomal protein L13a
ACTB	NM_001101	Actin, beta

---

## LEBENS LAUF

### PERSÖNLICHE DATEN

---

Vor- und Zuname     Thomas Georg Hofmann  
Geburtsdatum        08.01.1976  
Geburtsort            Bayreuth, Deutschland  
Familienstand        ledig

### SCHULE UND STUDIUM

---

2004 – 2009    Doktorarbeit an der Friedrich-Schiller-Universität Jena  
                  Institut für Ernährungswissenschaften, Lehrstuhl für Ernährungstoxikologie  
                  Thema der Doktorarbeit: "Genexpressionsprofile in humanen peripheren  
                  mononukleären Blutzellen als neuer Biomarker für Interventionsstudien"  
1997 – 2003    Studium der Ernährungswissenschaften an der Friedrich-Schiller-Universität  
                  Jena, Akademischer Grad: Diplom Trophologe mit Abschlussnote 1,1  
                  Thema der Diplomarbeit: "Charakterisierung der chemopräventiven  
                  Wirkungen – Untersuchungen mit Arabinoxylanen aus der Weizenkleie und  
                  einem Synbiotikum an humanen Kolonzellen "  
1996 – 1997    Diplom-Chemie Studium an der Universität, Bayreuth  
1995 – 1996    Zivildienst, Rotes-Kreuz/Rettungsdienst, Bayreuth  
1986 – 1995    Wirtschafts-Wissenschaftliches-Gymnasium, Bayreuth

### PRAKTIKA

---

2002    Mahidol University, Abteilung „tropical nutrition/food science“, Bangkok, Thailand  
2001    Unilever/Bestfoods, Abteilung „Functional foods R&D“, Heilbronn, Deutschland  
2001    Unilever/Bestfoods, Abteilung „Marketing“, Heilbronn, Deutschland  
2000    Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung, Gatersleben,  
                  Deutschland  
1999    Inselbergklinik, Abteilung „Patientenberatung“, Tabarz, Deutschland  
1998    Geb. Maisel Brauerei, Abteilung "Qualitätssicherung", Bayreuth, Deutschland

---

## PUBLIKATIONEN

**Hofmann T**, Kuhnert A, Schubert A, Gill C, Rowland I, Pool-Zobel BL, Gleis M

Modulation of detoxification enzymes by watercress – in vitro and in vivo investigations in human peripheral blood cells. **Eur J Nutr. 2009 Jul 28 [Epub ahead of print]**

**Hofmann T**, Klenow S, Borowicki A, Gill C, Pool-Zobel BL, Gleis M

Use of gene expression profiles in human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) as biomarker for in vitro and in vivo investigations. **Eingereicht bei Genes and Nutrition**

**Hofmann T**, Weber A, Sauer J, Gleis M, Pool-Zobel BL

Formation of tumour promoting and tumour inhibitory products during gut flora mediated fermentation of inulin and wheat bran. **J. Clin. Biochem. Nutr. Suppl. 43, 1–5, June 2008**

**Hofmann T**, Liegibel U, Winterhalter P, Bub A, Rechkemmer G, Pool-Zobel BL

Intervention with polyphenol-rich fruit juices results in an elevation of glutathione S-transferase P1 (hGSTP1) protein expression in human leucocytes of healthy volunteers. **Mol Nutr Food Res. 2006 Dec;50(12):1191-200**

Scharlau D, Borowicki A, Habermann N, **Hofmann T**, Klenow S, Miene C, Munjal U, Stein K, Gleis M

Mechanisms of primary cancer prevention by butyrate and other products formed during gut flora-mediated fermentation of dietary fibre. **Mutation Research – Reviews 2009 Apr 19**

Radeva M, **Hofmann T**, Altenberg B, Mothes H, Richter KK, Pool-Zobel BL, Greulich KO

The Database dbEST Correctly Predicts Gene Expression in Colon Cancer Patients. **Current Pharmaceutical Biotechnology, 2008, 9, 509-514**

Bellion P, **Hofmann T**, Pool-Zobel BL, Will F, Dietrich H, Knaup B, Richling E, Baum M, Eisenbrand G, Janzowski C

Antioxidant effectiveness of phenolic apple juice extracts and their gut fermentation products in the human colon carcinoma cell line Caco-2. **J Agric Food Chem** 2008 Jul 15

Veeriah S, Miene C, Habermann N, **Hofmann T**, Klenow S, Sauer J, Böhmer FD, Wöfl S, Pool-Zobel BL

Apple polyphenols modulate expression of selected genes related to toxicological defense and stress response in human colon adenoma cells. **Int J Cancer**. 2008 Jun 15;122(12):2647-55

Veeriah S, **Hofmann T**, Gleis M, Dietrich H, Will F, Schreier P, Knaup B, Pool-Zobel BL

Apple polyphenols and products formed in the gut differently inhibit survival of human cell lines derived from colon adenoma (LT97) and carcinoma (HT29). **J Agric Food Chem**. 2007 Apr 18;55(8):2892-900

Gleis M, **Hofmann T**, Kuster K, Hollmann J, Lindhauer MG, Pool-Zobel BL

Both wheat (*Triticum aestivum*) bran arabinoxylans and gut flora-mediated fermentation products protect human colon cells from genotoxic activities of 4-hydroxynonenal and hydrogen peroxide. **J Agric Food Chem**. 2006 Mar 22;54(6):2088-95



## DANKSAGUNG

Besonders bedanken möchte ich mich in Erinnerung bei Frau Prof. Dr. Beatrice Pool-Zobel. Ihr gelang es immer mit ihrer Begeisterung für die Forschung neu zu motivieren. Die von ihr angeregten Teilnahmen an Tagungen im In- und Ausland stellten für mich eine große Bereicherung dar.

Weiterer Dank gilt allen Mitarbeitern des Lehrstuhls für Ernährungstoxikologie für die gute Zusammenarbeit und das freundschaftlich Verhältnis. Insbesondere möchte ich mich bei PD Dr. Michael Gleibedenken, der für alle Probleme und Schwierigkeiten immer ein offenes Ohr hatte.

Sehr wichtig waren in den letzten Jahren meine Freunde Raju und Nina, auf welche ich mich immer uneingeschränkt verlassen konnte.

Dr. Chris Gill und Prof. Dr. Ian Rowland gebührt mein Dank für die Bereitstellung des Wasserkresseextrakts und Zellen aus der Wasserkresse-Interventionsstudie. Ebenso möchte ich mich bei Frau Dr. Christine Janzowski und Dr. Tamara Weisel für die Bereitstellung von RNA-Proben bedanken.

Ein großer Dank gebührt ebenso allen Diplomanden und Forschungspraktikanten mit welchen ich zusammenarbeiten durfte.

Außerdem möchte ich mich bei der Deutschen Forschungsgemeinschaft und den Thüringer Ministerium für Wirtschaft, Technologie und Arbeit bedanken, welche meine Arbeiten finanziell unterstützt haben.

Vielen Dank auch an alle Freunde. Was wäre die Arbeit ohne den privaten Ausgleich.

Des Weiteren möchte ich meiner ganzen Familie für ihre uneingeschränkte Unterstützung und ihr Verständnis danken. Sie hat mir mein Studium erst ermöglicht und hat mich dahin gebracht wo ich jetzt bin.

Mein letzter Dank gilt Nicole für Ihr Verständnis und die benötigte Ruhe und Sicherheit, welche sie mir gab. Ich weiß mein Glück zu schätzen Dich zu haben.

## **EIGENSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG**

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

Die Arbeit wurde in keiner Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt und auch nicht veröffentlicht.

Jena, August 2009

---

Thomas Hofmann