

**EINFLUSS MIKROBIELLER FERMENTATIONSPRODUKTE DES
WEIZENALEURONS AUF DIE MOLEKULAREN MECHANISMEN
DER SEKUNDÄRPRÄVENTION IN HUMANEN KOLONZELLEN
UNTERSCHIEDLICHEN TRANSFORMATIONSGRADES**

DISSERTATION

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

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

von

Dipl. troph. Anke Borowicki
geboren am 08.12.1981 in Magdeburg

Gutachter:

1. Gutachter: PD Dr. Michael Glei, FSU Jena
2. Gutachter: Prof. Dr. Gerhard Jahreis, FSU Jena
3. Gutachter: Prof. Dr. Gerald Rimbach, CAU Kiel

Tag der öffentlichen Disputation: 10.05.2010

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis	VI
1. Einleitung.....	1
1.1. Ernährung und Kolorektalkrebs.....	1
1.1.1. Molekulare Grundlagen der Kolonkanzerogenese	1
1.1.2. Mechanismen der Chemoprävention von Kolonkrebs	3
1.2. Funktion und Bedeutung der Darmflora des Menschen	4
1.3. Probiotika, Präbiotika und Synbiotika als Bestandteile funktioneller Lebensmittel	7
1.3.1. Probiotika.....	7
1.3.2. Präbiotika und Synbiotika.....	9
1.4. Ballaststoffe und deren Fermentation im Gastrointestinaltrakt.....	10
1.4.1. Kurzkettige Fettsäuren als Hauptmetabolite der bakteriellen Fermentation	13
1.4.2. Andere Fermentationsmetabolite.....	13
1.5. Chemopräventives Potential von Butyrat	14
1.5.1. Inhibierung der Proliferation	15
1.5.2. Induktion der Apoptose	16
1.6. Weizen als ein Bestandteil funktioneller Lebensmittel	18
1.6.1. Aufbau des Weizenkorns und Zusammensetzung der Aleuronfraktion	18
1.6.2. <i>In vitro</i> und <i>in vivo</i> Studien zur darmkrebspräventiven Wirkung von Weizeninhaltsstoffen	20
1.7. <i>In vitro</i> Fermentationsmodelle und deren Anwendung.....	21
1.8. Ziele der Arbeit.....	22
2. Publikationen	25
2.1. Publikation I: MODIFICATION OF AN <i>IN VITRO</i> MODEL SIMULATING THE WHOLE DIGESTIVE PROCESS TO INVESTIGATE CELLULAR ENDPOINTS OF CHEMOPREVENTION.	25
2.2. Publikation II: FERMENTED WHEAT ALEURONE INHIBITS GROWTH AND INDUCES APOPTOSIS IN HUMAN HT29 COLON ADENOCARCINOMA CELLS.	49

2.3.	Publikation III: FERMENTATION SUPERNATANTS OF WHEAT (<i>TRITICUM AESTIVUM</i> L.) ALEURONE BENEFICIALLY MODULATE CANCER PROGRESSION IN HUMAN COLON TUMOR CELLS.	61
2.4.	Publikation IV: FERMENTED WHEAT ALEURONE ENRICHED WITH PROBIOTIC STRAINS LGG AND Bb12 MODULATES MARKERS OF TUMOR PROGRESSION IN HUMAN COLON CELLS.	71
3.	Weitere Ergebnisse	107
3.1.	Bestimmung der Konzentration ausgewählter Fermentationsmetabolite nach einer <i>in vitro</i> Fermentation von Synergy1 sowie von Aleuron angereichert mit LGG/Bb12	107
3.2.	Bestimmung des antioxidativen Potentials und Quantifizierung der Ferulasäure	110
3.2.1.	Bestimmung des antioxidativen Potentials und des Gehalts an Ferulasäure in den Getreidemustern.....	111
3.2.2.	Bestimmung des antioxidativen Potentials und des Gehalts an Ferulasäure in den Fermentationsüberständen und Fermentationspellets.....	111
3.3.	Einfluss der Nachbereitung der Fermentationsüberstände auf die antioxidative Kapazität.....	115
3.4.	Untersuchung der Stabilität der Ferulasäure.....	116
4.	Diskussion	117
4.1.	<i>In vitro</i> Fermentation	118
4.1.1.	Methoden-Adaptation	119
4.1.2.	Fermentationsmetabolite.....	120
4.2.	Zytotoxizität und Genotoxizität	122
4.3.	Modulation des Zellzyklus	125
4.4.	Modulation der Apoptose	126
4.5.	Modulation der Zelldifferenzierung	129
4.6.	Zusätzlicher Wert des Aleurons gegenüber reinen Ballaststoffquellen.....	130
4.7.	Kofermentation von Aleuron durch die Probiotika LGG und Bb12	132
4.8.	Zusammenfassende Schlussfolgerungen	135
4.9.	Ausblick.....	136
5.	Zusammenfassung	138

Literaturangaben.....	VII
Lebenslauf	XVIII
Selbständigkeitserklärung	XXII
Danksagung.....	XXIII

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Das Mehrstufenmodell der Kolonkanzerogenese am Beispiel der Adenom-Karzinom-Sequenz nach Fearon und Vogelstein [9] und weitere genetische Veränderungen [11,12]..	2
Abb. 2	Die unterschiedlichen Phasen der Chemoprävention.....	4
Abb. 3	Zusammensetzung der Mikroflora und pH-Werte im menschlichen Gastrointestinaltrakt.....	5
Abb. 4	Inhibierung der Histondeacetylasen durch Butyrat, wodurch die Expression von Genen beeinflusst wird, die in wachstumsregulatorische Prozesse, in die Apoptose und in die Zelldifferenzierung eingreifen.....	15
Abb. 5	Die Phasen des Zellzyklus, untergliedert in die Mitose (Zellteilung), die Interphase (G ₁ -, S- und G ₂ -Phase) und die Ruhephase (G ₀).....	16
Abb. 6	Ablauf des extrinsischen und intrinsischen Weges der Apoptose.	17
Abb. 7	Botanischer Aufbau der verschiedenen Schichten des Weizenkorns.	19
Abb. 8	Gehalt an Gallussäureäquivalenten (GAE) in den Fermentationsüberständen (A) und Fermentationspellets (B) von Blank –, Blank +, Aleuron – und Aleuron + nach definierten Zeitpunkten.....	113
Abb. 9	Gehalt an gesamter Ferulasäure in den Fermentationspellets von Blank –, Blank +, Aleuron – und Aleuron + nach definierten Zeitpunkten.....	114
Abb. 10	Die Veränderung der antioxidativen Kapazität durch die Behandlung der Fermentationsüberstände nach Abschluss der <i>in vitro</i> Fermentation..	115
Abb. 11	Kinetik der Bildung bzw. des Abbaus der Ferulasäure-Isomere (cis-Ferulasäure, trans-Ferulasäure) und des Metaboliten 3-(4-Hydroxy-3-methoxyphenyl)-propionsäure in den Fermentationspellets.....	116

Tabellenverzeichnis

Tab. 1	Bedeutung eines positiven Fermentationsprofils, das durch den Verzehr und die Fermentation von Ballaststoffen hervorgerufen wird.	11
Tab. 2	Erläuterung der durchgeführten Fermentationsserien.....	107
Tab. 3	Konzentrationen an SCFA, deren Verhältnis sowie Konzentrationen an Gallensäuren und Ammoniak im Fermentationsüberstand Synergy1.....	108
Tab. 4	Konzentrationen an Gallensäuren und Ammoniak in den Fermentationsüberständen der Fermentation III.....	108
Tab. 5	Kinetik der SCFA-Konzentrationen, deren Verhältnisse sowie der Konzentrationen an Gallensäuren und Ammoniak in den Fermentationsüberständen.	109
Tab. 6	Gehalts an Gallussäureäquivalenten (GAE) sowie gesamter und freier Ferulasäure in den Getreidemustern des Weizens.	111
Tab. 7	Gehalt an Gallussäureäquivalenten (GAE) sowie gesamter Ferulasäure in den Fermentationsüberständen (FÜ) und Fermentationspellets der Weizenproben.	112
Tab. 8	Gehalt an gesamter Ferulasäure in den Fermentationspellets.....	116

Abkürzungsverzeichnis

ACF	aberrante Krypt Foci
7-AAD	7-Amino-actinomycin
AOM	Azoxymethan
APC	Adenomatöse polyposis coli
Bb12	<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> Bb12
CA	Cholsäure
CDK	Cyclin-abhängige-Kinase
CDKI	Cyclin-abhängige-Kinase-Inhibitor
DCA	Deoxycholsäure
DCC	deleted in colon cancer
DMH	Dimethylhydrazin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EU	europäisch
FÜ	Fermentationüberstand
GAE	Gallussäureäquivalente
GST	Glutathion-S-Transferase
G ₀	Ruhephase des Zellzyklus
G ₁	Präsynthesephase des Zellzyklus
G ₂	Postsynthesephase des Zellzyklus
KBE	Koloniebildende Einheit
LGG	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG
M	Mitosephase des Zellzyklus
NIM-DAPI	<i>nuclear isolation medium</i> -4',6-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid
NSP	Nicht-Stärke-Polysaccharid
PARP	Poly-(ADP-ribose)-polymerase
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
S	Synthesephase des Zellzyklus
SCFA	kurzkettige Fettsäuren (engl. short-chain fatty acids)
SHIME	simulator of the human intestinal microbial ecosystem
SMCT1/MCT1	(Natrium-abhängiger) Monocarboxylat-Transporter Isoform 1
SULT	Sulfotransferase
TIM	TNO Intestinal Model
TNFR1	Tumor-Nekrose-Faktor Rezeptor 1
US	amerikanisch
WCRF	World Cancer Research Fund

1. Einleitung

1.1. Ernährung und Kolorektalkrebs

Das kolorektale Karzinom stellt weltweit die dritthäufigste Krebserkrankung dar, wobei es aufgrund der westlichen Ernährungs- und Lebensgewohnheiten überwiegend in Wohlstandsgesellschaften auftritt [1]. So erkrankten im Jahr 2007 in Industrieländern über 720.000 Menschen an Kolorektalkrebs, über 340.000 Patienten verstarben an den Folgen ihrer Erkrankung [2]. In Deutschland ist das kolorektale Karzinom bei beiden Geschlechtern das zweithäufigste Krebsleiden und bildet nach Lungenkrebs bei Männern und Brustkrebs bei Frauen die zweithäufigste Krebstodesursache [3].

Die Entstehung einer Krebserkrankung ist nicht auf eine einzige Ursache, sondern auf ein Zusammenspiel verschiedener Faktoren zurückzuführen [2]. Nur ein verhältnismäßig geringer Anteil der Krebsfälle (5-10 %) beruht auf einer ererbten genetischen Veränderung, wohingegen maligne Tumore größtenteils durch Verhaltens- und Umwelteinflüsse verursacht werden [2]. In geringerem Maße erhöhen auch chronisch-entzündliche Darmerkrankungen wie *Colitis ulcerosa* und *Morbus Crohn* das Darmkrebsrisiko [4]. Da eine unausgewogene Ernährung eine wesentliche Rolle bei der Erhöhung des Risikos für Kolorektalkrebs spielt, könnten durch eine Umstellung der Ernährungsweise 50-70 % aller kolorektalen Tumore verhindert werden [5].

1.1.1. Molekulare Grundlagen der Kolonkanzerogenese

Krebserkrankungen entstehen durch eine Entgleisung der Zellvermehrung und haben somit gestörte Organfunktionen zur Folge. Die Kanzerogenese wird als ein Mehrstufenprozess bestehend aus der Initiation, der Promotion und der Progression angesehen, welcher nach einer Latenzzeit von mehreren Jahren bis Jahrzehnten von der irreversiblen initialen Transformation einer normalen Zelle zu einem klinisch manifesten Tumor führt [6].

Der Organismus ist zeitlebens endogenen und exogenen Einflussfaktoren ausgesetzt, welche die Krebsentstehung begünstigen können. Grundlage der Kanzerogenese sind Mutationen einer somatischen Zelle in wachstumsregulatorischen Genen (Protoonkogene, Tumorsuppressorgene) oder in DNA-Reparaturgenen. Aktivierte Kanzerogene oder endogen gebildete reaktive Sauerstoffspezies können an

nukleophile Zentren der DNA binden und an dieser chemische Veränderungen (z. B. DNA-Addukte) hervorrufen. Werden in den folgenden Zellteilungen diese reversiblen Veränderungen nicht durch zelleigene Abwehrmechanismen (DNA-Reparaturenzyme oder Apoptose) beseitigt, kommt es zur Manifestation hervorgerufener Mutationen (**Initiationsphase**) [7]. Initiierte Zellen zeichnen sich durch eine erhöhte Zellproliferation und eine verminderte Apoptoserate aus, wodurch unter Einwirkung bestimmter Promotoren die Bildung präkanzerogener Herde begünstigt wird (**Promotionsphase**). Dabei stellen Promotoren nicht-genotoxische Substanzen wie z. B. *N*-Nitroso-Verbindungen, Ammoniak und sekundäre Gallensäuren dar, welche den Prozess der Kanzerogenese weiter vorantreiben können [8]. Die **Progressionsphase** ist durch eine Akkumulation weiterer Mutationen gekennzeichnet. Diese sind mit einer zunehmenden Entdifferenzierung der Zellen verbunden [9]. Die Phase der Progression ist hierbei durch ein invasives Tumorwachstum und die Metastasenbildung gekennzeichnet [10].

Fearon und Vogelstein erstellten im Jahr 1990 ein Modell von aufeinanderfolgenden genetischen Veränderungen, die sogenannte Adenom-Karzinom-Sequenz als mögliche Erklärung für die Entstehung des kolorektalen Karzinoms (Abb. 1) [9].

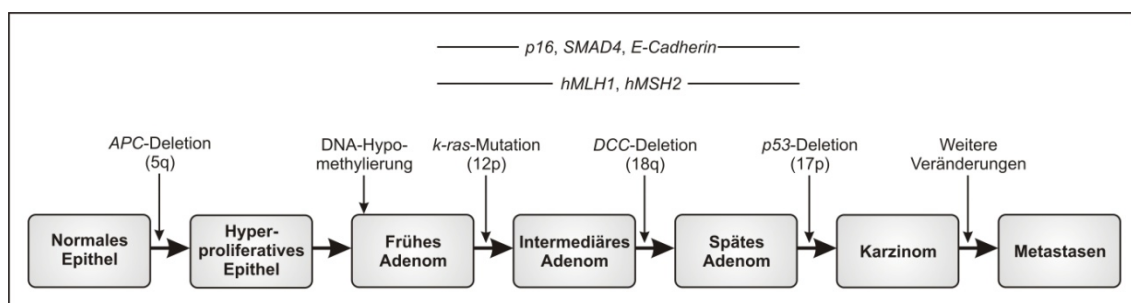


Abb. 1 Das Mehrstufenmodell der Kolonkanzerogenese am Beispiel der Adenom-Karzinom-Sequenz nach Fearon und Vogelstein [9] und weitere genetische Veränderungen [11,12]. Neben der charakteristischen Akkumulation von Mutationen in Tumorsuppressorgenen (*APC*, *DCC*, *p53*) und Onkogenen (*k-ras*) können weitere wachstumsregulatorische Gene (*p16*, *SMAD4*), die Expression des Zelladhäsion-Transmembran-Glykoprotein E-Cadherin und Gene der DNA-Mismatch-Reparatur (*hMLH1*, *hMSH2*) verändert sein.

Von zentraler Bedeutung für den sporadischen Entartungsprozess sind Mutationen in den Tumorsuppressorgenen *APC* (*adenomatous polyposis coli*), *DCC* (*deleted in colon cancer*) und *p53* (*53 kDa nuclear protein*) sowie im Protoonkogen *k-ras* (*V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*) [9]. Der vollständige Funktionsverlust des Tumorsuppressorgens *APC* (85 % aller kolorektalen Tumore)

repräsentiert ein frühes Ereignis innerhalb der Kolonkanzerogenese. Als spätes Ereignis führt eine Mutation im Zellzyklusregulator *p53* (75 % aller Kolorektalkarzinome) dazu, dass die Zellproliferation beim Auftreten von DNA-Schäden nicht blockiert wird und in den Zellen bei unzureichender Reparatur keine Apoptose ausgelöst werden kann. Durch die Zunahme der chromosomalen Instabilität kann sich aus einem späten Adenom ein Karzinom ausbilden [13,14].

1.1.2. Mechanismen der Chemoprävention von Kolonkrebs

Kolonepithelzellen sind zeitlebens Substanzen ausgesetzt, die mit der Nahrung aufgenommen oder durch Verdauungsprozesse im Gastrointestinaltrakt gebildet werden. So interagieren einerseits Toxine, Kanzerogene und Tumorpromotoren mit den Kolonozyten, andererseits spielen protektive Substanzen, die diesen krebsinduzierenden Prozessen entgegen wirken, eine bedeutende Rolle. Demzufolge ist die kolorektale Kanzerogenese ein Prozess, der wesentlich durch die Nahrung beeinflusst wird [8,15].

Es gibt zahlreiche Hinweise darauf, dass ein hoher Fleisch- und Fettverzehr sowie ein häufiger Konsum von Alkohol das Risiko für die Entstehung von kolorektalen Tumoren erhöhen kann [5,16,17]. Hingegen werden als protektive Faktoren eine hohe Aufnahme von Gemüse, Obst und Ballaststoffen sowie Kalzium, Vitamin D, Selen und Folsäure diskutiert [5].

Zur Prävention von Krebserkrankungen dient neben der Vermeidung der Exposition mit Kanzerogenen vor allem die Chemoprävention. Hierunter versteht man die Verwendung pharmazeutischer oder natürlicher Verbindungen (z. B. Nahrungsbestandteile) mit dem Ziel, die Kanzerogenese in gesundem Gewebe oder prämaligen Vorstufen zu inhibieren, zu verzögern oder sogar umzukehren [6]. Die zugrunde liegenden Mechanismen der Chemoprävention sind in Abb. 2 zusammengefasst.

Prinzipiell lässt sich die Chemoprävention in drei Stufen gliedern: die Primär- und Sekundärprävention sowie die Therapie. Innerhalb der primären Prävention stehen Maßnahmen zur Vermeidung der Initiation der Kolonkanzerogenese im Vordergrund. Eine Initiation kann durch sogenannte „Blocking agents“ vermieden werden, indem die Resorption und die metabolische Aktivierung von Kanzerogenen verhindert werden oder die Interaktion von kanzerogenen Substanzen mit zellulären Makromolekülen unterbunden wird. Darüber hinaus können „Blocking agents“ antioxidative

Eigenschaften aufweisen, reaktive Intermediate abfangen oder die Reparatur einer bereits eingetretenen DNA-Schädigung fördern [18].

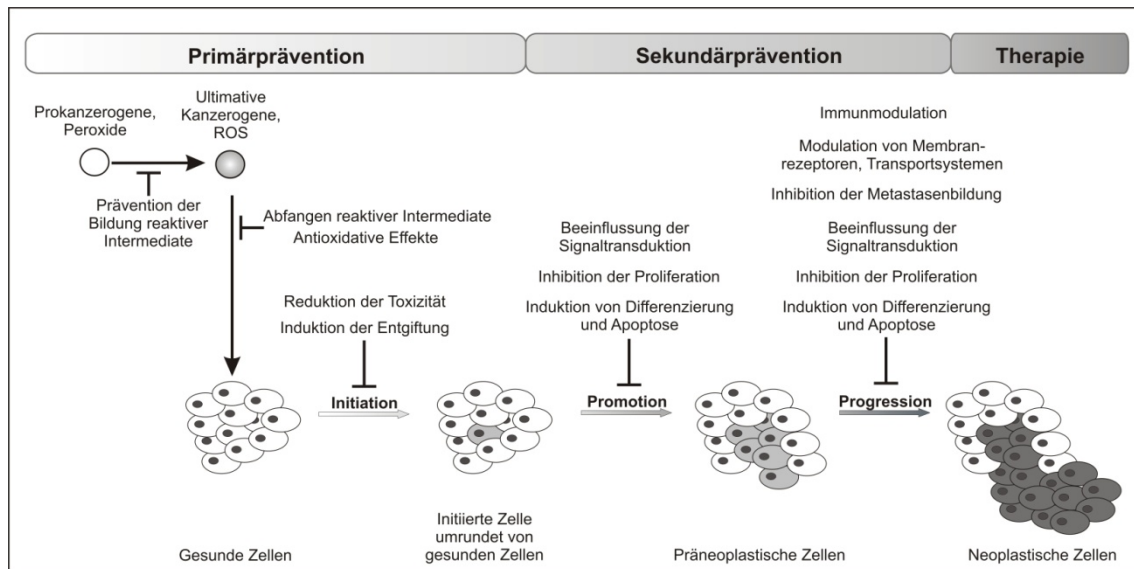


Abb. 2 Die unterschiedlichen Phasen der Chemoprävention. Innerhalb dieser Intervention soll entweder die Initiation gesunder Zellen blockiert und/oder eine weitere Promotion entarteter Zellen vermieden werden. ROS, reaktive Sauerstoffspezies (modifiziert nach [19])

Bei der Sekundärprävention wird die Promotion initiierteter Zellen und die Progression präneoplastischer Läsionen durch sogenannte „Suppressing agents“ eingeschränkt, indem die Proliferation inhibiert sowie die Apoptose und Differenzierung induziert werden [18]. Darüber hinaus können inflammatorische Prozesse unterdrückt werden [6]. Die Ansatzpunkte der Therapie stellen vor allem neoplastische Läsionen dar, wobei neben der Blockierung der charakteristischen Zellvermehrung und der Entdifferenzierung insbesondere die Metastasierung verhindert werden soll.

Eine ballaststoffreiche und fettarme Ernährung basierend auf einer ausgewogenen Mischkost oder einer vegetabil-orientierten Kostform bietet eine ideale Quelle für krebopräventive Agenzien [5,20,21]. Welche Inhaltsstoffe der pflanzlichen Nahrung im Einzelnen für die Protektion ursächlich sind und welche Wirkmechanismen zugrunde liegen, ist seit Jahren Gegenstand zahlreicher Untersuchungen.

1.2. Funktion und Bedeutung der Darmflora des Menschen

Die einzelnen Abschnitte des Verdauungstraktes (Mund, Magen, Dünndarm, Dickdarm) stellen verschiedene ökologische Bereiche dar, die mit jeweils spezifischen

Mikrobengemeinschaften kolonisiert sind [22]. Allerdings verhindern das saure Milieu des Magens und der schnelle Transport des Verdauungsbreis durch den Dünndarm die Bildung einer signifikanten, permanenten Bakterienpopulation in diesen Bereichen [8]. Erst im Dickdarm nimmt die mikrobielle Besiedlung deutlich zu, so dass die Entwicklung eines relativ stabilen Ökosystems möglich ist (Abb. 3).

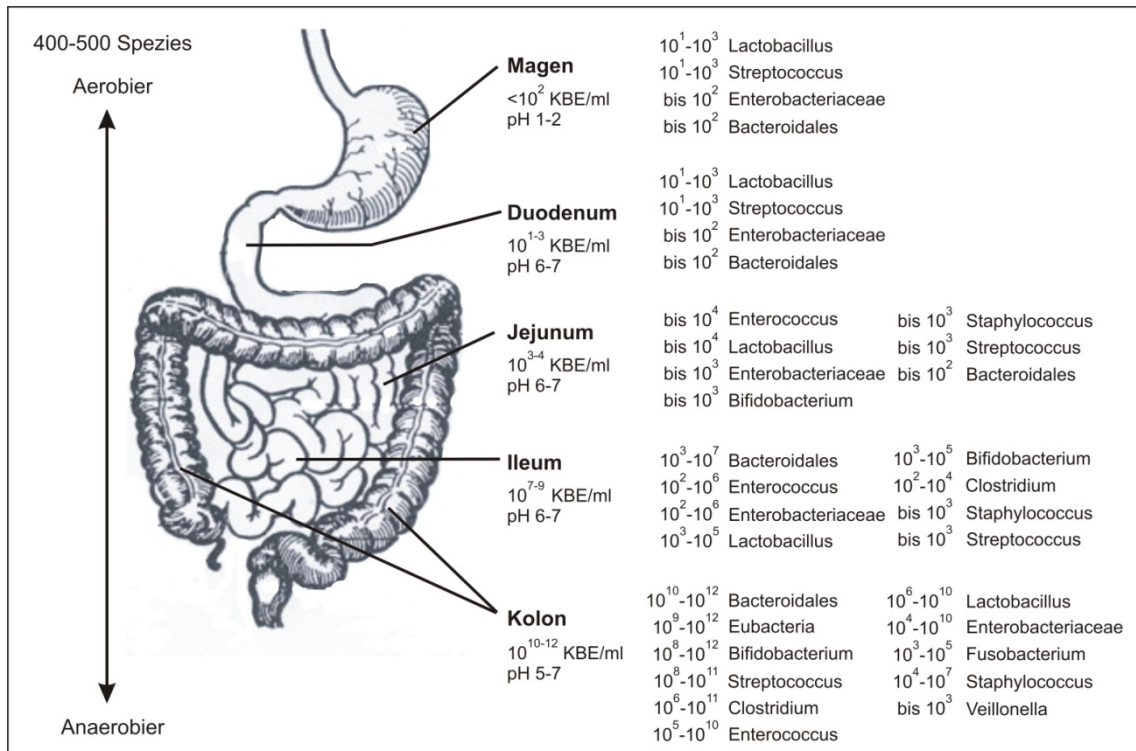


Abb. 3 Zusammensetzung der Mikroflora und pH-Werte im menschlichen Gastrointestinaltrakt. Zusammensetzung und Dichte der Darmflora variieren in den unterschiedlichen Bereichen des Gastrointestinaltrakts. KBE, Koloniebildende Einheiten (modifiziert nach [8,22-24])

Beim Erwachsenen liegt die Bakteriendichte im Kolon bei 10¹⁰ bis 10¹² Koloniebildenden Einheiten (KBE) pro ml Darminhalt. Daher setzt sich die Darmflora aus 400-500 verschiedenen aeroben und anaeroben Mikroorganismenarten zusammen, wobei die Anaerobier der Genera *Bacteroidales*, *Eubacteria* und *Bifidobacterium* dominieren [8,23]. Aktivität und Zusammensetzung der bakteriellen Flora werden durch die Verfügbarkeit an Substraten, den pH-Wert und den Sauerstoffpartialdruck bestimmt [23], wobei diese sowohl intra- als auch interindividuellen Unterschieden von bis zu 30 % unterliegen können [25,26]. Die Zusammensetzung der Stuhlflora, die für zahlreiche Untersuchungen zur Funktion und Bedeutung der Darmflora die Grundlage bildet, wird im Wesentlichen durch Keime des Kolons bestimmt, wobei berücksichtigt werden muss, dass sich sowohl das Artenspektrum als auch die Bakteriendichte in den

verschiedenen Kolon-Abschnitten unterscheiden. Man nimmt an, dass etwa 50 Bakterien-Genera im Kolon angesiedelt sind, welche sich wiederum aus mehreren hundert Spezies zusammensetzen können [22].

Während der Schwangerschaft ist der im Mutterleib heranwachsende Fetus normalerweise keimfrei [8,23]. Der erste Kontakt mit Mikroorganismen erfolgt während der Geburt durch Keime der vaginalen und intestinalen Flora der Mutter. Die weitere Entwicklung der Flora ist abhängig von der Ernährung mit Muttermilch (*Bifidobacterium*) oder Kuhmilch (*Bifidobacterium*, *Bacteroidales*, *Enterobacteriaceae* und *Streptococcus*) [26] und wird mit zunehmenden Alter hauptsächlich durch individuelle Ernährungsgewohnheiten bestimmt [23].

Beim erwachsenen Menschen repräsentiert die Darmflora ein relativ stabiles, sehr komplexes mikroökologisches System mit vielfältiger Stoffwechselaktivität. Neben ihrer Funktion als Barriere gegen die Ansiedlung darmpathogener Keime ist die Darmflora ein wichtiger Bestandteil der humanen Immunabwehr, indem die Entwicklung und Aktivität des Darm-assoziierten Immunsystems beeinflusst wird [27]. Die Darmflora trägt außerdem zur Reifung und Integrität des Darmepithels, zum Metabolismus von Fremdstoffen sowie zur Produktion einiger B- und K-Vitamine bei [23]. Von herausragender Bedeutung ist der Beitrag der physiologischen Darmflora zum intraluminalen Stoffwechsel im Kolon [8]. Die intestinale Mikroflora metabolisiert komplexe Nahrungsbestandteile, die im oberen Verdauungstrakt nicht hydrolysiert und daher dort von den Enterozyten nicht absorbiert werden können. Unverdauliche Substanzen sind neben Nicht-Stärke-Polysacchariden (NSP), resistenter Stärke und Oligosacchariden auch unvollständig hydrolysierte Kohlenhydrate, Proteine und Aminosäuren [28]. Im proximalen Kolon dominieren aufgrund ihrer Fähigkeit zur saccharolytischen Spaltung acidophile Bakterienarten, die zur Bildung von kurzkettigen Fettsäuren (englisch: short-chain fatty acids: SCFA) beitragen. Hingegen kolonisieren im distalen Kolon zusätzlich Bakterien mit proteolytischen Fähigkeiten, so genannte Fäulniskeime, die neben Aminosäuren auch toxische Metabolite freisetzen.

Endogene und exogene Einflüsse können das Gleichgewicht von gesundheitsfördernden Bakterien (vor allem *Lactobacillus* und *Bifidobacterium*) zugunsten von pathogenen Darmkeimen (*Clostridium*, *Veillonella* und *Staphylococcus*) verschieben, was möglicherweise mit einem vermehrten Auftreten verschiedener Erkrankungen wie

kardiovaskulären Erkrankungen, Diabetes mellitus und entzündlichen Darmerkrankungen [29] assoziiert ist. Weiterhin deuten einige Studien darauf hin, dass nach einer Verschiebung der physiologischen Verteilung der Darmbakterien ein erhöhtes Risiko für Krebserkrankungen im Kolon auftritt [30]. Hierbei werden verschiedene zugrunde liegende Mechanismen (z. B. Aktivierung von Prokanzerogenen zu ultimativen Kanzerogenen, direkte Bildung von Mutagenen) diskutiert [30].

Aufgrund der kombinierten Aktivitäten aller Bakterienspezies ergibt sich letztendlich eine enorme Komplexität der Darmflora mit vielfältigen Aufgaben zur Erhaltung der Darmgesundheit [8]. Daher bietet die Beeinflussung der humanen Mikroflora durch diätetische Maßnahmen gute Chancen für den Einsatz von funktionellen Lebensmitteln.

1.3. Probiotika, Präbiotika und Synbiotika als Bestandteile funktioneller Lebensmittel

Funktionelle Lebensmittel spielen zunehmend eine wichtige Rolle, bestimmten ernährungsabhängigen chronischen Erkrankungen wie koronaren Herzkrankheiten, Übergewicht, Osteoporose, Diabetes mellitus und malignen Neubildungen entgegen zu wirken [31]. Als funktionelle Lebensmittel bezeichnet man solche Lebensmittel oder Bestandteile davon, denen über die Aufnahme von Nährstoffen hinaus ein weiterer gesundheitlicher Nutzen zugesprochen wird, der in der Steigerung des Wohlbefindens und dem Erhalt der Gesundheit liegt [31-33]. Als funktionelle Inhaltsstoffe werden organische und anorganische Mikronährstoffe, Vitamine, Antioxidantien, Ballaststoffe, bestimmte Proteine (z. B. Lactoferrin), bioaktive Peptide (z. B. Casomorphine) und mehrfach ungesättigte Fettsäuren angesehen [32]. Ein vielversprechender Ansatz innerhalb der Entwicklung von funktionellen Lebensmitteln ist der Erhalt und die Förderung der Darmgesundheit, indem als funktionelle Bestandteile gezielt Probiotika, Präbiotika und Synbiotika eingesetzt werden.

1.3.1. Probiotika

„Probiotika“ sind lebende Mikroorganismen, die in ausreichender Menge in aktiver Form in den Darm gelangen und dadurch positive gesundheitliche Wirkungen

erzielen [8]. Ein Probiotikum sollte nicht pathogen und resistent gegenüber antimikrobiellen Faktoren im Darm (Magen- und Gallensäure, Peristaltik) sein, um im vitalen Zustand die unteren Darmabschnitte zu erreichen [34]. Probiotische Keime, die industriell der Nahrung zugesetzt werden, gehören hauptsächlich zu den beiden Genera *Lactobacillus* und *Bifidobacterium*, allerdings finden auch Keime der Gattungen *Escherichia*, *Enterococcus*, *Bacillus* und *Streptococcus* sowie fungizide Stämme des Genus *Saccharomyces* Einsatz [35]. Als unverbindliche Richtgröße für eine gesundheitliche Wirkung wird in der Lebensmittelindustrie eine Tageszufuhr von mindestens 5×10^9 KBE über einen Zeitraum von wenigstens fünf Tagen empfohlen [36]. Beim erwachsenen Menschen konnte bisher gezeigt werden, dass Probiotika wahrscheinlich Symptome einer Laktoseintoleranz und einer Obstipation vermindern, das Risiko einer Antibiotika-assoziierten Diarrhö herabsetzen und entzündlichen Darmerkrankungen entgegenwirken [37,38]. Möglicherweise sind sie darüber hinaus in der Lage, den Cholesterinspiegel zu senken und präventiv in die Kolonkanzerogenese einzugreifen [34,35]. Als zugrunde liegender Mechanismus einer chemopräventiven Wirkung wird vor allem die Verschiebung der Keimbesiedlung zugunsten von Milchsäurebakterien diskutiert [34]. So wird zum einen die Aktivität bestimmter bakterieller Enzyme, beispielsweise der Gattung *Bacteroides*, gehemmt, wodurch die Bildung von Kanzerogenen vermindert wird [34,35]. Zum anderen sind bifidogene Keime in der Lage, mutagene Substanzen im Kolon zu binden [39], die Immunabwehr zu stärken [40] oder *in vitro* direkt mit entarteten Kolonozyten zu interagieren [41,42].

Lactobacillus rhamnosus GG (LGG) ist einer der bekanntesten und am besten untersuchten probiotischen Stämme [43]. Nach dessen Applikation wird insbesondere das intestinale Immunsystem positiv beeinflusst [35,44]. Für den Stamm *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb12 (Bb12) konnte ein ähnlicher stimulierender Effekt auf die Immunabwehr gezeigt werden [45,46]. Ebenso wird für beide Stämme ein chemopräventives Potential diskutiert, indem beispielsweise die Genotoxizität von Fäzeswasser herabgesetzt [47] oder die Krebsinitiation in mit Dimethylhydrazin (DMH) behandelten Ratten vermindert wurde [42].

1.3.2. Präbiotika und Synbiotika

Unter dem Begriff „Präbiotika“ versteht man unverdauliche Nahrungsbestandteile, die durch ihre selektive Fermentation spezifische Änderungen in der Zusammensetzung und/oder der Aktivität der intestinalen Mikroflora hervorrufen, wodurch das Wohlbefinden und die Gesundheit des Wirtes begünstigt wird [48]. Damit ein Nahrungsbestandteil oder ein Lebensmittel als Präbiotikum deklariert werden darf, müssen drei wichtige Kriterien erfüllt sein: 1) Resistenz gegenüber der Magensäure, der Hydrolyse und der Absorption im Verdauungstrakt, 2) Fermentierbarkeit durch die intestinale Mikroflora und 3) eine selektive Stimulation des Wachstums bzw. der Aktivität von gesundheitsfördernden Bakterienspezies [49]. Die deutlichsten präbiotischen Effekte werden fruktosylierten und galaktosylierten Oligosacchariden nach einer täglichen Dosis von 5 g bis maximal 20 g zugesprochen [32,50]. Am besten untersucht sind hierbei die Fruktane des Inulin-Typs wie Inulin und Oligofruktose, die von menschlichen Enzymen des Verdauungstraktes nicht hydrolysiert werden können und so der intestinalen Mikroflora als Substrat zur Verfügung stehen [32]. Präbiotika werden durch die Darmflora zu Lactat und SCFA fermentiert [51,52], wobei für letztere ein chemopräventives Potential diskutiert wird [53]. In einer Studie mit Azoxymethan (AOM)-behandelten Ratten konnten Aberrante Krypt Foci (ACF), als Marker einer präneoplastischen Läsion, durch Fütterung von Inulin oder Oligofruktose reduziert werden [54]. Des Weiteren führte die Gabe beider Fruktane zu einer erhöhten Apoptoserate in den Krypten von Ratten, die zuvor mit DMH behandelt wurden [55]. In diesen Studien zeigte Inulin ein höheres chemopräventives Potential als Oligofruktose. Es wurde postuliert, dass die antikanzerogene Wirkung durch eine Mischung beider Substanzen zeitlich noch verlängert werden kann [56]. Oligofruktose wird bereits im proximalen Kolon fermentiert, wohingegen Inulin aufgrund des höheren Polymerisierungsgrades erst in distalen Regionen des Dickdarms durch die Darmflora metabolisiert wird. AOM-behandelte Tiere wiesen nach Fütterung von Synergy1 (Oligofruktose-angereichertes Inulin) eine signifikant verringerte Anzahl an ACF als die Gruppen auf, denen nur Inulin oder Oligofruktose appliziert wurde [57].

Ergebnisse aus Tier- und Humanstudien zeigen, dass eine kombinierte Gabe von Prä- und Probiotika, sogenannte Synbiotika, einen größeren chemopräventiven Effekt ausüben als ihre Einzelkomponenten [34,50,58]. „Synbiotika“ sind Lebensmittel, die

sowohl Probiotika als auch Präbiotika enthalten und die Zusammensetzung der intestinalen Mikroflora positiv beeinflussen, indem das Wachstum und Überleben neu aufgenommener probiotischer Keime zusätzlich zum Wachstum bereits vorhandener gesundheitsfördernder Bakterienspezies verbessert wird [50]. In Studien mit Ratten konnten ACF, hervorgerufen durch die Kanzerogene DMH und AOM, nach einer Fütterung von Oligofruktose bzw. Inulin in Kombination mit Bifidobakterien signifikant vermindert werden [59,60]. Des Weiteren konnte die gemeinsame Applikation von Synergy1 und LGG/Bb12 die Anzahl an AOM-induzierten Adenomen und Karzinomen senken [61]. In einer anschließenden humanen Interventionsstudie wurde die Wirkung dieses Synbiotikums (Synergy1 und LGG/Bb12) auf die Krebsentstehung in Individuen mit erhöhtem Kolonkrebsrisiko untersucht [62]. Nach einer 12-wöchigen Intervention konnten in Polypen-Patienten der Proliferationsindex, ein ausgewählter Biomarker für Kolorektalkrebs, in den Kolonkrypten und die Genotoxizität des Fäzeswassers reduziert werden [62].

1.4. Ballaststoffe und deren Fermentation im Gastrointestinaltrakt

Epidemiologische und vorklinische Studien deuten darauf hin, dass ein erhöhter Verzehr an Ballaststoffen die Darmgesundheit fördert [21,63]. Nach aktuellen Angaben des *World Cancer Research Fund* (WCRF) sollten pro Tag mindestens 25 g Ballaststoffe verzehrt werden, indem die Aufnahme von relativ unverarbeitetem Getreide (z. B. Vollkornbrot) und weiteren Lebensmitteln, die eine natürliche Ballaststoffquelle darstellen, erhöht wird [21]. Es wird eine Verteilung auf drei Mahlzeiten pro Tag empfohlen.

Die Bezeichnung „Ballaststoffe“ umschreibt keine einheitliche Substanzgruppe, sondern leitet sich entweder von der chemischen Analyse pflanzlicher Zellwandbestandteile oder von ihren ernährungsphysiologischen Funktionen ab. Letzteres umfasst alle essbaren Substanzen pflanzlichen Ursprungs, die nicht von den Enzymen des menschlichen Verdauungstraktes gespalten werden können, allerdings vollständig oder teilweise im Dickdarm fermentierbar sind und verschiedene positive Wirkungen auf den Verdauungstrakt sowie die Gesundheit des Körpers zeigen [21]. Hierbei werden neben Nicht-Stärke-Polysacchariden (NSP) wie Zellulose, Hemizellulosen, Pektinen

und β -Glucanen ferner auch Lignin, resistente Stärke und Oligosaccharide eingeschlossen.

Ballaststoffe können neben einer generellen Förderung der Darmgesundheit möglicherweise über verschiedene Mechanismen das Risiko für Kolorektalkrebs senken. Aufgrund der physikalischen Eigenschaften führt eine vermehrte Aufnahme an Ballaststoffen zu einem erhöhten Volumen des Stuhls, der Bindung von Kanzerogenen und einer verkürzten Transitzeit des Stuhls, wodurch die Kontaktzeit zwischen toxischen Substanzen und den Kolonepithelzellen vermindert wird [63]. Ferner binden Ballaststoffe sekundäre Gallensäuren, für die eine tumorpromovierende Wirkung nachgewiesen ist, und entziehen diese dem enterohepatischen Kreislauf [4]. Darüber hinaus sind Ballaststoffe in der Lage, die bakterielle Fermentation zu fördern und die Zusammensetzung der Mikroflora zu beeinflussen. Die bakterielle Fermentation der Ballaststoffe im Kolon führt zur Bildung von SCFA, vor allem Acetat, Propionat und Butyrat. Hierdurch wird eine Absenkung des luminalen pH-Wertes verursacht, was wiederum selektiv das Wachstum von Milchsäurebakterien fördert, die Konversion von primären in sekundäre Gallensäuren verhindert sowie die Löslichkeit der Gallensäuren im Darmlumen herabsetzt [63,64]. Die Verschiebung der intestinalen Darmflora zugunsten der Milchsäurebakterien vermindert die Aktivität verschiedener bakterieller Enzyme (β -Glucuronidase, 7α -Dehydroxylase, Nitroreduktase, Azoreduktase), die die Aktivierung prokanzerogener Substanzen unterstützen [34]. Insgesamt ist der Verzehr von Ballaststoffen mit einem positiven Fermentationsprofil verbunden (Tab. 1).

Effekt	Veränderung	Mögliche Mechanismen
Stuhlvolumen Wassergehalt im Stuhl Transitzeit im Stuhl	erhöht erhöht erniedrigt	verringert Exposition der Kolonmukosa gegenüber potentiellen genotoxischen Verbindungen
Fermentation	erhöht	erhöht die Bildung der SCFA & Milchsäurebakterien
Milchsäurebakterien pH-Wert	erhöht erniedrigt	führt zur Bildung von protektiven Metaboliten
Butyrat-Anteil	erhöht	Nährstoff für Kolonzellen, beeinflusst Methylierungsstatus der DNA, induziert Apoptose in Tumorzellen, fördert Bildung der Mucinschicht
β -Glucuronidase, 7α -Dehydroxylase, Nitroreduktase, Azoreduktase	erniedrigt	verringerte Aktivierung von Prokanzerogenen
Phenole, Indole, N-Verbindungen, Gallensäuren	erniedrigt	verringerte Belastung mit Toxinen

Tab. 1 Bedeutung eines positiven Fermentationsprofils, das durch den Verzehr und die Fermentation von Ballaststoffen hervorgerufen wird. SCFA, kurzkettige Fettsäuren (modifiziert nach [8,24,64])

Allerdings ist anzumerken, dass nur ausgewählte Ballaststoffquellen, vorrangig Oligosaccharide, per Definition auch als Präbiotika bezeichnet werden dürfen. Im Gegensatz zu präbiotischen Substanzen wird durch die Fermentation von Ballaststoffen allgemein das Wachstum einer breiten Palette an Mikroorganismen gefördert. So bedarf es weiterer Untersuchungen, welche Ballaststoffquellen einen gezielten präbiotischen Effekt, also die selektive Wachstumsstimulation gesundheitsfördernder Keime, besitzen.

Der protektive Einfluss von Ballaststoffen auf die Entstehung von Kolorektalkrebs wird für den Menschen in der Literatur kontrovers diskutiert. Einerseits belegt die Mehrzahl an durchgeführten Korrelations- und Fall-Kontroll-Studien einen inversen Zusammenhang zwischen einer erhöhten Aufnahme von Ballaststoffen und dem Risiko, an Darmkrebs zu erkranken [63]. Andererseits zeigten prospektive epidemiologische Studien und Interventionstudien keinen gesicherten Zusammenhang [63,65]. Gründe dieser Diskrepanz sind vielfältig und könnten in Limitationen der epidemiologischen Untersuchungen liegen [5,66]. Eine mögliche Ursache ist die Auswahl untersuchter Biomarker, so dass eine protektive Wirkung von Ballaststoffen vor allem in präneoplastischen Läsionen nachgewiesen wurde [67,68]. Hingegen konnte nur in einigen Studien gezeigt werden, dass die Bildung von Adenomen und Karzinomen durch einen erhöhten Verzehr ballaststoffhaltiger Nahrung vermindert wurde [68]. Zusätzlich werden eine zu geringe tägliche Aufnahme (< 30 g) der verabreichten Ballaststoffquellen und die begrenzte Fermentierbarkeit diskutiert [69]. Insbesondere unlösliche Ballaststoffe, die auch im distalen Kolon bakteriell abgebaut werden können, spielen anscheinend eine protektive Rolle [63]. Ein unzureichender Verzehr anderer Pflanzenstoffe mit gesundheitsfördernder Wirkung könnte eine weitere Ursache für die kontroverse Datenlage sein [58,63].

Untersuchungen zu Wirkungen einzelner Ballaststoffe an Zelllinien und in Tierexperimenten deuten aber darauf hin, dass diese Substanzgruppe durchaus ein chemopräventives Potential besitzt [58]. Aus diesem Grund ist es notwendig, zunächst die Wirkmechanismen einzelner ballaststoffhaltiger Lebensmittel zu beleuchten, um anschließend auf der Grundlage dieser Erkenntnisse gezielt kontrollierte Ernährungsstudien am Menschen durchzuführen.

1.4.1. Kurzkettige Fettsäuren als Hauptmetabolite der bakteriellen Fermentation

Ballaststoffe werden überwiegend im proximalen, aber auch im distalen Kolon durch Bakterien mit saccharolytischer Aktivität (z. B. *Bacteroidales*, *Eubacteria*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*) zu Lactat und SCFA, hauptsächlich Acetat, Propionat und Butyrat, abgebaut [8]. In Abhängigkeit von der Ernährung, der Ballaststoffquelle, der Transitzeit und der Zusammensetzung der Darmflora kommen SCFA im proximalen Kolon in Konzentrationen von 70-140 mM und im distalen Kolon von 20-70 mM vor, wobei das durchschnittliche Verhältnis von Acetat:Propionat:Butyrat in den Fäzes 60:20:20 beträgt [24,58,70]. Über 95 % der SCFA werden rasch von den Kolonozyten, gekoppelt an den Natriumchlorid- und Wassertransport, resorbiert, wobei Butyrat am effizientesten aufgenommen wird [53]. Im Darmepithel werden Acetat und Propionat nur in geringem Maße verstoffwechselt und gelangen über das Pfortadersystem zur Leber (Acetat, Propionat) und zur Peripherie (Acetat). Hingegen verbleibt Butyrat größtenteils (zu ~70 %) in den Kolonozyten und dient diesen als wichtige Energiequelle, wobei es durch die β -Oxidation metabolisiert wird [28].

Milchsäurebakterien (*Lactobacillus* und *Bifidobacterium*) sind nicht in der Lage, Ballaststoffe zu Butyrat abzubauen. Vielmehr erhöht sich im Darmlumen die Konzentration an Acetat und Lactat. Diese Fettsäuren werden hauptsächlich extrazellulär von Butyrat-produzierenden Bakterienspezies verstoffwechselt [71]. Butyratbildner sind auf ausgewählte Genera beschränkt: *Clostridium*, *Eubacteria*, *Fusobacterium* und *Butyrivibrio* [72]. Diese können entweder Saccharide direkt zu Butyrat fermentieren (z. B. durch *Faecalibacterium prausnitzii*) oder gebildetes Acetat und Lactat in Butyrat metabolisieren (z. B. durch *Roseburia intestinalis*) [73].

1.4.2. Andere Fermentationsmetabolite

Bakterienspezies mit einer saccharolytischen Aktivität setzen neben den SCFA auch geringe Mengen an Format, Valerat und Capronat frei. Zusätzlich führt die bakterielle Fermentation sowohl zur Bildung verschiedener Gase, wie Wasserstoff, Kohlenstoffdioxid, Methan und Wasserstoffsulfid, als auch zur Anreicherung von Ethanol, Lactat, Succinat und Pyruvat [74].

Vor allem in komplexen Nahrungsmitteln (Obst, Gemüse und Vollkornprodukten) sind sekundäre Pflanzenstoffe mit den Polysaccharidketten der Ballaststoffe

verestert, so dass sie der intestinalen Verdauung durch wirtseigene Enzyme entzogen werden. Im Kolon werden diese durch bakterielle Enzymsysteme (z. B. Esterasen und Xylanasen) freigesetzt und können von den Kolonepithelzellen absorbiert werden [69].

Die meisten im proximalen Kolon angesiedelten Darmkeime metabolisieren bevorzugt Kohlenhydrate im Gegensatz zu Proteinen. Daraus resultierend findet eine proteolytische Fermentation, bei der Nahrungsproteine und Proteine des Mucus oder von abgeschilferten Zellen abgebaut werden, erst im distalen Kolon statt. Durch die proteolytische Fermentation erhöht sich die Konzentration an verzweigt-kettigen SCFA und toxischen Metaboliten wie Phenolen, Indolen, Aminen und Ammoniak, denen ein tumorpromovierendes Potential zugesprochen wird [8,28]. Darüber hinaus verfügen einige Bakterienspezies über Enzymsysteme (β -Glucuronidase, 7α -Dehydroxylase, Nitroreduktase, Azoreduktase), die potentielle Prokanzerogene aktivieren können. Demzufolge entstehen weitere Fermentationsmetabolite, die einen schädigenden Effekt auf das Dickdarmepithel ausüben können, beispielsweise bei der Reduktion von Nitrit oder stickstoffhaltigen Substanzen (*N*-Nitroso-Verbindungen), beim Lipidabbau (Diacylglycerol, 4-Hydroxy-2-nonenal) und bei der Umwandlung primärer in sekundäre Gallensäuren (Deoxycholsäure, Lithocholsäure) [8]. Vor allem in den distalen Regionen des Kolons treten gehäuft chronisch-entzündliche Darmerkrankungen und maligne Neubildungen auf, so dass postuliert wurde, dass die vermehrte Bildung dieser Toxine und die verminderte Verfügbarkeit der SCFA im engen Zusammenhang mit der Pathogenese von Darmerkrankungen stehen [53].

1.5. Chemopräventives Potential von Butyrat

Butyrat dient den normalen, nicht-transformierten Kolonzellen der Kryptbasis als Energielieferant, fördert die Mucinbildung und schützt die Zellen vor Apoptose [75,76]. Demgegenüber wirkt Butyrat in transformierten Zelllinien durch Induktion der Apoptose und Differenzierung sowie Hemmung der Proliferation als potentiell chemopräventives Agens [63]. Als zugrunde liegender Mechanismus wird die Funktion von Butyrat als Inhibitor der Histondeacetylasen diskutiert [77]. Durch die resultierende Hyperacetylierung von Histonen (H3 und H4) wird die nukleosomale DNA zugänglicher für Transkriptionsfaktoren (vor allem Sp1 und Sp3), so dass die Expression von Genen beeinflusst wird, die in wachstumsregulatorische Prozesse, in die

Apoptose und in die Zelldifferenzierung eingreifen [53,78] (Abb. 4). Es konnte gezeigt werden, dass ca. 5 % aller Gene durch die Inhibierung von Histondeactetylasen moduliert werden [79]. Darüber hinaus ist Butyrat in der Lage, den Methylierungsstatus der DNA und intrazelluläre Signal-Kaskaden zu beeinflussen [80,81].

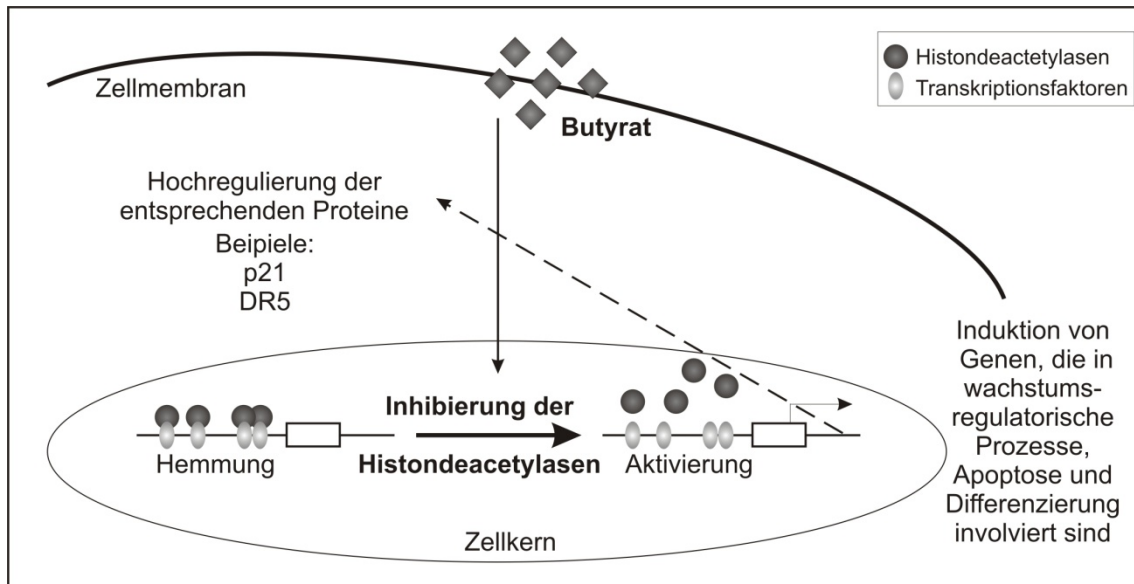


Abb. 4 Inhibition der Histondeactetylasen durch Butyrat, wodurch die Expression von Genen beeinflusst wird, die in wachstumsregulatorische Prozesse, in die Apoptose und in die Zelldifferenzierung eingreifen. (vereinfachte Darstellung, modifiziert nach [82,83])

Gleichwohl die Datenlage nicht eindeutig ist, deuten die meisten Untersuchungen darauf hin, dass adäquate Konzentrationen an Butyrat vor allem der frühen Kolonkanzerogenese entgegen wirken können [68,84].

1.5.1. Inhibition der Proliferation

In einer Vielzahl von *in vitro* Studien konnte gezeigt werden, dass Butyrat in der Lage ist, in den Zellzyklus (Abb. 5) einzugreifen, indem in transformierten Kolonozyten ein Wachstumsarrest ausgelöst wird [85,86]. Die antiproliferative Wirkung von Butyrat ist dadurch gekennzeichnet, dass es auf mRNA- und Proteinebene die Expression des Cyclin-abhängigen-Kinase (CDK) Inhibitors (CDKI) p21 induziert, wodurch ein Wachstumsarrest in der G_0/G_1 -Phase des Zellzyklus ausgelöst wird [53,86]. Der CDKI p21 bindet an die Cyclin D-CDK4 und Cyclin D-CDK6 Komplexe, so dass die Phosphorylierung des Retinoblastoma-Proteins verhindert wird [86]. In Folge findet

keine Aktivierung der Transkription von Zielgenen statt, die ein Voranschreiten des Zellzyklus ermöglichen.

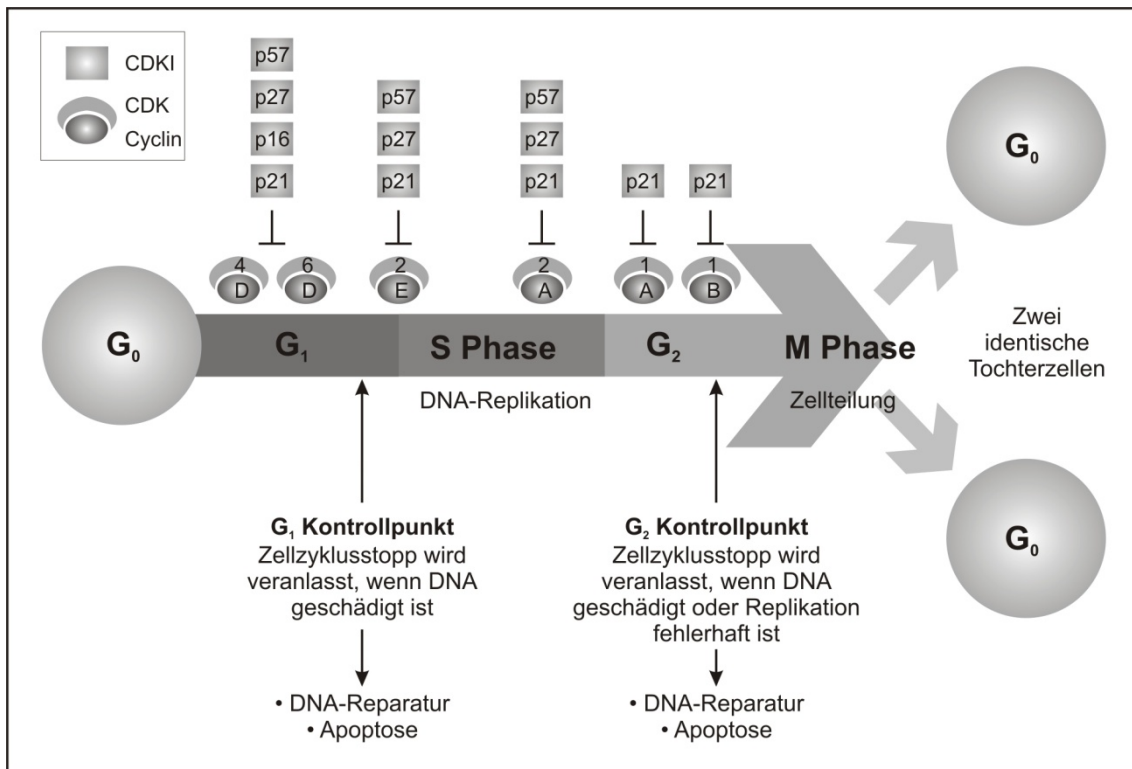


Abb. 5 Die Phasen des Zellzyklus, untergliedert in die Mitose (Zellteilung), die Interphase (G_1 -, S- und G_2 -Phase) und die Ruhephase (G_0). Dauer und Abfolge der Phasen werden von Steuerungsmechanismen (Kontrollpunkten) überwacht. Die Aktivierung oder Inaktivierung von Cyclin/CDK-Komplexe bestimmen den Verlauf des Zellzyklus. CDKI, Cyclin-abhängiger-Kinase Inhibitor; CDK, Cyclin-abhängige Kinase; G_0 , Ruhephase; G_1 , Präsynthesephase; S, Synthesephase; G_2 , Postsynthesephase; M, Mitosephase (vereinfachte Darstellung, modifiziert nach [21,86])

1.5.2. Induktion der Apoptose

Der Prozess der Apoptose ist ein physiologischer Vorgang zur kontrollierten Beseitigung geschädigter, seneszenter und entarteter Zellen. Da die Apoptose in Krebszellen meist ausgeschaltet ist, stellt eine Induktion der Apoptose in entarteten Zellen einen wichtigen Marker der Sekundärprävention dar [19]. Über verschiedene Signalwege, die sowohl extrinsisch als auch intrinsisch initiiert werden, wird die Aktivierung nachgeordneter Caspasen (Caspase-Kaskade) eingeleitet und damit der Zelluntergang kontrolliert herbeigeführt [87].

Eine Inkubation mit Butyrat führt in Tumorzelllinien zur Induktion sowohl des intrinsischen als auch des extrinsischen Weges der Apoptose (Abb. 6), indem

beispielsweise die Expression von Bak [88] oder von DR5 [82] erhöht wird, was die Caspase-Kaskade aktiviert [89].

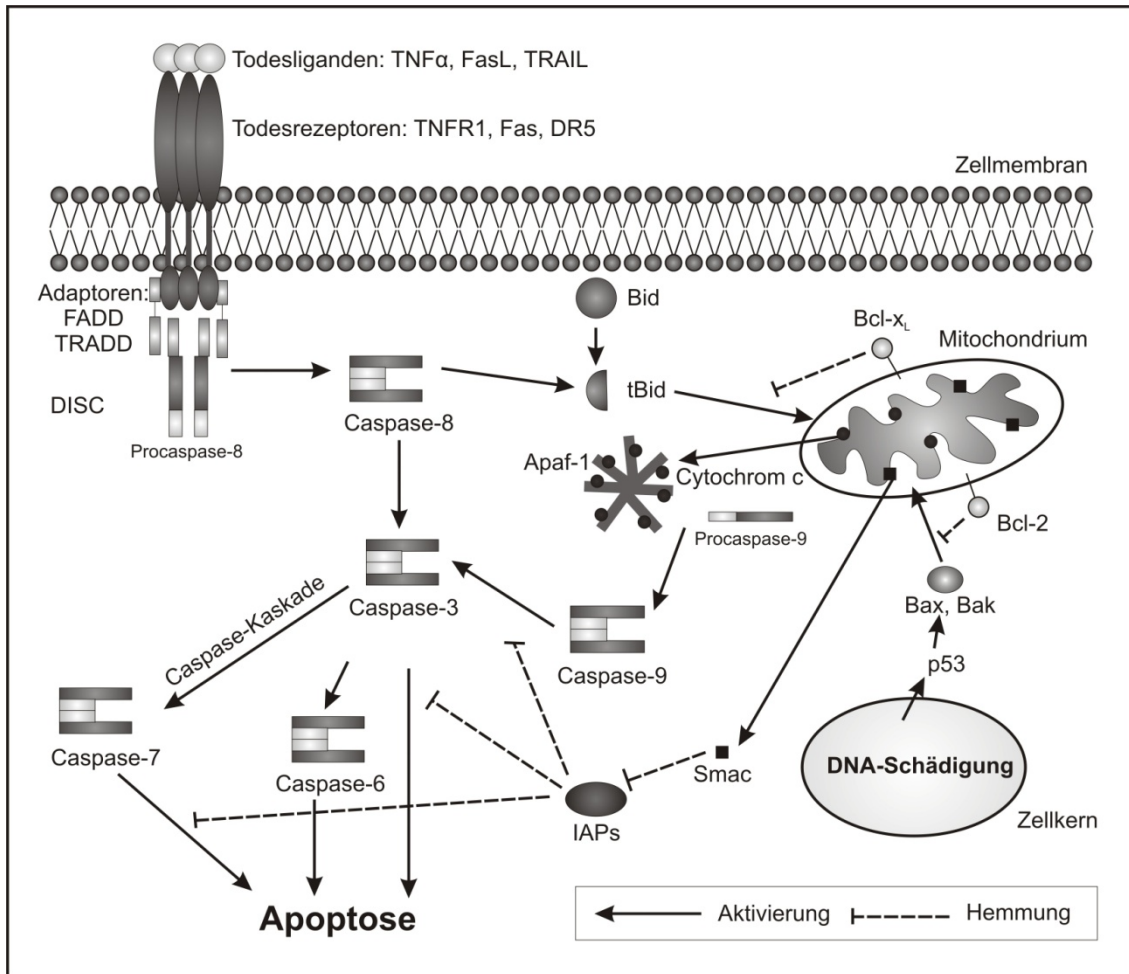


Abb. 6 Ablauf des extrinsischen und intrinsischen Weges der Apoptose. Durch die Ligandenbindung an einen Todesrezeptor wird der extrinsische Weg der Apoptose eingeleitet. Nach der Trimerisierung des Rezeptors binden an diesen Adaptoren und die Procaspase-8 (DISC: death inducing signal complex). Diese Bindung führt zur Aktivierung der Caspase-8, die ihrerseits die Caspase-3 aktiviert (Einleitung der Caspase-Kaskade). Beim intrinsischen Weg werden aus den Mitochondrien Cytochrom c und andere proapoptotische Faktoren (Smac) freigesetzt, wodurch nach Zusammenlagerung von Apaf-1, dATP, der Procaspase-9 und Cytochrom c das Apoptosom gebildet wird. Dadurch wird die Caspase-9 in den aktiven Zustand versetzt und kann ebenfalls die Caspase-3 aktivieren. Eine Verbindung des extrinsischen Weges mit dem intrinsischen Weg stellt die Spaltung des zytosolischen Proteins Bid zu tBid (truncated Bid) dar, welches nach Translokation in die Mitochondrien wiederum zur Cytochrom c-Freisetzung führt. IAPs, Apoptose-inhibitorische Proteine; Bax/Bak, proapoptotische Proteine; Bcl-2, Bcl-x_L; antiapoptotische Proteine (vereinfachte Darstellung, modifiziert nach [87,90])

Eine durch Butyrat-vermittelte höhere Aktivität des DR5-Proteins führte zur verstärkten Bindung von TRAIL, so dass der extrinsische Weg der Apoptose initiiert wurde [82]. Andere Studien deuten darauf hin, dass Butyrat in transformierten Kolonzellen Apoptose über den Tumor-Nekrose-Faktor Rezeptor 1 (TNFR1) oder den Fas-Rezeptor induziert [83]. Chirakkal et al. konnten zeigen, dass Butyrat in

Adenokarzinomzellen (HCT116, CaCo-2, HT29) die Expression von Bak auf mRNA- und Proteinebene induziert [88]. In der Literatur wird darüber hinaus eine mögliche Verbindung des ex- und intrinsischen Mechanismus durch die Butyrat-induzierte Spaltung von Bid diskutiert [83].

Aktuelle Studien deuten darauf hin, dass Butyrat durch die Inhibierung von Histondeacetylasen die Synthese weiterer Membranrezeptoren oder deren Bestandteile fördert, so dass Butyrat die Apoptose sowohl über den TGF- β -Signalweg [91] als auch über den WNT- β -Catenin-Signalweg [68] initiieren kann.

1.6. Weizen als ein Bestandteil funktioneller Lebensmittel

Unverarbeitetes Getreide enthält eine Vielzahl verschiedener physiologisch relevanter Inhaltsstoffe (Ballaststoffe, Mineralstoffe, Vitamine und sekundäre Pflanzenstoffe), die ernährungsabhängigen chronischen Erkrankungen wie Krebs, kardiovaskulären Störungen, Diabetes und Übergewicht entgegen wirken können. Kombinationen aus mehreren Substanzen weisen ein höheres gesundheitsförderndes Potential als isolierte Einzelsubstanzen auf [92]. Aufgrund einer Vielfalt an protektiven Substanzen sind Vollkornprodukte in der Lage, *in vivo* eine Reihe von physiologischen Prozessen positiv zu beeinflussen, wie z. B. die Förderung eines positiven Fermentationsprofils (Tab. 1), die Erhöhung der antioxidativen Abwehr und die Senkung der Insulinausschüttung [92]. In den Industriestaaten werden hauptsächlich Weizen, Reis und Mais verzehrt, wohingegen Hafer, Roggen, Gerste und Hirse nur eine untergeordnete Rolle spielen [21]. Weizen stellt hierbei ein Drittel der gesamten Weltgetreideproduktion [64].

1.6.1. Aufbau des Weizenkorns und Zusammensetzung der Aleuronfraktion

Das Weizenkorn untergliedert sich in drei wesentliche Bestandteile: die Schale als äußere Umhüllung, der Keimling sowie das Endosperm, das ca. 85 % des Korngewichts ausmacht (Abb. 7). Die Schale besteht aus einer Vielzahl fein differenzierter Schichten, die sich in zwei Gruppen unterteilen lassen: der Fruchtschale (Epidermis, Hypodermis, Mesokarp, Endokarp) und der Samenschale (Testa, Episperm). Die einreihige Aleuronschicht des Weizens bildet den äußeren Rand des

Endosperms und beträgt ca. 7-9 % des Weizenkorns sowie 45-50 % der Kleiefraktion [93]. Die Kleiefraktion enthält neben den zurückbleibenden Rückständen aus der Frucht- und Samenschale, die bei der Getreideverarbeitung nach dem Absieben des Mehles entstehen, auch die Aleuronzellen. Während des Mahlprozesses wird die Aleuronschicht vom Endosperm abgetrennt [94].

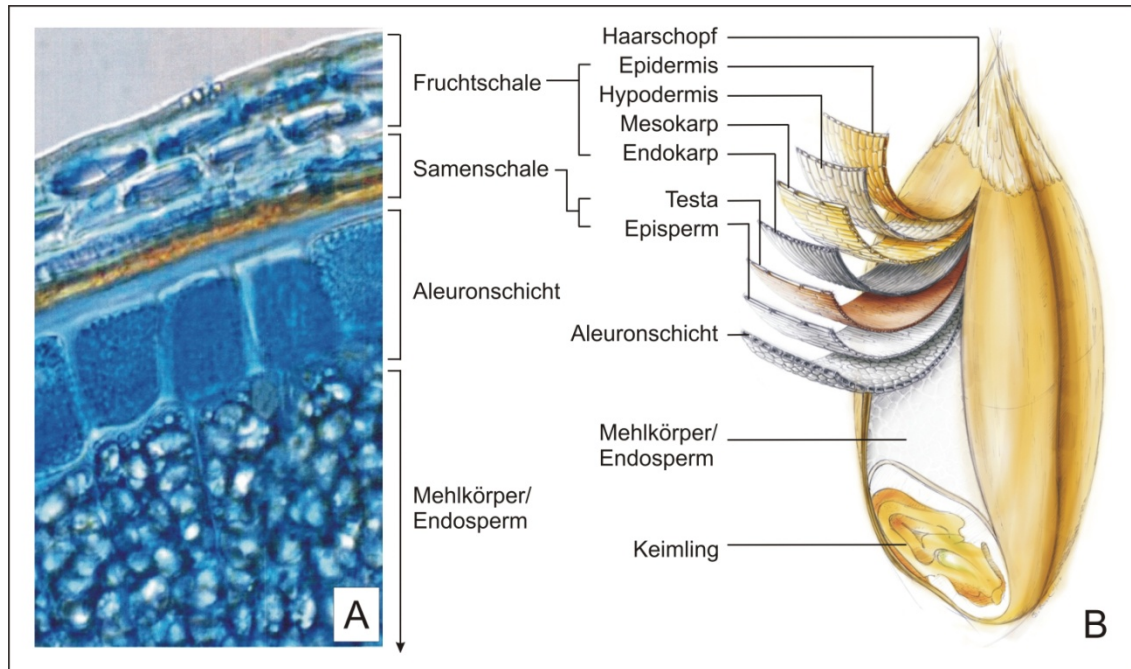


Abb. 7 Botanischer Aufbau der verschiedenen Schichten des Weizenkorns. A: Mikroskopische Aufnahme der äußeren Schichten des Weizenkorns (Cumarin-Färbung), B: Aufbau der Bestandteile des Weizenkorns als Computersimulation (modifiziert nach Kampffmeyer Food Innovation GmbH)

Weizengetreide enthält einen hohen Anteil an gesundheitsfördernden Substanzen, wobei diese in der Aleuronschicht des Weizens konzentriert vorkommen [93]. Weizenaleuron ist durch einen hohen Gewichtsanteil an komplexen unverdaulichen Kohlenhydraten (47 %), vorrangig Arabinoxylanen gekennzeichnet [92,93]. Das Verhältnis von unlöslichen zu löslichen Ballaststoffen beträgt hierbei 9:1.

Weiterhin weist die Aleuronschicht einen relativ hohen Anteil an Proteinen (16 %) mit einer ernährungsphysiologisch günstigen Zusammensetzung an essentiellen Aminosäuren und einen hohen Anteil an sekundären Pflanzenstoffen (Polyphenole, Lignane und Sterole) auf [95].

Vor allem Ferulasäure (80-90 %), größtenteils mit Arabinoxylanen verestert, ist in der Aleuronfraktion konzentriert [93,96]. Im Dünndarm wird nur ein geringer Teil der gebundenen Ferulasäure durch Xylanasen und Esterasen des Dünndarmepithels freigesetzt und absorbiert [97]. Demgegenüber können im Dickdarm etwa 95 % der

gebundenen Ferulasäure durch Xylanasen und Esterasen der humanen Mikroflora freigesetzt und von den Epithelzellen vorrangig über passive Diffusion, aber auch aktive Transportsysteme aufgenommen werden [97].

1.6.2. *In vitro* und *in vivo* Studien zur darmkrebspräventiven Wirkung von Weizeninhaltsstoffen

Epidemiologische und experimentelle Studien konnten zeigen, dass insbesondere Inhaltsstoffe der Weizenkleie für eine inverse Korrelation von Vollkornprodukten und der Krebsentstehung verantwortlich sind [98,99]. In einer Rattenstudie konnte nach dem Verzehr von Weizenkleie die Transitzeit verkürzt und das Stuhlvolumen erhöht werden, wodurch vor allem die Expositionszeit der Kolonepithelzellen mit Kanzerogenen herabgesetzt wurde [100]. Darüber hinaus belegen Humanstudien, dass durch eine erhöhte Aufnahme von Weizenkleie im Gegensatz zur Hafer- und Maiskleie die luminale Konzentration an verschiedenen Tumorpromotoren (z. B. fäkale Mutagene, sekundäre Gallensäuren, neutrale Sterole) gesenkt werden kann [101]. Des Weiteren könnte eine mögliche krebspräventive Wirkung von Weizeninhaltsstoffen in der bakteriellen Fermentation der Ballaststoffe, vorrangig der Arabinoxylane, begründet sein, wodurch SCFA gebildet werden [92]. In Ratten konnte nach Gabe von Weizenkleie und Weizenaleuron die Anzahl AOM-induzierter Adenome tendenziell vermindert werden, wobei die Wirkung vermutlich auf eine signifikant erhöhte Butyratkonzentration und eine daraus resultierende pH-Senkung zurückzuführen war [102]. Auch neuste Studien an Ratten belegen, dass Weizeninhaltsstoffe, hier Arabinoxylan-Oligosaccharide, die Anzahl an induzierten ACF im distalen Kolon vermindern [103]. Eine *in vitro* Fermentation von Arabinoxylanen der Weizenkleie führte zu einer erhöhten Konzentration an SCFA, wodurch das Wachstum von Adenokarzinomzellen verringert und zelluläre Entgiftungsmechanismen gegen Kanzerogene gefördert werden konnten [104]. Des Weiteren wiesen Ratten nach einer Fütterung mit Weizenkleie eine erhöhte Expression und Aktivität Fremdstoff-metabolisierender Enzyme in der Leber und im Kolon auf [105], wobei der induktive Effekt zum einen auf die gebildeten SCFA, vor allem Butyrat, und zum anderen auf die freigesetzten phenolischen Substanzen zurückgeführt wurde [105,106]. Auch Drankhan et al. konnten in Adenokarzinomzellen und in

Tierexperimenten zeigen, dass im Weizen neben den Ballaststoffen vor allem Phenolsäuren für eine mögliche antikanzerogene Wirkung verantwortlich waren [107]. Phenolische Substanzen, die größtenteils im Dickdarm durch bakterielle Enzymsysteme freigesetzt werden, könnten die Kolonzellen vor Schädigungen durch Peroxide oder reaktive Sauerstoffspezies schützen [92,108]. Jenab und Thompson zeigten [109], dass in der Weizenkleie enthaltene Phytinsäure antikanzerogen wirkte, indem in AOM-behandelten Ratten die Differenzierung und die Apoptose induziert wurden. Ein möglicher inverser Zusammenhang zwischen der Aufnahme an Weizenvollkornprodukten und dem Risiko für Kolorektalkrebs könnte zusätzlich in der Fähigkeit begründet sein, die Zusammensetzung der intestinalen Darmflora zu beeinflussen. So führte der Verzehr verschiedener Weizenprodukte (Weizenzerealien und Arabinoxylan-Oligosaccharide) sowohl in Nagern (Ratten, Mäuse) [110,111] als auch im Menschen [112,113] zu einem erhöhten Wachstum an Lactobacillen und Bifidobakterien. Ein präbiotisches Potential von Weizeninhaltsstoffen wurde darüber hinaus *in vitro* unter Verwendung von Fermentationsmodellen nachgewiesen [114-117].

1.7. *In vitro* Fermentationsmodelle und deren Anwendung

Fermentationsmodelle werden hauptsächlich eingesetzt, um die Verdaulichkeit von Substanzen zu überprüfen und/oder das präbiotische Potential von Nahrungsinhaltsstoffen zu untersuchen. Einfache *in vitro* Fermentationssysteme basieren auf einer Simulation der Dickdarmpassage in einem einzelnen Reaktionsgefäß (*one-batch*) durch Fermentation der Testsubstanzen mit einer humanen Fäzessuspension, meist hergestellt aus mehreren Fäzesproben gesunder Probanden und einem spezifischen Fermentationsmedium [118]. Darüber hinaus finden kontinuierliche Fermentationssysteme Anwendung, bei denen zwei bis drei aufeinanderfolgende Reaktionsgefäße die unterschiedlichen Regionen des Kolons simulieren [119]. Neben reinen Ballaststoffquellen ist es von Interesse, komplexe Lebensmittel oder Nahrungsbestandteile zu untersuchen. Durch eine Simulation des gesamten Verdauungstraktes können hydrolysierbare Bestandteile von den unverdaulichen Substanzen abgetrennt werden, bevor die eigentliche Fermentation im Dickdarm stattfindet. Stellvertretend für dieses kontinuierliche Fermentationssystem sind hier das SHIME-Modell nach Molly et al. [120] und das Computer-kontrollierte TIM-Modell

(TNO Intestinal Models) nach Minekus et al. [121,122] zu nennen, mit denen gezielt die physiologischen und ernährungsbedingten Gegebenheiten im Gastrointestinaltrakt reproduziert werden können [49,123].

Mit der Fermentationssimulation lassen sich auch gezielt krebspräventive bzw. kanzerogene Effekte bestimmter Nahrungsinhaltsstoffe näher charakterisieren. Hierfür wird die Wirkung *in vitro* hergestellter Fermentationsüberstände in humanen Kolonzelllinien untersucht – ein relativ neues Gebiet im Bereich der Kolonkrebisforschung [124]. Allerdings erwiesen sich Fermentationsüberstände, die aus einer Simulation des gesamten Verdauungstrakts resultieren (SHIME, TIM), in Zellkultur als besonders zytotoxisch, wobei diese Zytotoxizität auf die eingebrachten Gallensäuren der Dünndarmsimulation zurückgeführt wurde [125,126]. Aus diesem Grund ist es notwendig, ein Fermentationsmodell zu etablieren, welches den Verdau komplexer Nahrungsmittel simuliert und gleichzeitig für *in vitro* Zellkulturuntersuchungen eingesetzt werden kann.

1.8. Ziele der Arbeit

In dieser Arbeit stand die Charakterisierung der Einflüsse mikrobieller Fermentationsprodukte aus Weizenaleuron auf die molekularen Vorgänge der Sekundärprävention von Kolonkrebis im Vordergrund. Es wurden zwei Zelllinien unterschiedlichen Transformationsgrades (LT97 und HT29) verwendet, um folgende Aufgabenstellungen zu bearbeiten:

- Entwicklung einer geeigneten *in vitro* Fermentationsmethode zur Bereitstellung von Fermentationsüberständen (FÜ) für den Einsatz in Zellexperimenten (**Publikation I**).
- Charakterisierung ausgewählter Metabolite, die durch die Fermentation von Weizenaleuron mit Fäzesbakterien gebildet werden (**Publikationen II, IV**).
- Bestimmung des zytotoxischen und genotoxischen Potentials der FÜ in den Kolonkrebiszellen (**Publikationen II, III, IV**).
- Einfluss der FÜ auf relevante Mechanismen der Sekundärprävention (Inhibition der Proliferation sowie Induktion der Apoptose und der Differenzierung) (**Publikationen II, III, IV**).

- Vergleich der durch die FÜ in den Kolonozyten induzierten Effekte mit der Wirkung einer reinen Ballaststoffquelle (Synergy1) (**Publikation III**).
- Einfluss der FÜ auf die gewählten Endpunkte der Sekundärprävention nach einer Kofermentation des Weizenaleurons mit zwei Probiotikastämmen (*Lactobacillus rhamnosus* GG und *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb12) und mit Fäzesbakterien (**Publikationen IV**).

2. Publikationen *

2.1. Publikation I: MODIFICATION OF AN *IN VITRO* MODEL SIMULATING THE WHOLE DIGESTIVE PROCESS TO INVESTIGATE CELLULAR ENDPOINTS OF CHEMOPREVENTION. Katrin Stein, Anke Borowicki, Daniel Scharlau, Kerstin Scheu, Gerald Brenner-Weiss, Ursula Obst, Jürgen Hollmann, Meinolf Lindhauer, Norbert Wachter, Michael Glei. In Begutachtung bei der Zeitschrift *European Journal of Nutrition*. Mai 2010.

Mit der *in vitro* Fermentationssimulation lassen sich krebspräventive bzw. kanzerogene Effekte bestimmter Nahrungsmittelinhaltsstoffe im Zusammenhang mit den komplexen Einflüssen, die aus der bakteriellen Fermentation im Darm resultieren, gezielt untersuchen. Dabei fanden bisher Fermentationssysteme Anwendung, in denen vor allem der Abbau von Nahrungskomponenten und deren Einfluss auf die Darmflora untersucht wurden. In der vorliegenden Arbeit wurde ein etabliertes Modell unter Berücksichtigung des gesamten Verdauungstraktes modifiziert, um die Auswirkungen aktiver Fermentationsmetabolite in humanen Kolonzellen untersuchen zu können.

Durch die Erweiterung des *in vitro* Fermentationsmodells um die Simulation des oberen Verdauungstraktes sowie die Anpassung der zugesetzten Konzentration an Gallensäuren kann die Wirkung aktiver Fermentationsmetabolite komplexer Lebensmittel oder Nahrungsbestandteile in *in vitro* Zellmodellen untersucht werden.

Eigenanteil:

- Anteilige Modifizierung und Durchführung der *in vitro* Fermentation
- Anteilige Auswertung der analytischen Untersuchungen
- Anteilige Durchführung sowie Auswertung und Darstellung der Wachstumsuntersuchungen in HT29-Zellen nach Inkubation mit den Testsubstanzen
- Mitarbeit an der Verfassung des Manuskriptes

* Weitere Publikationen, die nicht in den engeren thematischen Zusammenhang der Dissertation gehören, erscheinen in der Publikationsliste am Ende der Arbeit. Experimentelle Arbeiten meinerseits und eine Mitarbeit an der Verfassung des Manuskriptes während der Promotionsphase führten zur Aufführung im Autorenverzeichnis.

1 MODIFICATION OF AN *IN VITRO* MODEL SIMULATING THE WHOLE DIGESTIVE PROCESS TO
2 INVESTIGATE CELLULAR ENDPOINTS OF CHEMOPREVENTION

3

4 Katrin Stein^{a✉}, Anke Borowicki^a, Daniel Scharlau^a, Kerstin Scheu^b, Gerald Brenner-Weiß^b, Ursula Obst^b, Jürgen
5 Hollmann^c, Meinolf Lindhauer^c, Norbert Wachter^d, Michael Gleis^a

6

7 ^a Friedrich-Schiller-University Jena, Institute for Nutrition, Department of Nutritional Toxicology, Dornburger
8 Str. 24, 07743 Jena, Germany

9 ^b Research Center Karlsruhe, Institute of Functional Interfaces (IFG), Department of Microbiology of Natural
10 and Technical Interfaces, Hermann-von-Helmholtz-Platz 1, 76344 Eggenstein-Leopoldshafen, Germany

11 ^c Max Rubner-Institute, Federal Research Institute of Nutrition and Food, Schützenberg 12, 32756 Detmold,
12 Germany

13 ^d Kampffmeyer Food Innovation GmbH, Trettaustr. 32-34, 21107 Hamburg, Germany

14

15 (✉) Corresponding author:

16 Phone: +493641949675

17 Fax: +493641949672

18 E-mail: stein.katrin@googlemail.com

19

20 **Abstract**

21 *In vitro* gut fermentation systems are relevant tools to study health benefits of foodstuffs. Most of them are
22 commonly used to investigate the degradation of nutrients or the development of gut flora. Using these models,
23 strong cytotoxic effects of the resulting samples on cultured cells were observed. Hence, the aim of this work
24 was to prepare samples resulting from an *in vitro* fermentation model simulating the whole digestive tract and
25 make them suitable for following cell culture experiments. Wholemeal wheat flour (wwf) was digested and
26 fermented *in vitro* with a fermentation model using different ox gall concentrations (41.6 and 0.6 g/L). The
27 resulting fermentation supernatants (fs) were characterised for metabolites and biological effects in HT29 cells.
28 Chemopreventive short chain fatty acids were increased and carcinogenic deoxycholic acid (DCA) was
29 decreased in the fs wwf. The strong cytotoxic effects of the fs, which were partly due to cholic acid and DCA
30 was diminished by lowering the ox gall concentration, allowing the use of the samples in cell culture
31 experiments. All together, an *in vitro* digestion model which can be used to study effects of foodstuffs on
32 chemoprevention and gut health in colon cells is introduced and its physiological relevance is demonstrated.

33

34 **Keywords:** chemoprevention: DCA: fermentation: SCFA: wheat

35

36 **Abbreviations used**

37 CA, cholic acid; DCA, deoxycholic acid; fs, fermentation supernatant; SCFA, short chain fatty acids; wwf,
38 wholemeal wheat flour

39 **Introduction**

40 Several epidemiological studies suggest that diet and lifestyle play a major role in carcinogenesis, especially in
41 colon cancer [1;2]. Dietary fibre, which mainly consists of nonstarch polysaccharides, oligosaccharides and
42 resistant starch, is well known to exhibit protective effects especially against colon cancer by acting as a
43 substrate for the gut flora to yield fermentation products with chemopreventive activity such as short chain fatty
44 acids (SCFA, mainly acetate, propionate and butyrate) [3]. Butyrate, in particular, has been recognised as a key-
45 factor for a potential protection against colon cancer, since it can inhibit proliferation as well as induce
46 differentiation and apoptosis in colon tumour cells [4-6]. To characterise *in vivo* situations more precisely, it
47 makes sense to initially determine *in vitro* not only effects of individual compounds but also the interactions of
48 various fermentation metabolites in terms of cancer prevention. So far, only few studies examine the effect of
49 complex fermentation supernatants (fs) from dietary fibre on chemoprevention [5-8]. Those studies highlight the
50 positive effects of fermentation samples on colon cancer prevention by mechanisms that could retard tumour
51 promotion and progression, e.g. inhibition of tumour cell survival, induction of apoptosis, enhancement of
52 glutathione S-transferases (GST) and alkaline phosphatase activity. Furthermore, Beyer-Sehlmeyer et al. showed
53 that fermentation samples from plant foods, e.g. wheat, containing a variety of different phytoprotectants are
54 more active than their corresponding pure SCFA mixtures in growth inhibition of transformed cells. The so-
55 called ‘added value’ of the complete fermentation samples probably reflects the properties of a large number of
56 other plant ingredients and nutrients such as vitamins, lignans, isoflavones and phenolic acids [5;6].
57 To investigate potential health benefits of nutrients, in particular dietary fibre, on the large intestine, *in vitro*
58 models simulating the colon have to be used to study resulting fermentation metabolites and their interaction
59 with colonocytes. The research of complex foodstuff is more difficult because the digestion and the absorption of
60 nutrients should be additionally taken into account. These processes are spatiotemporal and dynamic, involving
61 complex enzymatic systems and transport reactions. In spite of that, several *in vitro* models have been
62 developed. A basic form of the *in vitro* colon models is the single batch fermentation described by Barry et al.
63 [9]. More complex versions are multistage continuous models including models of the stomach and small
64 intestine [10], the colon [11-13] as well as the small and large intestine [14]. The models are used to elucidate
65 the role of microbiota in the metabolism of all non-digestible parts of the diet [15] and to analyze fermentation
66 products, e.g. SCFA, bile acids and ammonia [13]. Moreover, the complex *in vitro* models should allow the
67 investigation of possible synergistic effects of dietary fibre and other ingredients in complex foods, e.g. in

68 wholemeal wheat flour (wwf), on colon cells. So far, detailed evidence is missing how fermentation products of
69 complex foods interact with human colon cells.

70 Hence, the aim of this work was to develop a cheap and easy to handle fermentation model of the whole
71 gastrointestinal tract considering former activities of Barry et al. [9] and Aura et al. [16]. Since samples from
72 previous *in vitro* digestion systems have been shown to have cytotoxic effects [7], that make it unsuited for cell
73 culture experiments, our main focus was to find conditions that allow the application of fs in cell culture
74 experiments without cytotoxic side effects. Therefore, fermentation products (SCFA and bile acids), generated
75 by using different *in vitro* model conditions, were determined and the influence of the samples on cell growth of
76 HT29 colon cancer cells was measured. Furthermore, the efficiency of digestive enzymes and dialysis, which
77 simulates absorption of small molecular metabolites, was investigated.

78

79 **Materials and Methods**

80 *Dietary fibre sources*

81 Wholemeal wheat flour (wwf) from Kampffmeyer Food Innovation GmbH (Hamburg, Germany) was used as
82 source of dietary fibre. The composition of the wwf was reported in Borowicki et al. [17]. Synergy1, a
83 commercially available mixture of inulin enriched with oligofructose, was obtained from ORAFTEI, Tienen,
84 Belgium. To maintain stability of the samples, aliquots were prepared and stored in air- and light-proof flasks at
85 4 °C.

86

87 *Fermentation of dietary fibre sources*

88 Wwf was digested and fermented *in vitro* in a batch-culture system according to Aura et al. [16;17] and Barry et
89 al. [9] with some modifications. Two fermentation series, with different ox gall concentrations in the intestinal
90 extract for simulation of the small intestine, were conducted. Fermentation I contained 41.6 g/L ox gall
91 according to Aura et al. [16] and fermentation II contained only 0.6 g/L ox gall considering more physiological
92 bile acid concentrations occurring during digestion of food containing a moderate fat content [18]. Moreover, for
93 the statistical evaluation of the fermentation procedure the well characterised dietary fibre source Synergy1 was
94 digested and fermented *in vitro* in three repetitions.

95 Wwf was weighed (0.5 g fermentable material) into glass bottles and mixed with 10 mL potassium phosphate
96 buffer (0.1 M, pH 7.0). A sample without wwf was used as control (blank). All following incubations were

97 performed at 37 °C in a continuously shaking water bath. Salivary *alpha*-amylase (Sigma, Taufkirchen,
98 Germany) diluted to 1000 U/ml with 20 mM sodium phosphate buffer (17.36 U/sample) and 0.85 % (w/v) NaCl
99 were added and the samples were incubated for another 5 min. Hydrochloric acid solution (150 mM, 2.81 ml)
100 was added to lower the pH to 2.0. Pepsin (Sigma, Taufkirchen, Germany) dissolved in 0.94 ml of 20 mM
101 hydrochloride acid was added to each sample and incubated for 2 h at 37 °C. An intestinal extract was prepared
102 by dissolving 208 mg (fermentation I) or 3 mg (fermentation II) ox gall (Fluka-Sigma, Taufkrichen, Germany),
103 respectively, and 2.6 mg pancreatin (Sigma, Taufkirchen, Germany) in 5 mL sodium bicarbonate buffer (11 mM,
104 pH 6.5). This solution (5 ml) was added to each sample or blank, the pH was adjusted to 6.5 using sodium
105 hydroxide solution (10 M) and the suspension (25 ml) was transferred into a dialysis tube (MW cut off 1000 Da)
106 (Roth, Karlsruhe, Germany). The tubes were placed into glass bottles filled with 2 L dialysis buffer (13.61 g
107 potassium phosphate and 1.88 g sodium bicarbonate dissolved in a. bidest, pH 6.5) and incubated for 6 h at
108 37 °C under semi-anaerobic conditions. Semi-anaerobic conditions in the glass bottles were achieved by
109 removing a part of the air with an injected cannula (0.5 bar for 1 min) and subsequently, filling the bottles with
110 the fermentation gas mixture (86 % nitrogen, 10 % carbon dioxide and 4 % hydrogen at 37 °C) via the cannula
111 (0.8 bar for 1 min). After 15 min (7 cycles repeated), the cannulae were removed. At the end of the incubation
112 the suspension was transferred from the dialysis tube into a 500 ml glass bottle and the pH of each sample was
113 measured.

114 Thereafter, the *in vitro* fermentation was performed according to the method described by Gleis et al. [5]. Fecal
115 homogenate (25 mL) was mixed with the digested wheat samples (see above, final concentration of wheat
116 sample: 10 g/L) and the pH was adjusted to 6.5 using sodium hydroxide solution (10 M). *In vitro* fermentation
117 was conducted under anaerobic conditions which were achieved by removing the available air with an injected
118 cannula (0.5 bar for 1 min). Subsequently, the bottles were filled with the fermentation gas mixture (see above)
119 via the cannula (0.8 bar for 1 min). After 30 min (15 cycles repeated), the cannulae were removed and the
120 fermentation suspensions were incubated for 24 h in a shaking water bath at 37 °C. Afterwards, the fermentation
121 process was stopped by placing the suspensions on ice and the pH was measured with a pH meter Hydrus 300
122 (Fisherbrand, Schwerte, Germany). Each sample was centrifuged (4200×g, 4 °C) for 30 min. Supernatants were
123 centrifuged again (4200×g, 4 °C) for 15 min and stored at -80 °C. Before sterilisation of the fs, samples were
124 thawed quickly, aliquoted in 2 mL tubes and centrifuged (16000×g, 4 °C). Afterwards, fs were sterilised by
125 filtration (pore size, 0.22 µm) to obtain final fs for the use in cell culture experiments.

126 To investigate the functionality of digestion enzymes and dialysis during wwf digestion the remaining
127 suspensions, dialysates (dialysis buffer containing low molecular (<1000 Da) digested products and bile acids)
128 and retentates (suspension in dialysis tube), obtained by simulation of mouth to small intestine using 0.6 g/L ox
129 gall were stored at -80 °C until use for analysis.

130

131 *Determination of bile acids*

132 Bile acids were determined in the intestinal extract, retentate as well as dialysate, and in all fs by high
133 performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS). Therefore, fs were diluted
134 1:10 using potassium phosphate buffer. 20 µL cholic acid-d₄ (CA-d₄) (50 µg/mL) were added as internal
135 standard. The sample enrichment was performed by neutral solid-phase extraction with 200 mg 101 sorbent
136 columns (Separtis, Grenzach-Wyhlen, Germany). The columns were preconditioned with 10 mL methanol,
137 15 mL distilled water and 5 mL potassium phosphate buffer. The sample was applied onto the cartridge and
138 allowed to pass through by gravity and water jet vacuum pump. Afterwards, the cartridge was washed with
139 10 mL a. bidest., dried with nitrogen, and the bile acids were eluted with 5 mL methanol. The eluted substances
140 were dried at 45 °C under nitrogen and the residue was dissolved in 1 mL 10 mM NH₄OAc/acetonitrile, 50:50
141 (v/v). Liquid chromatography-MS/MS was performed similar to Burkard et al. with an Agilent 1100 Series
142 HPLC system (Agilent, Waldbronn, Germany) [19]. Bile acids were separated on an RP-C8 column (100 x 4
143 mm, 5 µm, MZ-Analysentechnik, Mainz, Germany). The injection volume was 20 µL. The mobile phase
144 consisted of 10 mM ammonium acetate buffer pH 5.0 containing 0.012 % formic acid (eluent A) and acetonitrile
145 (eluent B). The eluents were linearly changed from 70 % A and 30 % B to 30 % A and 70 % B within 38 min,
146 held for 10 min, and finally adjusted to the original ratio of 70 % A and 30 % B within 2 min and held for
147 15 min to equilibrate the column. The column flow rate was set to 0.5 mL/min during the entire analysis. The
148 detection of the bile acids was performed with a tandem mass spectrometer API 4000™ (Applied
149 Biosystems/MDS SCIEX, Toronto, Canada) equipped with an ESI ionisation source operating in the negative
150 mode at -4.5 kV at 450 °C. Bile acids were recorded in multiple reactions monitoring mode at m/z 407.2 →
151 343.2 cholic acid (CA), m/z 411.2 → 347.2 (CA-d₄) and m/z 391.2 → 345 deoxycholic acid (DCA). A
152 validation of the method was done by using enriched standards from 0.02 to 2.0 mg/L (n=3). Repeatability,
153 standard deviation, limit of detection and limit of quantitation were calculated according to the German Standard
154 DIN 32645.

155

156 *Analysis of glucose concentrations*

157 The amount of glucose was analysed in retentate and dialysate as well as in the starting raw material by high-
158 performance anion-exchange chromatography on a DIONEX BioLC system (DIONEX Corporation, Sunnyvale,
159 CA, USA) according to Hollmann et al. [20].

160

161 *Determination of SCFA*

162 SCFA in the fs were determined by gas chromatography combined with mass spectrometry (GC-MS) as
163 described by Wang et al. with some modifications [21]. Briefly, fs were diluted 1:50 using potassium phosphate
164 buffer to a final volume of 1 mL and 2-ethyl butyric acid was added as internal standard. Samples were acidified
165 with 20 μ L hydrochloric acid solution (32 %) and SCFA were extracted by shaking the samples two times with
166 700 μ L tert-butyl methyl ether. The organic phases were collected and 1 mL of the respective organic phases
167 were derivatised with 20 μ L trimethylsulfonium hydroxide solution (TMSH) (Fluka, Buchs, Switzerland) in
168 methanol (10 % v/v) for 20 min at room temperature. 2 μ L aliquots of the derivatised samples were injected
169 into a GC/MS (Varian Saturn 2000) onto a Stabilwax-DA column (Restek, Bellefonte, PA, USA, 30 m \times
170 0.25 mm I.D. \times 0.25 μ m). Helium was used as carrier gas. The chromatographic conditions were as follows:
171 60 $^{\circ}$ C held for 2 min, 10 $^{\circ}$ C min^{-1} until 150 $^{\circ}$ C, held for 1 min and 50 $^{\circ}$ C min^{-1} until 240 $^{\circ}$ C, held for 10 min. For
172 the detection of the SCFA the mass spectrometer was used in full scan mode. A method validation has been
173 carried out using enriched six point calibration functions from 5 to 100 mg/L (n=3). Repeatability, standard
174 deviation, limit of detection and limit of quantitation were calculated according to the German Standard DIN
175 32645.

176

177 *Preparation of synthetic bile acid mixtures*

178 The preparation of the synthetic mixtures of the two main bile acids, CA and DCA, contained in the fs blank and
179 wwf of fermentation I and II was based on the analytical data. Investigations using the synthetic mixtures were
180 expected to reveal which cellular effects were caused by the bile acids in the fs. Therefore, sodium cholate
181 hydrate (Sigma, Taufkirchen, Germany) and sodium deoxycholate (Sigma, Taufkirchen, Germany) in the
182 determined concentrations were dissolved in DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium, Gibco BRL,
183 Eggenstein, Germany) cell culture medium supplemented with 10 % fetal calf serum.

184

185 *Cell culture*

186 The human colon adenocarcinoma cell line HT29 was established in 1964 by Fogh (Memorial Sloan Kettering
187 Cancer Centre, New York) [22] and was obtained from the German Collection of Microorganisms and Cell
188 Cultures (Braunschweig, Germany). The Cells (passages 30–40) were maintained as a subconfluent monolayer
189 cultured in supplemented DMEM at 37 °C in a 95 % humidified incubator (5 % CO₂). The cultured cells were
190 trypsinised with 5 mL of trypsin/versene (1:10 v/v) for 4 min and subcultivated at dilutions of 1:5 to 1:10 in T₇₅
191 flasks. In regular intervals a mycoplasma test (MycoAlert™ Detection Kit) was performed and contamination
192 with mycoplasma was excluded.

193

194 *Measurement of cell number*

195 The number of colon cells was determined in 96-well microtiter plates. 24 h after seeding, the cells were
196 incubated with 2.5–20.0 % (v/v) of all fs diluted in DMEM to determine cytotoxicity. After 24, 48 and 72 h cell
197 number was measured as described [23]. Results were calculated on the basis of the medium control which was
198 set to equal 100 %.

199

200 *Statistical analysis*

201 All experiments apart from the fermentation (I and II) of the wwf were conducted independently at least three
202 times. Means and standard deviations were calculated from at least three independent experiments. Differences
203 were calculated with GraphPad Prism Version 5.02 for Windows (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA,
204 USA) using one- or two-way ANOVA with Bonferroni post-test with selected pairs, or Students *t*-test. The
205 statistical analyses used depended on the respective experimental design and are specified in the legends to the
206 figures and tables.

207

208 **Results**

209 *Bile acids in fermentation supernatants*

210 Bile acid concentrations in the fs of fermentation I and II, with two different ox gall concentrations (fermentation
211 I: 41.6 g/L; fermentation II: 0.6 g/L) were analysed by HPLC-MS/MS. It is important to note that the two
212 applied ox gall concentrations contained different amounts of bile acids (fermentation I: 645 μM CA, 423 μM
213 DCA; fermentation II: 9 μM CA, 6 μM DCA). The much lower concentration of ox gall (0.6 g/L) was used to
214 achieve more physiological bile acid concentrations during the simulation of digestion. Levels of bile acids, both

215 CA and DCA, in the fs were in general higher than in the applied intestinal extracts, due to the added fecal
216 sample. High concentrations of CA were detected in fs blank I (1562 μM) and in fs wwf I (656 μM).
217 Concentration of DCA was highest in fs blank I (502 μM). The reduced amount of CA and DCA resulted in low
218 bile acid concentrations in fs blank II (CA: $<0.5 \mu\text{M}$ (limit of quantitation, LOQ), DCA: 26 μM) and wwf II
219 (CA: <0.5 (LOQ), DCA: 2 μM). Noteworthy, the concentration of the potential toxic secondary bile acid DCA
220 was markedly reduced by fermentation of wwf independently of the ox gall concentration (wwf I: 2 μM , wwf II:
221 2 μM).

222

223 *SCFA and pH in fermentation supernatants*

224 The fs were further characterised for their contents of SCFA and pH after 24 h anaerobic fermentation. It could
225 be shown that the amount of SCFA in both fs wwf I and II were markedly increased in comparison to the
226 respective fs blank (Table). At this, the amount of butyrate was highest in the fs wwf II. Furthermore, the
227 relative proportion of butyrate was slightly increased. Interestingly, relative and absolute propionate
228 concentrations in samples of fs I were higher than in fs II samples whereas butyrate levels were increased in the
229 latter. Fermentation of wwf resulted in a clearly decreased pH compared to fs blank. Lowered pH may reflect the
230 increased total amount of the SCFA by the active microflora.

231

232 *Effects of fermentation supernatants on cell growth of HT29*

233 Fig. 1 shows the effects of fs blank and fs wwf of fermentation I and II on cell growth of HT29 cells. The
234 treatment of HT29 cells with the fs of fermentation I (fs blank, fs wwf) and II (fs blank, fs wwf) resulted in a
235 significant time and dose dependent decrease of surviving cells. In comparison, effects of fs blank I were
236 significantly different from effects of fs blank II, whereby fs blank I was the most cytotoxic of all samples with
237 an EC_{50} of $14.1 \pm 1.2 \%$ (Table) after 24 h of treatment. The reduced cytotoxicity of fs blank II with an EC_{50} of
238 $13.4 \pm 1.1 \%$ which was reached only after 48 h indicates that residual ox gall must be involved in the reduction
239 of the cell number. Moreover, fs blank I was more cytotoxic than corresponding fs wwf I, whereas fs wwf II was
240 more effective than fs blank II in inhibition of cell growth.

241

242 *Effects of synthetic mixtures of CA and DCA on cell number of HT29 cells*

243 To characterise the role of bile acids in inhibition of cell growth, HT29 cells were treated with the synthetic
244 mixtures of CA and DCA which were prepared according to their corresponding complex fs blank and fs wwf of

245 fermentation I and II, respectively (Fig. 2) The cell number of HT29 cells was only decreased time-dependently
246 by the synthetic bile acid mixture of fs blank I (48 h and 72 h). However, in comparison to the complex fs blank
247 I (Fig. 1) it was significantly less effective. All other synthetic mixtures of complex fs (fs wwf I, fs blank II and
248 wwf II) had no effect on the cell number.

249

250 *Efficacy of digestion enzymes and dialysis*

251 To investigate the efficiency of digestion and dialysis we characterised the retentate and dialysate (0.6 g/L ox
252 gall in intestinal extract) for their contents of glucose and bile acids. Digestion of wwf resulted in a total
253 increased amount of glucose in the dialysate (3.64 mg absolute) and retentate (12.64 mg absolute) compared to
254 the raw material (0 mg). This demonstrates an effective enzymatic degradation of starch and at least partial
255 dialysis of glucose during simulation of the small intestine. Furthermore, most of the amount of the inserted bile
256 acids CA (blank: 510 μM ; wwf: 380 μM) and DCA (blank: 330 μM ; wwf: 260 μM) were found in the dialysates
257 (blank: 360 μg CA, 280 μg DCA; wwf: 230 μg CA, 190 μg DCA) which also proofed the functionality of
258 dialysis during simulation of the upper digestive tract.

259

260 *Statistical evaluation of fermentation II*

261 In order to statistically validate the newly established fermentation protocol II, Synergy1, a well-analysed dietary
262 fibre, was fermented in three independent experiments according to the protocol of fermentation II. Key
263 parameters reflecting the physiological relevance of the method, namely concentrations of SCFA and bile acids,
264 were then analysed in the obtained fs. The fermentation of Synergy1 resulted in a strong and significant decrease
265 of DCA ($2.23 \pm 2.07 \mu\text{M}$) and a non-significant decrease of CA ($0.27 \pm 0.19 \mu\text{M}$) compared to the fs blank (DCA:
266 $36.06 \pm 10.27 \mu\text{M}$; CA: $0.36 \pm 0.12 \mu\text{M}$) (Table 3). The total SCFA concentration in the fs Synergy1 was
267 increased by trend ($p < 0.1$) in comparison to the blank. In addition, a significant increase of butyrate by
268 approximately 4-fold was observed (blank: $6.65 \pm 2.52 \mu\text{M}$; Synergy1: $27.28 \pm 2.64 \mu\text{M}$). Since these values are
269 comparable to those obtained by the fermentation of the wwf (Table 1), they statistically support the
270 physiological relevance of the established protocol of fermentation II.

271

272 **Discussion**

273 *In vitro* gut fermentation systems are thought to reflect conditions in the gastrointestinal tract (GIT) which make
274 them a relevant tool, with the advantages of low costs and relatively easy performance, to study health benefits
275 and risks of foodstuffs and nutrients, metabolites of food digestion as well as effects on the colonic microflora.
276 To determine how the intestinal epithelium is influenced by different gut metabolites in detail it is useful to
277 investigate the effects of fermentation samples in colon cell culture experiments. Only few such cell culture
278 studies are available and most of them investigated effects of fermentation samples obtained from basic *in vitro*
279 fermentation models that only mimic the large intestine. Therefore, the aim of the present study was to establish
280 a new *in vitro* model, simulating the whole GIT based on two previously described models, suitable for cell
281 culture experiments.

282

283 *SCFA production*

284 Major metabolites of the gut flora mediated fermentation of foodstuffs are SCFA, which result in a lower pH in
285 the colon. Special attention is being paid to the ratio of the SCFA, since they exhibit different physiological
286 functions and effects. Various population survey data showed that fecal SCFA production is in the order of
287 acetate>propionate>butyrate in a molar ratio of approximately 60:20:20 to 60:25:15, respectively [24;25]. Total
288 SCFA concentrations have been found to range from 49-147 mM depending on the consumed diet as well as the
289 region of the colon [26]. In the present study, the total SCFA concentrations increased after both fermentation
290 series of the wheat samples from 47 mM and 45 mM to 132 mM and 128 mM, respectively, as well as after
291 fermentation of the Synergy1 from 45 mM to 118 mM. Therefore, the detected values are comparable to the
292 physiological concentrations. These results are in line with previous studies using a simple *in vitro* fermentation
293 model according to Barry et al. [9] in which SCFA concentrations increased 2-3-fold compared to the feces
294 control after fermentation of arabinoxylanes [5] and Synergy1 [27].

295 In our study the statistical evaluation of the complex fermentation model II demonstrated the reproducibility by a
296 comparable increase of total SCFA and butyrate after each fermentation (n=3) of Synergy1. Furthermore, in
297 other studies using the introduced *in vitro* fermentation II to digest a number of different substrates, namely wwf,
298 wheat bran, wheat aleurone [17] as well as of different wheat and rye breads (our unpublished data) and nuts
299 (our unpublished data), a comparable increase in the amounts of SCFA were detected. In addition, the
300 reproducibility of the underlying *in vitro* fermentation simulating the colon was approved in an European
301 interlaboratory study during the estimation of fermentability of dietary fibre sources by Barry and Co-workers

302 [9]. Here, in most cases, very similar results regarding the SCFA production were found during a ring test, even
303 though some interlaboratory differences of unknown origin remained.

304 The ratio of SCFA shifted slightly from acetate to propionate and butyrate (fermentation I) or to butyrate only
305 (fermentation II) during the bacterial fermentation of wwf. In addition, fermentation (series II) of Synergy1
306 showed a shift towards butyrate which was comparable to wwf II. A particular interest in butyrate has arisen
307 because of its potential preventive role against colon cancer [4]. Butyrate can have numerous biological effects,
308 like inducing apoptosis in tumour cells [28] and protecting cells from genotoxic insults by elevating phase II
309 detoxification [29;30]. Therefore, the high production of SCFA *in vitro* is possibly an indication of protective
310 effects by the diet.

311 Interestingly, the physiological amount of propionate constituting 20-25 % of the total SCFA amount was clearly
312 exceeded during fermentation I whereas the concentration after fermentation II was still physiologic [24;25].
313 Zampa et al. showed that after fermentation of xylo-oligosaccharides propionate concentrations were high after
314 6 days of fermentation and then decreased, while butyrate started with low values and then increased to its
315 highest values [31]. During the first 6 days the primary bile acid CA was converted into the corresponding
316 secondary bile acid DCA with a conversion rate of more than 90 %. Additionally, it was observed, that the
317 primary bile acid metabolism and the production of butyrate are inversely related during fermentation.
318 Therefore, our observed high propionate and low butyrate proportions could possibly be a result of a reduced
319 growth of butyrate-producing bacteria caused by the high bile acid concentrations used in fermentation I.

320

321 *Bile acid production*

322 In general, our investigations showed that the fermentation of wwf and Synergy1 resulted in low levels of the
323 secondary bile acid DCA, produced by bacterial conversion of primary bile acids. DCA showed tumour-
324 promoting properties by acting directly on the mucosa or by promoting the effects of carcinogenic substances
325 present in the intestine [31]. Thus, the reduction of DCA can be regarded to be positive in terms of colon cancer
326 prevention. Besides reducing the solubility of bile acids, the lower pH can also reduce the activity of 7 α -
327 dehydroxylases which is responsible for the conversion of primary to secondary bile acids [32]. Additionally,
328 DCA may bind to dietary fibre as has been demonstrated for CA and chenodeoxycholic acid by Elhardallou et al.
329 who showed the binding of these bile acids by a fibre-rich fraction of different legumes [33]. These results
330 suggest that the dietary fibre sources wwf and Synergy1 may reduce the amounts of carcinogenic DCA in the
331 colon. This finding is in line with studies of our group using different sources of dietary fibres [27;34].

332

333 *Effects on cell number*

334 Several *in vitro* studies indicated that SCFA, especially butyrate, reduce cell growth of transformed colon cells
335 [6;27;34], a parameter of secondary chemoprevention [35]. The generated fs used in this study also led to an
336 efficient reduction of cell number of HT29 cells, whereas fs blank I exhibited the strongest effect. A synthetic
337 mixture of CA (1628±66 µM) and DCA (577±75 µM) of the corresponding complex fs blank I reduced the
338 growth of HT29 cells significantly but less than the corresponding fs. Therefore bile acids are apparently
339 involved in growth reduction by fs blank I, but others factors in the complex fs seem to enhance these effects. A
340 study of Shiraki et al. supports these findings, because 100 µM DCA reduced the proliferation rate of HT29 [36].
341 The change in ox gall concentration (0.6 g/L) used for the *in vitro* fermentation II resulted in a fs wwf II which
342 was more effective in reducing cell growth than the corresponding blank II. Noteworthy, the less reducing
343 activity of the fs blank II is comparable with other faeces controls which were obtained with a single *in vitro*
344 fermentation system and successfully used in further cell culture experiments [5;27]. Therefore, under these
345 more physiological conditions comparable to a daily secretion of 20-30 g bile acids [18], the contained SCFA
346 seem to be more important for the reduced cell growth than the contained reduced concentrations of bile acids
347 (CA: 66-132 µM; DCA: 0.2-0.4 µM). Additionally, other ingredients of the fs such as the antioxidant and anti-
348 mutagenic compounds hydroxycinnamic acids might have contributed to the detected inhibition of cell growth as
349 it was suggested by Beyer-Sehlmeyer. et al. [6]. However, the high ox gall concentration (41.6 g/L) that was
350 used for other *in vitro* models of digestion and for our fermentation I resulted in highly cytotoxic fermentation
351 samples and the contained bile acids apparently masked the effects of other, more physiological metabolites like
352 SCFA. A reduction of the ox gall to 0.6 g/L in our newly established model simulating the whole digestive tract
353 is thus a critical parameter to use these samples in cell culture experiments. Therefore, samples obtained using
354 this optimized protocol, can be used to study the effects of different foodstuffs on colon cell lines and can
355 therefore improve the outcome of *in vitro* studies.

356

357 *Efficacy of in vitro fermentation*

358 Predigestion of starch by *alpha*-amylase as well as the subsequent removal of glucose by dialysis is important
359 for the following *in vitro* fermentation. It has been previously demonstrated that the fermentation of starch and

360 glucose can result in high SCFA concentrations [37;38]. Therefore these compounds can mask the results of
361 dietary fibre fermentation if these compounds are not previously degraded and removed.

362 In our experiments, an effective degradation of starch contained in wwf was demonstrated by increased
363 concentrations of glucose in the retentate and dialysate. This reflects the hydrolysis of starch by added *alpha*-
364 amylase and is in accordance with results of Aura et al. [16]. In addition this confirmed the subsequent removal
365 of glucose by dialysis. The efficiency of the dialysis was further demonstrated by the detection of the majority of
366 the most of the inserted bile acids in the dialysate. These results thus indicate that dialysis is an effective step to
367 simulate absorption of small molecules occurring in the small intestine. But it has also to be kept in mind that the
368 presented model is only an approach to physiological conditions. A complete physiological and selective
369 absorption is limited by the absence of brush border enzymes. This is however a limitation that our model shares
370 with all other available models simulating human digestion *in vitro*.

371

372 In conclusion, we introduce a modified *in vitro* digestion system that mimics the whole gastrointestinal tract. The
373 samples obtained with this simulation can be used in cell culture experiments to study the effects of foodstuffs
374 on colon cells. The reduction of high ox gall concentrations used in other models diminished cytotoxic side-
375 effects and enables an unmasked analysis of effects of fermentation metabolites on cells. The fermentation of
376 two different dietary fibre sources, namely wwf and Synergy1 (inulin enriched with oligo-fructose) using the
377 presented system, resulted in the production of potentially chemopreventive metabolites such as SCFA on the
378 one hand and a reduction of the tumor promoting secondary bile acid DCA on the other hand. Therefore, the
379 designed protocol can successfully be used to study effects of different nutrients and foodstuffs on colon cancer
380 prevention and general markers of gut health in human colon cell cultures. Hence, the described *in vitro*
381 fermentation model was already proved to be successful in subsequent investigations studying the cancer
382 preventive effects of different fermented wheat sources [17;39].

383

384 **Acknowledgements**

385 For funding we would like to thank the Federal Ministry of Education and Research, Germany (BMBF
386 0313829A). We gratefully acknowledge the excellent technical assistance by Ms Esther Woschee. We thank
387 Norbert Wachter, Kampffmeyer Food Innovation GmbH, Germany for providing the dietary fibre source
388 wholemeal wheat flour.

1. Doll R, Peto R (1981) The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. *J Natl Cancer Inst* 66:1191-1308

2. Pool-Zobel B, van LJ, Rowland I, Roberfroid MB (2002) Experimental evidences on the potential of prebiotic fructans to reduce the risk of colon cancer. *Br J Nutr* 87 Suppl 2:S273-S281

3. Topping DL, Clifton PM (2001) Short-chain fatty acids and human colonic function: roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. *Physiol Rev* 81:1031-1064

4. Amrein TM, Gränicher P, Arrigoni E, Amadò R (2003) In vitro digestibility and colonic fermentability of aleurone isolated from wheat bran. *Lebensm -Wiss u Technol* 36:451-460

5. Gleis 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* 54:2088-2095

6. Beyer-Sehlmeyer G, Gleis M, Hartmann E, Hughes R, Persin C, Bohm V, Rowland I, Schubert R, Jahreis G, Pool-Zobel BL (2003) Butyrate is only one of several growth inhibitors produced during gut flora-mediated fermentation of dietary fibre sources. *Br J Nutr* 90:1057-1070

7. Fassler C, Gill CI, Arrigoni E, Rowland I, Amado R (2007) Fermentation of resistant starches: influence of in vitro models on colon carcinogenesis. *Nutr Cancer* 58:85-92

8. Klinder A, Gietl E, Hughes R, Jonkers N, Karlsson P, McGlynn H, Pistoli S, Tuohy K, Rafter J, Rowland IR, van LJ, Pool-Zobel BL (2004) Gut fermentation products of inulin-derived prebiotics beneficially modulate markers of tumour progression in human colon tumour cells. *Int J Canc Prev* 1:19-32

9. Barry JL, Hoebler C, Macfarlane GT, Macfarlane S, Mathers JC, Reed KA, Mortensen PB, Nordgaard I, Rowland IR, Rumney CJ (1995) Estimation of the fermentability of dietary fibre in vitro: a European interlaboratory study. *Br J Nutr* 74:303-322

10. Minekus M, Marteau P, Havenaar R, Huisintveld JHJ (1995) A Multicompartmental Dynamic Computer-Controlled Model Simulating the Stomach and Small-Intestine. *Atla-Alternatives to Laboratory Animals* 23:197-209

11. Gibson GR, Cummings JH, Macfarlane GT (1988) Use of A 3-Stage Continuous Culture System to Study the Effect of Mucin on Dissimilatory Sulfate Reduction and Methanogenesis by Mixed Populations of Human Gut Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 54:2750-2755

12. Macfarlane GT, Cummings JH, Macfarlane S, Gibson GR (1989) Influence of retention time on degradation of pancreatic enzymes by human colonic bacteria grown in a 3-stage continuous culture system. *J Appl Bacteriol* 67:520-527

13. Minekus M, Smeets-Peters M, Bernalier A, Marol-Bonnin S, Havenaar R, Marteau P, Alric M, Fonty G, Huis i, V (1999) A computer-controlled system to simulate conditions of the large intestine with peristaltic mixing, water absorption and absorption of fermentation products. *Appl Microbiol Biotechnol* 53:108-114

14. Molly K, Vande WM, Verstraete W (1993) Development of a 5-step multi-chamber reactor as a simulation of the human intestinal microbial ecosystem. *Appl Microbiol Biotechnol* 39:254-258

- 429 15. Aura, A. M. *In vitro* digestion models for dietary phenolic compounds. (VTT Publications 575). 2005.
430 Espoo.
431 Ref Type: Thesis/Dissertation
- 432 16. Aura AM, Härkönen H, Fabritius M, Poutanen K (1999) Development of an *in vitro* enzymatic
433 digestion method for removal of starch and protein and assessment of its performance using rye and
434 wheat breads. *Journal of Cereal Science* 29:139-152
- 435 17. Borowicki A, Stein K, Scharlau D, Scheu K, Brenner-Weiss G, Obst U, Hollmann J, Lindhauer M,
436 Wachter N, Gleib M (2010) Fermented wheat aleurone inhibits growth and induces apoptosis in human
437 HT29 colon adenocarcinoma cells. *Br J Nutr* 103:360-369
- 438 18. Bhagavan NV (2002) *Gastrointestinal Digestion and Absorption*. Medical Biochemistry. fourth ed. S
439 Harcourt Science and Technology Company, Academic Press, Canada edn. pp 216-217
- 440 19. Burkard I, von EA, Rentsch KM (2005) Differentiated quantification of human bile acids in serum by
441 high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol*
442 *Biomed Life Sci* 826:147-159
- 443 20. Hollmann J, Lindhauer MG (2005) Pilot-scale isolation of glucuronoarabinoxylans from wheat bran.
444 *Carbohydrate Polymers* 59:225-230
- 445 21. Wang JF, Zhu YH, Li DF, Wang Z, Jensen BB (2004) *In vitro* fermentation of various fiber and starch
446 sources by pig fecal inocula. *J Anim Sci* 82:2615-2622
- 447 22. Rousset M (1986) The human colon carcinoma cell lines HT-29 and Caco-2: Two *in vitro* models for
448 the study of intestinal differentiation. *Biochimie* 68:1035-1040
- 449 23. Klenow S, Gleib M, Haber B, Owen R, Pool-Zobel BL (2008) Carob fibre compounds modulate
450 parameters of cell growth differently in human HT29 colon adenocarcinoma cells than in LT97 colon
451 adenoma cells. *Food Chem Toxicol* 46:1389-1397
- 452 24. Wong JM, de SR, Kendall CW, Emam A, Jenkins DJ (2006) Colonic health: fermentation and short
453 chain fatty acids. *J Clin Gastroenterol* 40:235-243
- 454 25. Cummings JH (1981) Short chain fatty acids in the human colon. *Gut* 22:763-779
- 455 26. Scheppach W, Bartram P, Richter A, Richter F, Liepold H, Dusel G, Hofstetter G, Ruthlein J, Kasper H
456 (1992) Effect of short-chain fatty acids on the human colonic mucosa *in vitro*. *JPEN J Parenter Enteral*
457 *Nutr* 16:43-48
- 458 27. Munjal U, Gleib M, Pool-Zobel BL, Scharlau D (2009) Fermentation products of inulin-type fructans
459 reduce proliferation and induce apoptosis in human colon tumour cells of different stages of
460 carcinogenesis. *Br J Nutr* 1-9
- 461 28. Pool-Zobel BL, Sauer J (2007) Overview of experimental data on reduction of colorectal cancer risk by
462 inulin-type fructans. *J Nutr* 137:2580S-2584S
- 463 29. Pool-Zobel BL, Selvaraju V, Sauer J, Kautenburger T, Kiefer J, Richter KK, Soom M, Wolf S (2005)
464 Butyrate may enhance toxicological defence in primary, adenoma and tumor human colon cells by
465 favourably modulating expression of glutathione S-transferases genes, an approach in nutrigenomics.
466 *Carcinogenesis* 26:1064-1076
- 467 30. Scharlau D, Borowicki A, Habermann N, Hofmann T, Klenow S, Miene C, Munjal U, Stein K, Gleib M
468 (2009) Mechanisms of primary cancer prevention by butyrate and other products formed during gut
469 flora-mediated fermentation of dietary fibre. *Mutat Res* 682:39-53

- 470 31. Zampa A, Silvi S, Fabiani R, Morozzi G, Orpianesi C, Cresci A (2004) Effects of different digestible
471 carbohydrates on bile acid metabolism and SCFA production by human gut micro-flora grown in an in
472 vitro semi-continuous culture. *Anaerobe* 10:19-26
- 473 32. Ridlon JM, Kang DJ, Hylemon PB (2006) Bile salt biotransformations by human intestinal bacteria. *J*
474 *Lipid Res* 47:241-259
- 475 33. Elhardallou SB (1992) The bile acids binding of the fibre-rich fractions of three starchy legumes. *Plant*
476 *Foods Hum Nutr* 42:207-218
- 477 34. Hofmann T, Weber A, Sauer J, Glei M, Pool-Zobel B (2008) Formation of Tumour Promoting and
478 Tumour Inhibitory Products during Gut Flora Mediated Fermentation of Inulin-Type Fructans and
479 Wheat Bran. accepted in *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*
- 480 35. Bonovas S, Tsantes A, Drosos T, Sitaras NM (2008) Cancer chemoprevention: a summary of the
481 current evidence. *Anticancer Res* 28:1857-1866
- 482 36. Shiraki K, Ito T, Sugimoto K, Fuke H, Inoue T, Miyashita K, Yamanaka T, Suzuki M, Nabeshima K,
483 Nakano T, Takase K (2005) Different effects of bile acids, ursodeoxycholic acid and deoxycholic acid,
484 on cell growth and cell death in human colonic adenocarcinoma cells. *Int J Mol Med* 16:729-733
- 485 37. Mortensen PB, Holtug K, Rasmussen HS (1988) Short-chain fatty acid production from mono- and
486 disaccharides in a fecal incubation system: implications for colonic fermentation of dietary fiber in
487 humans. *J Nutr* 118:321-325
- 488 38. Lebet V, Arrigoni E, Amadò R (1998) Digestion procedure using mammalian enzymes to obtain
489 substrates for in vitro fermentation studies. *Lebensm -Wiss u Technol* 31:509-515
- 490 39. Borowicki A, Stein K, Scharlau D, Glei M (2010) Fermentation supernatants of wheat (*Triticum*
491 *aestivum* L.) aleurone beneficially modulate cancer progression in human colon cells. *J Agric Food*
492 *Chem* 58:2001-2007
493
494

495 **Table 1** Concentration and molar ration of short chain fatty acids (SCFA) as well as pH in fermentation
 496 supernatants (fs) of the fecal control (blank) and wholemeal wheat flour (wwf) after fermentation I (41.6 g/L ox
 497 gall) and II (0.6 g/L ox gall).

	fs	pH	SCFA [mM]			ratio of
			acetate	propionate	butyrate	SCFA [%]
fermentation I	blank	6.61	23.49	17.61	5.62	50:38:12
	wwf	5.19	60.68	53.38	17.85	46:40:14
fermentation II	blank	6.54	24.00	12.00	9.00	53:27:20
	wwf	5.09	74.00	24.00	30.00	58:19:23

498

499 **Table 2** EC₅₀ (inhibitory concentrations leading to 50 % reduction of cell number) after incubation of HT29 cells
 500 with fermentation supernatants (fs) I and II of blank (faeces control) and wholemeal wheat flour (wwf)^s.

fs		EC ₅₀ [%]		
		24 h	48 h	72 h
fermentation I	blank	14.1 ± 1.2	6.3 ± 1.1	3.9 ± 0.5
	wwf	×	8.6 ± 0.8 ^b	6.5 ± 0.5 ^b
fermentation II	blank	×	13.4 ± 1.1 ^c	9.8 ± 0.8 ^c
	wwf	×	7.7 ± 1.7 ^b	4.6 ± 0.4 ^b

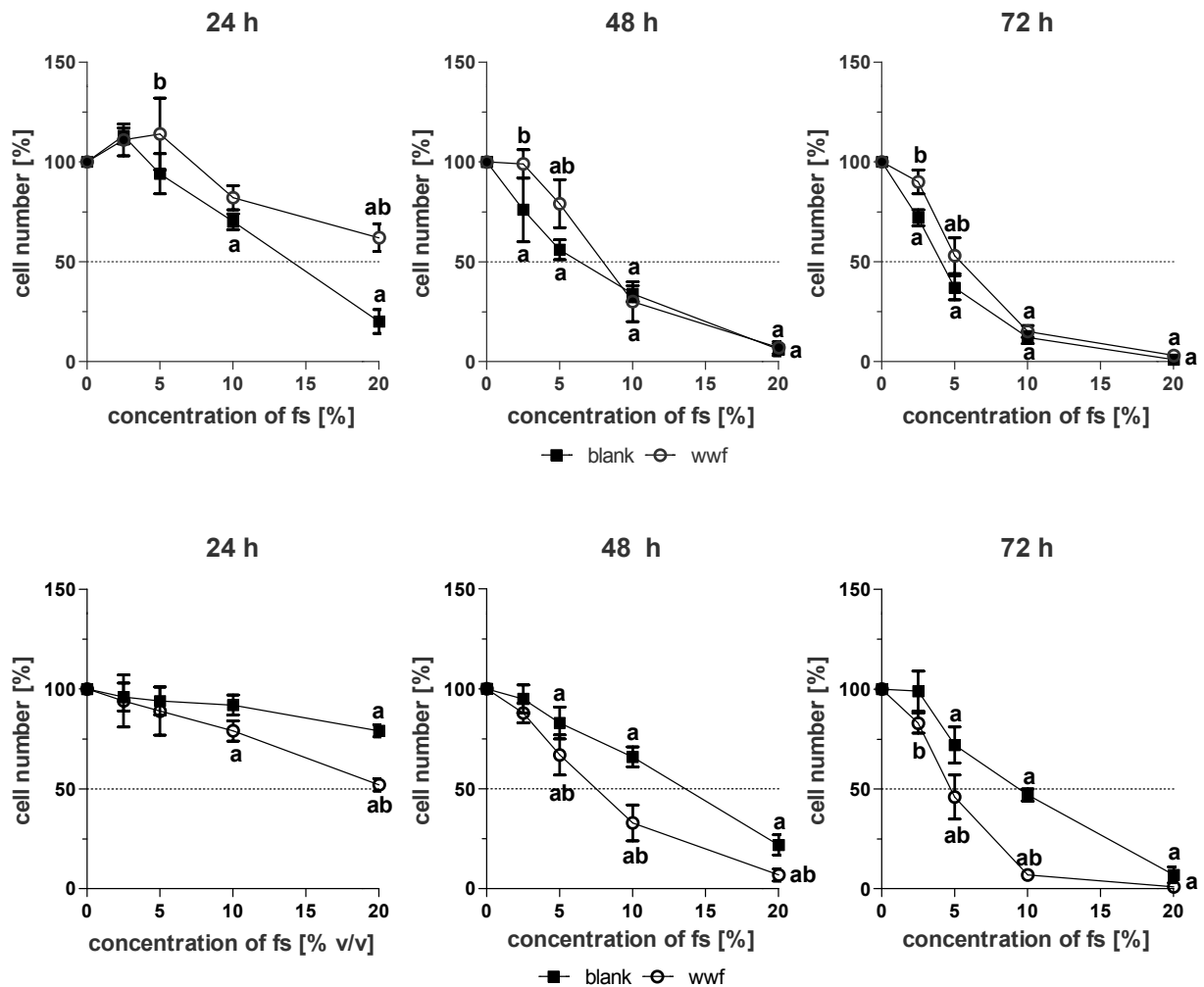
501 ^sValues are means with their standard deviations (n=3). The Students *t*-test was used to calculate the differences
 502 to the respective fs blank (b: p<0.05) and between the respective sample of the fermentation I and II (c: p<0.05).
 503 × indicates that EC₅₀ was not achieved.

504

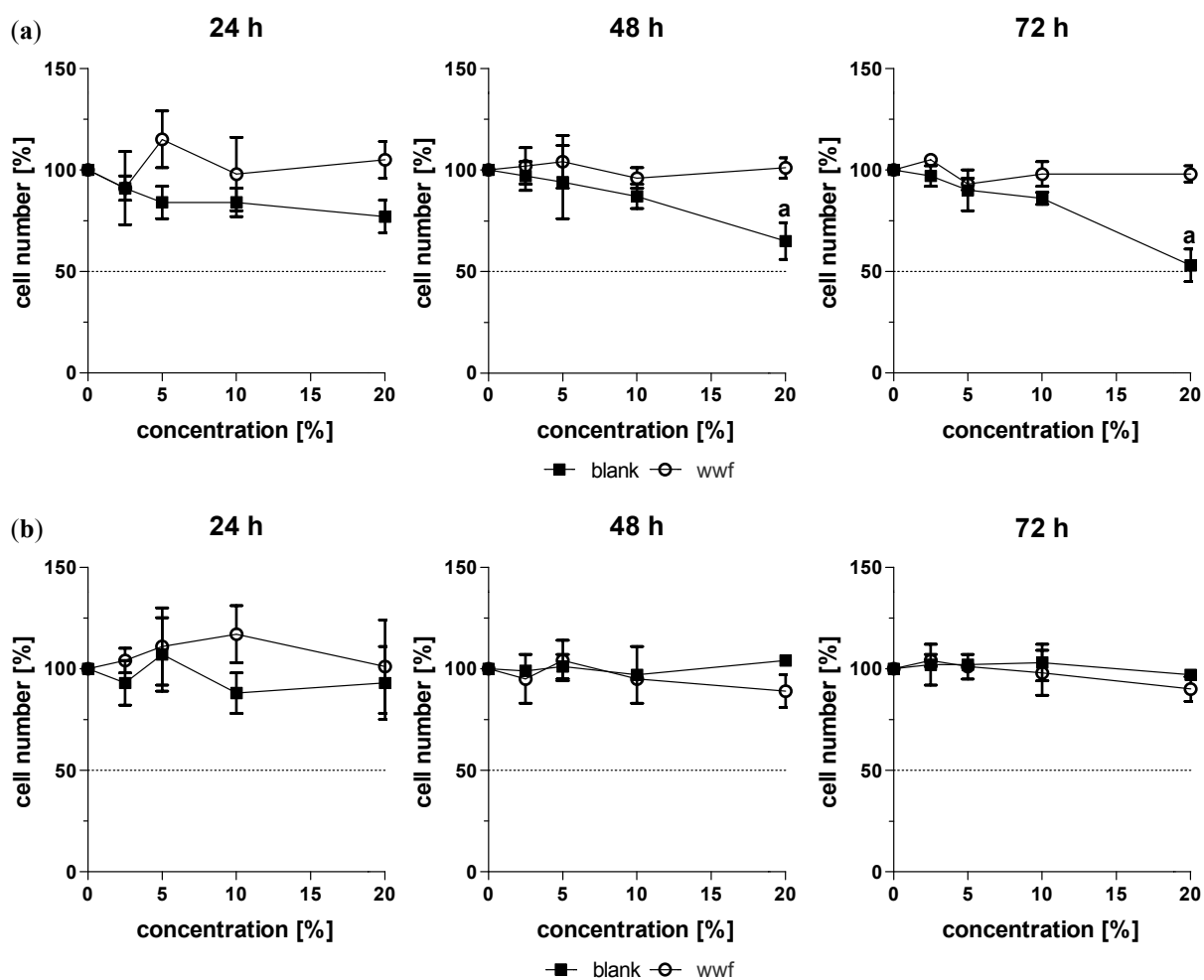
505 **Table 3** Concentrations and molar ratios of short chain fatty acids (SCFA) as well as concentrations of bile acids
 506 (cholic- (CA) and deoxycholic acid (DCA)) in fermentation supernatants (fs) of the faecal control (blank) and
 507 Synergy1 after fermentation II using 0.6 g/L ox gall (n=3)[§].

fs	SCFA [mM]			total SCFA [mM]	bile acids [μ M]	
	acetate	propionate	butyrate		CA	DCA
blank	16.71 \pm 4.39	7.08 \pm 4.39	6.65 \pm 2.52	30.44 \pm 13.57	0.36 \pm 0.12	36.06 \pm 10.27
Synergy1	43.23 \pm 18.52 ^(b)	12.50 \pm 9.23	27.28 \pm 2.64 ^b	83.01 \pm 30.35 ^(b)	0.27 \pm 0.19	2.23 \pm 2.07 ^b

508 [§]Values are means with their standard deviations (n=3). Students *t*-test was used to calculate the differences to
 509 the fs blank (b: p<0.05). Parentheses denote the effect vary by trend (p<0.10).



510 **Fig. 1** Effects of fermentation supernatants (fs) I (upper graphs) and II (lower graphs) of faeces control (blank)
 511 and wholemeal wheat flour (wwf) using 41.6 g/L or 0.06 g/L of ox gall in the intestinal extract on HT29 cell
 512 number after 24-72 h incubation. The signal of the medium control was set to equal 100 %. Values are means
 513 with their standard deviations depicted by vertical bars (n=3). One-way ANOVA with Bonferroni post test with
 514 selected pairs was used to calculate the differences to the medium control (a: $p < 0.05$). Two-way ANOVA with
 515 Bonferroni post test was used to calculate the differences between blank and ww (b: $p < 0.05$).



516 **Fig. 2** Effects of corresponding synthetic mixtures of CA and DCA of the complex fermentation supernatants
 517 (fs) I (upper graphs) and II (lower graphs) of faeces control (blank) and wholemeal wheat flour (wwf) using
 518 41.6 g/L or 0.06 g/L of ox gall in the intestinal extract on HT29 cell number after 24-72 h incubation. The signal
 519 of the medium control was set to equal 100 %. Values are means with their standard deviations depicted by
 520 vertical bars (n=3). One-way ANOVA with Bonferroni post test with selected pairs was used to calculate the
 521 differences to the medium control (a: p<0.05).

522

523 Figures were created using the GraphPad Prism Version 5.02 for Windows (GraphPad Software, Inc., San
 524 Diego, CA, USA)

2.2. Publikation II: FERMENTED WHEAT ALEURONE INHIBITS GROWTH AND INDUCES APOPTOSIS IN HUMAN HT29 COLON ADENOCARCINOMA CELLS. Anke Borowicki, Katrin Stein, Daniel Scharlau, Kerstin Scheu, Gerald Brenner-Weiss, Ursula Obst, Jürgen Hollmann, Meinolf Lindhauer, Norbert Wachter, Michael Glei. *British Journal of Nutrition*. Februar 2010, 103(3):360-369, Epub 07.09.2009.

Bei der Fermentation durch die Mikroflora erhöhen sich im Darm die Konzentrationen an kurzkettigen Fettsäuren, denen chemopräventive Eigenschaften zugeschrieben werden. Funktionelle Lebensmittel mit einem hohen Aleuronanteil könnten das Risiko einer Krebsentstehung senken, indem einer Störung des Gleichgewichts zwischen Zellzyklus und Zelltod entgegen gewirkt wird. Ziel dieser Studie war es zu klären, ob fermentiertes Weizenaleuron in humanen Adenokarzinomzellen den programmierten Zelltod (Apoptose) induzieren kann und in der Lage ist, proliferationshemmend zu wirken.

Eine Fermentation von Weizenaleuron durch die Darmflora führte zu erhöhten Gehalten an kurzkettigen Fettsäuren, vor allem Butyrat, und deutlich gesenkten Konzentrationen an tumorpromovierenden Gallensäuren. Dabei war fermentiertes Weizenaleuron in der Lage, Apoptose zu induzieren und einen Wachstumsarrest einzuleiten – zwei wesentliche Marker der Sekundärprävention.

Eigenanteil:

- Anteilige Durchführung der *in vitro* Fermentation und der Wachstumsuntersuchungen
- Durchführung des Comet Assays und der Apoptose- sowie Zellzyklusuntersuchungen
- Auswertung, Interpretation und Darstellung aller Ergebnisse
- Verfassung des Manuskriptes

Fermented wheat aleurone inhibits growth and induces apoptosis in human HT29 colon adenocarcinoma cells

Anke Borowicki^{1*}, Katrin Stein¹, Daniel Scharlau¹, Kerstin Scheu², Gerald Brenner-Weiss², Ursula Obst², Jürgen Hollmann³, Meinolf Lindhauer³, Norbert Wachter⁴ and Michael Glei¹

¹Department of Nutritional Toxicology, Friedrich-Schiller-University Jena, Institute for Nutrition, Dornburger Strasse 24, 07743 Jena, Germany

²Department of Microbiology of Natural and Technical Interfaces, Research Centre Karlsruhe, Institute of Functional Interfaces (IFG), Hermann-von-Helmholtz-Platz 1, 76344 Eggenstein-Leopoldshafen, Germany

³Max Rubner-Institute, Federal Research Institute of Nutrition and Food, Schützenberg 12, 32756 Detmold, Germany

⁴Kampffmeyer Food Innovation GmbH, Trettaustr. 32-34, 21107 Hamburg, Germany

(Received 27 March 2009 – Revised 14 July 2009 – Accepted 3 August 2009 – First published online 7 September 2009)

Fermentation of dietary fibre by the gut microflora may enhance levels of SCFA, which are potentially chemoprotective against colon cancer. Functional food containing wheat aleurone may prevent cancer by influencing cell cycle and cell death. We investigated effects of fermented wheat aleurone on growth and apoptosis of HT29 cells. Wheat aleurone, flour and bran were digested and fermented *in vitro*. The resulting fermentation supernatants (fs) were analysed for their major metabolites (SCFA, bile acids and ammonia). HT29 cells were treated for 24–72 h with the fs or synthetic mixtures mimicking the fs in SCFA, butyrate or deoxycholic acid (DCA) contents, and the influence on cell growth was determined. Fs aleurone was used to investigate the modulation of apoptosis and cell cycle. The fermented wheat samples contained two- to threefold higher amounts of SCFA than the faeces control (blank), but reduced levels of bile acids and increased concentrations of ammonia. Fs aleurone and flour equally reduced cell growth of HT29 more effectively than the corresponding blank and the SCFA mixtures. The EC₅₀ (48 h) ranged from 10 % (flour) to 19 % (blank). Markedly after 48 h, fs aleurone (10 %) significantly induced apoptosis and inhibited cell proliferation by arresting the cell cycle in the G0/G1 phase. In conclusion, fermentation of wheat aleurone results in a reduced level of tumour-promoting DCA, but higher levels of potentially chemopreventive SCFA. Fermented wheat aleurone is able to induce apoptosis and to block cell cycle – two essential markers of secondary chemoprevention.

Aleurone: Apoptosis: Cell cycle: Colon cancer: Fermentation

Colorectal cancer (CRC) is the second most common type of cancer worldwide in both men and women and accounts yearly for 9 % of all new cases of cancer⁽¹⁾. Most CRC are sporadic, with dietary factors being among the most important risk factors. Latest epidemiological and preclinical studies revealed that an increased intake of dietary fibre can influence normal human gut function as well as intestinal flora and may modulate colon cancer risk⁽²⁾. Dietary fibre exerts several effects in the gastrointestinal tract, but the precise mechanisms for this protective role are not clearly understood. The mechanisms by which dietary fibre may reduce the risk of CRC include stool bulking (diluting faecal content and shortening transit time), binding luminal potential carcinogens like secondary bile acids and lowering faecal pH⁽³⁾. A further mechanism by which dietary fibre could improve colonic health is by acting as a substrate for luminal health-promoting bacteria species to increase fermentation products mainly SCFA, particularly acetate, propionate and butyrate. Butyrate is considered as the major energy source

for normal, non-transformed colonocytes and has received much attention as a potential chemopreventive agent by inhibiting promotion and progression or by removing degraded cells from the tissue⁽⁴⁾.

Butyrate inhibited histone deacetylases resulting in histone hyperacetylation, which can lead to transcriptional modulation and silencing of genes that are involved in control of cell cycle progression, differentiation, apoptosis and cancer development^(3,5).

Under physiological conditions, butyrate affects human colon cells not separately but rather in conjunction with other fermentation products, which are formed simultaneously by microbial degradation of dietary fibre. Detailed evidence is limited on how fermentation products from dietary fibre sources such as grains interact with human intestinal cells and how these fermentation supernatants (fs) affect cells in comparison to analogous SCFA concentrations or butyrate alone^(6,7). Fermentation products can be generated *in vitro* using batch models that simulate the physiological conditions

Abbreviations: CRC, colorectal cancer; DCA, deoxycholic acid; EU, European; fs, fermentation supernatant; US, American.

* **Corresponding author:** Anke Borowicki, fax +49 36 41 94 96 72, email anke.borowicki@uni-jena.de

of the human gastrointestinal tract. This provides an experimental approach to compare the biological activities of foodstuffs rich in dietary carbohydrates in terms of their fermentation products and interactions of these products^(8,9). Wheat grain contains high amounts of dietary fibre and other physiologically beneficial substances. In wheat grains, aleurone is a unicellular layer that forms the outer part of the endosperm. The aleurone layer makes up 7–9% of the kernel and 45–50% of the bran fraction and contains the major portion of the physiologically relevant substances found in the whole grains in a concentrated form, namely dietary fibre, minerals, B-vitamins, proteins and secondary plant compounds^(10,11). Several epidemiological and experimental studies indicated that wheat bran as a source of dietary fibre is one of the most effective parts of the whole grain in protecting against CRC^(12,13). The main components of the dietary fibre fraction are predominantly arabinoxylans, followed by cellulose, β -glucans and starch, whereas the ratio of insoluble to soluble fibre is in the order of 9:1⁽¹¹⁾. Reddy *et al.*⁽¹⁴⁾ showed that wheat bran, but not oat or maize bran, significantly decreased the levels of several tumour promoters in the colon. It was assumed that this protective mechanism is most likely multifactorial, because differences could be caused by the slower degradation of wheat bran by colonic microflora or additional effects of phytoprotectants, although there is only few data to support this⁽¹³⁾. In the aleurone layer, ferulic acid is the major phenolic compound largely ester linked to arabinoxylans^(11,12). The protective potential of this natural antioxidant depends on the fermentability, because digestive processes increase the antioxidative activity of wheat and wheat-based products⁽¹⁵⁾. In human subjects, more than 95% of the enzymatic release of ferulic acid occurs in the colon⁽¹⁵⁾. Thus, antioxidative compounds may enhance chemopreventive effects of fermentation products of dietary fibre.

The first goal of the present work was to use a modified 'batch' model simulating the whole digestive tract to characterise and compare fermentation products of three wheat sources, namely aleurone, bran and flour, on parameters of chemoprevention, more precisely enhancement of health-promoting metabolites and reduction in tumour-promoting faecal products. Secondly, the effect of fs and relevant concentrations of SCFA (acetate, propionate and butyrate) as well as deoxycholic acid (DCA) on cell growth of HT29 colon tumour cells was studied. Beyond this, fermented European (EU) and American (US) aleurone were used to determine modulation of cell cycle and apoptosis, because dysfunction of the balance between cell growth and death in colonic epithelium is associated with cancer promotion. Understanding how this balance is influenced by interaction of specific dietary components, especially fermentation products, could lead to improved treatment and prevention strategies for cancer since there is considerable evidence from animal experiments that prebiotics are chemoprotective in the later phases of carcinogenesis⁽¹⁴⁾.

Materials and methods

Dietary fibre sources

Three different wheat fractions (aleurone, bran and flour) of two varieties (EU and US) were used as dietary fibre sources. All were from Kampffmeyer Food Innovation GmbH

(Hamburg, Germany). To guarantee the stability of the wheat samples, aliquots were prepared and stored in air- and light-proof flasks at 4°C.

Analysis of dietary fibre sources

Analysis of dietary fibre was performed according to standard method AOAC Official Methods of Analysis no. 985.29 and no. 991.43, respectively. Arabinoxylans were analysed according to Hollmann *et al.*⁽¹⁶⁾. Analysis of crude ash, β -glucans and protein was performed according to standard method ICC no. 104/1, no. 166 and no. 167, respectively. Concentration of starch was determined according to standard method EWG, VO 228/67. D-glucose was analysed by high-performance anion-exchange chromatography on a DIONEX BioLC system (DIONEX Corporation, Sunnyvale, CA, USA) according to Hollmann *et al.*⁽¹⁶⁾. Analysis of crude fat was performed by Soxhlet extraction of lipids with petroleum ether (flash point 40–60°C) for 4 h and gravimetric determination of the dried residue.

Digestion and fermentation of wheat components

Aleurone (EU and US), flour (EU) and bran (EU) were digested and fermented *in vitro* according to the described procedures of Aura *et al.*⁽⁹⁾ and Glei *et al.*⁽¹⁷⁾ with some modifications. Two fermentation series (each *n* 6) were used to study the effects of fermented wheat components. In fermentation I, EU aleurone, EU flour and EU bran were digested and fermented *in vitro*, whereas in fermentation II, EU aleurone and US aleurone were used.

Briefly, for simulation of the whole digestive tract, samples were weighed (0.5 g fermentable sample), mixed thoroughly with 10 ml PBS (0.1 M, pH 7.0), and 0.85% (w/v) saline solution (6.25 ml) was added to the samples. A sample without wheat was used (blank – faeces control) as a control. All incubation steps were performed at 37°C in a shaking water-bath under the same conditions. Salivary α -amylase (Sigma A-0521) diluted to 1000 U/ml with 20 mM sodium phosphate buffer was added (17.36 U/sample), and the samples were incubated for 5 min. HCl solution (150 mM, 2.8125 ml) was added to lower pH to 2.0. Pepsin (Sigma P-7012, 1.11 mg) dissolved in 0.9375 ml of 20 mM HCl per sample or blank was added and incubated for 2 h. Intestinal extract was produced by dissolving 3 mg ox gall (Fluka-Sigma 70 168) and 2.6 mg pancreatin (Sigma P-1750) in 5 ml sodium bicarbonate buffer (11 mM, pH 6.5). Intestinal extract was added to each sample or blank, the pH was adjusted to 6.5 using NaOH solution (10 M) and the suspension (25 ml) was filled into a dialysis tube (Roth, 4596.1, molecular weight cut-off 1000 Da). The tubes were placed into glass bottles filled with 2 litre dialysis buffer (13.61 g potassium phosphate and 1.88 g sodium bicarbonate dissolved in distilled water, pH 6.5) and incubated for 6 h at 37°C under semi-anaerobic conditions. Semi-anaerobic conditions in the glass bottles were achieved by removing a part of the air with an injected cannula (0.5 bar for 1 min). Subsequently, the bottles were filled with a fermentation gas mixture (86% N₂, 10% CO₂ and 4% H₂) via the cannula (0.8 bar for 1 min). After 15 min (seven cycles repeated), the cannulae were removed. At the end of the incubation, the suspension was transferred from

the dialysis tube into a 500 ml glass bottle and the pH was measured for each sample. The *in vitro* fermentation was performed as described by Gleib *et al.*⁽¹⁷⁾ with slight modifications. All fermentations were conducted under anaerobic conditions at 37°C for 24 h. The fermentation process was stopped by placing the suspensions on ice and the pH was measured. Each sample was transferred to 50 ml tubes and centrifuged (4200 g, 4°C) for 30 min. The supernatants were transferred into new 50 ml tubes and centrifuged again (4200 g, 4°C) for 15 min and stored at -80°C. The fs were pooled after finishing one fermentation series to minimise effects of individual nutrition. Before sterilisation of the fs, the samples were thawed quickly, aliquoted in 2 ml tubes and centrifuged (16 000 g, 4°C). Afterwards, the fs were sterilised by filtration (pore size, 0.22 µm) to get final fs for use in the cell culture experiments.

Determination of pH and analysis of fermentation products

The pH was determined with a pH meter Hydrus 300 (Fisherbrand, Schwerte, Germany).

SCFA concentrations were determined by GC combined with MS (GC-MS) as described by Wang *et al.*⁽¹⁸⁾ with some modifications. In short, SCFA were extracted from diluted fs (1:50 in fermentation buffer) via liquid-liquid with tert-butyl methyl diethyl ether using 2-ethyl butyric acid as the internal standard. About 1 ml of the combined organic phase was derivatised with 20 µl trimethylsulfonium hydroxide solution (Sigma 92 723) in methanol (10 % v/v) for 20 min at room temperature. GC-MS was performed with a Star 3400cx and Saturn 2000 (Varian, Palo Alto, CA, USA). About 2 µl aliquots of the derivatised samples were injected onto a Stabilwax-DA column (Restek, Bellefonte, PA, USA, 30 m × 0.25 mm internal diameter × 0.25 µm) using helium gas as carrier. The chromatographic conditions were as follows: 60°C held for 2 min, +10°C/min until 150°C held for 1 min and +50°C/min until 240°C held for 10 min. For the detection of the SCFA, the mass spectrometer was used in full scan mode.

Bile acids were determined similar to the procedure of Burkard *et al.*⁽¹⁹⁾. Briefly, after dilution of the fs (1:10 in fermentation buffer), solid phase extraction was carried out using 101 sorbent cartridges (Separtis, Grenzach-Wyhlen, Germany) and cholic acid-d₄ as an internal standard. The eluted bile acids were separated on an RP-C8 column (100 × 4 mm, 5 µm, MZ-Analysentechnik, Mainz, Germany), using 10 mM ammonium acetate buffer (pH 5) containing 0.012 % formic acid (eluent A) and acetonitrile (eluent B) as a mobile phase at a flow rate of 0.5 ml/min. The eluents were linearly changed from 70 % A and 30 % B to 30 % A and 70 % B within 38 min, held for 10 min and finally adjusted to the original ratio of 70 % A and 30 % B for 15 min for equilibration. The detection of bile acids was performed with a tandem mass spectrometer API 4000™ (Applied Biosystems/MDS SCIEX, Toronto, Ont., Canada), equipped with an ESI ionisation source operating in the negative mode at -4.5 kV at 450°C. Bile acids were quantified by external calibration in the MRM mode using the Analyst 1.4 (Applied Biosystems/MDS SCIEX).

The ammonia concentration of the resulting fs was determined colorimetrically by the Berthelot reaction, in which ammonia is converted into a blue-coloured indophenol

ion⁽²⁰⁾. For this, the fs were diluted 1:1000 in aqua bidest, and 2 ml solution 1 (0.1 g/l phenol and 0.5 mg/l sodium nitroprusside dissolved in aqua bidest) and 2 ml solution 2 (0.05 g/l NaOH and 4 mg/l sodium hypochlorite dissolved in aqua bidest) were added. Subsequently, samples were incubated for 10 min at 60°C and thereafter cooled down to room temperature. The samples (200 µl/cavity) were transferred into ninety-six-well plates, and the extinction at 630 nm was measured in triplicates (GENios, Tecan Germany GmbH, Crailsheim, Germany).

Preparation of synthetic mixtures and of aqueous extracts of wheat fractions

Sodium butyrate and sodium acetate were obtained from Merck-Schuchardt (Hohenbrunn, Germany) whereas sodium propionate and DCA were from Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Germany). All chemicals were of the highest commercially available grade of purity. SCFA and DCA were weighed and dissolved in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Gibco BRL, Eggenstein, Germany), supplemented with 10 % fetal calf serum to obtain corresponding mixtures containing identical concentrations and ratios of SCFA and DCA as the particular fs. Mixtures or individual substances were used for cell culture incubation experiments.

Aleurone, flour and bran of both varieties (EU and US) were weighed and mixed thoroughly for 30 s with supplemented DMEM (100 g/l) according to Gleib *et al.*⁽²¹⁾.

Cell culture

The human colon adenocarcinoma cell line HT29 (American Type Culture Collection (ATCC) no. HTB-38) was used for all cell culture experiments⁽²²⁾ (passages 12-47). In regular intervals, a mycoplasma test (MycAlert™ Detection Kit) was performed and contamination with mycoplasma was excluded.

Determination of cell growth

HT29 cells were incubated with fs 24 h after seeding in ninety-six-well plates. Concentrations between 2.5 and 20 % of fs and corresponding concentrations of synthetic mixtures as well as individual substances were tested. After 24, 48 or 72 h of incubation, the amount of DNA, which is related to the number of cells, was quantified as described previously⁽¹⁷⁾. The results were calculated on the basis of the medium control that was set to equal 100 %. In comparison to the fs, the aqueous extracts of unfermented wheat samples (0.05-40 g/l) were analysed for their influence on cell number. The effective mean doses (EC₅₀) of fs and aqueous extracts that inhibited growth by 50 % were determined and expressed as percentage (%) and gram/litre (g/l), respectively.

Determination of genotoxicity

To determine the genotoxic potential of the fs, 1 × 10⁶ cells were seeded in six-well plates 24 h before the experiment. The cells were incubated with different concentrations (5 and 10 %) of fs aleurone or fs blank for 1 h (short term) or 24 h (long term). Subsequently, the cells were trypsinised and dissolved in PBS. Hydrogen peroxide (150 µM; 5 min at 4°C)

was used as positive control. Viabilities and cell numbers were determined with a CASY-cell counter (CASY[®]-TT, Innovatis AG, Reutlingen, Germany), and 0.4×10^6 cells were mixed with 0.7% low-melting agarose (Biozym, 850.110) dissolved in PBS and distributed onto microscopical slides followed by application of another layer of low-melting agarose. The further steps were carried out as described elsewhere^(17,21).

Cell cycle analysis

For analysis of cell cycle parameters, the cells were seeded in six-well plates (1.5×10^6 cells/well) and grown for 24 h before exposition to fs (5 and 10%) or corresponding synthetic SCFA mixtures (10%) and butyrate (10%) for 24 or 48 h. Subsequently, the cells were trypsinised and dissolved in PBS. Viabilities and cell numbers were determined with a CASY-cell counter and 2×10^6 cells were stained with nuclear isolation medium-4,6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (NIM-DAPI) (0.6% Nonidet P40 and 10 µg/ml DAPI dissolved in PBS). After incubation for 10 min, intercalated DAPI was quantified by flow cytometry, whereas counted cells were allocated to specified phases of cell cycle using cytometry analysis software (Cell Lab Quanta[™] SC-MPL 1.0, Beckman Coulter, Krefeld, Germany).

Detection of apoptosis

Cells were seeded in six-well plates (1.5×10^6 cells/well) and grown for 1 d before exposition to fs (10%) or corresponding concentrations of synthetic SCFA mixtures and butyrate for 24 and 48 h. Subsequently, the cells were trypsinised and dissolved in PBS. Viabilities and cell numbers were determined with a CASY-cell counter, and 1×10^6 cells were stained with annexin V-FITC as well as 7-amino-actinomycin D in annexin V-binding buffer using the annexin V-FITC/7-amino-actinomycin D kit (Beckman Coulter). After incubation for 15 min, apoptosis was quantified by flow cytometry and counted cells were classified using cytometry analysis software (Cell Lab Quanta[™] SC-MPL 1.0, Beckman Coulter). Enzyme activity of caspase-9, caspase-8 and caspase-3 was determined to obtain more detailed information on the induction of apoptosis. Therefore, cells were treated as described above, and 2.4×10^6 cells were lysed for 20 min at 4°C in a cell lysis buffer (250 mM HEPES, 25 mM 3-[(3-cholamidopropyl)-dimethylamino]-2-hydroxy-1-propanesulfonate (CHAPS), 25 mM *threo*-1,4-dimercapto-2,3-butanediol (DTT), 1 µg/ml leupeptin, 1 µg/ml pepstatin A, 100 µg/ml pefabloc SC, 1 mM phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF) and 1 mM sodium orthovanadate). After centrifugation at 16 000 g for 15 min at 4°C, half of each lysate was incubated with 50 nM caspase inhibitors (caspase-3: Ac-DEVD-CHO; caspase-9: Ac-LEHD-CHO; caspase-8: Ac-IETD-CHO, Axxora GmbH, Lörrach Germany) for 10 min, followed by incubation with 25 µM caspase substrate (caspase-3: Ac-DEVD-AMC; caspase-9: Ac-LEHD-AMC; caspase-8: Ac-IETD-AMC, Axxora GmbH) for 2 h at 37°C for all cell lysates. Modulation of caspase activity was detected by fluorimetric analysis with Ex/Em 380/465 nm (SpectraFluor Plus, Tecan Germany GmbH, Crailsheim, Germany). For interpretation of all results, fold changes were calculated on the basis of the medium control that was set to 1.0.

Statistical evaluation

Means and standard deviations were calculated from at least three independent experiments. Differences were calculated by one- or two-way ANOVA, including Bonferroni post test with selected pairs, using GraphPad Prism Version 4 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). The one-way ANOVA was done to define differences within one group if more than two concentrations were used. The two-way ANOVA was used to define differences between two groups if more than two concentrations were used. Otherwise comparisons of two groups were done with Student's *t* test. The statistical analyses used depended on the respective experimental design and are specified in the legends to the figures and tables.

Results

Composition of dietary fibre sources

Generally, no large differences were seen in the composition of both wheat varieties (EU and US). In flour, starch was the major component (66%), followed by protein (16%), dietary fibre (15%), crude fat (3%) and crude ash (<2%). Starch is the primary compound of the endosperm, which is the main part of the whole grain. Isolation of bran from whole grains resulted in increased amounts of all components except from starch (14%). The bran fraction and the concentrated aleurone fraction primarily contained dietary fibre (56 and 47%). Additionally, substantial amounts of protein (17 and 21%), fat (5 and 6%) and ash (6 and 10%) were present. Therefore, isolation of aleurone from bran resulted in an accumulation of protein, fat and ash. Furthermore, while levels of total dietary fibre were slightly reduced, water-soluble fibres were enriched in the aleurone fraction (3% in bran and 5% in aleurone). Arabinoxylans were the predominant fibres in the aleurone fraction with a quantity of nearly 55% of total dietary fibres, whereas less amounts of β-glucans were present (9%).

Fermentation products in fermentation supernatants of different wheat samples

Table 1 compares the concentrations of various fermentation products and the measured pH in the fs of both fermentation series (I and II). Fermentation of the wheat samples resulted in significantly decreased pH (5.15–5.80) compared with fs blank (6.41–6.45). Lowered pH reflects the increased total concentration of the three SCFA acetate, propionate and butyrate. The fermented wheat samples contained two- to threefold higher amounts of SCFA than the fs blank. In particular, butyrate was increased three- to fivefold during fermentation, whereas the ratio of SCFA shifted from acetate to butyrate compared with fs blank. The analytical measurements of bile acids revealed low concentrations, and only CA and DCA were detectable. Both levels of the primary bile acid, CA, and particularly the secondary bile acid, DCA, were reduced compared to fs blank (1.3–2.2-fold and 3.5–13.8-fold lower concentrations, respectively). By fermentation of the wheat samples, more ammonia was produced in correlation to contained protein amounts of the raw material.

Table 1. Comparison of pH, SCFA concentrations, ratio of SCFA as well as concentrations of bile acids and ammonia in fermentation supernatants (fs) after *in vitro* fermentation of different wheat fractions (Mean values and standard deviations)

	pH		SCFA (mm)†			Ratio of SCFA (%)	Bile acids (µM)†		Ammonia (mm)†
	Mean	SD	Acetate	Propionate	Butyrate		CA	DCA	
Fermentation I									
Blank	6.41 ^a	0.13	15.24	4.54	5.82	59:18:23	0.24	35.41	10.87
EU aleurone	5.67 ^b	0.12	27.56	12.20	24.41	43:19:38	0.18	10.26	18.53
EU flour	5.15 ^b	0.06	43.77	9.68	29.72	53:11:36	0.11	2.57	11.64
EU bran	5.80 ^b	0.15	22.90	8.47	18.42	43:19:38	0.18	9.10	14.56
Fermentation II									
Blank	6.45 ^a	0.11	10.75	4.56	4.56	54:23:23	0.35	46.65	11.92
EU aleurone	5.76 ^b	0.07	21.01	7.12	20.32	43:15:42	0.20	5.04	16.63
US aleurone	5.78 ^b	0.06	25.41	9.06	24.23	43:16:41	0.23	5.93	21.28

CA, cholic acid; DCA, deoxycholic acid; EU, European; US, American.

^{a,b} Mean values within a column with unlike superscript letters were significantly different ($P < 0.001$; unpaired *t* test).

† Because fs from six fermentations were pooled, only one determination in triplicate could be conducted. A statistical analysis was therefore not possible.

Modulation of cell growth by fermentation supernatants (series I) and corresponding SCFA

The fermentation series I was used to analyse the effect of different wheat fractions on cell growth. Treatment of HT29 cells with the fs of different wheat samples (aleurone, flour and bran) reduced the cell number in a time- and dose-dependent manner. After 24 h, the calculated EC₅₀ (effective concentrations leading to a reduction of 50% in cell number) was not detectable for any fs, whereas after 48 h, EC₅₀ ranged from 10.2 to 19.0% (Table 2). After 48 and 72 h of treatment, fermented wheat samples reduced cell growth more effectively than fs blank. Significant differences between wheat fractions were seen for aleurone or flour and bran ($P < 0.05$) in lower concentrations (5 and 10%). To evaluate which compounds are responsible for the cytotoxic effects of fs, synthetic mixtures of SCFA (acetate, propionate and butyrate), butyrate and propionate as well as butyrate alone mimicking the concentration in the fs were analysed for growth-inhibitory activities (Table 2). The growth of cells was efficiently retarded in HT29 cells by the SCFA mixtures, as well as mixtures of butyrate and propionate or butyrate as single substance of fermented wheat samples. Nevertheless, all synthetic mixtures were less effective than the fs, but the general profile of response was similar. No differences were seen between synthetic mixtures of fermented aleurone or flour. Higher concentrations of butyrate in fs flour (30 mM) compared with fs aleurone (24 mM) did not result in an additional influence on cell growth. However, butyrate was still primarily responsible for the cytotoxic effect of fs. Acetate and propionate only slightly affected cell growth. Opposed to this, the inhibitory effect of fs blank was not only caused by the contained SCFA (Table 2). Fs blank significantly affected cell growth more than the synthetic mixtures.

Furthermore, the effects of DCA, a potential tumour-promoting fermentation metabolite, alone or in combination with SCFA, on cell growth of HT29 cells were analysed. Treatment with DCA ($< 7 \mu\text{M}$) alone did not modulate cell growth. Additionally, cytotoxic effects of SCFA were not enforced by the addition of the secondary bile acid DCA (data not shown). In general, the pH of the cell culture medium was not affected by the highest concentration of the fs used (20%).

Modulation of cell growth by fermentation supernatants (series II) and corresponding SCFA

The fermentation series II was used to analyse the effect of different varieties of aleurone (EU and US) on cell growth. After treatment with the fs aleurone (EU and US), the number of HT29 cells was efficiently reduced in a time- and dose-dependent manner. The calculated EC₅₀ ranged from 11.7 to 19.1% after 48 h (Table 3). No EC₅₀ was, however,

Table 2. EC₅₀ (%)* of fermentation supernatants (fs; series I) and corresponding synthetic mixtures SCFA (acetate, propionate and butyrate), propionate + butyrate and butyrate alone in HT29 cells (Mean values and standard deviations)

	EC ₅₀ (%)			
	48 h		72 h	
	Mean	SD	Mean	SD
fs				
Blank	19.0	†	13.4	2.7
EU aleurone	12.0	2.2	9.4	1.2
EU flour	10.2	0.7	6.1	1.0
EU bran	14.5	1.4	10.9	0.9
SCFA				
Blank	×	×	×	×
EU aleurone	13.5	3.6	7.2	3.1
EU flour	13.4	4.2	8.5	2.1
EU bran	ND	ND	ND	ND
Propionate + butyrate				
Blank	×	×	×	×
EU aleurone	15.6	3.8	8.8	3.1
EU flour	14.6	3.0	8.6	2.8
EU bran	ND	ND	ND	ND
Butyrate				
Blank	×	×	×	×
EU aleurone	15.4	5.6	9.6	1.9
EU flour	20.0	†	9.4	1.7
EU bran	ND	ND	ND	ND

EU, European.

× Indicates that EC₅₀ was not achieved.

* EC₅₀ is defined as effective concentration at which cell number decreased to 50% of viable cells.

† Standard deviation was not determinable because EC₅₀ was not achieved in all three experiments.

Table 3. EC₅₀ (%)^{*} of fermentation supernatants (fs; series II) and corresponding synthetic mixtures SCFA (acetate, propionate and butyrate), propionate + butyrate and butyrate alone in HT29 cells (Mean values and standard deviations)

	EC ₅₀ (%)			
	48 h		72 h	
	Mean	SD	Mean	SD
fs				
Blank	19.1	†	14.1	0.9
EU aleurone	13.6	1.3	8.8	1.6
US aleurone	11.7	1.1	8.2	1.4
SCFA				
Blank	×	×	×	×
EU aleurone	×	×	14.4	4.1
US aleurone	×	×	14.6	3.7
Propionate + butyrate				
Blank	×	×	×	×
EU aleurone	×	×	17.4	1.5
US aleurone	20.0	†	13.8	0.4
Butyrate				
Blank	×	×	×	×
EU aleurone	×	×	17.3	†
US aleurone	×	×	14.8	3.2

EU, European, US, American.

× EC₅₀ was not achieved.

^{*}EC₅₀ is defined as effective concentration at which cell number decreased to 50% of viable cells.

† Standard deviation was not determinable because EC₅₀ was not achieved in all three experiments.

detectable after 24 h. The fermented aleurone affected the cell growth more effectively than fs blank independently of the variety after 48 and 72 h of treatment. Again, the growth of cells was efficiently retarded in HT29 cells by the SCFA mixtures (acetate, propionate and butyrate), as well as mixtures of butyrate and propionate or butyrate alone of both fs aleurone. The synthetic mixtures, however, were found to be slightly less effective than the respective fs in inhibiting growth of the cells. Higher concentrations of butyrate in fs US aleurone (24 mM) compared with fs EU aleurone (20 mM) had no increased influence on cell growth. Up to 65%, butyrate was responsible for the cytotoxic effect of fs. Acetate and propionate had no clear additional effect on cell growth. Opposed to this, the cell-modulating

effect of fs blank could not be explained by the contained SCFA (Table 3). Comparable to fermentation series I, fs blank had a significantly increased inhibitory effect on cell growth than the equivalent synthetic mixtures.

Modulation of cell growth by aqueous extracts of wheat samples

To determine the biological activity of the water-soluble compounds of the wheat samples (aleurone, flour and bran), the aqueous extracts were analysed for their influence on cell growth. Treatment of HT29 cells with the aqueous extracts of the wheat samples inhibited cell growth in a dose-dependent manner. After 24 h, the calculated EC₅₀ was not detectable for any extract, whereas after 48 h, the EC₅₀ was determinable only for EU aleurone (22.7 g/l) and both varieties of bran (EU: 31.2 g/l; US: 39.3 g/l). EU aleurone was most effective compared with other fractions of the same variety or to US aleurone.

Genotoxic potential of fermentation supernatants of different wheat samples

Fs of both fermentation series were used to analyse the genotoxic potential of concentrations that were used in further experiments (5 and 10%). Treatment of HT29 cells with fs of different wheat samples (5 and 10%) for 1 or 24 h did not induce DNA damage as reflected by tail intensities below 5% (DNA in tail: 1 h, 1.92 (SD 0.12)% to 4.16 (SD 2.32)%; 24 h, 1.79 (SD 0.40)% to 3.57 (SD 1.87)%).

Modulation of cell cycle by fermentation supernatants of aleurone and corresponding SCFA mixtures

The fs of different aleurone varieties were used to analyse their antiproliferative effect on HT29 cells, a relevant marker of secondary chemoprevention. In HT29 cells treated with fs aleurone (10%) for 48 h, an increased amount of cells in the G0/G1 phase was observed indicating a cell cycle arrest. This increase was accompanied by a decrease of cells in S and G2/M phases (Fig. 1). In comparison, the fs blank (10%), lower concentrations of the fs aleurone (5%) or a shorter incubation time (24 h) did not influence the cell cycle progression. Mixtures with analogous SCFA

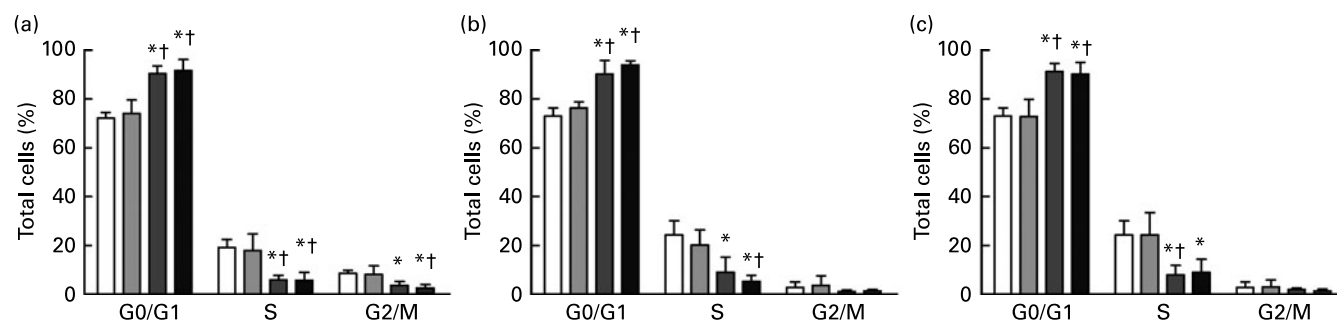


Fig. 1. Effects of medium control (□), blank (■), European aleurone (■) and American aleurone (■) on cell cycle phases (G0/G1; S; G2/M) in HT29 cells after treatment with fermentation supernatants (10%) (a), the corresponding SCFA mixtures (acetate, propionate and butyrate) (b) and butyrate alone (c) for 48 h. Cell cycle was assessed by intercalation of 4,6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI) into DNA and quantification by flow cytometry. Values are means with their standard deviations depicted by vertical bars (*n* 3). Student's *t* test was used to calculate the difference from the respective medium control (^{*}*P* < 0.05) and from blank († *P* < 0.05).

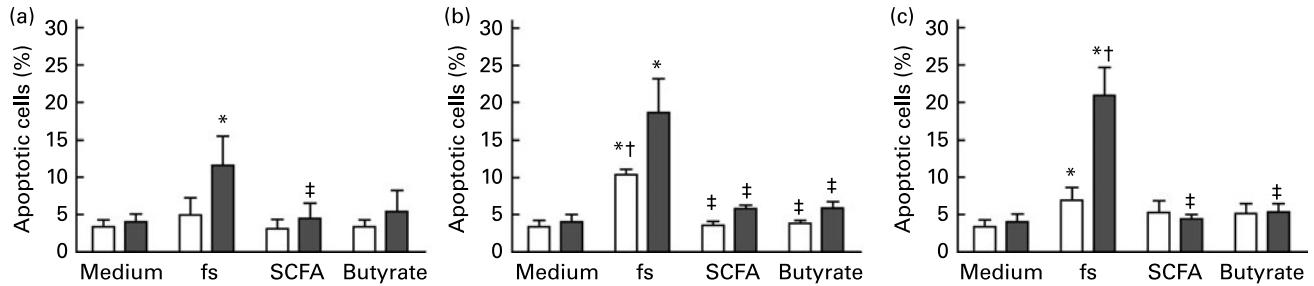


Fig. 2. Effects of fermentation supernatants (fs, 10%), the corresponding SCFA mixtures (acetate, propionate and butyrate) and butyrate alone on early apoptosis in HT29 cells after treatment with blank (a), European aleurone (b) and American aleurone (c) for 24 h (□) and 48 h (■). Apoptosis was assessed by binding of annexin V and exclusion of 7-amino-actinomycin D quantified by flow cytometry. Values are means with their standard deviations depicted by vertical bars (n 3). Student's t test was used to calculate the difference from the respective medium control (* P <0.05), from blank († P <0.05) and from each fs (‡ P <0.05).

and butyrate concentrations caused a cell cycle arrest in G0/G1 phase in a similar manner like fs.

Induction of apoptosis by fermentation supernatants of both aleurone varieties

Fs of both aleurone varieties were used to analyse the effect on apoptosis as another important marker of secondary chemoprevention. The basal levels of early apoptotic cells detected in HT29 cells were 3.36 (SD 0.89)% after 24 h and 4.02 (SD 1.03)% after 48 h, respectively. The fs (10%) of different aleurone varieties (EU and US) induced a significant increase in apoptosis in HT29 cells (Fig. 2). The fs blank was able to induce apoptosis after 48 h, but levels of apoptotic cells were significantly lower after treatment with the fs blank than with both fs aleurone. Synthetic mixtures of SCFA (acetate, propionate and butyrate) or butyrate alone had no influence on apoptosis and were significantly different from the fs. A higher butyrate concentration of 10 mM (positive control) significantly shifted the rate of early apoptotic cells to 10.82 (SD 2.46)% after 24 h and 19.07% (SD 5.78)% after 48 h, respectively.

To confirm the results obtained using annexin V/7-amino-actinomycin D and to get more detailed information about the underlying molecular mechanisms, the influence of fs on caspase activity was measured. Fermented aleurone of both varieties (10%) significantly induced caspase-3 activity compared with the medium control, which confirms the results obtained by flow cytometry (Fig. 3). In contrast, the fs blank did not induce the activity of caspase-3. Initiator caspases-8

and -9 were not modulated by all fs (data not shown). Therefore, no information was obtained on which pathway underlies fs-dependent induction of apoptosis.

Discussion

It is a matter of debate whether dietary fibre actually does play an important role in human cancer prevention. While recent large trials document a reduction in the risk of getting CRC, other well-conducted epidemiological studies do not support the conclusion that fibre intake and colon cancer are inversely associated⁽⁴⁾. Reasons for this controversy are multifaceted and possibly result from limited expressiveness of epidemiological studies⁽²³⁾. Furthermore, lack of protective effects of dietary fibre may depend on less intake (<30 g dietary fibre), the quality of fibre (different fermentability by colonic microflora lead to different SCFA patterns) as well as the presence or absence of phytoprotectants in the food-stuffs^(3,4,6,7). However, the protective characteristics, which have been proven for wheat grain components in numerous studies⁽¹³⁾, could be assigned neither to a single compound nor to a certain group of substances so far. There are some indications that dietary fibres of wheat bran inhibit colon tumours in animal experiments more consistently than other dietary fibres. Fermentation of dietary fibre by intestinal bacterial flora may lead to enhanced levels of potential chemoprotective metabolites such as SCFA indicated by a lower pH in the colon⁽⁴⁾. Here, fast metabolism of arabinoxylans of wheat compounds, particularly of the aleurone layer by luminal microflora, resulted in high concentrations of SCFA

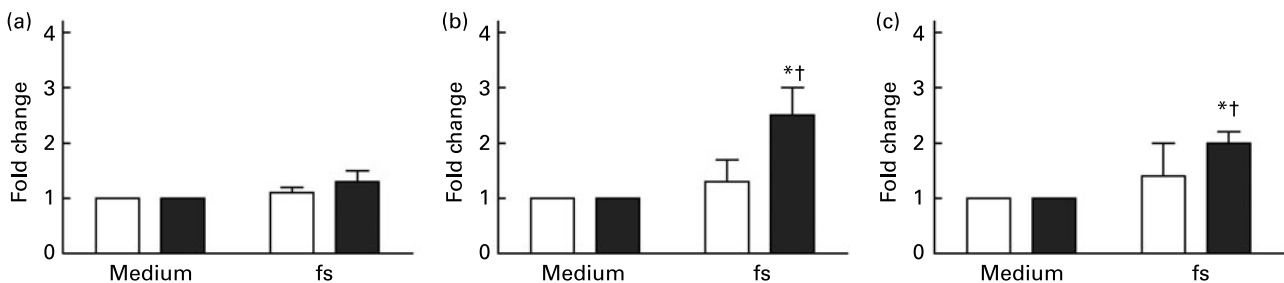


Fig. 3. Effects of fermentation supernatants (fs, 10%) on caspase-3 activation in HT29 cells after treatment with blank (a), European aleurone (b) and American aleurone (c) for 24 h (□) and 48 h (■). Caspase-3 activity as an indicator for apoptotic effects was assessed in whole-cell lysates of HT29 cells in the absence and presence of caspase-3 inhibitor Ac-DEVD-CHO. Fold changes of results out of three separate experiments were calculated on the basis of the respective medium control that was set to 1.0. Values are means with their standard deviations depicted by vertical bars (n 3). Student's t test was used to calculate the difference from the respective medium control (* P <0.05) and from blank († P <0.05).

and thus in a lowered pH. Survey data from various populations showed that faecal SCFA are in the range from acetate > propionate \geq butyrate in a ratio of 60:20:20^(3,24). Depending on the diet, total SCFA concentrations in the proximal colon are 70–140 mM falling to 20–70 mM in the distal colon⁽²⁴⁾. Thus, the ratio of fs blank resulting from fermentation I and II of 59:18:23 and 54:23:23, respectively, fits very well to physiological conditions. In addition, the ratio of SCFA shifted from acetate to butyrate during bacterial degradation of fermentable material, primarily of arabinoxylans, contained in the investigated wheat samples. Moreover, a lowered luminal pH caused by increased SCFA concentrations may affect intestinal microflora by conveying growth of acidophilic bacteria species such as lactobacilli and bifidobacteria⁽²⁵⁾.

In general, Western style diets, characterised by high concentrations of fat and animal protein, as well as low amounts of fibre, fruits and vegetables, are connected with a high release of bile acids, which seems to be a risk factor for the development of colon cancer⁽²⁾. Especially, secondary bile acids, produced by bacterial conversion of primary bile acids, showed tumour-promoting properties by acting directly on the mucosa or by promoting the effects of carcinogenic substances present in the lumen⁽²⁶⁾. The present results demonstrated that fermentation of wheat sources extensively lowered the concentration of the secondary bile acid DCA. Next to a reduced solubility and conversion of bile acids, a lower pH also can reduce the activity of the enzyme 7- α -dehydroxylase, which is responsible for the conversion of primary to secondary bile acids⁽²⁷⁾. An increase in number and activity of acidophilic bacteria strains could lead to an enhanced binding of bile acids by these bacteria⁽²⁶⁾. Furthermore, direct binding of bile acids by dietary fibre could also lead to reduced concentrations in the gut lumen⁽²⁸⁾. Since bile acids are presumed to promote colon cancer growth and progression⁽²⁹⁾ and are known to interfere with antiproliferative properties of butyrate^(26,30), this observed decline in bile acids in the presence of dietary fibre can be considered to be favourable in terms of colon cancer prevention.

Ammonia, which is a product from proteolytic bacterial fermentation in the distal colon⁽³⁾, could also promote colon cancer, since ammonia exhibits a number of effects on the colonic mucosa, including increased mucosal cell turnover and the incidence of colon carcinomas induced by *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine in rats⁽³¹⁾. Dietary fibre sources are thought to reduce ammonia concentrations in the intestinal lumen. This is attributed to their role as bacterial substrates resulting either in an increased utilisation of ammonia for bacterial cell growth or a reduced deamination of nitrogenous compounds⁽³²⁾ or indirectly by lowering the pH and so affecting enzyme activity e.g. of amino acid decarboxylase⁽³³⁾. In the present study, the ammonia concentration in all fs showed a direct correlation to the protein content of the test substances. Therefore, fermented aleurone exhibited the highest amounts of ammonia. Cummings *et al.*⁽³²⁾ showed that fibre sources with relatively high-protein contents diminish the ammonia-lowering effect of fibre. So, non-cereal dietary fibre sources that contain less protein may be more effective at lowering faecal ammonia levels than fibres from wheat grains.

Secondary chemoprevention is defined as the use of natural, synthetic or biological agents to reverse or suppress

the promotion and progression of neoplastic cells to cancer⁽³⁴⁾. Investigations on effects of the fs on the growth of transformed cells as a useful indicator of secondary chemoprotection showed that the growth of HT29 cells was efficiently retarded by all fs in a time- and dose-dependent manner, with increased effectiveness of the fermented wheat samples compared to the faeces control. No important differences were seen between different wheat fractions and aleurone varieties. Hence, fermentable dietary fibre, concentrated in the aleurone layer, seems to be responsible for the growth-inhibitory effects of whole-wheat grains. In this study, SCFA were the major biologically active and growth-inhibitory components in the fs of wheat samples, especially aleurone. However, the fermentation samples were more effective in inhibiting the cell growth than the synthetic SCFA mixtures. These findings are in line with previous experiments in which several fs of various fibre sources were analysed for their effects on cell growth and survival⁽⁶⁾. Even though it has been hypothesised that butyrate is the primarily SCFA, which inhibits colon tumour cell proliferation^(35,36), results of Beyer-Sehlmeyer *et al.*⁽⁶⁾ and Gamet *et al.*⁽³⁷⁾ indicate that propionate also exhibits appreciable antiproliferative properties. The present study showed that the cell growth-inhibiting effects of SCFA in the fermented wheat sources are caused almost solely by butyrate. Propionate concentrations comparable with concentrations found in fs aleurone (2 mM) exhibited an antiproliferative effect only after 8 d of treatment⁽³⁸⁾. Coradini *et al.*⁽³⁶⁾ have demonstrated that 4 mM butyrate for 72 h reduces the growth of HT29 cells by 75%. A comparable growth reduction (60–70%) was found in the present work in cells treated with butyrate concentrations contained in 20% fs of wheat sources (3.7–5.9 mM). In comparison, the fs reduced cell growth by 95%. Thus, the growth-inhibiting effect of the fs in the present study is probably not only due to the butyrate content. The additional activity of the fermentation samples reflects the growth-inhibitory properties of other metabolites, which have not yet been identified, or synergistic effects of these metabolites with SCFA. Furthermore, fs blank, containing less amounts of SCFA than the fermented wheat samples, also efficiently reduced cell growth. Gleib *et al.*⁽¹⁷⁾ suggested that secondary bile acids possibly cause the effects of fs blank on cell number. But, the DCA concentrations found in fs blank (7 μ M in 20% fs) as well as the concentrations of ammonia (4 mM in 20%) are too low to affect cells (data not shown). Thus, so far, unidentified metabolites probably resulting from the faecal inoculum must be partially responsible for the cell-modulating effects of fs blank. Growth inhibition by unfermented extracts of wheat sources is possibly caused by the presence of free phenolic acids, which have been shown to act antiproliferative in colon tumour cells⁽³⁹⁾.

Additionally, the impact of the fs on cell cycle modulation was investigated to enhance our knowledge about mechanisms, which could be responsible for the effects on cell growth. Butyrate has been shown to inhibit cell proliferation by arresting cell cycle in the G0/G1 phase by a mechanism of action still not completely understood⁽⁴⁰⁾. The present results indicated that fs aleurone independently of the variety inhibited HT29 cell growth after 48 h related to blocking cells in the G0/G1 phase of the cell cycle. This impact is attributed to butyrate's effect, since butyrate mimicking the concentration of fs

aleurone (2–2.4 mM) caused a cell cycle arrest in the G0/G1 phase in a similar manner. Fs blank, in which only low concentrations of butyrate were found (0.5 mM), did not modulate cell cycle progression. G0/G1 arrest induced by butyrate is related to a downregulation of genes involved in cell proliferation⁽⁴¹⁾. Results of Coradini *et al.*⁽³⁶⁾ indicated that butyrate (> 1 mM) reduced cyclin D1 and maintained the synthesis of p21^{waf1/cip1}, probably in a p53-independent way. Overexpression of p21^{waf1/cip1} selectively inhibits the G1/S cdk-cyclin complexes; thus, it is inversely associated with proliferation and directly affects terminal differentiation⁽⁵⁾.

In addition to growth inhibition, induction of apoptosis is another relevant marker for secondary chemoprevention of CRC. Although the molecular basis for the proapoptotic effects of butyrate has not been fully worked out, there are indications that extrinsic as well as intrinsic pathways of programmed cell death are involved^(5,42). In contrast, effects of fs or SCFA mixtures have not been well investigated. Using annexin V staining, the externalisation of phosphatidylserine as an early event in apoptosis could be detected after treatment of HT29 cells with the fs. Fs aleurone (10%) independently of variety (EU and US) was able to induce apoptosis in a time-dependent manner and was more effective than the fs blank, although fs blank also had proapoptotic effects in HT29 cells. Beyond this, the proapoptotic effects of the fs aleurone resulted in an enhanced activity of caspase-3. Caspase-3 is a member of a cysteine protease family that is involved in the execution of the apoptotic programme. Since fs aleurone did not induce activities of caspase-8 or -9, no information is given if the extrinsic or intrinsic pathway plays a role in activation of apoptosis. Therefore, experimental conditions like the time frame or less sensitivity of the method could be the reason for the lack of induction of the initiator caspases. Furthermore, SCFA (acetate, propionate and butyrate) or butyrate mimicking the concentration in the fs did not enhance the level of apoptotic cells. A study by Medina *et al.*⁽⁴³⁾ has shown that butyrate (4 mM) induces activation of caspase-3 in CRC cells. Kim *et al.*⁽⁴²⁾ suggested that butyrate sensitises human cancer cells to TRAIL-mediated apoptosis by upregulation of expression of death receptor DR5 that is mediated by activation of Sp1-transcriptional factor. In HT29 cells, 4 mM butyrate induced a 2.4-fold increase in DR5 expression, whereas lower concentrations (2 mM), found in our fs, did not modulate expression levels. In addition, only higher butyrate concentrations (> 5 mM) enhanced histone acetylation resulting in reactivation or silencing of genes critical for apoptosis⁽²²⁾. Therefore, further studies are needed to identify which molecular cascades are involved in the proapoptotic activity of fs and which metabolites are responsible for its effect.

In conclusion, the present results provide evidence on the biological effects of fermentation samples from different wheat sources, in particular aleurone. Gut flora-mediated fermentation of wheat aleurone results in reduced levels of tumour-promoting DCA but higher levels of potentially chemopreventive SCFA, especially butyrate. The aleurone layer was identified as the most beneficial subfraction, since its fermentation metabolites were able to induce apoptosis and to block cell cycle – two essential markers of secondary chemoprevention. Partly, chemoprotective activities of fermented aleurone are caused by butyrate. Thus, a fibre-rich

diet (e.g. with aleurone-enriched products) could be an effective strategy, firstly to enhance gut health and secondly to inhibit growth of transformed colon cells.

Acknowledgements

We would like to thank the Federal Ministry of Education and Research, Germany (BMBF 0313829A) for funding. The authors have no conflicts of interest. A. B., K. S., D. S. and M. G. designed the research and wrote the paper. A. B. and K. S. performed the *in vitro* fermentation and experiments on cell growth. A. B. performed the experiments on quantification of cell cycle parameters and apoptosis. K. S., G. B.-W. and U. O. performed the analysis of SCFA and bile acids and wrote the part describing the corresponding methods. J. H. and M. L. performed the analysis of dietary fibre sources that were provided by N. W. We thank Walter von Reding, Bühler AG, Switzerland, for preparation of the aleurone fraction from wheat sources.

References

1. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, *et al.* (2005) Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* **55**, 74–108.
2. World Cancer Research Fund (2007) *Food, Nutrition, Physical Activity, and the Prevention of Cancer: A Global Perspective*. Washington, DC: American Institute for Cancer Research.
3. Hamer HM, Jonkers D, Venema K, *et al.* (2008) Review Article: the role of butyrate on colonic function. *Aliment Pharmacol Ther* **27**, 104–119.
4. Young GP, Hu Y, Le Leu RK, *et al.* (2005) Dietary fibre and colorectal cancer: a model for environment-gene interactions. *Mol Nutr Food Res* **49**, 571–584.
5. Williams EA, Coxhead JM & Mathers JC (2003) Anti-cancer effects of butyrate: use of micro-array technology to investigate mechanisms. *Proc Nutr Soc* **62**, 107–115.
6. Beyer-Sehlmeyer G, Gleim M, Hartmann E, *et al.* (2003) Butyrate is only one of several growth inhibitors produced during gut flora-mediated fermentation of dietary fibre sources. *Br J Nutr* **90**, 1057–1070.
7. Munjal U, Gleim M, Pool-Zobel BL, *et al.* (2009) Fermentation products of inulin-type fructans reduce proliferation and induce apoptosis in human colon tumour cells of different stages of carcinogenesis. *Br J Nutr* 1–9 (Epublication ahead of print version).
8. Wang X & Gibson GR (1993) Effects of the *in vitro* fermentation of oligofructose and inulin by bacteria growing in the human large intestine. *J Appl Bacteriol* **75**, 373–380.
9. Aura A-M, Härkönen H, Fabritius M, *et al.* (1999) Development of an *in vitro* enzymic digestion method for removal of starch and assessment of its performance using rye and wheat breads. *J Cereal Sci* **29**, 139–152.
10. Amrein TM, Gränicher P, Arrigoni E, *et al.* (2003) *In vitro* digestibility and colonic fermentability of aleurone isolated from wheat bran. *Lebensm -Wiss U -Technol* **36**, 451–460.
11. Buri RC, von Reding W & Gavin MH (2004) Description and characterization of wheat aleurone. *Cereal Foods World* **49**, 274–281.
12. Ferguson LR & Harris PJ (1999) Protection against cancer by wheat bran: role of dietary fibre and phytochemicals. *Eur J Cancer Prev* **8**, 17–25.
13. Lupton JR & Turner ND (1999) Potential protective mechanisms of wheat bran fiber. *Am J Med* **106**, 24S–27S.

14. Reddy BS (1999) Role of dietary fiber in colon cancer: an overview. *Am J Med* **106**, 16S–19S.
15. Baublis AJ, Lu C, Clydesdale FM, *et al.* (2000) Potential of wheat-based breakfast cereals as a source of dietary antioxidants. *J Am Coll Nutr* **19**, 308S–311S.
16. Hollmann J & Lindhauer MG (2005) Pilot-scale isolation of glucuronoarabinoxylans from wheat bran. *Carbohydrate Polymers* **59**, 225–230.
17. Glei M, Hofmann T, Kuster K, *et al.* (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**, 2088–2095.
18. Wang JF, Zhu YH, Li DF, *et al.* (2004) *In vitro* fermentation of various fiber and starch sources by pig fecal inocula. *J Anim Sci* **82**, 2615–2622.
19. Burkard I, von Eckardstein A & Rentsch KM (2005) Differentiated quantification of human bile acids in serum by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **826**, 147–159.
20. Chaney AL & Marbach EP (1962) Modified reagents for determination of urea and ammonia. *Clin Chem* **8**, 130–132.
21. Glei M, Matuschek M, Steiner C, *et al.* (2003) Initial *in vitro* toxicity testing of functional foods rich in catechins and anthocyanins in human cells. *Toxicol In Vitro* **17**, 723–729.
22. Kiefer J, Beyer-Sehlmeyer G & Pool-Zobel BL (2006) Mixtures of SCFA, composed according to physiologically available concentrations in the gut lumen, modulate histone acetylation in human HT29 colon cancer cells. *Br J Nutr* **96**, 803–810.
23. Schatzkin A & Kipnis V (2004) Could exposure assessment problems give us wrong answers to nutrition and cancer questions? *J Natl Cancer Inst* **96**, 1564–1565.
24. Wong JM, de Souza R, Kendall CW, *et al.* (2006) Colonic health: fermentation and short chain fatty acids. *J Clin Gastroenterol* **40**, 235–243.
25. Blaut M (2002) Relationship of prebiotics and food to intestinal microflora. *Eur J Nutr* **41**, Suppl. 1, I11–I16.
26. Zampa A, Silvi S, Fabiani R, *et al.* (2004) Effects of different digestible carbohydrates on bile acid metabolism and SCFA production by human gut micro-flora grown in an *in vitro* semi-continuous culture. *Anaerobe* **10**, 19–26.
27. Owen RW (1986) The metabolism of bile acids. In *Microbial Metabolism in The Digestive Tract*, pp. 51–65 [MJ Hill, editor]. Boca Raton, FL: CRC Press.
28. Das D, Arber N & Jankowski JA (2007) Chemoprevention of colorectal cancer. *Digestion* **76**, 51–67.
29. Pai R, Tarnawski AS & Tran T (2004) Deoxycholic acid activates beta-catenin signaling pathway and increases colon cell cancer growth and invasiveness. *Mol Biol Cell* **15**, 2156–2163.
30. McMillan L, Butcher S, Wallis Y, *et al.* (2000) Bile acids reduce the apoptosis-inducing effects of sodium butyrate on human colon adenoma (AA/C1) cells: implications for colon carcinogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* **273**, 45–49.
31. Hughes R, Magee EA & Bingham S (2000) Protein degradation in the large intestine: relevance to colorectal cancer. *Curr Issues Intest Microbiol* **1**, 51–58.
32. Cummings JH, Hill MJ, Bone ES, *et al.* (1979) The effect of meat protein and dietary fiber on colonic function and metabolism. II. Bacterial metabolites in feces and urine. *Am J Clin Nutr* **32**, 2094–2101.
33. Cummings JH & Englyst HN (1987) Fermentation in the human large intestine and the available substrates. *Am J Clin Nutr* **45**, 1243–1255.
34. Bonovas S, Tsantes A, Drosos T, *et al.* (2008) Cancer chemoprevention: a summary of the current evidence. *Anticancer Res* **28**, 1857–1866.
35. Ruemmele FM, Dionne S, Qureshi I, *et al.* (1999) Butyrate mediates Caco-2 cell apoptosis via up-regulation of pro-apoptotic BAK and inducing caspase-3 mediated cleavage of poly-(ADP-ribose) polymerase (PARP). *Cell Death Differ* **6**, 729–735.
36. Coradini D, Pellizzaro C, Marimpietri D, *et al.* (2000) Sodium butyrate modulates cell cycle-related proteins in HT29 human colonic adenocarcinoma cells. *Cell Prolif* **33**, 139–146.
37. Gamet L, Daviaud D, Denis-Pouxviel C, *et al.* (1992) Effects of short-chain fatty acids on growth and differentiation of the human colon-cancer cell line HT29. *Int J Cancer* **52**, 286–289.
38. Siavoshian S, Blottiere HM, Le FE, *et al.* (1997) Comparison of the effect of different short chain fatty acids on the growth and differentiation of human colonic carcinoma cell lines *in vitro*. *Cell Biol Int* **21**, 281–287.
39. Ferguson LR, Zhu ST & Harris PJ (2005) Antioxidant and antigenotoxic effects of plant cell wall hydroxycinnamic acids in cultured HT-29 cells. *Mol Nutr Food Res* **49**, 585–593.
40. Blottiere HM, Buecher B, Galmiche JP, *et al.* (2003) Molecular analysis of the effect of short-chain fatty acids on intestinal cell proliferation. *Proc Nutr Soc* **62**, 101–106.
41. Iacomino G, Tecce MF, Grimaldi C, *et al.* (2001) Transcriptional response of a human colon adenocarcinoma cell line to sodium butyrate. *Biochem Biophys Res Commun* **285**, 1280–1289.
42. Kim YH, Park JW, Lee JY, *et al.* (2004) Sodium butyrate sensitizes TRAIL-mediated apoptosis by induction of transcription from the DR5 gene promoter through Sp1 sites in colon cancer cells. *Carcinogenesis* **25**, 1813–1820.
43. Medina V, Edmonds B, Young GP, *et al.* (1997) Induction of caspase-3 protease activity and apoptosis by butyrate and trichostatin A (inhibitors of histone deacetylase): dependence on protein synthesis and synergy with a mitochondrial/cytochrome c-dependent pathway. *Cancer Res* **57**, 3697–3707.

2.3. Publikation III: FERMENTATION SUPERNATANTS OF WHEAT (*TRITICUM AESTIVUM* L.) ALEURONE BENEFICIALLY MODULATE CANCER PROGRESSION IN HUMAN COLON TUMOR CELLS. Anke Borowicki, Katrin Stein, Daniel Scharlau Michael Glei. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Februar 2010, 58:2001-2007, Epub 02.12.2009.

Weizenvollkorn und vor allem die Aleuronschicht beinhalten hohe Gehalte an nicht-verdaulichen Ballaststoffen. Diese werden von der Darmflora vor allem zu kurzkettigen Fettsäuren fermentiert. Ein Hauptvertreter der kurzkettigen Fettsäuren ist Butyrat, das zahlreiche chemopräventive Eigenschaften aufweist, z. B. die Inhibierung des Wachstums entarteter Zellen sowie die Induktion der Differenzierung und Apoptose. In der vorliegenden Studie wurden der Einfluss von fermentiertem Weizenaleuron auf das Zellwachstum und die Induzierbarkeit der Apoptose in Adenomzellen sowie die Wirkung auf die Differenzierung und die Beteiligung möglicher Zielgene im Vergleich zu Adenokarzinomzellen untersucht.

In Adenomzellen wirkten Metabolite des fermentierten Aleurons proliferationshemmend und induzierten sowohl die Apoptose als auch die Enzymaktivität der alkalischen Phosphatase als Marker der Differenzierung. Da Adenomzellen sensitiver auf Fermentationsmetabolite des Aleurons reagierten als Adenokarzinomzellen, könnte, übertragen auf die *in vivo* Situation, durch den Verzehr von Aleuron-angereicherten Lebensmitteln ein wichtiger Beitrag im Sinne der Chemoprävention geleistet werden, indem das Wachstum von früh entarteten Zellen vermindert wird.

Eigenanteil:

- Anteilige Durchführung der *in vitro* Fermentation
- Durchführung der Wachstumsuntersuchungen in LT97-Zellen
- Durchführung der Untersuchungen zur Apoptose und der Aktivität der alkalischen Phosphatase
- RNA-Isolation und Durchführung der *real-time* qPCR
- Auswertung, Interpretation und Darstellung aller Ergebnisse
- Verfassung des Manuskriptes

Fermentation Supernatants of Wheat (*Triticum aestivum* L.) Aleurone Beneficially Modulate Cancer Progression in Human Colon Cells

ANKE BOROWICKI,* KATRIN STEIN, DANIEL SCHARLAU, AND MICHAEL GLEI

Institute for Nutrition, Department of Nutritional Toxicology, Friedrich-Schiller-University
 Jena, Dornburger Strasse 24, 07743 Jena, Germany

Wheat aleurone contains high amounts of dietary fibers that are fermented by the microflora, resulting in the formation of short-chain fatty acids (SCFA), which are recognized for their chemopreventive potential. This study investigated the effects of fermented aleurone on growth, apoptosis, differentiation, and expression of several genes using two different human colon cell lines (LT97 and HT29). In LT97 cells, the fermentation supernatant (fs) aleurone reduced significantly the cell growth (EC_{50} after 48 h = 7.6–8.3%), whereas the level of apoptotic cells was significantly increased (2.1–2.3-fold). Differentiation was enhanced in HT29 cells (1.8-fold) more than in LT97 cells (1.6-fold). Cell growth and apoptosis-related genes, namely *WNT2B* and *p21*, were induced by the fs (LT97, 1.7–3.3-fold; HT29, 7.9–22.2-fold). In conclusion, fermented wheat aleurone is able to act as a secondary chemopreventive agent by modulating parameters of cell growth and survival, whereas cells of an early transformation stage are more sensitive.

KEYWORDS: Aleurone; apoptosis; colon cancer; differentiation; fermentation; *Triticum aestivum* L.

INTRODUCTION

Some epidemiological studies suggest that dietary fiber and complex carbohydrates in the diet may help to reduce colon cancer risks, but scientific evidence is still lacking (1, 2). Whereas recent large trials document a reduction in the risk of colorectal cancer development after dietary fiber intake (3), other well-conducted studies do not support this inverse association (4). Dietary fiber might improve colonic health by acting as a substrate for luminal health-promoting bacteria species that increase fermentation products, mainly short-chain fatty acids (SCFA), particularly butyrate, propionate, and acetate. Butyrate is considered to be the major energy source for normal, non-transformed colon cells, thereby enhancing survival of these cells. In addition, butyrate has been suggested to play a central role in reducing cancer risk by promoting differentiation, inducing apoptosis, and inhibiting growth of neoplastic cells in vitro (5).

Physiologically, butyrate affects human colonocytes in conjunction with other fermentation products, which are formed simultaneously by microbial degradation of dietary fiber. Detailed evidence is limited on how fermentation products from complex dietary fiber sources such as grains interact with human intestinal cells and how generated fermentation supernatants (fs) affect cells in comparison to analogous SCFA concentrations (6, 7). Wheat grains are particularly high in dietary fiber and other physiologically beneficial substances, which are mainly concentrated in the bran fraction, more precisely, in the aleurone layer, which forms the outer part of the endosperm (8). Schatzkin et al.

have shown in a large prospective study that particularly wheat-grain products were associated with a modest reduced risk of colorectal cancer development (9). Some epidemiological and experimental studies have indicated that wheat bran might be one of the most effective parts of the whole grain in protecting against colorectal cancer (10).

We have previously shown that fermented wheat aleurone was able to induce apoptosis and to block the cell cycle in highly transformed HT29 colon adenocarcinoma cells (11). In terms of chemoprevention, it is useful to affect also cells of earlier stages in carcinogenesis such as preneoplastic adenoma cells, because microadenomas are very frequent in the human population (12). Therefore, an adenoma cell line (LT97) representing an early premalignant genotype (13) was used for the presented study to analyze which effects the same samples would have on a cell line of a different stage of transformation. It was of special interest to find out if fermented aleurone and analogous SCFA concentrations would inhibit the growth and induce apoptosis in human LT97 adenoma cells similar to HT29 adenocarcinoma cells or if they would react in different manners.

Synergyl (oligofructose-enriched inulin) was used as a reference because growth-inhibiting and apoptosis-inducing effects of fs were indicated previously (14). In addition to growth inhibition and induction of apoptosis, the promotion of differentiation is another relevant marker of secondary chemoprevention. Previously, it has been shown that butyrate induces differentiation by enhancing the enzyme activity of alkaline phosphatase (AP) in colon carcinoma cells (15). Hence, the AP activity was examined after treatment with the fermented aleurone in LT97 adenoma and HT29 adenocarcinoma cells.

*Corresponding author (telephone ++ 49-36 41-94 96 75; fax ++ 49-36 41-94 96 72; e-mail Anke.Borowicki@uni-jena.de).

Table 1. Concentration and Ratio of SCFA in the Fermentation Supernatant (fs) after *In Vitro* Fermentation of Aleurone Published in Borowicki et al. (11) and of Synergy1

	SCFA (mM)			ratio of SCFA (%)
	acetate	propionate	butyrate	
fs blank	10.75	4.56	4.56	54:23:23
fs EU ^a aleurone	21.01	7.12	20.32	43:15:42
fs U.S. ^b aleurone	25.41	9.06	24.23	43:16:41
fs Synergy1	31.78	7.09	25.19	50:11:39

^aEU, European. ^bU.S., American.

To obtain more detailed information about the chemopreventive potential of the fermented aleurone as well as Synergy1, the mRNA expression of selected genes involved in pathways of cell cycle arrest (*p21*) and apoptosis (*DR5*) was investigated in both cell lines. Additionally, another gene (*WNT2B*) was chosen, which is associated with processes involved in proliferation and differentiation (16). However, in butyrate-treated cells, a hyperactivation of the WNT signaling pathway seems to be a required event to achieve high levels of apoptosis (16).

Overall, the aim of our study was to enhance our understanding of the chemoprotective properties of wheat aleurone and its specific role in secondary cancer prevention.

MATERIALS AND METHODS

Dietary Fiber Sources. Wheat aleurone of two varieties [European (EU) and American (U.S.)] was used as dietary fiber source (obtained from Kampffmeyer Food Innovation GmbH, Hamburg, Germany). Preparation of the aleurone fraction (ASP-2 preparation with high purity) was done by Bühler AG, Uzwil, Switzerland, according to the method of Bohm et al. (17). Synergy1, a commercially available mixture of inulin enriched with oligofructose, was obtained from ORAFIT, Tienen, Belgium, and used as a reference. To guarantee the stability of the samples, aliquots were prepared and stored in air- and light-proof flasks at 4 °C.

Fermentation of Dietary Fiber Sources and Preparation of the Synthetic Mixtures. Wheat aleurone (EU and U.S.) and Synergy1 were digested and fermented *in vitro* in six repetitions according to a described procedure of Borowicki et al. (11). A sample without dietary fiber was used (blank – feces control) as a control. The synthetic mixtures containing identical concentrations and ratios of SCFA as the corresponding fs (Table 1) were prepared according to the method of Borowicki et al. (11).

Cell Lines and Culture Conditions. The cell lines (HT29 and LT97 human colon cells) and the culture conditions used are described in Gleis et al. (7) and Klenow et al. (18). Passages 14–31 of HT29 cells and passages 6–38 of LT97 cells were used for the experiments in this study. In regular intervals a mycoplasma test (MycAlert Mycoplasma Detection Kit, Lonza, Switzerland) was performed, and contamination with mycoplasma was excluded.

For cell culture experiments, LT97 cells were incubated with the fs (2.5–20%) for 1–4 days after seeding in 96-well plates (determination of cell growth), 6-well plates (determination of apoptosis and enzyme activities), or T₂₅ cell culture flasks (experiments on mRNA expression) after reaching a confluence of 50–60%. HT29 cells were seeded in 6-well plates (1.5 × 10⁶ cells/well) to analyze AP activity or in T₂₅ flasks (3 × 10⁶ cells/T₂₅ flask) to quantify mRNA expression and were grown for 1 day before exposure to the fs (10%). After incubation, LT97 and HT29 cells were trypsinized and suspended in PBS. Viabilities and cell numbers were determined with a CASY-cell counter (CASY model TT, Innovatis AG CASY Technology, Reutlingen, Germany).

Determination of Cell Growth. After 24, 48, or 72 h of incubation with the fs or the synthetic mixtures, the amount of DNA was quantified as described previously (18) as a relative measure of cell number. The results were calculated on the basis of the medium control, which was set to 100%. The effective mean doses (EC₅₀) of the fs and the synthetic mixtures that inhibited growth by 50% were determined and expressed as percentages.

Detection of Apoptosis. To determine the level of apoptosis in LT97 cells, 1 × 10⁶ cells were stained with annexin V-FITC as well as

7-aminoactinomycin D (7-AAD) in annexin V binding buffer using the annexin V-FITC/7-AAD kit (Beckman Coulter, Krefeld, Germany), and the level of apoptotic cells was quantified by flow cytometry as described previously (11). Furthermore, the enzyme activity of caspase-9, caspase-8, and caspase-3 was determined to obtain more detailed information on the induction of apoptosis according to ref 11. For interpretation of all results, fold changes were calculated on the basis of the medium control, which was set to 1.0.

Determination of Alkaline Phosphatase Activity. Cell lysates of LT97 and HT29 cells were prepared as described before (19). AP activity was measured as described by Beyer-Sehlmeyer et al. (6) with slight modifications. Briefly, AP activity was measured at 37 °C using *p*-nitrophenylphosphate (5 mM) as substrate. *p*-Nitrophenol (0–800 μM) was used to generate a standard curve. The amount of *p*-nitrophenol liberated was determined spectrophotometrically at 400 nm (SpectraFluor Plus, Tecan GmbH, Crailsheim, Germany). One unit is defined as the activity that hydrolyzes 1 μmol of substrate per minute at 37 °C. Results are expressed relative to the cellular protein content, which was determined spectrophotometrically according to Bradford's method (20).

RNA Extraction and mRNA Expression Analysis. Total RNA from LT97 and HT29 cells was isolated using the RNeasy Plus Mini Kit according to the manufacturer's manual (Qiagen, Hilden, Germany), dissolved in 50 μL of RNase-free water, and stored at –20 °C until further use. RNA was quantified by measuring the absorbance at 260 nm, and the purity of the samples was verified by measuring the ratios of absorbance at 260:280 or 260:230, respectively, using a NanoDrop ND-1000 photometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE). RNA was checked for integrity using the Agilent RNA 6000 Nano Kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) on the Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany). RNA quality was expressed as an RNA integrity number (RIN). Only RNA samples with a RIN > 8 were used for further experiments.

The expression of selected target genes was analyzed with 2.5 μg of total RNA converted into first-strand cDNA using SuperScript II (Invitrogen, Karlsruhe, Germany). Real-time quantitative PCR was carried out using specific primer pairs and qPCR GreenMaster (Jena Bioscience, Jena, Germany). All reactions were performed in duplicate. The PCR reaction profile included an initial denaturation of 2 min at 95 °C followed by 50 cycles of denaturation (15 s at 95 °C), annealing, and extension (30 s at 56–60 °C, depending on the primer pairs). Cumulative fluorescence was measured at the end of the extension phase of each cycle. Product specific amplification was confirmed by melting curve analysis. The following gene-specific primer sequences were used for the quantification: *GAPDH* (5'-ACCCACTCCTCCACCTTTGAC-3' and 5'-CACTGTCTTGTA-CCCTTG-3'); *DR5* (5'-CCACCTGGACACCATATCTC-3' and 5'-TA-CAATCACCGACCTTGACC-3'); *p21* (5'-CACTGTCTTGTAACCTT-GTG-3' and 5'-CTTCTCTTGGAGAAGATCAG-3'); and *WNT2B* (5'-TCATGCAGAAGTAGCCGA-3' and 5'-ACACCGTAGTGGATG-TTGTC-3'). All primers were designed using the freely available PerlPrimer v1.1.17 (<http://perlprimer.sourceforge.net>) software. The mRNA expression of the target genes was calculated on the basis of the house-keeping gene *GAPDH* according to the method of Pfaffl et al. (21). For interpretation of all results, fold changes were calculated on the basis of the medium control, which was set to 1.0.

Statistical Evaluation. Means and standard deviations (SD) were calculated from at least three independent experiments. Differences were calculated by one- or two-way ANOVA, including a Bonferroni post test with selected pairs, using GraphPad Prism version 5 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA). The one-way ANOVA was done to define differences within one group if more than two concentrations were used. The two-way ANOVA was used to define differences between two groups if more than two concentrations were used. Otherwise, comparisons of two groups were done with Student's *t* test. The statistical analyses used depended on the respective experimental design and are specified in the legends to the figures and tables.

RESULTS

Modulation of Cell Growth by the fs and the Corresponding SCFA in LT97 Cells. The effects of fs of different varieties of aleurone (EU and U.S.) on cell growth of LT97 cells were

Table 2. EC₅₀ of the Fermentation Supernatant (fs) and the Corresponding Synthetic Mixtures of SCFA (Acetate, Propionate, and Butyrate), Propionate + Butyrate, and Butyrate Alone in LT97 Cells

	EC ₅₀ ^a (%)															
	fs				SCFA				propionate + butyrate				butyrate			
	48 h		72 h		48 h		72 h		48 h		72 h		48 h		72 h	
	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD
blank	15.8	4.3	15.5	2.9	× ^b	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×
EU ^c aleurone	8.3	1.7	7.9	0.5	13.7	1.2	13.0	2.0	×	×	17.0	4.3	14.8	2.4	13.7	2.4
U.S. ^d aleurone	7.6	1.6	7.4	0.7	10.7	1.8	11.3	1.3	18.3	4.7	14.9	2.6	12.2	2.6	12.2	1.5

^aEC₅₀ (%) is defined as the effective concentration at which cell number decreased to 50% of viable cells. ^b× indicates that EC₅₀ was not achieved. ^cEU, European. ^dU.S., American.

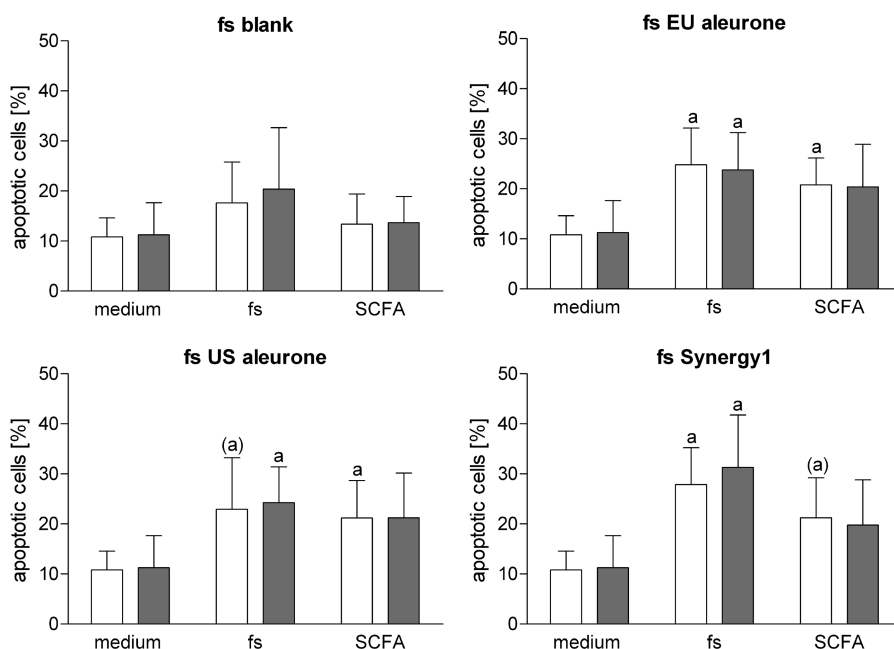


Figure 1. Effects of fermentation supernatant (fs, 5%) and its corresponding SCFA mixtures (acetate, propionate, and butyrate) on early apoptosis in LT97 cells after treatment with fs blank, fs EU aleurone, fs U.S. aleurone, and fs Synergy1 for 24 h (white bars) and 48 h (gray bars). Apoptosis was assessed by binding of annexin V and exclusion of 7-AAD. Values are means with their standard deviations depicted by vertical bars ($n = 4$). Student's *t* test was used to calculate the difference from the respective medium control (*a*, $P < 0.05$). Parentheses denote that effects vary by trend only ($P < 0.07$).

analyzed using the DAPI assay. Treatment of LT97 cells with the fs aleurone (EU and U.S.) affected the cell number in a time- and dose-dependent manner, even after 24 h on a significant level. However, after 24 h, the calculated EC₅₀ was not detectable for any fs, whereas after 48 h, EC₅₀ ranged from 7.6 to 15.8% (Table 2). After 48 and 72 h of treatment, the fermented aleurone reduced cell growth more effectively than the fs blank independent of the variety. In addition, the growth of cells was efficiently retarded in LT97 cells by the SCFA mixtures as well as mixtures of butyrate and propionate or butyrate alone in concentrations corresponding to both fs aleurone. Nevertheless, all synthetic mixtures were less effective than the fs, but the general profiles of response were similar. The higher concentrations of butyrate present in fs U.S. aleurone (24 mM) compared to fs EU aleurone (20 mM) did not result in a measurable additional influence on cell growth.

The concentration of 5% fs was selected for subsequent experiments in LT97 cells, because effects on apoptosis, differentiation, and mRNA expression should be determined using a subtoxic concentration.

Induction of Apoptosis by the fs of Both Aleurone Varieties in LT97 Cells. The fermentation supernatants of both aleurone varieties and Synergy1 were used to analyze the effect on apoptosis as a relevant marker of secondary chemoprevention.

The basal levels of early apoptotic cells detected in LT97 cells were $10.81 \pm 3.79\%$ after 24 h and $11.26 \pm 6.40\%$ after 48 h, respectively. The fs (5%) of different aleurone varieties (EU and U.S.) and of Synergy1 induced a significant increase in apoptosis (2.1–2.8-fold) in LT97 cells time-independently (Figure 1). The fs blank was not able to induce apoptosis, but also did not differ significantly from the fs aleurone. Particularly after 24 h, the synthetic mixtures of SCFA enhanced levels of apoptotic cells comparable to the fs. Furthermore, there were no differences between the fs aleurone and the fs Synergy1.

To confirm these results and to get more detailed information about the underlying molecular mechanisms, the influence of the fs on caspase-3, -8, and -9 activity was measured. The fermented aleurone of both varieties (5%) as well as Synergy1 (5%) significantly induced the caspase-3 activity compared to the medium control, whereas the fs blank could not modulate the enzyme activity (Figure 2). Generally, the caspase-3 activity was more inducible after 24 h than after 48 h. The initiator caspases-8 and -9 were not modulated by any fs (data not shown).

Induction of Alkaline Phosphatase by the fs of Both Aleurone Varieties in LT97 and HT29 Cells. Tumor cells are typified by a loss of responsiveness to some or all of the factors regulating cell growth, differentiation, and apoptosis, resulting in more

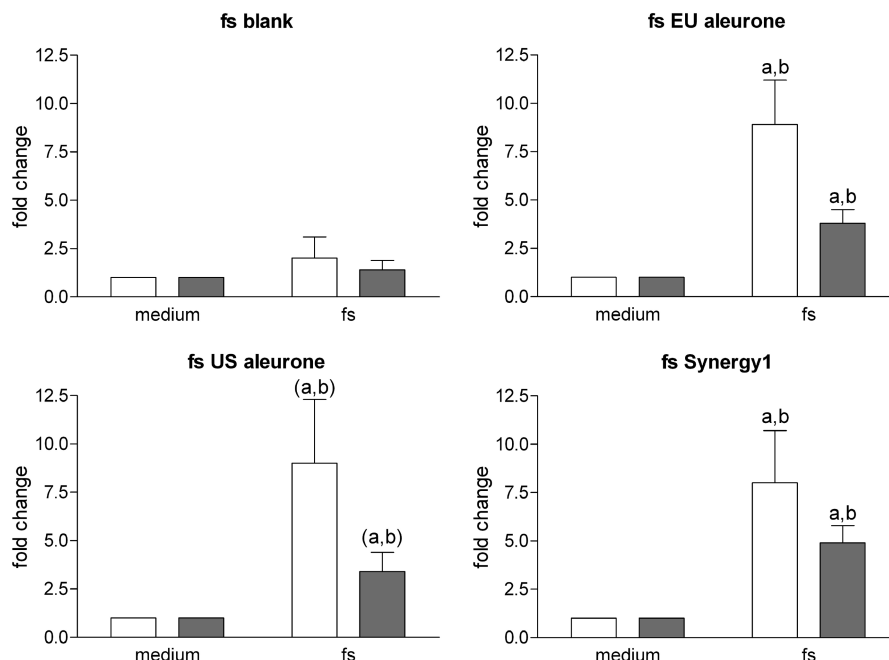


Figure 2. Effects of fermentation supernatants (fs, 5%) on caspase-3 activation in LT97 cells after treatment with fs blank, fs EU aleurone, fs U.S. aleurone, and fs Synergy1 for 24 h (white bars) and 48 h (gray bars) as indicator for apoptotic effects. The caspase-3 activity was assessed by measuring the amount of liberated AMC from the respective substrate. The specificity of the assay was confirmed by inhibition of enzymatic activity with the specific caspase-3 inhibitor Ac-DEVD-CHO. Fold changes of results of three separate experiments were calculated on the basis of the respective medium control, which was set to 1.0. Values are means with their standard deviations depicted by vertical bars ($n = 3$). Student's t test was used to calculate the difference from the respective medium control (a, $P < 0.05$) and from blank (b, $P < 0.05$). Parentheses denote that effects vary by trend only ($P = 0.05$).

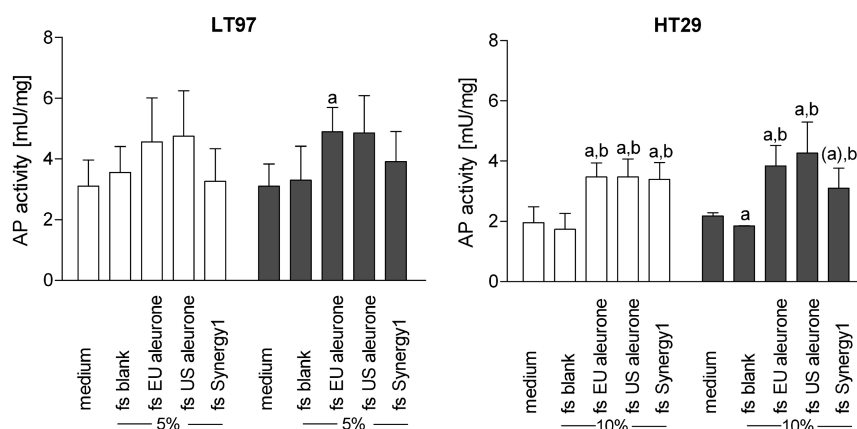


Figure 3. Effects of fermentation supernatants (fs, 5 and 10%) on alkaline phosphatase activity in LT97 and HT29 cells after treatment with fs blank, fs EU aleurone, fs U.S. aleurone, and fs Synergy1 for 48 h (white bars) and 72 h (gray bars) as marker of differentiation. The enzyme activity was assessed by measuring the amount of liberated *p*-nitrophenol. Values are means with their standard deviations depicted by vertical bars ($n = 3$). Student's t test was used to calculate the difference from the respective medium control (a, $P < 0.05$) and from blank (b, $P < 0.05$). Parentheses denote that effects vary by trend only ($P = 0.08$).

undifferentiated cell types. Thus, the fermentation supernatants of both aleurone varieties and Synergy1 were used to analyze the effect on differentiation by measuring the modulation of the AP activity in the cell lysates. Because no modulation of AP activity was seen after 24 h in both cell lines, only effects after 48 and 72 h are illustrated in **Figure 3**. In LT97 cells, the AP activity was significantly induced only by 5% fs EU aleurone (1.6-fold after 72 h) even though the effect was not significantly different from the fs blank. Interestingly, butyrate (4 mM) did not enhance the AP activity (data not shown). In HT29 cells, the fermentation supernatants (10%) of both aleurone varieties (EU and U.S.) significantly induced the AP activity 1.8-fold after 48 and 72 h and were significantly more effective than the fs blank, which did not

modulate the AP activity after 48 h and even reduced activity after 72 h. Synergy1 significantly enhanced the enzyme activity only after 48 h (1.8-fold) but did not differ from the fs aleurone of both varieties. Butyrate (4 mM) induced the AP activity already after 24 h (1.5-fold) as well as after 48 h (2.8-fold) and 72 h (2.0-fold), respectively (data not shown).

Effect of the fs of Both Aleurone Varieties on mRNA Expression of Selected Target Genes in LT97 and HT29 Cells. To obtain more detailed information about a chemopreventive potential of the fermented aleurone as well as Synergy1, the mRNA expression of selected genes involved in pathways of cell cycle arrest (*p21*), apoptosis (*DR5*), or both events (*WNT2B*) was investigated in LT97 adenoma and HT29 adenocarcinoma cells (**Table 3**).

Table 3. Modulated mRNA Expression of *p21*, *DR5*, and *WNT2B* in LT97 and HT29 Cells Treated with Fermentation Supernatant (fs) (5 or 10%) or Butyrate (4 mM) for 24 h^a

	LT97 (5% fs)		HT29 (10% fs)			
	mean	SD	mean	SD		
<i>p21</i>						
butyrate, 4 mM	4.02	1.97	13.95	2.67	a	
fs blank	1.11	0.12	10.38	3.86	a	
fs EU ^b aleurone	3.34	1.34	(a), b	19.25	4.85	a, (b)
fs U.S. ^c aleurone	3.26	0.87	a, b	22.24	5.15	a, b
fs Synergy1	2.32	0.69	(a), b	20.45	1.91	a, b
<i>DR5</i>						
butyrate, 4 mM	3.09	1.35	1.26	0.31		
fs blank	0.81	0.13	0.86	0.29		
fs EU aleurone	1.20	0.59	1.11	0.19		
fs U.S. aleurone	1.80	0.41	(a), b	1.31	0.07	a, (b)
fs Synergy1	1.03	0.52	1.38	0.24	(b)	
<i>WNT2B</i>						
butyrate, 4 mM	2.17	0.37	a	9.54	0.85	a
fs blank	0.85	0.10		3.36	2.02	
fs EU aleurone	1.80	0.34	(a), b	7.90	1.35	a, b
fs U.S. aleurone	1.72	0.44	(a), b	8.34	2.58	a, (b)
fs Synergy1	1.62	0.00	a, b	9.20	0.64	a, b

^a Results are presented as fold changes calculated on the basis of the medium control, which was set to 1.0. Student's *t* test was used to calculate the difference from the respective medium control (a, $P < 0.05$), from blank (b, $P < 0.05$), and from Synergy1 (c, $P < 0.05$). Parentheses denote that effects vary by trend only ($P \leq 0.1$). ^bEU, European. ^cU.S., American.

(a) *Effect on mRNA Expression of p21.* In LT97 cells *p21* was induced by all fermentation supernatants of dietary fiber sources, but only for the fs U.S. aleurone on a significant level. There were no differences seen either between both aleurone varieties or between the fs aleurone and Synergy1. The fs blank did not modulate the mRNA expression. In HT29 cells *p21* was significantly induced by all fermentation supernatants compared to the medium control, whereas the fs blank induced *p21* on a lower level than the fs aleurone (EU and U.S.) and the fs Synergy1. Again, fermented aleurone was comparably effective as Synergy1. In LT97 cells, butyrate (4 mM) did not modulate *p21* on a significant level. In HT29 cells, in contrast, butyrate significantly induced mRNA expression of *p21*. In general, *p21* was less regulated in LT97 adenoma cells compared to HT29 adenocarcinoma cells, possibly due to the higher concentrations of the used fs (5% in LT97 versus 10% in HT29).

(b) *Effect on mRNA Expression of DR5.* In LT97 cells only the fs U.S. aleurone induced *DR5* expression on mRNA level compared to the medium control and was significantly different from the fs blank. In contrast, the fs EU aleurone and Synergy1 did not modulate mRNA expression of *DR5*. In HT29 cells, again up-regulation of *DR5* was detected only by treatment with fs U.S. aleurone compared to the medium control. The fs U.S. aleurone and the fs Synergy1 were more effective than the fs blank. Butyrate (4 mM) had no effect on *DR5* mRNA expression in both cell lines used.

(c) *Effect on mRNA Expression of WNT2B.* The mRNA expression level of *WNT2B* was induced by all fermentation supernatants except from the fs blank compared to the medium control in LT97 as well as HT29 cells. The fermented aleurone was comparably effective as Synergy1. In addition, butyrate (4 mM) significantly induced mRNA expression in both cell lines. *WNT2B* was less regulated in LT97 cells compared to HT29 cells.

DISCUSSION

Chemoprevention of colorectal cancer is a major concern for improving public health, because this is the third and the second most common type of cancer in developed countries in men and women, respectively (22). The consumption of dietary fiber from fruits and grains might be associated with a reduced risk of colorectal cancer development, whereby high but also lower amounts may exert beneficial effects (1, 4). Nevertheless, it is apparent that more detailed studies are needed on how different types of foods and dietary fibers contribute to gut health and how they may act on a molecular basis.

Hence, the present study was performed to elucidate in depth which chemopreventive effects can ensue from fermented wheat aleurone in human colon cancer cells of different transformation stages. The wheat aleurone used in this study, in which beneficial substances such as arabinoxylans and polyphenols are concentrated, was previously characterized. It was shown that an in vitro fermentation of aleurone by the colonic microflora obtained from fecal slurry resulted in a marked increase of SCFA concentrations in comparison to the feces control (11). Because the fermentation of Synergy1, a pure dietary fiber source made of oligofructose-enriched inulin, generated similar SCFA concentrations, the fiber source of aleurone should be as highly fermentable as the prebiotics inulin or oligofructose.

LT97 adenoma cells are highly relevant target cells for studying aspects of chemoprevention in an earlier stage of carcinogenesis (5). In the present study we found a significant time- and dose-dependent growth inhibition in LT97 cells by the fermented aleurone, which may be attributed to the increase in SCFA, in particular butyrate, after fermentation of this dietary fiber source. Thus, the synthetic mixtures of the SCFA and butyrate alone followed a similar pattern of response in mediating growth inhibition, reflecting the potential of SCFA in secondary chemoprevention. However, the fermentation samples were more effective in inhibiting the growth of LT97 cells than the corresponding SCFA mixtures. Furthermore, the feces control also reduced the growth of LT97 cells. The additional activity of the fermentation samples and of the feces control reflects the growth-inhibitory properties of other so far unidentified metabolites, probably from the fecal inoculum. After 48 h, the growth-inhibiting properties of the fs and the synthetic mixtures were 1.6-fold more efficient in LT97 adenoma than in HT29 adenocarcinoma cells (11). After 72 h, the impacts were similar in both cell lines. These findings are almost in line with previous experiments in which several fermentation supernatants of various fiber sources were analyzed for their effects on cell growth and survival (6, 14). It was demonstrated that the difference in growth inhibition may be potentially caused by varying butyrate uptake rates in adenoma and carcinoma cell lines (23) resulting from a down-regulation of butyrate transporters in human colon cancer tissues compared to normal cells (24). Hence, primarily after 48 h the uptake of butyrate might be delayed, and this delay may be accompanied by a reduced sensitivity against butyrate exposure in HT29 cells compared to LT97 cells. Furthermore, dietary fiber is physiologically consumed by the intake of cereals, fruits, and vegetables several times per day. The human colon epithelium is therefore continuously exposed by metabolites of the bacterial degradation of fiber. In the case of wheat fiber it was reported that when humans were given one serving including wheat bran, the transit was up to 41 h (25). Hence, the in vitro growth-inhibiting properties of wheat aleurone might have important consequences for chemoprevention when translated to the in vivo situation, because it indicates that fermentation products of wheat aleurone could efficiently suppress the growth of cells of earlier cancer stages.

In addition to growth inhibition, several *in vitro* studies indicated that butyrate induces apoptosis and promotes differentiation in various colon cancer cells (24) and thus could be important for secondary chemoprevention of colorectal cancer. In contrast, effects of fs or synthetic SCFA mixtures have not been well investigated. In the present study, we observed a significant increase in apoptotic cells and caspase-3 activity after incubating the LT97 adenoma cells with the fermented aleurone. The synthetic SCFA mixtures mimicking the concentration in the fs enhanced the level of apoptotic cells in a similar response compared to the fs. These findings are opposite to effects on apoptosis in HT29 cells in which SCFA did not induce apoptosis (11). This may have important implications for possible chemopreventive activities in earlier stages of the cancer process, because it is of high benefit to induce apoptosis in adenoma cells and thereby reduce the formation of more degenerated carcinoma cells.

Agents that act by modulating the differentiation of neoplastic and carcinoma cells, thereby slowing or even halting their growth, exhibit a chemopreventive activity (26). HT29 cells synthesize the intestinal form of AP at extremely low levels, and the expression can be enhanced by differentiating agents (27). Several studies have shown that butyrate induces the AP activity in HT29 adenocarcinoma cells accompanied by a more differentiated phenotype (15,24). In the present study, butyrate (4 mM) induced AP activity in adenocarcinoma cells after only 24 h, which is in line with other findings (6, 15). The fermentation supernatants of aleurone and Synergy1 were of equal potency in enhancing AP activity, which is probably due to the amount of butyrate (2–2.5 mM). Interestingly, in LT97 adenoma cells treatment with butyrate or the fs had nearly no influence on AP activity. Previously it has been suggested that butyrate stimulates colonic cancer cells to progress to a more differentiated phenotype followed by an apoptotic death (26). Orchel et al. demonstrated that higher doses of butyrate (> 5 mM) induced apoptosis in the cells and failed to stimulate colonocyte differentiation (15). Because LT97 cells are more sensitive to a treatment with fs, particularly SCFA, this could be a reason for no effect on the enzyme activity level. Because LT97 cells represent an earlier stage of carcinogenesis, they are more differentiated than HT29 cells. Therefore, basal AP activity may be higher in LT97 cells, and the cells may be more resistant to induction of AP activity (28).

Furthermore, we have chosen three selected target genes, which are involved in pathways of cell cycle arrest (*p21*) and apoptosis (*DR5*) or are associated with both processes (*WNT2B*), to obtain more detailed information about the protective capability of the fermented aleurone as well as Synergy1.

In HT29 cells, the fs aleurone was able to induce *p21* on a transcriptional level, and this is associated with a cell cycle arrest as we have shown before (11). Because the fermentation supernatants containing just 2–2.5 mM butyrate were much more effective than butyrate (4 mM) alone and even the feces control could enhance *p21* mRNA expression, again additional factors seem to be present in the fermentation supernatants bearing an effect on cells. Interestingly, in LT97 adenoma cells *p21* mRNA expression was less inducible, but still on a remarkable level. Because butyrate (4 mM) failed to modulate mRNA expression, probably most of the LT97 cells were already in apoptosis caused by an enhanced susceptibility against butyrate in comparison to HT29 cells (unpublished data).

Furthermore, butyrate (4 mM) and the fs (containing 1–2.5 mM butyrate) mostly failed to induce *DR5* on a transcriptional level in both cell lines, contrary to findings of Kim et al., which have demonstrated that 4 mM butyrate induced a 2.4-fold increase of *DR5* expression in HT29 cells (29). Therefore,

experimental conditions such as the time frame (we used 24 h of exposure; no information by Kim et al.) could be a reason for the lack of induction. Medina et al. described that in LIM 1215 colorectal cancer cells the hyperacetylation of DNA–histone complexes appear early after induction with butyrate, resulting in an activation of caspase-3 within 16 h, which is rapidly followed by an apoptotic death (within 24 h) (30). Hence, a shortened exposure time to butyrate could be associated with an increased mRNA expression of *DR5*, which is an early step within the signal cascade of apoptosis. Furthermore, induction of the intrinsic pathway could be responsible for the demonstrated apoptotic effects of the fermented aleurone as has been described for butyrate before (24).

The WNT signaling pathway is constitutively activated in the majority of colorectal cancers (16) by mutation of the *APC* gene, which LT97 and HT29 cells also carry. However, it was reported that a hyperactivation of the WNT signaling pathway in butyrate-treated colon cancer cells is a required event to achieve high levels of apoptosis in these cells (16), which is still mentioned as a marker of secondary chemoprevention. This is in line with our findings because we could report that the fs induced *WNT2B* on the transcriptional level accompanying an enhanced level of apoptotic cells in both cell lines. Again, the fs aleurone and the fs Synergy1 were of equal potency in modulating mRNA expression of all three selected genes, which indicates that the complex dietary fiber source is as effective as the well-known pure dietary fiber source consisting of oligofructose-enriched inulin.

In conclusion, this study provides new interesting insights as to how fermentation products of wheat aleurone may support secondary chemoprevention. Hence, the effects of fermented aleurone point to mechanisms involved in inducing cell cycle arrest as well as apoptosis and differentiation, thereby suppressing the progression of carcinogenesis. Because adenoma cells primarily were found to be more susceptible, this may have important implications for chemoprevention when translated to the *in vivo* situation, because the survival of neoplastic cells could be reduced. Thus, a fiber-rich diet (e.g., with aleurone-enriched products) might be an effective strategy to inhibit growth of colon cancer cells.

ABBREVIATIONS USED

7-AAD, 7-aminoactinomycin D; AP, alkaline phosphatase; APC, adenomatous polyposis coli; DAPI, 4,6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride; DR5, death receptor 5; EU, European; FITC, fluorescein isothiocyanate; fs, fermentation supernatant; RIN, RNA integrity number; SCFA, short-chain fatty acids; SD, standard deviation; U.S., American; WNT2B, wingless-type MMTV integration site family, member 2B.

ACKNOWLEDGMENT

We thank Norbert Wachter, Kampffmeyer Food Innovation GmbH, Germany, for providing the wheat aleurone and Walter von Reding, Bühler AG, Switzerland, for preparation of the aleurone fraction. Furthermore, we thank Anne Franck, OR-AFTI, Belgium, for providing Synergy1. In addition, we thank Brigitte Marian (Institute for Cancer Research, Medical University of Vienna, Austria) for the kind gift of the LT97 cells. Finally, we gratefully acknowledge the excellent assistance by Esther Woschee and Anke Michelmann.

Note Added after ASAP Publication

The abstract was modified in the version of this paper published ASAP December 2, 2009; the corrected version published ASAP December 4, 2009.

LITERATURE CITED

- (1) World Cancer Research Fund. *Food, Nutrition, Physical Activity, and the Prevention of Cancer: a Global Perspective*; American Institute for Cancer Research: Washington, DC, 2007.
- (2) Tan, K. Y.; Seow-Choen, F. Fiber and colorectal diseases: separating fact from fiction. *World J. Gastroenterol.* **2007**, *13* (31), 4161–4167.
- (3) Bingham, S. A.; Day, N. E.; Luben, R.; Ferrari, P.; Slimani, N.; Norat, T.; Clavel-Chapelon, F.; Kesse, E.; Nieters, A.; Boeing, H.; Tjonneland, A.; Overvad, K.; Martinez, C.; Dorronsoro, M.; Gonzalez, C. A.; Key, T. J.; Trichopoulou, A.; Naska, A.; Vineis, P.; Tumino, R.; Krogh, V.; Bueno-De-Mesquita, H. B.; Peeters, P. H.; Berglund, G.; Hallmans, G.; Lund, E.; Skeie, G.; Kaaks, R.; Riboli, E. Dietary fibre in food and protection against colorectal cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC): an observational study. *Lancet* **2003**, *361* (9368), 1496–1501.
- (4) McCullough, M. L.; Robertson, A. S.; Chao, A.; Jacobs, E. J.; Stampfer, M. J.; Jacobs, D. R.; Diver, W. R.; Calle, E. E.; Thun, M. J. A prospective study of whole grains, fruits, vegetables and colon cancer risk. *Cancer Causes Control* **2003**, *14* (10), 959–970.
- (5) Scharlau, D.; Borowicki, A.; Habermann, N.; Hofmann, T.; Klenow, S.; Miene, C.; Munjal, U.; Stein, K.; Gleib, M. Mechanisms of primary cancer prevention by butyrate and other products formed during gut flora-mediated fermentation of dietary fibre. *Mutat. Res.* **2009**, *682* (1), 39–53.
- (6) Beyer-Sehlmeyer, G.; Gleib, M.; Hartmann, E.; Hughes, R.; Persin, C.; Bohm, V.; Rowland, I.; Schubert, R.; Jahreis, G.; Pool-Zobel, B. L. Butyrate is only one of several growth inhibitors produced during gut flora-mediated fermentation of dietary fibre sources. *Br. J. Nutr.* **2003**, *90* (6), 1057–1070.
- (7) Gleib, M.; Hofmann, T.; Kuster, K.; Hollmann, J.; Lindhauer, M. G.; Pool-Zobel, B. L. 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**, *54*, 2088–2095.
- (8) Buri, R. C.; von Reding, W.; Gavin, M. H. Description and characterization of wheat aleurone. *Cereal Foods World* **2004**, *49* (5), 274–281.
- (9) Schatzkin, A.; Mouw, T.; Park, Y.; Subar, A. F.; Kipnis, V.; Hollenbeck, A.; Leitzmann, M. F.; Thompson, F. E. Dietary fiber and whole-grain consumption in relation to colorectal cancer in the NIH-AARP Diet and Health Study. *Am. J. Clin. Nutr.* **2007**, *85* (5), 1353–1360.
- (10) Lupton, J. R.; Turner, N. D. Potential protective mechanisms of wheat bran fiber. *Am. J. Med.* **1999**, *106* (1A), 24S–27S.
- (11) Borowicki, A.; Stein, K.; Scharlau, D.; Scheu, K.; Brenner-Weiss, G.; Obst, U.; Hollmann, J.; Lindhauer, M.; Wachter, N.; Gleib, M. Fermented wheat aleurone inhibits growth and induces apoptosis in human HT29 colon adenocarcinoma cells. *Br. J. Nutr.* **2009**, 1–10 [Epub ahead of print].
- (12) Manus, B.; Adang, R. P.; Ambergen, A. W.; Bragelmann, R.; Armbrrecht, U.; Stockbrugger, R. W. The risk factor profile of recto-sigmoid adenomas: a prospective screening study of 665 patients in a clinical rehabilitation centre. *Eur. J. Cancer Prev.* **1997**, *6* (1), 38–43.
- (13) Richter, M.; Jurek, D.; Wrba, F.; Kaserer, K.; Wurzer, G.; Karner-Hanusch, J.; Marian, B. Cells obtained from colorectal microadenomas mirror early premalignant growth patterns in vitro. *J. Cancer* **2002**, *38* (14), 1937–1945.
- (14) Munjal, U.; Gleib, M.; Pool-Zobel, B. L.; Scharlau, D. Fermentation products of inulin-type fructans reduce proliferation and induce apoptosis in human colon tumour cells of different stages of carcinogenesis. *Br. J. Nutr.* **2009**, *102* (5), 663–671.
- (15) Orchel, A.; Dzierzewicz, Z.; Parfiniewicz, B.; Weglarz, L.; Wilczok, T. Butyrate-induced differentiation of colon cancer cells is PKC and JNK dependent. *Dig. Dis. Sci.* **2005**, *50* (3), 490–498.
- (16) Bordonaro, M.; Lazarova, D. L.; Sartorelli, A. C. Butyrate and Wnt signaling: a possible solution to the puzzle of dietary fiber and colon cancer risk? *Cell Cycle* **2008**, *7* (9), 1178–1183.
- (17) Bohm, A.; Bogoni, C.; Behrens, R.; Otto, T. Method for the extraction of aleurone from bran. World Patent WO 02/15711A2, 2002.
- (18) Klenow, S.; Pool-Zobel, B. L.; Gleib, M. Influence of inorganic and organic iron compounds on parameters of cell growth and survival in human colon cells. *Toxicol. In Vitro* **2009**, *23* (3), 400–407.
- (19) Ebert, M. N.; Klinder, A.; Peters, W. H.; Schaferhenrich, A.; Sendt, W.; Scheele, J.; Pool-Zobel, B. L. Expression of glutathione S-transferases (GSTs) in human colon cells and inducibility of GSTM2 by butyrate. *Carcinogenesis* **2003**, *24* (10), 1637–1644.
- (20) Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248–254.
- (21) Pfaffl, M. W.; Horgan, G. W.; Dempfle, L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res.* **2002**, *30* (9), e36.
- (22) Garcia, M.; Jemal, A.; Ward, E. M.; Center, M. M.; Hao, Y.; Siegel, R. L.; Thun, M. J. *Global Cancer Facts & Figures 2007*; American Cancer Society: Atlanta, GA, 2007.
- (23) Sauer, J.; Richter, K. K.; Pool-Zobel, B. L. Physiological concentrations of butyrate favorably modulate genes of oxidative and metabolic stress in primary human colon cells. *J. Nutr. Biochem.* **2007**, *18* (11), 736–745.
- (24) Hamer, H. M.; Jonkers, D.; Venema, K.; Vanhoutvin, S.; Troost, F. J.; Brummer, R. J. Review article: the role of butyrate on colonic function. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **2008**, *27* (2), 104–119.
- (25) Topping, D. L.; Clifton, P. M. Short-chain fatty acids and human colonic function: roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. *Physiol Rev.* **2001**, *81* (3), 1031–1064.
- (26) Heerdt, B. G.; Houston, M. A.; Augenlicht, L. H. Potentiation by specific short-chain fatty acids of differentiation and apoptosis in human colonic carcinoma cell lines. *Cancer Res.* **1994**, *54* (12), 3288–3293.
- (27) Herz, F.; Schermer, A.; Halwer, M.; Bogart, L. H. Alkaline phosphatase in HT-29, a human colon cancer cell line: influence of sodium butyrate and hyperosmolality. *Arch. Biochem. Biophys.* **1981**, *210* (2), 581–591.
- (28) Mariadason, J. M.; Velcich, A.; Wilson, A. J.; Augenlicht, L. H.; Gibson, P. R. Resistance to butyrate-induced cell differentiation and apoptosis during spontaneous Caco-2 cell differentiation. *Gastroenterology* **2001**, *120* (4), 889–899.
- (29) Kim, Y. H.; Park, J. W.; Lee, J. Y.; Kwon, T. K. Sodium butyrate sensitizes TRAIL-mediated apoptosis by induction of transcription from the DR5 gene promoter through Sp1 sites in colon cancer cells. *Carcinogenesis* **2004**, *25* (10), 1813–1820.
- (30) Medina, V.; Edmonds, B.; Young, G. P.; James, R.; Appleton, S.; Zalewski, P. D. Induction of caspase-3 protease activity and apoptosis by butyrate and trichostatin A (inhibitors of histone deacetylase): dependence on protein synthesis and synergy with a mitochondrial/cytochrome c-dependent pathway. *Cancer Res.* **1997**, *57* (17), 3697–3707.

Received for review September 17, 2009. Revised manuscript received November 12, 2009. Accepted November 17, 2009. This research was supported by the Federal Ministry of Education and Research of Germany (BMBF 0313829A).

2.4. Publikation IV: FERMENTED WHEAT ALEURONE ENRICHED WITH PROBIOTIC STRAINS LGG AND Bb12 MODULATES MARKERS OF TUMOR PROGRESSION IN HUMAN COLON CELLS. Anke Borowicki, Anke Michelmann, Katrin Stein, Daniel Scharlau, Kerstin Scheu, Ursula Obst, Michael Glei. In Begutachtung bei der Zeitschrift *Nutrition and Cancer*. März 2010.

Die Fermentation von Weizenaleuron durch die Darmflora erhöht die luminale Konzentration an aktiven Metaboliten, welche potentiell der Kanzerogenese entgegen wirken können. Eine zusätzliche Gabe von probiotischen Kulturen könnte das Potential von Weizenaleuron noch erhöhen. In dieser Arbeit wurde Weizenaleuron in Kombination mit den Bakterienstämmen LGG und Bb12 fermentiert und das chemopräventive Potential (Modulation des Zellwachstums, der Apoptose, der Differenzierung und der Genexpression) *in vitro* in humanen Kolonzellen verschiedener Transformationsgrade erfasst.

Die Fermentation des Weizenaleurons mit/ohne Zugabe von LGG/Bb12 führte zu einer deutlichen Erhöhung der Konzentration an kurzkettigen Fettsäuren. Die Metabolite zeigten antikanzerogene Effekte, indem vor allem das Wachstum der Krebszelllinien inhibiert und die Differenzierung angeregt wurde. Adenomzellen reagierten sensitiver auf eine Behandlung mit fermentiertem Aleuron \pm LGG/Bb12 als Adenokarzinomzellen. Übertragen auf die menschliche Ernährung könnte eine ballaststoffreiche Kost (beispielsweise durch Aleuron-angereicherte Produkte) in Kombination mit Probiotika eine wichtige Maßnahme darstellen, das Dickdarmkrebsrisiko zu senken.

Eigenanteil:

- Anteilige Durchführung der *in vitro* Fermentation und der Wachstumsuntersuchungen in beiden Krebszelllinien des Kolons
- Anteilige Durchführung der Untersuchungen zur Apoptose, des Zellzyklus und der Aktivität der alkalischen Phosphatase
- RNA-Isolation und anteilige Durchführung der *real-time* qPCR
- Auswertung, Interpretation und Darstellung aller Ergebnisse
- Verfassung des Manuskriptes

1 **Fermented wheat aleurone enriched with probiotic strains LGG and Bb12 modulates**
2 **markers of tumor progression in human colon cells**

3 Anke Borowicki¹ *, Anke Michelmann¹, Katrin Stein¹, Daniel Scharlau¹, Kerstin Scheu²,
4 Ursula Obst², Michael Gleit¹

5
6 ¹ *Friedrich-Schiller-University Jena, Institute for Nutrition, Department of Nutritional*
7 *Toxicology, Dornburger Str. 24, 07743 Jena, Germany*

8 ² *Research Centre Karlsruhe, Institute of Functional Interfaces (IFG), Department of*
9 *Microbiology of Natural and Technical Interfaces, Hermann-von-Helmholtz-Platz 1, 76344*
10 *Eggenstein-Leopoldshafen, Germany*

11

12 *Corresponding author: Dipl. troph. Anke Borowicki
13 Friedrich-Schiller-University Jena
14 Biological-Pharmaceutical Faculty
15 Institute for Nutrition
16 Department of Nutritional Toxicology
17 Dornburger Str. 24
18 07743 Jena
19 **Germany**
20 Tel: ++ 49-36 41-94 96 75
21 Fax: ++ 49-36 41-94 96 72
22 Email: Anke.Borowicki@uni-jena.de

23

24 **Keywords:** Aleurone; Cancer progression; Fermentation; Probiotics

25

26

27 **Abstract**

28

29 Fermentation of dietary fiber by the microflora enhances the levels of effective
30 metabolites which are potentially protective against colon cancer. The specific addition of
31 probiotics may enhance the efficiency of fermentation of wheat aleurone, a source of dietary
32 fiber. We investigated the effects of aleurone, fermented with fecal slurries with the addition
33 of the probiotics LGG and Bb12 (aleurone +), on cell growth, apoptosis and differentiation as
34 well as expression of genes related to growth and apoptosis using two different human colon
35 cell lines (HT29: adenocarcinoma cells; LT97: adenoma cells).

36 The efficiency of fermentation of aleurone was only slightly enhanced by the addition
37 of LGG/Bb12 resulting in an increased concentration of butyrate. In LT97 cells the growth
38 inhibition of aleurone + was stronger than in HT29 cells. In HT29 cells, a cell cycle arrest in
39 G₀/G₁ and the alkaline phosphatase activity, a marker of differentiation, were enhanced by
40 the fs aleurone +. Treatment with all fermentation supernatants resulted in a significant
41 increase in apoptosis and an up-regulation of genes involved in cell growth and apoptosis
42 (*p21* and *WNT2B*).

43 In conclusion, fs aleurone + modulated markers of cancer prevention, namely inhibition
44 of cell growth and promotion of apoptosis as well as differentiation.

45

46

47

48

49

50

51

52

53 Introduction

54

55 Daily consumption of dietary fiber may result in a growth stimulation of health
56 promoting bacteria such as lactobacilli and bifidobacteria in the human gut. This modulation
57 of the gut flora can increase the formation of fermentation products like short chain fatty
58 acids (SCFA), in particular butyrate, propionate and acetate, which may have beneficial
59 effects on intestinal metabolism and health (1). Especially butyrate may be a protective factor
60 against colorectal cancer by acting as a “cancer-suppressing type of agent” (2,3). While
61 butyrate is the major energy source for normal, non-transformed colon cells (4) and thus
62 enhances the survival of these cells (5), it inhibits growth of neoplastic cells, induces their
63 apoptosis and promotes a more differentiated phenotype *in vitro* (6).

64 The health-promoting potential of dietary fiber might be caused in part by prebiotic
65 properties. A prebiotic is defined as “a selectively fermented ingredient that allows specific
66 changes, both in the consumption and/or activity in the gastrointestinal microflora that
67 confers benefits upon host wellbeing and health” (7). Primarily growth of bacteria of the
68 genera *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* are stimulated after consumption of prebiotic food.
69 These lactic acid producing bacteria are also commonly used as probiotics, which are defined
70 as “living microorganism which upon ingestion in certain numbers, exert health benefits
71 beyond inherent general nutrition” (8). Several mechanisms have been proposed for the
72 action of probiotics such as decreasing the levels of the fecal enzymes that may be involved
73 in the formation of carcinogens or reducing the intestinal pH and thereby preventing the
74 growth of harmful bacteria species (9). Recently, evidence has been gathered from animal
75 studies and several human intervention trials that a combination of prebiotics and probiotics,
76 called ‘synbiotics’, may be particularly effective in terms of colorectal cancer prevention (10-
77 12). The synergistic effects are characterized by improving the survival, implantation and
78 growth of newly added probiotic strains in addition to promoting the growth of existing

79 beneficial strains in the colon (11). A synbiotic intervention with oligofructose-enriched
80 inulin as prebiotic and probiotic strains *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) as well as
81 *Bifidobacterium lactis* Bb12 (Bb12) altered certain colorectal cancer biomarkers such as
82 lowering the crypt proliferation index and the capacity of fecal water to induce necrosis in
83 colonic cells (13).

84 Particularly fructooligosaccharides, inulin, lactulose and resistant starch have been
85 shown to exert bifidogenic and therefore chemopreventive properties, but only few studies
86 have emphasized the prebiotic potential of more complex dietary fiber sources especially
87 from grains (14). Wheat grains contain high amounts of dietary fiber, primarily arabinoxylans,
88 and other physiologically relevant substances. The unicellular aleurone layer of the grain
89 forms the outer part of the endosperm and contains the major portion of the beneficial
90 compounds (dietary fiber, polyphenols) in a concentrated form (15). Animal studies (16) and
91 human intervention trials (17,18) have shown that wheat cereals as well as arabinoxylan
92 oligosaccharides may exert a prebiotic potential by increasing the proportion of bifidobacteria,
93 lactobacilli, or both in the gut and by modulating the microflora's metabolism. Furthermore,
94 *in vitro* fermentation of arabinoxylan fractions isolated from the wheat grain increased the
95 populations of lactobacilli and bifidobacteria and probably other saccharolytic genera which
96 produce high levels of SCFA (19-22). Thus, it was of interest to obtain first results *in vitro* as
97 a starting point for the development of a functional food, containing wheat aleurone as a
98 dietary fiber source and a multispecies probiotic (LGG and Bb12). Since several studies
99 provide evidence for multispecies probiotics, containing probiotic strains of more than one
100 genus, being more effective than individual strains (23), we decided to prefer a multispecies
101 probiotic rather than a monostrain probiotic. Previous work (24,25) showed that an *in vitro*
102 fermentation of wheat aleurone by fecal inoculum resulted in increased levels of active
103 metabolites such as SCFA, in particular butyrate, which were able to inhibit cell proliferation

104 and to induce apoptosis as well as differentiation in two different colon cancer cell lines –
105 essential *in vitro* markers of inhibiting tumor progression.

106 The objective of this study was to find out whether an *in vitro* fermentation of aleurone
107 by fecal bacteria combined with probiotic strains LGG and Bb12 would increase the
108 production of SCFA in a greater extent than the sole fermentation of aleurone by fecal
109 bacteria and therefore may enhance the functional value of wheat aleurone. Hence, we
110 analyzed the possible additional effects of aleurone, fermented after enrichment of the fecal
111 slurry with probiotics LGG and Bb12, on markers of colon cancer prevention, namely the
112 influence on cell growth, apoptosis and differentiation as well as expression of genes related
113 to growth and apoptosis in two different human colon cell lines representing an early (LT97)
114 and late (HT29) stage of carcinogenesis, respectively.

115 Altogether, this work will provide information on the potential anticarcinogenic
116 properties of wheat aleurone, fermented with fecal slurries with the addition of the probiotics,
117 and its specific role in prevention of tumor progression to give first hints *in vitro* for
118 developing a functional food consisting of a complex dietary fiber and a multispecies
119 probiotic.

120

121 **Material and Methods**

122

123 *Dietary fiber sources and probiotics*

124 European wheat aleurone was used as dietary fiber source (obtained from Kampffmeyer
125 Food Innovation GmbH (Hamburg, Germany)). Preparation of aleurone fraction (ASP-2
126 preparation with high purity) was done by Bühler AG (Uzwil, Switzerland) according to
127 Bohm et al. (26). To conserve the stability of the samples, aliquots were prepared and stored
128 in air- and light-proof flasks at 4°C. A mixture of probiotic strains was used to maximize
129 efficacy of microbial fermentation. Therefore, *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) from

130 Valio (Helsinki, Finland) and *Bifidobacterium lactis* Bb12 (Bb12) from Christian Hansen
131 (Hørsholm, Denmark) were used according to Rafter et al. (13). Both strains were available
132 as lyophilized highly viable powders ($>\log_{10}$ CFU/g product).

133

134 *Digestion and fermentation of wheat aleurone supported by LGG/Bb12*

135 To investigate the effects of wheat aleurone enriched with LGG and Bb12 on markers
136 of cancer prevention in colon cancer cell lines we used an affordable and easy to handle
137 fermentation model of the whole gastrointestinal tract according to described procedures of
138 Borowicki et al. (24) to generate fermentation supernatants (fs) which can be applied for cell
139 culture experiments. Wheat aleurone (0.5 g fermentable sample) and probiotic strains (LGG
140 and Bb12, each 3×10^9 CFU) were weighed and mixed thoroughly in 10 ml potassium
141 phosphate buffer (0.1 M, pH 7.0). Subsequently, the samples were digested and fermented *in*
142 *vitro* in duplicate using human fecal samples as a source of undefined bacteria. Fecal samples
143 from three different healthy adult Caucasian donors were pooled and diluted by adding five
144 parts of potassium phosphate buffer (0.1 M, pH 7.0) to one part of feces (v/w). The donors
145 consumed their normal diet without any restrictions. The use of nutritional supplements and
146 antibiotics was forbidden at least six months preceding the donation of feces. Altogether, four
147 fermentation samples were produced whereas all samples were fermented by fecal bacteria:
148 *blank -*: feces control; *blank +*: feces control plus LGG/Bb12; *aleurone -*: only aleurone and
149 *aleurone +*: aleurone plus LGG/Bb12. The resulting fs of two fermentation series were
150 pooled to minimize the effects of individual nutrition and composition of the gut flora. The fs
151 were analyzed for the generated concentrations of SCFA by mass spectrometry (GC-MS) as
152 described elsewhere (24) and used to study their effects on markers of colon cancer
153 prevention in colon cell lines of different transformation stages.

154

155

156 *Cell lines and culture conditions*

157 The culture conditions of the cell lines used (HT29 and LT97 human colon cells) have
158 been described in Gleib et al. (27) and Knoll et al. (28). Passages 11-29 of HT29 cells and
159 passages 11-19 as well as 41-43 of LT97 cells were used for the experiments in this study. In
160 regular intervals a mycoplasma test (MycoAlert™ Detection Kit, Lonza, Switzerland) was
161 performed and contamination with mycoplasma was excluded.

162 For cell culture experiments, LT97 cells were incubated with the fs (2.5-20 %, v/v) 1-4
163 days after seeding in ninety-six-well plates (determination of cell growth), six-well plates
164 (determination of apoptosis) or T₂₅ cell culture flasks (experiments on mRNA expression)
165 after reaching a confluence of 50-60 %. HT29 cells were seeded in ninety-six-well plates
166 (0.08×10^6 cells/well) for determination of cell growth, in six-well plates (1.5×10^6 cells/well)
167 to analyze AP activity and cell cycle distribution or in T₂₅ flasks (3×10^6 cells/T₂₅ flask) to
168 quantify mRNA expression. HT29 cells were grown for one day before exposition to the fs
169 (2.5-20 %, v/v). After incubation, LT97 and HT29 cells were trypsinized and suspended in
170 PBS. Viabilities and cell numbers were determined with a CASY cell counter (CASY®
171 model TT, Roche Innovatis AG CASY® technology, Bielefeld, Germany).

172

173 *Determination of cell growth*

174 After 24, 48 or 72 h incubation with the fs, the amount of DNA was quantified using
175 the DNA-specific fluorochrome 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) as described
176 previously as a relative measure of cell number (27). The results were calculated on the basis
177 of the medium control which was set to equal 100 %. The effective mean doses (EC₅₀) of the
178 fs that inhibited growth by 50 % were determined and expressed as percentage (% , v/v).

179

180

181

182 *Determination of cell cycle distribution*

183 To quantify the distribution of cells between cell cycle phases, HT29 cells (2×10^6
184 cells/sample) were stained with nuclear isolation medium-4,6-diamidino-2-phenylindole
185 dihydrochloride (NIM-DAPI: 0.6 % Nonidet P40 and 10 $\mu\text{g/ml}$ DAPI dissolved in PBS) and
186 intercalated DAPI was quantified by flow cytometry as described previously (24).

187

188 *Determination of alkaline phosphatase activity*

189 AP activity in the cell lysates of HT29 cells was measured using *p*-
190 nitrophenylphosphate (5 mM) as substrate according to a described procedure (25). The
191 amount of *p*-nitrophenol liberated was determined spectro-photometrically at 400 nm
192 (SectraFlour Plus, Tecan GmbH, Crailsheim, Germany). All values were based upon the
193 number of cells as has been described elsewhere (29).

194

195 *Detection of apoptosis*

196 To determine the level of apoptosis in both cell lines, 1×10^6 cells were stained with
197 annexin V-FITC as well as 7-amino-actinomycin D (7-AAD) in annexin V binding puffer
198 using the annexin V-FITC/7-AAD kit (Beckman Coulter, Krefeld, Germany) and quantified
199 by flow cytometry as described previously (24).

200

201 *RNA extraction and mRNA expression analysis*

202 Total RNA from LT97 and HT29 cells was isolated using the RNeasy mini kit
203 according the manufacturer's manual (Qiagen, Hilden, Germany), dissolved in 50 μl of
204 RNase free water and stored at -20°C until further use. RNA was quantified and checked for
205 integrity as described previously (25). RNA quality was expressed as an RNA integrity
206 number (RIN). Only RNA samples with a RIN >9.0 were used for further experiments.

207 The expression of selected target genes was analyzed with 2.5 µg of total RNA
208 converted into first-strand cDNA using SuperScript II (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) and
209 an oligo(dT)₁₂₋₁₈ primer. Real-time qPCR was carried out using specific primer pairs and
210 qPCR GreenMaster (Jena Bioscience, Jena, Germany) as described before (25). The
211 following gene-specific primer sequences were used for the quantification: *GAPDH* (5'-
212 ACCCACTCCTCCACCTTTGAC-3' and 5'-CACTGTCTTGTACCCTTG-3'); *DR5* (5'-
213 CCACCTGGACACCATATCTC-3' and 5'-TACAATCACCGACCTTGACC-3'); *p21* (5'-
214 CACTGTCTTGTACCCTTGTG-3' and 5'-CTTCCTCTTGGAGAAGATCAG-3'); *WNT2B*
215 (5'-TCATGCAGAAGTAGCCGA-3' and 5'-ACACCGTAGTGGATGTTGTC-3'). All
216 primers were designed using the freely available PerlPrimer v1.1.17
217 (<http://perlprimer.sourceforge.net>) software. The mRNA expression of the target genes was
218 calculated on the basis of the housekeeping gene *GAPDH* according to Pfaffl et al. (30). For
219 interpretation of all results, fold changes were calculated on the basis of the medium control
220 which was set to 1.0.

221

222 *Statistical evaluation*

223 Means and standard deviations (SD) were calculated from at least three independent
224 experiments. Differences were calculated by one- or two-way ANOVA, including Bonferroni
225 post test with selected pairs, using GraphPad Prism Version 5 for Windows (GraphPad
226 Software, San Diego California, USA). The one-way ANOVA was done to define differences
227 within one group if more than two concentrations were used. The two-way ANOVA was
228 used to define differences between two groups if more than two concentrations were used.
229 Otherwise comparisons of two groups were done with Student's *t*-test. The statistical
230 analyzes used depended on the respective experimental design and are specified in the
231 legends to the figures and tables.

232

233 **Results**

234

235 *Analysis of the SCFA in the fs*

236 The concentrations and the ratios of the three main SCFA (acetate, propionate and
237 butyrate) in the fs are listed in Table 1. The fermented aleurone samples, fs aleurone – and fs
238 aleurone +, contained 2.2-fold and 1.7-fold higher amounts of SCFA than their respective
239 blanks. The probiotics alone (fs blank +) also increased the SCFA concentration by 1.5-fold
240 compared with the fs blank –. The specific cofermentation of aleurone with the probiotics (fs
241 aleurone +) only marginally increased the rate of produced SCFA (1.1-fold) compared to the
242 fs aleurone –. Noteworthy, in particular butyrate was increased 3.8-fold (fs aleurone –) and
243 2.1-fold (fs aleurone +) during fermentation of aleurone, and thus the ratio of SCFA shifted
244 from acetate to butyrate compared with the respective blanks. Addition of probiotics also
245 increased the amount of butyrate 2.3-fold in fs blank + compared to the fs blank –, but only a
246 slight effect (1.3-fold increase) was seen in comparison to fs aleurone –.

247

248 *Modulation of cell growth by the fs in LT97 and HT29 cells*

249 The effects of the fs aleurone ± on cell growth of LT97 and HT29 cells were analyzed
250 using the DAPI assay. The treatment with all fs affected the cell number in a time- and dose-
251 dependent manner in both cell lines. After 24 h, the calculated EC₅₀ (effective concentrations
252 leading to a reduction of 50 % in cell number) was not detectable for any fs whereas after
253 48 h, EC₅₀ ranged from 4.2 % to 10.8 % for LT97 and from 9.5 % to 16.9 % for HT29 cells,
254 respectively (Table 2). In LT97 cells a significant decrease in cell number was already
255 observed after 24 h of treatment with all fs, whereas the number of HT29 cells was only
256 significantly reduced after 48 h of exposure (data not shown). Generally, the growth-
257 inhibiting effects of the fs were stronger in LT97 adenoma cells than in HT29 carcinoma cells.
258 However, after 48 h and 72 h of treatment, the fermented aleurone (fs aleurone –) and

259 aleurone enriched with probiotics (fs aleurone +) reduced cell growth more effectively than
260 the respective fs blank – and fs blank + in both cell lines. In LT97 cells, even after 24 h of
261 exposure the fs aleurone – and the fs aleurone + were more effective than their blanks (data
262 not shown). In addition, in LT97 cells the fs blank – was less effective than the fs blank +.
263 Addition of probiotics resulted in a slight but significant augmentation of growth inhibition of
264 both cell lines after 72 h.

265

266 *Modulation of the cell cycle by the fs in HT29 cells*

267 The antiproliferative effects of the fs on HT29 cells were further characterized by
268 determination of the cell cycle distribution, a relevant marker of cancer prevention. A dose-
269 dependent G₀/G₁ block was observed after treatment with the fs aleurone ± after 24 h of
270 exposure (Fig. 1) and 48 h (data not shown), respectively. This increase of cells in the G₀/G₁
271 phase was accompanied by a decrease of cells in the S and G₂/M phase, as expected. In
272 contrast, after 24 h treatment with the fs blank – but not after 48 h a significant decrease of
273 cells in G₀/G₁ was observed. Enrichment with probiotics (fs aleurone +, 10 %) resulted in a
274 slight, but significant additional inhibition of cell cycle progression caused by a cell cycle
275 arrest in G₀/G₁ in comparison to fs aleurone – (10 %). The addition of probiotics (fs blank +)
276 induced a cell cycle arrest in the G₀/G₁ phase only at a concentration of 10 %, but on a
277 significantly lower level than the fs aleurone +. Butyrate (4 mM), which was used as a
278 positive control, also significantly arrested the cells in the G₀/G₁ phase of the cell cycle in a
279 similar manner as fs aleurone + after 24 h and 48 h, respectively (data not shown).

280

281 *Induction of alkaline phosphatase by the fs in HT29 cells*

282 Tumor cells have lost the ability to respond to some or all of the factors regulating
283 differentiation resulting in less differentiated cells. Thus, the fs were used to analyze the
284 effect on AP activity, a marker of colonocyte differentiation, in the cell lysates of HT29

285 adenocarcinoma cells. The fs aleurone \pm (10 %) significantly induced AP activity 1.6-fold
286 after 48 h and 2.8-fold after 72 h and was more effective than the respective fs blank which
287 modulated the AP activity primarily after 72 h on a significant lower level (Fig. 2). Even after
288 72 h of exposure, the fs blank + affected AP activity more than fs blank – whereas the
289 probiotics (fs aleurone +) had no additional influence. Butyrate (4 mM), which was used as a
290 positive control, also significantly induced the AP activity after 48 h (1.7-fold) and 72 h (1.9-
291 fold), respectively.

292

293 *Induction of apoptosis by the fs in LT97 and HT29 cells*

294 Next, the effects of the fs on another relevant marker of cancer prevention, namely
295 induction of apoptosis, were analyzed by Annexin-V FITC/7-AAD staining and flow
296 cytometry. The basal levels of early apoptotic cells detected in LT97 cells were
297 7.54 % \pm 2.50 % after 24 h and 9.08 % \pm 4.93 % after 48 h, respectively. In HT29 cells, the
298 basal levels of early apoptotic cells were 2.56 % \pm 0.85 % after 24 h as well as
299 4.22 % \pm 0.21 % after 48 h. All fs including the fs blank – as feces control induced the level
300 of early apoptotic cells time-independently in both cell lines (Fig. 3), whereas the fs were
301 more efficient in LT97 cells (2.4-3.3-fold increase in apoptosis) than in HT29 cells (1.8-2.6-
302 fold increase in apoptosis). The effects of fermented aleurone and the respective blank were
303 comparable. Addition of probiotics did not modulate the effects of the fs on apoptosis.
304 However, in HT29 cells, an incubation with fs aleurone + for 48 h increased the apoptosis
305 inducing effect of fs aleurone – by trend ($P=0.1$). The positive control butyrate (10 mM)
306 significantly induced the level of apoptotic cells after 24 h (LT97: 29.67 % \pm 8.31 %; HT29:
307 5.98 % \pm 0.17 %) and 48 h (LT97: 41.30 % \pm 4.53 %; HT29: 9.55 % \pm 1.34 %), respectively.

308

309

310

311 *Effect of the fs on mRNA expression of selected target genes in LT97 and HT29 cells*

312 To obtain information about effects of the fermented aleurone (fs aleurone \pm) on further
313 markers of chemoprevention, the mRNA expression of selected genes, involved in pathways
314 of cell cycle regulation (*p21*), apoptosis (*DR5*), or both events (*WNT2B*) was investigated in
315 LT97 and HT29 cells (Table 3).

316 In LT97 cells, *p21* was induced significantly by the fs aleurone – and non-significantly
317 by the fs aleurone + in comparison to the medium control. The fs aleurone – was more
318 effective than the respective blank which did not modulate mRNA expression. In HT29 cells,
319 *p21* expression was significantly increased by all fs compared to the medium control and by
320 fs aleurone – in comparison to the corresponding fs blank –. Enrichment with the probiotic
321 strains did not further influence the mRNA expression of *p21*. In general, regulation of *p21*
322 expression was less pronounced in LT97 adenoma cells than in HT29 adenocarcinoma cells.

323 Neither in LT97 nor in HT29 cells was the *DR5* mRNA expression significantly
324 modulated compared to the medium control. In LT97 cells, a slight decrease in mRNA
325 expression of *DR5* was observed for both fs blank \pm , whereas treatment with fs aleurone –
326 and fs aleurone + resulted a marginal increase of *DR5* expression in both cell lines.

327 In LT97 cells, the mRNA expression level of *WNT2B* was not modulated by all fs
328 compared with the medium control, whereas in HT29 cells all fs induced *WNT2B*. The
329 fermented aleurone (fs aleurone –) and aleurone enriched with probiotics (fs aleurone +) were
330 of equal potency in inducing *WNT2B* mRNA expression and were significantly more
331 effective than the respective blanks.

332

333 **Discussion**

334

335 Probiotics and prebiotics modify the human gut microflora by enhancing concentrations
336 of beneficial bacteria species such as *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* and diminishing the

337 levels of harmful microorganisms (11). The consumption of probiotics, prebiotics or a
338 combination of both (synbiotics) represents a novel prospect to improve public health.
339 Hereby, the process of carcinogenesis might be diminished or inhibited by modulation of the
340 immune function, binding of potential food carcinogens, reducing bacterial enzymes which
341 metabolize precarcinogenic compounds and increasing concentrations of beneficial SCFA in
342 the colonic lumen (10,14).

343 Therefore, the present work was conducted to analyze if a combination of a complex
344 dietary fiber source (wheat aleurone) and a multispecies probiotic (LGG and Bb12) may
345 enhance the functional value of the sole fiber and if generated fs are able to modulate markers
346 of tumor progression *in vitro*. Detection of relevant effects *in vitro* may provide first hints as
347 starting points for the development of a functional food which could favorably influence
348 intestinal health.

349 The present study provides evidence for an increased production of SCFA during the *in*
350 *vitro* fermentation of wheat aleurone by the colonic microflora obtained from fecal slurries.
351 Primarily the ratio of the SCFA shifted from acetate to butyrate during bacterial degradation
352 of fermentable material, mainly arabinoxylans, comparable to previous results (24). The
353 efficiency of the fermentation of wheat aleurone was only slightly enhanced by the addition
354 of the probiotic strains LGG and Bb12 indicated by an increased concentration of butyrate.
355 This demonstrates that the indigestible compounds of the aleurone might be metabolized by
356 the probiotic strains *in vitro* as was previously demonstrated by others (19,20,22) yielding in
357 augmented amounts of acetate. The generated SCFA caused a lower luminal pH which may
358 be caused by an induced growth of acidophilic bacteria species. These intestinal
359 microorganisms produce mainly lactate and acetate which are metabolized by microbial
360 butyrate producers, in particular by genera of *Roseburia* and *Faecalibacteria* (1). Therefore,
361 the additional fermentation by the probiotic strains LGG and Bb12 may have indirectly
362 increased butyrate production. It was shown that butyrate inhibits growth of neoplastic cells

363 and induces apoptosis as well as differentiation *in vitro* (6). Hence, the augmented butyrate
364 production might be inversely associated with the progression of colorectal cancer (31).

365 Thus, the present experiments were performed to investigate if the increased amounts
366 of butyrate in the fs of aleurone enriched with LGG/Bb12 (fs aleurone +) could modulate the
367 effects of fermented aleurone (fs aleurone –) on markers of chemoprevention in cultured
368 human cell lines representing an early and late stage of colon carcinogenesis. In the present
369 study we found a significant time- and dose-dependent growth inhibition in both cell lines by
370 the fs blank +, fs aleurone – and fs aleurone + which may result primarily from the increase
371 in SCFA, in particular in butyrate, after fermentation of dietary fibers. Hence, the inhibitory
372 properties of the samples were in the order of fs aleurone + \geq fs aleurone –
373 \gg fs blank + $>$ fs blank – analogous to the amount of the contained SCFA (Table 1). These
374 results are in line with other findings, since a synbiotic product consisting of oligofructose-
375 enriched inulin and bacterial strains LGG and/or Bb12 tended to inhibit the growth of HT29
376 cells more effectively than a prebiotic product without probiotics (29) and tended to lower the
377 crypt proliferative index in rats (32) and in polyp patients (13). Moreover, probiotics such as
378 *Bifidobacteria* themselves can have an antiproliferative activity in colon cancer cells *in vitro*
379 (33) and *in vivo* (34) even though the underlying mechanisms are not yet completely
380 understood. However, the feces control (fs blank –) also reduced the growth of LT97 and
381 HT29 cells, although on a much lower level than the fs aleurone. Thus, the feces control may
382 contain other so far unidentified metabolites which are probably part of the fecal inoculum
383 and can inhibit cell growth as we have demonstrated previously (24).

384 Our data show that the growth-inhibitory effect is more efficient in adenoma than in
385 adenocarcinoma cells, particularly after 48 h of exposure to the fermented samples, similar to
386 earlier results (24,35,36). These findings may be a result of a reduced butyrate uptake caused
387 by a downregulation of butyrate transporters in carcinoma compared to adenoma cells (31).

388 Altogether, this may have a relevant impact on chemoprevention, since particularly the
389 survival of preneoplastic cells could be efficiently reduced by increased levels of butyrate.

390 The antiproliferative activity of the fermented aleurone was caused by an arrest of the
391 cells in the G₀/G₁ phase of the cell cycle. It has been demonstrated before that this arrest by
392 fermentation samples is most likely caused by the contained butyrate (24). An arrest in the
393 G₀/G₁ phase of the cell cycle by butyrate has been shown in several colon cancer cell lines
394 (37). In the present finding, the following order for concentrations of butyrate was found:
395 fs aleurone + ≥ fs aleurone – >> fs blank + > fs blank –. Since both the inhibition of cell
396 growth and the induction of a G₀/G₁ arrest in HT29 cells were influenced in the same order,
397 the effects seem to be related to the butyrate contained in the different fs. The addition of the
398 probiotic strains to the fermentation of wheat aleurone increased the effects on cell survival
399 (only after 72 h) and cell cycle progression only slightly, but significantly.

400 Next to the inhibition of cell growth, the promotion of differentiation and the induction
401 of apoptosis are other appreciable mechanisms to prevent tumor progression (2). We
402 previously showed that a treatment with fermented aleurone induced differentiation and
403 apoptosis in HT29 adenocarcinoma cells whereas only apoptosis was induced in LT97
404 adenoma cells (24). The activity of the brush border enzyme AP is a marker of cell
405 differentiation and is thus only slightly active in neoplastic cells (38). In addition to dietary
406 fibers (24) probiotic strains such as *Bifidobacteria* have also been shown to increase the AP
407 activity in colon cancer cells (33). A synbiotic product consisting of oligofructose-enriched
408 inulin and bacterial strains LGG and/or Bb12 enhanced AP activity in a more favorable
409 manner than a prebiotic source mainly based on the amount of produced butyrate (29). In the
410 present experiments, the fs of the combination of aleurone and probiotics (LGG and Bb12)
411 promoted the AP activity in HT29 cells similar to the sole fermented aleurone and to butyrate
412 (4 mM) indicating that higher concentrations of butyrate found in the fs aleurone + (3 mM)
413 could not enhance the effect in comparison to the fs aleurone – (2.4 mM). The fs of the

414 probiotic (fs blank +; 1.4 mM butyrate) still had a significantly higher impact on AP activity
415 than the feces control (blank –; 0.6 mM butyrate). The augmented AP activity in the HT29
416 adenocarcinoma cells demonstrates the potency of butyrate as a differentiating agent in the fs
417 which might be one mechanism of preventing tumor progression *in vitro*.

418 Apoptosis is a physiological process of selected cell deletion and thus important for
419 prevention of tumor progression, if activated in cancer cells. Several animal studies
420 demonstrated a proapoptotic potential of prebiotics (39,40) and primarily of synbiotics
421 (41,42) whereby the impact on apoptosis was attributed to the fermentation-mediated
422 production of luminal butyrate.

423 Here, all fs were of equal potency in inducing apoptosis in both cell lines. This
424 indicates that the addition of aleurone to the fermentation did not increase the effects of the fs
425 on apoptosis. Opposed to this, previous investigations on the proapoptotic activity
426 demonstrated an increased effect of fermented aleurone compared to the feces control (24,25).
427 This discrepancy might be a result of the varying composition of the fecal inoculum, since for
428 every experiment fresh feces of three healthy donors was used. Therefore, ingredients of the
429 fecal inoculum themselves might have affected the level of apoptotic cells and may have
430 masked the proapoptotic effect of fermented aleurone on cells.

431 The mechanisms of anticarcinogenic effects of butyrate possibly involve the regulation
432 of gene expression as a consequence of histone deacetylases inhibition (31). It was assumed
433 that cancer prevention by fermented dietary fiber sources can be mainly attributed to the
434 contained butyrate (29,35,36). To analyze the effects of fs on gene expression, we have
435 selected three relevant target genes, which are involved in cell cycle regulation (*p21*) and
436 apoptosis (*DR5*) or are associated with both processes (*WNT2B*), and are known to be targets
437 of butyrate (37,43,44) to obtain more detailed information about the protective capability of
438 the fs aleurone \pm .

439 The cell cycle inhibitor *p21* was induced on the mRNA level by the fs aleurone ± more
440 than by the respective blank. Thus, the demonstrated arrest of the cell cycle in G₀/G₁ and the
441 inhibition of cell growth by the fs may be caused by a modulated expression of the p21
442 protein. However, the feces control also enhanced *p21* mRNA expression in HT29 cells
443 indicating that additional factors might be present in the fs bearing an effect on gene
444 expression. Since the feces control failed to induce a G₀/G₁ block, the modulation of *p21* on
445 the mRNA level is most likely not solely responsible for the cell cycle modulation.

446 Furthermore, it was shown that all fs were able to increase apoptosis but this effect was
447 not accompanied by an upregulation of *DR5* on the mRNA level. Since Kim et al. reported an
448 increased expression of DR5 in butyrate (4 mM) treated HT29 cells (43), the butyrate
449 concentrations contained in the fs (0.3-3 mM) might be too low to have an influence on
450 mRNA expression of *DR5*. Furthermore, other underlying mechanisms such as modulation of
451 the intrinsic pathway might be responsible for the proapoptotic effect of the fs as was
452 documented for butyrate as well (45).

453 One explanation how the fs could act proapoptotic might be by inducing the WNT
454 signaling pathway as was documented previously after exposure to butyrate (46). Although
455 the WNT signaling pathway is already constitutively activated in the majority of colorectal
456 cancers by a mutation of the *APC* gene (44), a hyperactivation of the WNT signaling pathway
457 in butyrate treated colon cancer cells is a required event to achieve high levels of apoptosis in
458 these cells (46). Therefore, the induction of *WNT2B* mRNA expression might be associated
459 with the butyrate contents of the fs, since the fs aleurone – and the fs aleurone + had a higher
460 impact than the respective blank – and blank +, respectively. However, enhanced
461 upregulation of *WNT2B* after treatment with the fs aleurone ± compared to the respective
462 blank did not result in an increased level of apoptotic cells. Furthermore, the higher impact of
463 the fs on the induction of apoptotic cells in LT97 cells was not associated with an

464 upregulation of *WNT2B*. Hence, other mechanisms seem to be involved in the proapoptotic
465 activity of the fs.

466 In conclusion, this study provides interesting insights how fermentation products of
467 wheat aleurone favorable influence markers of cancer prevention *in vitro*. In addition, the
468 functional value of wheat aleurone was slightly increased by the probiotic strains resulting in
469 an enhanced efficiency of fermentation. Since multispecies probiotics have shown several
470 health-promoting and anticarcinogenic effects *in vivo* (23), the development of a functional
471 food containing wheat aleurone as a dietary fiber source combined with a multispecies
472 probiotic might be an effective strategy to enhance intestinal health and to reduce the risk of
473 getting colon cancer in humans.

474

475 **Acknowledgments and Notes**

476

477 We would like to thank the Federal Ministry of Education and Research, Germany
478 (BMBF 0313829A) for funding. We thank Dr. N. Wachter, Kampffmeyer Food Innovation
479 GmbH, Germany for providing the wheat aleurone and the probiotic strains as well as W. von
480 Reding, Bühler AG, Switzerland for preparation of the aleurone fraction. In addition we
481 thank Prof. B. Marian (Institute for Cancer Research, Medical University of Vienna, Austria)
482 for the kindly gift of LT97 cells.

483 The authors have no conflicts of interest. This article represents original work and has
484 not been submitted to any other journals and if accepted for Nutrition and Cancer it will not
485 be published elsewhere.

486

References

- 487 1. Blaut M: Relationship of prebiotics and food to intestinal microflora. *Eur.J.Nutr.* 41
488 Suppl 1, I11-I16, 2002
- 489 2. Johnson IT, Williamson G, and Musk SR: Anticarcinogenic factors in plant foods: a
490 new class of nutrients? *Nutr.Res.Rev.* 7, 175-204, 1994
- 491 3. Wattenberg LW: Inhibition of carcinogenesis by minor dietary constituents. *Cancer*
492 *Res.* 52, 2085s-2091s, 1-4-1992
- 493 4. Topping DL and Clifton PM: Short-chain fatty acids and human colonic function: roles
494 of resistant starch and nonstarch polysaccharides. *Physiol Rev.* 81, 1031-1064, 2001
- 495 5. Hague A, Singh B, and Paraskeva C: Butyrate acts as a survival factor for colonic
496 epithelial cells: further fuel for the in vivo versus in vitro debate. *Gastroenterology* 112,
497 1036-1040, 1997
- 498 6. Young GP, Hu Y, Le Leu RK, and Nyskohus L: Dietary fibre and colorectal cancer: a
499 model for environment--gene interactions. *Mol.Nutr.Food Res.* 49, 571-584, 2005
- 500 7. Gibson GR, Probert HM, van Loo J, Rastall RA, and Roberfroid MB: Dietary
501 modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics.
502 *Nutr.Res.Rev.* 17, 259-275, 2004
- 503 8. Salminen S, Bouley C, Boutron-Ruault MC, Cummings JH, Franck A et al.: Functional
504 food science and gastrointestinal physiology and function. *Br.J.Nutr.* 80 Suppl 1, S147-
505 S171, 1998
- 506 9. Gupta V and Garg R: Probiotics. *Indian J.Med.Microbiol.* 27, 202-209, 2009
- 507 10. Fotiadis CI, Stoidis CN, Spyropoulos BG, and Zografos ED: Role of probiotics,
508 prebiotics and synbiotics in chemoprevention for colorectal cancer. *World*
509 *J.Gastroenterol.* 14, 6453-6457, 14-11-2008
- 510 11. Liong MT: Roles of Probiotics and Prebiotics in Colon Cancer Prevention: Postulated
511 Mechanisms and In-vivo Evidence. *Int.J.Mol.Sci.* 9, 854-863, 2008

- 512 12. Pool-Zobel BL: Inulin-type fructans and reduction in colon cancer risk: review of
513 experimental and human data. *Br.J.Nutr.* 93 Suppl 1, S73-S90, 2005
- 514 13. Rafter J, Bennett M, Caderni G, Clune Y, Hughes R et al.: Dietary synbiotics reduce
515 cancer risk factors in polypectomized and colon cancer patients. *Am.J.Clin.Nutr.* 85,
516 488-496, 2007
- 517 14. Lim CC, Ferguson LR, and Tannock GW: Dietary fibres as "prebiotics": implications
518 for colorectal cancer. *Mol.Nutr.Food Res.* 49, 609-619, 2005
- 519 15. Buri RC, von Reding W, and Gavin MH: Description and Charaterization of Wheat
520 Aleurone. *Cereal Foods World* 49, 274-281, 3-9-2004
- 521 16. Van Craeyveld V, Swennen K, Dornez E, Van de Wiele T, Marzorati M et al.:
522 Structurally different wheat-derived arabinoxylooligosaccharides have different
523 prebiotic and fermentation properties in rats. *J.Nutr.* 138, 2348-2355, 2008
- 524 17. Costabile A, Klinder A, Fava F, Napolitano A, Fogliano V et al.: Whole-grain wheat
525 breakfast cereal has a prebiotic effect on the human gut microbiota: a double-blind,
526 placebo-controlled, crossover study. *Br.J.Nutr.* 99, 110-120, 2008
- 527 18. Cloetens L, Broekaert WF, Delaedt Y, Ollevier F, Courtin CM et al.: Tolerance of
528 arabinoxylan-oligosaccharides and their prebiotic activity in healthy subjects: a
529 randomised, placebo-controlled cross-over study. *Br.J.Nutr.* 1-11, 10-12-2009
- 530 19. Napolitano A, Costabile A, Martin-Pelaez S, Vitaglione P, Klinder A et al.: Potential
531 prebiotic activity of oligosaccharides obtained by enzymatic conversion of durum wheat
532 insoluble dietary fibre into soluble dietary fibre. *Nutr.Metab Cardiovasc.Dis.* 19, 283-
533 290, 2009
- 534 20. Vardakou M, Palop CN, Christakopoulos P, Faulds CB, Gasson MA et al.: Evaluation
535 of the prebiotic properties of wheat arabinoxylan fractions and induction of hydrolase
536 activity in gut microflora. *Int.J.Food Microbiol.* 123, 166-170, 31-3-2008

- 537 21. Pastell H, Westermann P, Meyer AS, Tuomainen P, and Tenkanen M: In vitro
538 fermentation of arabinoxylan-derived carbohydrates by bifidobacteria and mixed fecal
539 microbiota. *J.Agric.Food Chem.* 57, 8598-8606, 23-9-2009
- 540 22. Hughes SA, Shewry PR, Li L, Gibson GR, Sanz ML et al.: In vitro fermentation by
541 human fecal microflora of wheat arabinoxylans. *J.Agric.Food Chem.* 55, 4589-4595,
542 30-5-2007
- 543 23. Timmerman HM, Koning CJ, Mulder L, Rombouts FM, and Beynen AC: Monostrain,
544 multistrain and multispecies probiotics--A comparison of functionality and efficacy.
545 *Int.J.Food Microbiol.* 96, 219-233, 15-11-2004
- 546 24. Borowicki A, Stein K, Scharlau D, Scheu K, Brenner-Weiss G et al.: Fermented wheat
547 aleurone inhibits growth and induces apoptosis in human HT29 colon adenocarcinoma
548 cells. *Br.J.Nutr.* 103, 360-369, 2010
- 549 25. Borowicki A, Stein K, Scharlau D, and Gleib M: Fermentation Supernatants of Wheat (
550 *Triticum aestivum* L.) Aleurone Beneficially Modulate Cancer Progression in Human
551 Colon Cells. *J.Agric.Food Chem.* 58, 2001-2007, 10-2-2010
- 552 26. Bohm A, Bogoni C, Behrens R, and Otto T: Method for the extraction of aleurone from
553 bran. *World Patent* WO 02/15711A2, 2002
- 554 27. Gleib M, Hofmann T, Kuster K, Hollmann J, Lindhauer MG et al.: Both wheat (*Triticum*
555 *aestivum*) bran arabinoxylans and gut flora-mediated fermentation products protect
556 human colon cells from genotoxic activities of 4-hydroxynonenal and hydrogen
557 peroxide. *J.Agric.Food Chem.* 54, 2088-2095, 22-3-2006
- 558 28. Knoll N, Weise A, Claussen U, Sendt W, Marian B et al.: 2-Dodecylcyclobutanone, a
559 radiolytic product of palmitic acid, is genotoxic in primary human colon cells and in
560 cells from preneoplastic lesions. *Mutat.Res.* 594, 10-19, 22-2-2006

- 561 29. Klinder A, Gietl E, Hughes R, Jonkers N, Karlsson P et al.: Gut fermentation products
562 of inulin-derived prebiotics beneficially modulate markers of tumour progression in
563 human colon tumour cells. *International Journal of Cancer Prevention* 1, 19-32, 2004
- 564 30. Pfaffl MW, Horgan GW, and Dempfle L: Relative expression software tool (REST) for
565 group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time
566 PCR. *Nucleic Acids Res.* 30, e36-1-5-2002
- 567 31. Hamer HM, Jonkers D, Venema K, Vanhoutvin S, Troost FJ et al.: Review article: the
568 role of butyrate on colonic function. *Aliment.Pharmacol.Ther.* 27, 104-119, 15-1-2008
- 569 32. Femia AP, Luceri C, Dolara P, Giannini A, Biggeri A et al.: Antitumorigenic activity of
570 the prebiotic inulin enriched with oligofructose in combination with the probiotics
571 *Lactobacillus rhamnosus* and *Bifidobacterium lactis* on azoxymethane-induced colon
572 carcinogenesis in rats. *Carcinogenesis* 23, 1953-1960, 2002
- 573 33. Baricault L, Denariaz G, Hourii JJ, Bouley C, Sapin C et al.: Use of HT-29, a cultured
574 human colon cancer cell line, to study the effect of fermented milks on colon cancer cell
575 growth and differentiation. *Carcinogenesis* 16, 245-252, 1995
- 576 34. Singh J, Rivenson A, Tomita M, Shimamura S, Ishibashi N et al.: *Bifidobacterium*
577 *longum*, a lactic acid-producing intestinal bacterium inhibits colon cancer and
578 modulates the intermediate biomarkers of colon carcinogenesis. *Carcinogenesis* 18,
579 833-841, 1997
- 580 35. Beyer-Sehlmeyer G, Glei M, Hartmann E, Hughes R, Persin C et al.: Butyrate is only
581 one of several growth inhibitors produced during gut flora-mediated fermentation of
582 dietary fibre sources. *Br.J.Nutr.* 90, 1057-1070, 2003
- 583 36. Munjal U, Glei M, Pool-Zobel BL, and Scharlau D: Fermentation products of inulin-
584 type fructans reduce proliferation and induce apoptosis in human colon tumour cells of
585 different stages of carcinogenesis. *Br.J.Nutr.* 102, 663-671, 2009

- 586 37. Blottiere HM, Buecher B, Galmiche JP, and Cherbut C: Molecular analysis of the effect
587 of short-chain fatty acids on intestinal cell proliferation. *Proc.Nutr.Soc.* 62, 101-106,
588 2003
- 589 38. Siavoshian S, Blottiere HM, Le FE, Kaeffer B, Cherbut C et al.: Comparison of the
590 effect of different short chain fatty acids on the growth and differentiation of human
591 colonic carcinoma cell lines in vitro. *Cell Biol.Int.* 21, 281-287, 1997
- 592 39. Hughes R and Rowland IR: Stimulation of apoptosis by two prebiotic chicory fructans
593 in the rat colon. *Carcinogenesis* 22, 43-47, 2001
- 594 40. Bauer-Marinovic M, Florian S, Muller-Schmehl K, Glatt H, and Jacobasch G: Dietary
595 resistant starch type 3 prevents tumor induction by 1,2-dimethylhydrazine and alters
596 proliferation, apoptosis and dedifferentiation in rat colon. *Carcinogenesis* 27, 1849-
597 1859, 2006
- 598 41. Rowland IR, Rumney CJ, Coutts JT, and Lievens LC: Effect of *Bifidobacterium*
599 *longum* and inulin on gut bacterial metabolism and carcinogen-induced aberrant crypt
600 foci in rats. *Carcinogenesis* 19, 281-285, 1998
- 601 42. Le Leu RK, Brown IL, Hu Y, Bird AR, Jackson M et al.: A synbiotic combination of
602 resistant starch and *Bifidobacterium lactis* facilitates apoptotic deletion of carcinogen-
603 damaged cells in rat colon. *J.Nutr.* 135, 996-1001, 2005
- 604 43. Kim YH, Park JW, Lee JY, and Kwon TK: Sodium butyrate sensitizes TRAIL-
605 mediated apoptosis by induction of transcription from the DR5 gene promoter through
606 Sp1 sites in colon cancer cells. *Carcinogenesis* 25, 1813-1820, 2004
- 607 44. Bordonaro M, Lazarova DL, and Sartorelli AC: Butyrate and Wnt signaling: a possible
608 solution to the puzzle of dietary fiber and colon cancer risk? *Cell Cycle* 7, 1178-1183,
609 1-5-2008
- 610 45. Williams EA, Coxhead JM, and Mathers JC: Anti-cancer effects of butyrate: use of
611 micro-array technology to investigate mechanisms. *Proc.Nutr.Soc.* 62, 107-115, 2003

- 612 46. Lazarova DL, Bordonaro M, Carbone R, and Sartorelli AC: Linear relationship between
613 Wnt activity levels and apoptosis in colorectal carcinoma cells exposed to butyrate.
614 *Int.J.Cancer* 110, 523-531, 1-7-2004
615

Legends to the tables

- Table 1 Concentrations and ratios of the SCFA in fs after *in vitro* fermentation of aleurone – and aleurone + and respective blanks
- Table 2 EC₅₀ (% v/v) of the fs determined in LT97 (*n* 4) and HT29 (*n* 3) cells
- Table 3 Modulated mRNA expression of *p21*, *DR5* and *WNT2B* in LT97 (*n* 3) and HT29 (*n* 3) cells treated with fs (5 % or 10 %) for 24 h. Results are presented as fold changes which were calculated on the basis of the medium control which was set to 1.0

Legends to the figures

Fig.1 Effects of fermentation supernatants (fs; 0 % (□), 5 % (■) and 10 % (■)) on cell cycle phases (G₀/G₁; S; G₂/M) in HT29 cells after treatment with fs blank –, fs blank +, fs aleurone – and fs aleurone + for 24 h. Cell cycle was assessed by intercalation of DAPI into DNA and quantification by flow cytometry. Values are means with their standard deviations depicted by vertical bars (*n* 3). One-way ANOVA and Bonferroni post test with selected pairs were used to calculate the differences from the medium control (*a* *P*<0.05) and two-way ANOVA with post tests was used to determine the differences from the respective blank (*b* *P*<0.05) and from the sample without probiotics (*c* *P*<0.05).

Fig. 2 Effects of fermentation supernatants (fs, 10 %) on alkaline phosphatase activity in HT29 cells after treatment with fs blank –, fs blank +, fs aleurone – and fs aleurone + for 48 h (□) and 72 h (■) as a marker of differentiation. The enzyme activity was assessed by measuring the amount of liberated p-nitrophenol. One unit is defined as the activity that hydrolyzes 1 μmol of substrate per minute at 37 °C. Values are means with their standard deviations depicted by vertical bars (n 3). Student's t -test was used to calculate the differences from the medium control (a $P < 0.05$), from the respective blank (b $P < 0.05$) and from the sample without probiotics (c $P < 0.05$). Parentheses denote that effects vary by trend only ($P = 0.06$).

Fig. 3 Effects of fermentation supernatants (fs, 5 % or 10 %) on early apoptosis in LT97 and HT29 cells after treatment with fs blank –, fs blank +, fs aleurone – and fs aleurone + for 24 h (□) and 48 h (■). Apoptosis was assessed by binding of annexin V and exclusion of 7-AAD. Values are means with their standard deviations depicted by vertical bars (n 3). Student's t -test was used to calculate the differences from the medium control (a $P < 0.05$) and from the respective blank (b). Parentheses denote that effects vary by trend only ($P \leq 0.1$).

Table 1

	*SCFA (mM)			ratio of SCFA (%)
	acetate	propionate	butyrate	
fs blank –	12.80	5.90	6.27	51:24:25
fs blank +	14.63	7.98	14.21	40:22:38
fs aleurone –	20.71	11.20	23.80	37:20:43
fs aleurone +	21.59	12.01	29.73	34:19:47

fs, fermentation supernatant; blank, feces control; SCFA, short chain fatty acids

*Because fs from two fermentations were pooled, only one determination in triplicate could be conducted. A statistical analysis was therefore not possible.

– Indicates an *in vitro* fermentation without addition of probiotic strains LGG and Bb12

+ Indicates an *in vitro* fermentation with addition of probiotic strains LGG and Bb12

Table 2

	*EC ₅₀ (% v/v)							
	LT97				HT29			
	48 h		72 h		48 h		72 h	
fs blank –	10.8±1.7		11.6±1.2		16.4±2.4	d	12.4±0.7	d
fs blank +	7.6±0.5	c	7.6±0.6	c	16.9±2.7	d	11.5±0.7	d
fs aleurone –	5.1±0.9	b	5.1±0.5	b	11.5±2.0	(b),d	7.3±0.3	b,d
fs aleurone +	4.2±0.7	b	4.0±0.5	b,c	9.5±0.4	b,d	5.9±0.4	b,c,d

fs, fermentation supernatant; blank, feces control

*EC₅₀ is defined as effective concentration at which cell number decreased to 50 % of viable cells.

Student's *t*-test was used to calculate the differences from the respective blank (b $P < 0.05$) and from the sample without probiotics (c $P < 0.05$) as well as the differences between LT97 and HT29 cells (d $P < 0.05$). Parentheses denote that effects vary by trend only ($P < 0.06$).

– Indicates an *in vitro* fermentation without addition of probiotic strains LGG and Bb12

+ Indicates an *in vitro* fermentation with addition of probiotic strains LGG and Bb12

Table 3

		LT97 (5 % fs)	HT29 (10 % fs)	
<i>p21</i>	fs blank –	1.10±0.38	10.57±2.11	a
	fs blank +	1.22±0.60	13.41±3.10	a
	fs aleurone –	2.05±0.37	17.75±0.00	a,b
	fs aleurone +	2.23±0.66	18.12±5.44	(a) a
<i>DR5</i>	fs blank –	0.75±0.28	1.04±0.28	
	fs blank +	0.60±0.23	1.16±0.22	
	fs aleurone –	1.32±0.44	1.59±0.62	
	fs aleurone +	1.46±0.62	1.60±0.61	(b)
<i>WNT2B</i>	fs blank –	0.68±0.46	3.99±0.62	a
	fs blank +	1.17±0.79	7.09±2.52	(a)
	fs aleurone –	2.15±1.31	14.32±2.99	a,b
	fs aleurone +	1.60±1.44	15.54±3.60	a,b

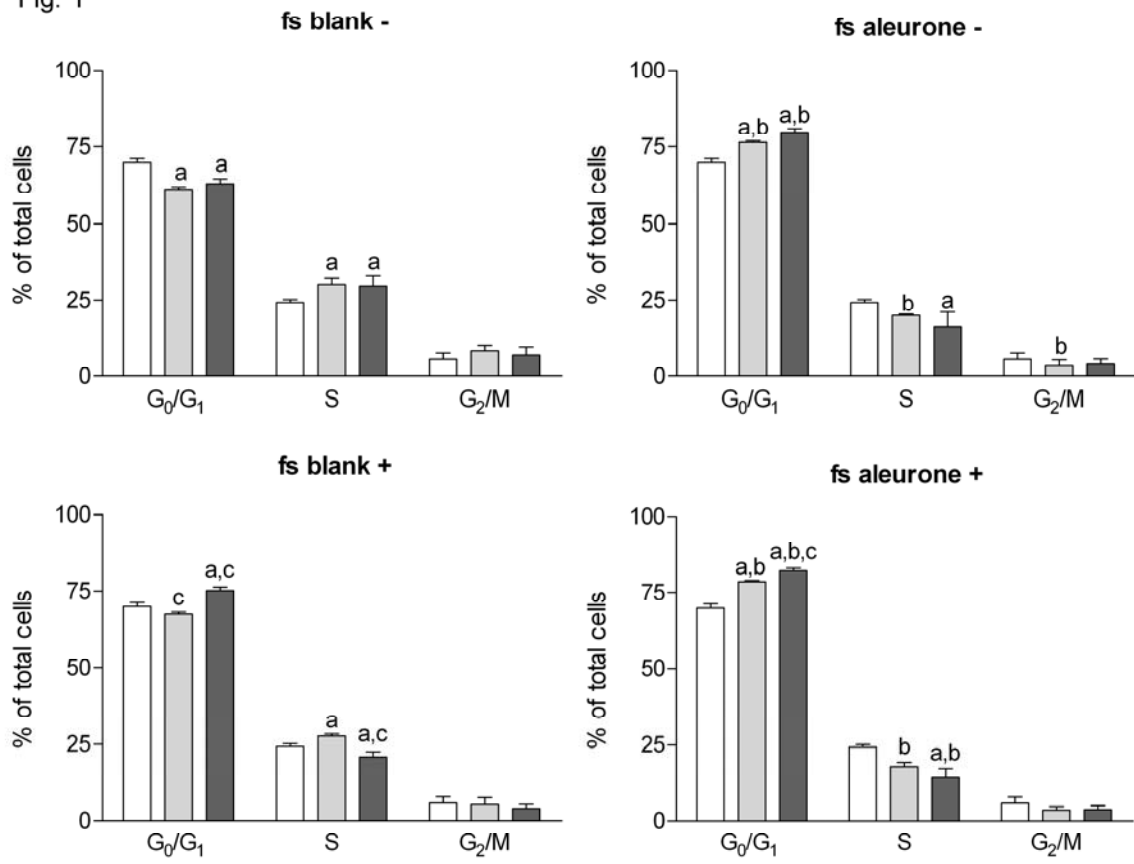
fs, fermentation supernatant; blank, feces control

Student's *t*-test was used to calculate the differences from the respective medium control (a $P < 0.05$) and from the respective blank (b $P < 0.05$). Parentheses denote that effects vary by trend only ($P \leq 0.1$).

– Indicates an *in vitro* fermentation without addition of probiotic strains LGG and Bb12

+ Indicates an *in vitro* fermentation with addition of probiotic strains LGG and Bb12

Fig. 1



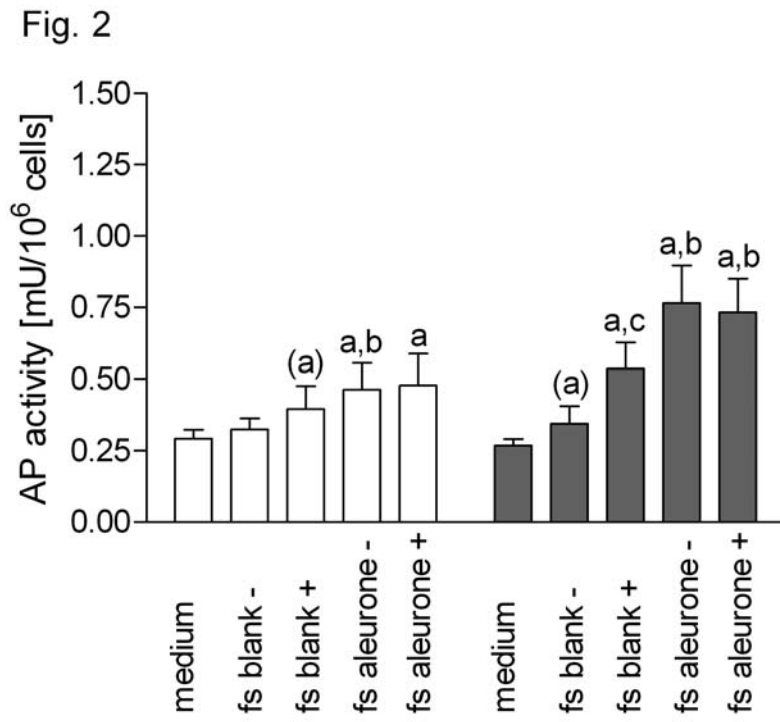
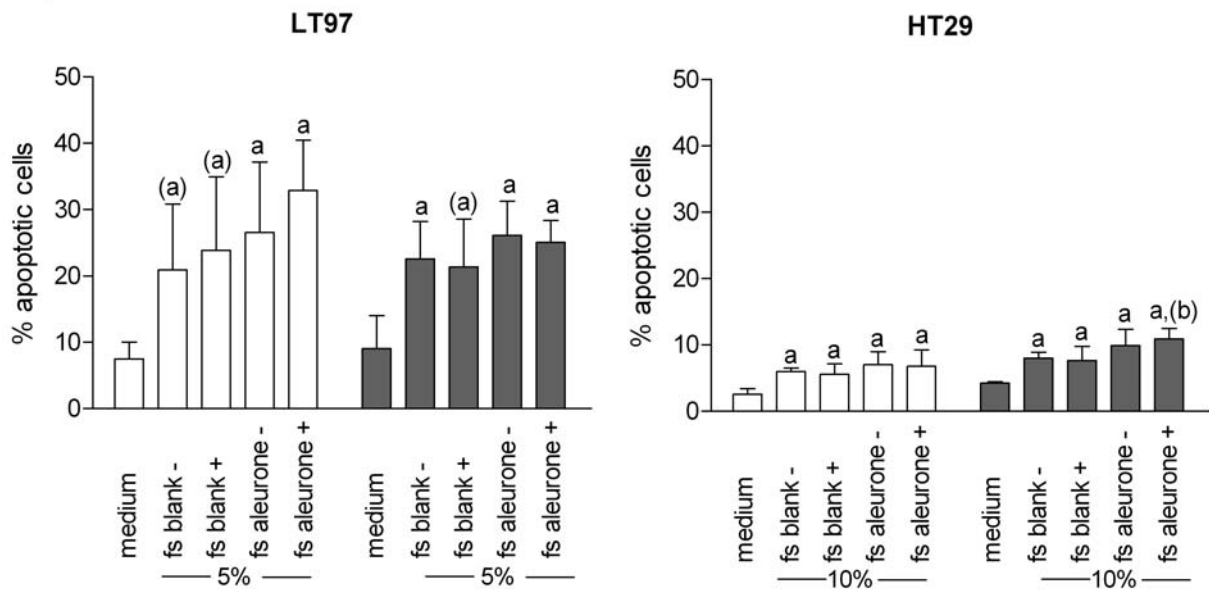


Fig. 3



3. Weitere Ergebnisse

3.1. Bestimmung der Konzentration ausgewählter Fermentationsmetabolite nach einer *in vitro* Fermentation von Synergy1 sowie von Aleuron angereichert mit LGG/Bb12

Im menschlichen Dickdarm werden unverdauliche Nahrungsbestandteile durch die bakterielle Darmflora partiell oder vollständig metabolisiert. Hierbei kann eine Vielzahl an unterschiedlichen Fermentationsmetaboliten entstehen. Insgesamt wurden für die vorliegenden Untersuchungen drei Fermentationsserien durchgeführt (Tab. 2). Im Anschluss an die *in vitro* Fermentation wurden die FÜ einer Fermentationsserie vereinigt, um den Einfluss einer individuellen Ernährung der Fäzesspender zu vermindern. So war es nicht möglich, die Ergebnisse der Analytik statistisch auszuwerten.

Tab. 2 Erläuterung der durchgeführten Fermentationsserien

	Fermentierte Substanzen
Fermentation I	Europäische Weizenfraktionen (Aleuron, Kleie, Mehl)
Fermentation II	Europäisches und amerikanisches Weizenaleuron, Synergy1
Fermentation III	Europäisches Weizenaleuron mit Zusatz von LGG/Bb12

Die Fermentationsüberstände der einzelnen Weizenfraktionen (Fermentation I, II) wurden hinsichtlich ausgewählter Inhaltsstoffe (SCFA, Gallensäuren, Ammoniak) analysiert (**Publikation II**). Darüber hinaus wurden vergleichend im FÜ der Referenzsubstanz Synergy1 dieselben Parameter bestimmt (Fermentation II). Die Konzentration an SCFA wurde nach einem Verfahren von Wang et al. [127] mittels GC-MS, der Gehalt an Gallensäuren nach Burkhardt et al. [128] mittels HPLC-MS quantifiziert. Die Konzentrationsbestimmung Ammoniaks erfolgte kolorimetrisch mittels Berthelot-Reaktion [129].

Die *in vitro* Fermentation von Synergy1 führte in gleicher Weise wie die von Aleuron (**Publikation II**) zu einem deutlich erhöhten Gehalt an Acetat, Propionat und Butyrat, wobei im Vergleich zum FÜ Blank (Fäzeskontrolle) das Verhältnis der SCFA zugunsten von Butyrat verschoben wurde (Tab. 3). Sowohl die Konzentration der primären Gallensäure Cholsäure (CA) als auch der Gehalt an der sekundären

Gallensäure Deoxycholsäure (DCA) konnte durch die Fermentation von Synergy1 gesenkt werden. Die Konzentration an Ammoniak im FÜ Synergy1 war um ein Dreifaches niedriger als im FÜ Blank.

Tab. 3 Konzentrationen an SCFA, deren Verhältnis sowie Konzentrationen an Gallensäuren und Ammoniak im Fermentationsüberstand Synergy1. SCFA, kurzkettige Fettsäuren; CA, Cholsäure; DCA, Deoxycholsäure

	SCFA [mM]			Verhältnis SCFA [%]	Gallensäuren [μ M]		Ammoniak [mM]
	Acetat	Propionat	Butyrat		CA	DCA	
Synergy1	31,78	7,09	25,19	50:11:39	0,16	4,11	3,95

Darüber hinaus wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob eine gezielte Kofermentation des Weizenaleurons mit den probiotischen Kulturen (LGG und Bb12) die Konzentration an tumorpromovierenden Darmfermentationsprodukten (DCA, Ammoniak) weiter senken kann (Fermentation III). Die erhöhte Bildung der SCFA ist in **Publikation IV** aufgeführt.

Bereits die Fermentation von Aleuron durch fäkale Bakterien (Aleuron –) führte zu einer deutlichen Senkung der Konzentration an DCA (6,1-fache Senkung) (Tab. 4) vergleichbar den Ergebnissen der ersten beiden Fermentationsserien (**Publikation II**). Durch die Kofermentation von Weizenaleuron mit den Probiotika LGG/Bb12 und den fäkalen Darmbakterien (Aleuron +) konnte die Bildung von DCA weiter gesenkt werden (2,8-fache Senkung). Die alleinige Gabe der Probiotika führte ebenfalls zu niedrigeren DCA-Gehalten (4,1-fache Senkung) im Vergleich zur Fäzeskontrolle. Die primäre Gallensäure CA wurde in keinem FÜ nachgewiesen.

	DCA [μ M]	Ammoniak [mM]	Tab. 4 Konzentrationen an Gallensäuren und Ammoniak in den Fermentationsüberständen der Fermentation III. DCA, Deoxycholsäure
Blank –	30,70	16,33	– bedeutet, dass die <i>in vitro</i> Fermentation ohne Zugabe der probiotischen Stämme LGG/Bb12 durchgeführt wurde.
Blank +	7,47	12,96	+ bedeutet, dass die <i>in vitro</i> Fermentation unter Zugabe der probiotischen Stämme LGG/Bb12 durchgeführt wurde.
Aleuron –	5,02	22,42	
Aleuron +	1,81	20,58	

Die Ammoniakkonzentration im FÜ nahm durch die Fermentation des Aleurons (Aleuron –) im Vergleich zum FÜ Blank – um das 1,4-fache zu. Die Zugabe der Probiotika führte zu niedrigeren Konzentrationen an Ammoniak im FÜ Blank + (1,3-fache Senkung) und im FÜ Aleuron + (1,1-fache Senkung).

Weiterhin wurde untersucht, mit welcher Kinetik die Fermentationsmetabolite während der Dickdarmsimulation gebildet werden. So wurde eine erneute *in vitro* Fermentation durchgeführt, wobei nach verschiedenen Zeitpunkten (0, 2, 4, 8, 16, 24 h) die Entnahme von Aliquoten erfolgte (Tab. 5).

Tab. 5 Kinetik der SCFA-Konzentrationen, deren Verhältnisse sowie der Konzentrationen an Gallensäuren und Ammoniak in den Fermentationsüberständen. SCFA, kurzkettige Fettsäuren; CA, Cholsäure; DCA, Deoxycholsäure; n.n., nicht nachweisbar

– bedeutet, dass die *in vitro* Fermentation ohne Zugabe der probiotischen Stämme LGG/Bb12 durchgeführt wurde.

+ bedeutet, dass die *in vitro* Fermentation unter Zugabe der probiotischen Stämme LGG/Bb12 durchgeführt wurde.

		SCFA [mM]			Verhältnis SCFA [%]	Gallensäuren [µM]		Ammoniak [mM]
		Acetat	Propionat	Butyrat		CA	DCA	
0 h	Blank –	13,02	4,32	4,23	60:20:20	10,7	42,39	13,78
	Blank +	15,50	4,65	5,49	59:19:22	0,62	20,63	12,23
	Aleuron –	18,48	6,23	7,83	57:19:24	0,56	21,88	13,48
	Aleuron +	18,74	4,87	4,97	66:17:17	0,37	9,36	12,40
2 h	Blank –	10,68	2,48	2,33	69:16:15	0,75	45,48	16,97
	Blank +	17,85	6,96	10,92	50:19:31	0,29	14,58	11,57
	Aleuron –	22,32	8,36	10,73	54:20:26	n.n.	17,30	19,14
	Aleuron +	26,09	9,07	15,41	52:18:30	0,16	2,86	19,31
4 h	Blank –	10,52	2,64	1,83	70:18:12	n.n.	37,29	18,37
	Blank +	18,75	7,62	12,81	48:19:33	n.n.	15,19	11,24
	Aleuron –	21,60	9,42	12,55	49:22:29	n.n.	12,49	23,69
	Aleuron +	26,76	10,75	17,21	49:20:31	n.n.	3,11	16,93
8 h	Blank –	12,53	4,54	4,08	59:22:19	n.n.	41,81	20,65
	Blank +	20,72	8,93	13,47	51:24:25	n.n.	13,70	15,47
	Aleuron –	26,92	11,19	14,64	51:24:25	n.n.	5,67	30,01
	Aleuron +	28,25	11,13	17,83	49:20:31	n.n.	2,92	21,76
16 h	Blank –	13,79	5,91	5,19	55:24:21	n.n.	40,53	24,72
	Blank +	14,16	7,29	11,32	43:22:35	n.n.	12,48	23,04
	Aleuron –	30,99	14,57	17,93	49:23:28	n.n.	2,94	31,16
	Aleuron +	31,17	13,80	19,85	48:21:31	n.n.	1,63	21,74
24 h	Blank –	17,50	8,24	7,44	53:25:22	n.n.	37,20	28,29
	Blank +	17,03	9,23	13,23	43:23:34	n.n.	7,57	24,13
	Aleuron –	27,19	13,78	11,59	52:26:22	n.n.	7,79	43,66
	Aleuron +	27,86	13,19	18,66	47:22:31	n.n.	1,60	31,21

Bereits im FÜ des Ausgangsmaterials (Fäzes) wurden SCFA nachgewiesen (~20 mM). Schon nach einer zweistündigen Dickdarmsimulation von Aleuron konnte die Bildung zusätzlicher SCFA nachgewiesen werden. Eine Fermentation der Fäzeskontrolle ohne Probiotika steigerte den Gehalt an SCFA ebenfalls geringfügig, allerdings war dieser Effekt erst nach 16 h detektierbar. Durch die Zugabe der Probiotika wurde die Bildung deutlich beschleunigt.

Die Konzentration an DCA verringerte sich zeitabhängig. Bereits zu Beginn der Dickdarmsimulation waren für Aleuron- und Aleuron+ 1,9-fach bzw. 2,2-fach niedrigere Gehalte nachzuweisen als für die jeweiligen Fäzeskontrollen. Eine Zugabe der Probiotika unterstützte diese Wirkung.

Zu Beginn der Dickdarmsimulation (0 h) war in allen FÜ Ammoniak nachweisbar. Die zeitabhängige Ammoniakproduktion durch die Fäzesbakterien konnte durch die Zugabe der Probiotika verringert werden.

3.2. Bestimmung des antioxidativen Potentials und Quantifizierung der Ferulasäure

Die gesundheitsfördernden Effekte von Vollkornprodukten sind hauptsächlich auf ihren hohen Gehalt an Ballaststoffen zurückzuführen, allerdings enthalten sie neben Ballaststoffen auch andere physiologisch relevante Inhaltsstoffe z. B. sekundäre Pflanzenstoffe [130]. Wie bereits im Kapitel 1.6.1 erwähnt, sind diese Phytoprotektanten, überwiegend gebundene Ferulasäure verestert mit Arabinoxylanen, im Weizen vor allem in der Aleuronfraktion angereichert.

Im Rahmen des Verbundprojektes „Triple Plus Functional Food“ wurden am Max Rubner-Institut in Detmold die Analysen zur Bestimmung des antioxidativen Potentials (Methode nach Folin-Ciocalteu) und zur Quantifizierung der Ferulasäure (GC-MS nach Ethanol- bzw. alkalischem Aufschluss) sowie die Bestimmungen zur Stabilität der Ferulasäure (GC-MS nach Essigsäureethylester-Extraktion) in den Ausgangsstoffen, den FÜ und den Fermentationspellets, durchgeführt.

3.2.1. Bestimmung des antioxidativen Potentials und des Gehalts an Ferulasäure in den Getreidemustern

Die einzelnen Weizenfraktionen der Getreidemuster – Vollkornmehl, Kleie und Aleuron – wiesen unabhängig von der Weizensorte eine unterschiedlich hohe antioxidative Kapazität auf, ausgedrückt als Gesamtphenolgehalt in Gallussäureäquivalenten (GAE). Das höchste Potential war innerhalb der Aleuronfraktion zu verzeichnen, gefolgt von der Kleiefraktion (Tab. 6). Die Vollkornmehle hatten die niedrigste antioxidative Kapazität. Der Gehalt an gesamter Ferulasäure folgte einem ähnlichen Muster: die Aleuronfraktion enthielt die höchsten Mengen an Ferulasäure, die Mehle den niedrigsten Gehalt an gesamter Ferulasäure. Interessanterweise war der Anteil an freier Ferulasäure in allen Fraktionen vergleichbar. Das antioxidative Potential korrelierte demzufolge mit dem Gehalt an gesamter, überwiegend gebundener Ferulasäure.

Tab. 6 Gehalts an Gallussäureäquivalenten (GAE) sowie gesamter und freier Ferulasäure in den Getreidemustern des Weizens. EU: europäisch, US: amerikanisch

		GAE [mg/g]	Ferulasäure, gesamt [µg/g]	Ferulasäure, frei [µg/g]
EU	Aleuron	3,30	4800,00	16,67
	Mehl	0,90	830,00	16,27
	Kleie	1,80	3540,00	17,56
US	Aleuron	2,90	4360,00	17,67
	Mehl	1,00	800,00	14,80
	Kleie	1,70	3420,00	19,56

3.2.2. Bestimmung des antioxidativen Potentials und des Gehalts an Ferulasäure in den Fermentationsüberständen und Fermentationspellets

Eine Auswahl der Getreidemuster wurde einer *in vitro* Fermentation unterzogen, um den Einfluss der mikrobiellen Fermentationsmetabolite auf verschiedene Endpunkte der Sekundärprävention in humanen Kolonzellen zu untersuchen. Neben der Bestimmung der Konzentration an SCFA, Gallensäuren und Ammoniak wurde das antioxidative Potential (Gesamtphenolgehalt) sowie der Gehalt an Ferulasäure in den FÜ und zum Teil in den Fermentationspellets (Fermentation III) analysiert.

Interessanterweise enthielten die FÜ der Fäzeskontrollen (Blank) den höchsten Gesamtphenolgehalt (Tab. 7). Im FÜ Synergy1, der fermentierten Referenzsubstanz,

waren die niedrigsten Konzentrationen zu verzeichnen. Innerhalb der Weizenfraktionen besaß der FÜ Aleuron den höchsten Gesamtphenolgehalt. Aber auch im Fermentationspellet waren Phenole nachweisbar, wobei wiederum das Aleuron tendenziell die höchste Konzentration enthielt. Das Pellet von Blank + besaß die geringste antioxidative Aktivität. Die Zugabe der Probiotikastämme hatte keinen eindeutigen Einfluss auf das antioxidative Potential im Pellet.

Tab. 7 Gehalt an Gallussäureäquivalenten (GAE) sowie gesamter Ferulasäure in den Fermentationsüberständen (FÜ) und Fermentationspellets der Weizenproben. EU: europäisch, US: amerikanisch; n.b., nicht bestimmbar

– bedeutet, dass die *in vitro* Fermentation III ohne Zugabe der probiotischen Stämme LGG/Bb12 durchgeführt wurde.

+ bedeutet, dass die *in vitro* Fermentation III unter Zugabe der probiotischen Stämme LGG/Bb12 durchgeführt wurde.

		GAE [mg/l]	Ferulasäure, gesamt [µg/ml]
Fermentation I	FÜ Blank	374	n.b.
	FÜ EU Aleuron	373	n.b.
	FÜ EU Mehl	317	n.b.
	FÜ EU Kleie	298	n.b.
Fermentation II	FÜ Blank	431	n.b.
	FÜ Synergy1	338	n.b.
	FÜ EU Aleuron	382	n.b.
	FÜ US Aleuron	381	n.b.
Fermentation III	FÜ Blank –	322	n.b.
	FÜ Blank +	319	n.b.
	FÜ EU Aleuron –	316	n.b.
	FÜ EU Aleuron +	306	n.b.
	Pellet Blank –	214	3,30
	Pellet Blank +	185	1,96
	Pellet EU Aleuron –	253	2,37
	Pellet EU Aleuron +	282	2,83

In allen FÜ war Ferulasäure zwar nachweisbar, allerdings lagen die ermittelten Konzentrationen unterhalb der Nachweisgrenze, so dass eine Quantifizierung nicht durchgeführt werden konnte (Tab. 7). Bei der Fermentation III wurden zusätzlich zu den FÜ auch die Fermentationspellets auf ihren Ferulasäuregehalt analysiert. Im Blank – waren die höchsten Konzentrationen nachweisbar, beim Aleuron enthielt die Probe mit den zugesetzten Probiotikastämmen (Aleuron +) den höheren Gehalt.

Darüber hinaus wurden die FÜ und Fermentationspellets der Kinetikstudie über 24 h auf ihr antioxidatives Potential und den Gehalt an Ferulasäure untersucht.

Interessanterweise nahm die antioxidative Kapazität über die Zeit in allen Proben geringfügig ab, wobei vor Beginn der Dickdarmsimulation (0 h) der FÜ Aleuron – das höchste antioxidative Potential aufwies (Abb. 8).

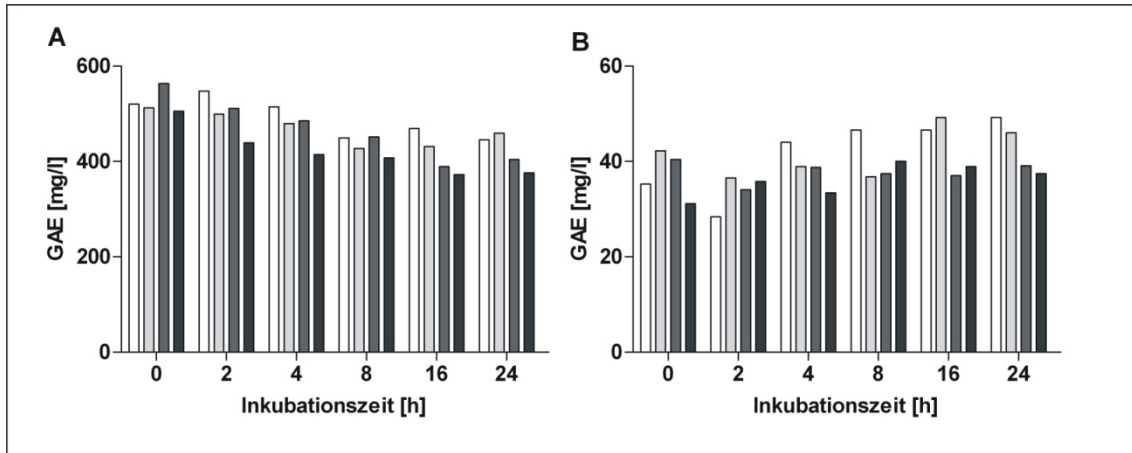


Abb. 8 Gehalt an Gallussäureäquivalenten (GAE) in den Fermentationsüberständen (A) und Fermentationspellets (B) von Blank – (□), Blank + (■), Aleuron – (■) und Aleuron + (■) nach definierten Zeitpunkten.

– bedeutet, dass die *in vitro* Fermentation ohne Zugabe der probiotischen Stämme LGG/Bb12 durchgeführt wurde.

+ bedeutet, dass die *in vitro* Fermentation unter Zugabe der probiotischen Stämme LGG/Bb12 durchgeführt wurde.

Demgegenüber besaß bereits nach 2 h der FÜ Blank – tendenziell die höchste Aktivität. Generell wiesen die jeweiligen Fäzeskontrollen ein höheres antioxidatives Potential auf als die Aleuronproben, vergleichbar mit den Analysedaten der Fermentationsreihen I bis III, allerdings auf einem höheren Niveau.

In den Fermentationspellets war vor allem in den Fäzeskontrollen ein Anstieg der antioxidativen Kapazität nachweisbar. Die Aleuronproben besaßen ein niedriges Potential. Interessanterweise war die detektierte Kapazität im Vergleich zu den FÜ der Reihe III auf einem fünffach niedrigeren Niveau. Die Zugabe der Probiotikastämme hatte wiederum keinen eindeutigen Einfluss auf das antioxidative Potential.

Zusätzlich wurde der Gehalt an gesamt Ferulasäure nach den definierten Zeitpunkten in den Fermentationspellets der Kinetikstudie bestimmt (Abb. 9). Vor Beginn der Dickdarmsimulation war in den Aleuronproben eine 2,5- bzw. 3,3-fach höhere Konzentration an Ferulasäure nachweisbar als in den jeweiligen Fäzeskontrollen, was vermutlich hauptsächlich auf die an Arabinoxylane gebundene Ferulasäure zurückzuführen ist. Nach einer Dickdarmsimulation über 4 h nahm vor allem die

Konzentration im Fermentationspellet Aleuron + deutlich ab. Der Gehalt an Ferulasäure im Pellet Aleuron-, also nach der Fermentation ohne zusätzliche Gabe der Probiotikastämme LGG und Bb12, verringerte sich zeitverzögert, so dass nach der Simulation über 24 h kein merklicher Unterschied zwischen den einzelnen Fermentationspellets mehr nachzuweisen war. Generell deutet eine Abnahme des Gehalts an Ferulasäure im Fermentationspellet darauf hin, dass durch die bakterielle Fermentation eine Freisetzung der gebundenen Ferulasäure erfolgte, welche in den FÜ nachweisbar sein müsste. In den FÜ der Kinetikstudie wurde daher die Konzentration an Ferulasäure bestimmt, wobei allerdings eine Quantifizierung aufgrund zu geringer Gehalte nicht möglich war.

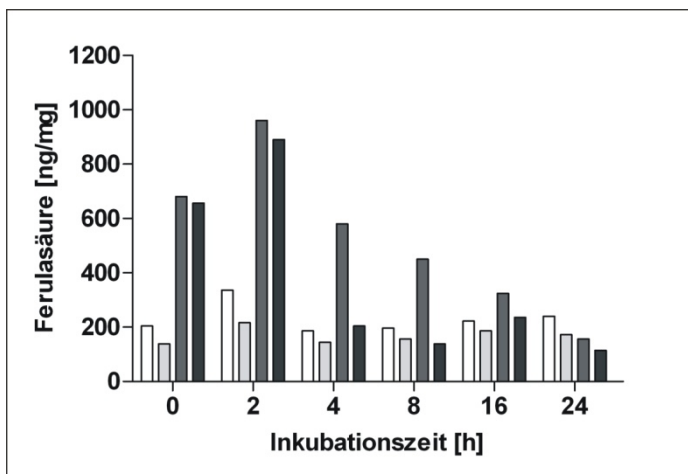


Abb. 9 Gehalt an gesamtter Ferulasäure in den Fermentationspellets von Blank- (□), Blank+ (▒), Aleuron- (■) und Aleuron+ (■) nach definierten Zeitpunkten.

- bedeutet, dass die *in vitro* Fermentation ohne Zugabe der probiotischen Stämme LGG/Bb12 durchgeführt wurde.

+ bedeutet, dass die *in vitro* Fermentation unter Zugabe der probiotischen Stämme LGG/Bb12 durchgeführt wurde.

Diese Analysedaten werfen zwei Fragen bezüglich des Nachweises der antioxidativen Kapazität und der Ferulasäure auf. Zum einen wiesen die FÜ der Ballaststoffquellen (Aleuron und Synergy1) entgegen den Erwartungen ein niedrigeres antioxidatives Potential als die jeweiligen Fäzeskontrollen auf. Zum anderen konnten nach einer Fermentation über 24 h keine nennenswerten Konzentrationen an Ferulasäure detektiert werden, obwohl laut Literatur bis zu 95 % der gebundenen Ferulasäure durch die Enzyme der Mikroflora im Dickdarm freigesetzt werden können. Die Ergebnisse der Kinetikstudie lieferten erste Hinweise darauf, dass durch die Fermentation tatsächlich Ferulasäure freigesetzt wird. Jedoch war in den FÜ aufgrund zu niedriger Konzentrationen an Ferulasäure keine Quantifizierung möglich, so dass die Ferulasäure möglicherweise durch die bakterielle Darmflora rasch metabolisiert wurde. In den nachfolgenden Untersuchungen wurden beide Fragen genauer untersucht.

3.3. Einfluss der Nachbereitung der Fermentationsüberstände auf die antioxidative Kapazität

Um zu überprüfen, ob der erhöhte Gehalt an Phenolen in den Fäzeskontrollen auf eine methodische Ursache zurückgeführt werden kann, wurde eine erneute *in vitro* Fermentation durchgeführt und die resultierenden FÜ sowie die zentrifugierten und sterilfiltrierten FÜ auf ihr antioxidatives Potential untersucht. Direkt nach Beendigung der Dickdarmsimulation enthielt der FÜ Aleuron den höchsten Gesamtphenolgehalt gefolgt von der Fäzeskontrolle (Abb. 10). Bereits nach der ersten Zentrifugation war zwischen den Proben kein Unterschied mehr nachweisbar. Vielmehr enthielt die Fäzeskontrolle nach der Sterilfiltration tendenziell den höchsten Gesamtphenolgehalt, vergleichbar mit den Analysendaten der Fermentationsreihen I bis III. Somit wurde durch die Nachbereitung der Überstände aus der *in vitro* Fermentation der Phenolgehalt nachträglich verändert, indem antioxidative Substanzen durch die Zentrifugationsschritte in das Fermentationspellet übergehen könnten.

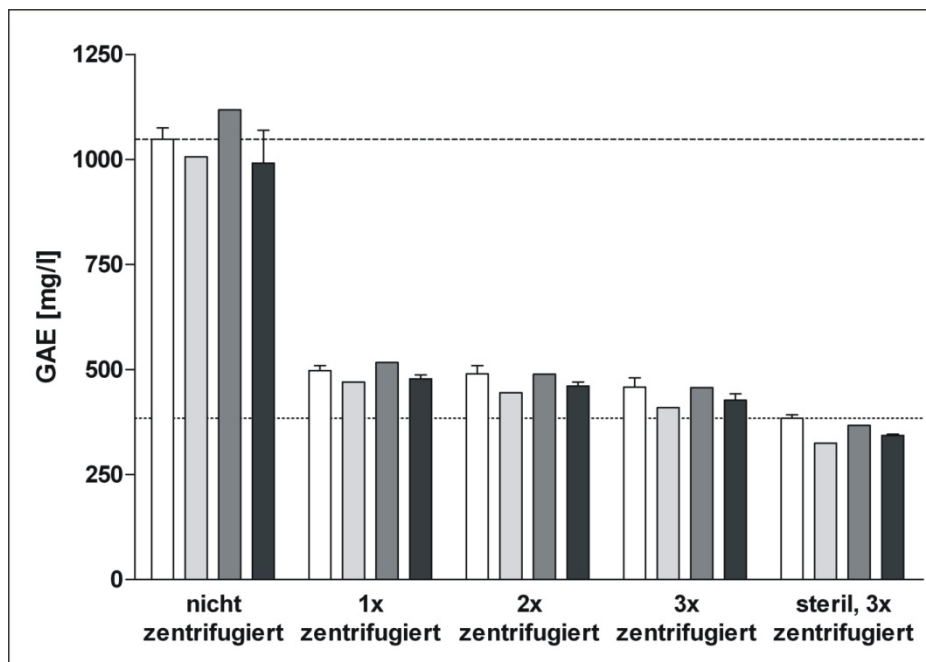


Abb. 10 Die Veränderung der antioxidativen Kapazität durch die Behandlung der Fermentationsüberstände nach Abschluss der *in vitro* Fermentation. Die Proben Blank (□), Synergy1 (■), EU Aleuron (■) und EU Mehl (■) wurden für 24 h einer *in vitro* Fermentation unterzogen, anschließend zentrifugiert und sterilfiltriert (steril).

3.4. Untersuchung der Stabilität der Ferulasäure

Um die Stabilität der Ferulasäure bzw. ihre mikrobiell bedingte Abbaukinetik zu untersuchen, wurde eine *in vitro* Fermentation ausschließlich unter Berücksichtigung der Dickdarmsimulation unter Zugabe synthetischer Ferulasäure über 24 h durchgeführt. Der Gehalt an vorkommenden Ferulasäure-Isomeren und des typischen Metaboliten 3-(4-Hydroxy-3-methoxyphenyl)propionsäure, der durch eine mikrobielle Reduktion der Seitenkette entsteht [131], wurde nach Entnahme der Fäzessuspension sowie anschließender Zentrifugation und Sterilfiltration nach definierten Zeitabständen bestimmt.

Bereits nach einer Fermentation über 4 h konnte keines der beiden cis- und trans-Isomere der Ferulasäure mehr nachgewiesen werden (Tab. 8, Abb. 11). In dem Maße, wie die Ferulasäure abgebaut wurde, stieg die Konzentration des mikrobiellen Metaboliten 3-(4-Hydroxy-3-methoxyphenyl)propionsäure bis zu 6 h stetig an. Bis zum Ende des Experiments war keine weitere Erhöhung nachweisbar.

Tab. 8 Gehalt an gesamt Ferulasäure in den Fermentationspellets.

Inkubationszeit [h]	Ferulasäure, gesamt [µg/ml]
0	570,0
1	364,0
2	73,0
4	0,0
6	0,0
24	0,0

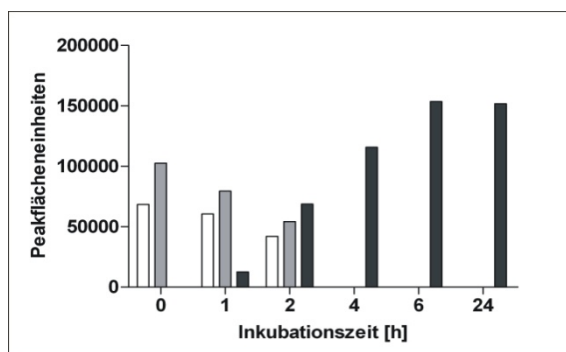


Abb. 11 Kinetik der Bildung bzw. des Abbaus der Ferulasäure-Isomere (cis-Ferulasäure (□), trans-Ferulasäure (■)) und des Metaboliten 3-(4-Hydroxy-3-methoxyphenyl)propionsäure (■) in den Fermentationspellets.

Laut Literaturangaben wird 3-(4-Hydroxy-3-methoxyphenyl)propionsäure durch bakterielle Stoffwechselprozesse, hauptsächlich Demethylierungs- und Dehydroxylierungsreaktionen, vor allem zu Phenylpropionsäuren abgebaut [96,131], was im vorliegenden Experiment nicht nachweisbar war.

4. Diskussion

Chemopräventive Maßnahmen, welche das kolorektale Karzinom – das dritthäufigste Krebsleiden weltweit – verhindern bzw. diesem entgegenwirken, können einen wichtigen Beitrag zur Erhaltung der Gesundheit liefern [1]. Einige Interventionsstudien deuten darauf hin, dass der Verzehr ballaststoffreicher Nahrungsmittel wie Vollkornprodukte, Obst und Gemüse das Risiko senken kann, an Darmkrebs zu erkranken [21,132]. Andere epidemiologische Untersuchungen konnten diesen inversen Zusammenhang nicht bestätigen [63,65]. Diese Diskrepanz ist vermutlich auf verschiedene Ursachen zurückzuführen: so wurden zum einen in den einzelnen Studien sehr unterschiedliche Ballaststoffkonzentrationen eingesetzt, wobei ein protektiver Effekt meist erst bei einer Aufnahme von mindestens 30 g Ballaststoffen pro Tag gezeigt werden konnte, zum anderen sind die Fermentierbarkeit der Ballaststoffquelle und das zusätzliche Vorhandensein von Phytoprotektanten maßgeblich für eine inverse Korrelation verantwortlich [53,63,133]. Somit sind weitere Studien erforderlich, um den Zusammenhang zwischen ballaststoffreichen Nahrungsmitteln und ihrem gesundheitsfördernden Potential noch besser zu beschreiben, insbesondere in Bezug auf die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen der Krebsprävention.

Tier- und Humanstudien deuten darauf hin, dass vor allem Weizeninhaltsstoffe der Darmkrebsentstehung entgegen wirken können, wobei allerdings die Effektivität bisher weder auf einzelne Inhaltsstoffe noch auf bestimmte Substanzgruppen zurückgeführt werden konnte [98,99]. Für ausgewählte Substanzen wie beispielsweise Butyrat, das im Darm durch die bakterielle Fermentation der Ballaststoffe gebildet wird, konnte *in vitro* eine antikanzerogene Wirkung nachgewiesen werden, wohingegen *in vivo* Untersuchungen kontroverse Ergebnisse lieferten [67,98].

Zur besseren Übertragung der *in vitro* beobachteten Einflüsse verschiedener Nahrungskomponenten auf die *in vivo* Situation ist es notwendig, nicht nur die Auswirkung einzelner Inhaltsstoffe zu untersuchen, sondern auch die Effekte komplexer Fermentationsprodukte zu betrachten. Die vorliegende Arbeit hatte somit zum Ziel, die Wirkungsweise von fermentiertem Weizenaleuron auf zelluläre Mechanismen der Kolonkanzerogenese und Tumorprogression anhand von zwei Zellkulturmodellen unterschiedlichen Transformationsgrades zu untersuchen. Dabei sollte zunächst

überprüft werden, in welcher Größenordnung ausgewählte Fermentationsmetabolite gebildet werden und ob die entstandenen FÜ zyto- oder genotoxisch wirken. Einen weiteren Schwerpunkt dieser Arbeit bildeten molekularbiologische Untersuchungen zum Einfluss des fermentierten Weizenaleurons und ausgewählter Fermentationsmetabolite auf die Proliferation, Apoptose und Differenzierung – drei Marker der sekundären Kolonkrebprävention. Darüber hinaus sollte die Effektivität des Weizenaleurons im Vergleich zu anderen Weizenfraktionen (Kleie und Vollkornmehl) und Synergy1, einer reinen Ballaststoffquelle, charakterisiert werden. Ein weiteres Augenmerk lag auf dem Vergleich der Wirkung der FÜ von Weizenaleuron und Weizenaleuron in Kombination mit zwei ausgewählten Probiotikastämmen, *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) und *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb12 (Bb12). Diese Versuche sollten klären, ob das Potential von Weizenaleuron noch gesteigert werden kann, indem die Fermentierbarkeit durch die gezielte Nutzung der Probiotika erhöht wird.

4.1. *In vitro* Fermentation

Mit der *in vitro* Simulation der Verdauung und der Fermentation lassen sich gesundheitsfördernde bzw. gesundheitsschädigende Effekte bestimmter Nahrungsmittelinhaltsstoffe im Zusammenhang mit den komplexen Einflüssen, die von der Darmflora ausgehen, gezielt untersuchen und bestimmte Prozesse der Verdauung im Dickdarm erklären. Dabei finden unterschiedliche Modelle Einsatz, die in ihrer Komplexität stark variieren [118-122,133]. Eine Übersicht zu den verschiedenen *in vitro* Fermentationsmodellen liefern die umfassenden Darstellungen von Macfarlane und Macfarlane [123] sowie von Scharlau et al. [124]. Die Modellsysteme bieten vor allem die Möglichkeit, den physiologischen Abbau von Nahrungskomponenten nachzuvollziehen oder die Auswirkungen einer Nährstoffgabe auf die Entwicklung der Darmflora zu untersuchen [123]. Um zu bestimmen, wie Kolonepithelzellen durch luminal gebildete Metabolite beeinflusst werden, ist es sinnvoll, die Wirkung komplexer FÜ in Zellkultursystemen zu charakterisieren. So wurden in früheren Untersuchungen verschiedene Endpunkte bestimmt wie beispielsweise die Hemmung der Tumorprogression durch Inhibierung der Proliferation und Induktion der Apoptose sowie die Aktivität wichtiger Entgiftungsenzyme [104,133-135]. Dabei wurden die FÜ

ausschließlich durch Simulation der Dickdarmpassage gewonnen. FÜ aus komplexeren Fermentationssystemen (SHIME-, TIM-Modell) besaßen meist eine hohe Zytotoxizität, so dass sie für den Einsatz in Zellkulturstudien ungeeignet waren [125,126]. Die vorliegende Arbeit hatte somit als erstes Ziel, eine bereits etablierte *in vitro* Fermentationsmethode [118] um die Simulation des oberen Verdauungstraktes zu erweitern und die Parameter so anzupassen, dass die Untersuchung verschiedener Endpunkte in Kolonzelllinien möglich ist.

4.1.1. Methoden-Adaptation

Unter *in vivo* Bedingungen wird Stärke durch enzymatische Prozesse bereits im Dünndarm verstoffwechselt und von den Darmzotten absorbiert. Durch die Zugabe von α -Amylase während der Simulation des oberen Verdauungstraktes wurde die enthaltene Stärke des Weizenmehles hydrolysiert, was sich in einem Anstieg der freien Glukose im Retentat und Dialysat widerspiegelte. Ein Teil der freien Glukose wurde durch die Dialyse während der Dünndarmsimulation entfernt (**Publikation I**). Dieser Vorverdau verhindert, dass Stärke und freie Glukose von der bakteriellen Darmflora zu SCFA abgebaut werden können und die Aussage der Ergebnisse verfälschen [136,137]. Zusätzlich konnte die Effektivität der Dialyse durch die Bestimmung des Gehalts an Gallensäuren bestätigt werden, da ein Großteil der in das System eingebrachten Gallensäuren im Dialysat nachweisbar waren. Durch die Dialyse konnte somit die Absorption freigesetzter Metabolite durch das Dünndarmepithel zumindest partiell simuliert werden. Das Fermentationssystem ist allerdings in seiner Komplexität limitiert, da der Stofftransport nur durch passive Diffusion gewährleistet wird. Ein aktiver und selektiver Transport durch die Bürstensaummembran der Darmzotten konnte somit, wie auch in allen anderen Modellsystemen, nicht simuliert werden.

Die Ergebnisse zeigten, dass nach einer in Anlehnung an Aura et al. [133] durchgeführten Simulation des oberen Verdauungstraktes und anschließender Fermentation in den FÜ hohe Konzentrationen an CA und DCA nachweisbar waren, die in Zelllinien zytotoxisch wirkten (**Publikation I**). Eine Studie von Shiraki et al. konnte ebenfalls zeigen, dass 100 μ M DCA die Proliferation von HT29-Zellen inhibierten [138]. Somit musste die innerhalb der Dünndarmsimulation von Aura et al. [133]

eingesetzte sehr hohe Konzentration an Gallensäuren (41,6 g/l) an die zu untersuchenden Nahrungsinhaltsstoffe (Ballaststoffquellen) angepasst werden.

Bei einer ballaststoffreichen Ernährung (30 g/Tag) kann von einer täglichen Ausschüttung von 20-30 g Gallensäuren ausgegangen werden [139]. Durch ein Herabsetzen der in das System eingebrachten Gallensäuren auf eine annähernd physiologische Konzentration (0,6 g/l) wurden die deutlichen zytotoxischen Effekte der FÜ verhindert. Das zytotoxische Potential der so generierten Fäzeskontrolle war dem anderer Untersuchungen vergleichbar, in denen nur die Dickdarmpassage simuliert wurde [104,133]. Damit wurde eine mögliche Maskierung der Wirkung weiterer aktiver Fermentationsmetabolite (z. B. SCFA) durch die Gallensäuren vermindert.

Insgesamt führten die Experimente zur *in vitro* Fermentation zu einer Methode, die die Voraussetzung schafft, die Wirkung aktiver Fermentationsmetabolite komplexer Lebensmittel oder Nahrungsbestandteile in *in vitro* Zellmodellen zu untersuchen. Die *in vitro* Fermentation wurde anschließend für die Gewinnung der FÜ von Weizenaleuron und dessen Vergleichssubstanzen eingesetzt (**Publikationen II, III, IV**).

4.1.2. Fermentationsmetabolite

Zur Charakterisierung der generierten FÜ wurden relevante Metabolite (SCFA, Gallensäuren, Ammoniak) quantifiziert. In allen durchgeführten Versuchsreihen führte die *in vitro* Fermentation des Weizenaleurons durch die bakterielle Darmflora der humanen Fäzesproben zu einer gesteigerten Bildung von SCFA auf das Zwei- bis Dreifache im Vergleich zu den jeweiligen Fäzeskontrollen. Darüber hinaus wurde eine Änderung des SCFA-Verhältnisses zugunsten von Butyrat nachgewiesen (**Publikationen II, IV**). Dieses Ergebnis entspricht einer Erhöhung von SCFA und einer Verschiebung der Proportionen, wie sie nach dem Verzehr hoher Mengen an Ballaststoffen auch *in vivo* messbar sind [24,70]. Hingegen ist das SCFA-Verhältnis in allen Fäzeskontrollen mit dem einer ausgewogenen Normalkost von Acetat:Propionat:Butyrat von 60:20:20 vergleichbar [70]. Eine Fermentation des Weizenvollkornmehls oder der Kleie lieferte wie Aleuron signifikant höhere SCFA-Konzentrationen als die Fäzeskontrolle (**Publikation II**). Allerdings war die Konzentration an Acetat im Vollkornmehl im Vergleich zu Aleuron um ein 1,6-faches erhöht. Dies ist vermutlich auf geringe Konzentrationen an nicht dialysierter Glukose

zurückzuführen, wodurch die SCFA-Konzentrationen erhöht wurden [137]. Eine im Vergleich zum fermentierten Aleuron 1,3-fach niedrigere Konzentration an SCFA im FÜ der Weizenkleie deutet darauf hin, dass Weizenkleie durch die bakterielle Darmflora weniger gut metabolisiert werden konnte als Aleuron oder Weizenvollkornmehl, was bereits von Anson et al. gezeigt wurden [96]. Die Ergebnisse der Fermentationskinetik über 24 h machen deutlich, dass erwartungsgemäß bereits die FÜ der humanen Fäzesproben SCFA (~20 mM) enthielten. In der Festphase humaner Fäzesproben konnte nach Verzehr einer ausgewogenen Mischkost SCFA-Konzentrationen von bis zu 100 mM nachgewiesen werden [24]. Die kontinuierliche Zunahme der Konzentrationen an SCFA in den vorliegenden Untersuchungen verdeutlicht die Verwertung der Ballaststoffe der zugesetzten Substrate bzw. aus den Fäzes durch die bakterielle Mikroflora.

Komplexe FÜ enthalten neben gesundheitsfördernden SCFA auch potentiell tumorpromovierende Substanzen wie Gallensäuren, stickstoffhaltige Verbindungen und Sulfate [8], deren Bildung durch eine fettreiche und ballaststoffarme Kostform gefördert wird [21]. Die Fermentation des Weizenaleurons führte vergleichbar mit den anderen Weizenfraktionen zu einer niedrigeren Konzentration an primärer CA und vor allem an sekundärer DCA im Vergleich zur jeweiligen Fäzeskontrolle (**Publikation II**). Dies ist vermutlich größtenteils auf eine direkte Bindung der Gallensäuren durch die Ballaststoffe des Aleurons zurückzuführen [5]. So konnte bereits zu Beginn der Dickdarmsimulation (0 h) die Konzentration der in den Fäzes enthaltenen Gallensäuren durch Aleuron reduziert werden und die Konzentration an DCA nahm über einen Zeitraum von 24 h deutlich ab. Bereits nach einer vierstündigen Dickdarmsimulation war keine CA mehr nachweisbar. Ein niedriger pH-Wert bewirkt zusätzlich eine reduzierte Löslichkeit der Gallensäuren sowie eine verminderte Aktivität der 7- α -Dehydroxylase [140], so dass die Umwandlung primärer in sekundäre Gallensäuren erschwert wird.

Für Ammoniak, einem Abbauprodukt der proteolytischen Fermentation im distalen Kolon, ist ebenfalls eine tumorpromovierende Wirkung beschrieben worden [141]. Ballaststoffe sind in der Lage, die luminale Ammoniakkonzentration zu vermindern, indem sie der bakteriellen Darmflora als Substrat dienen und so den Ammoniakverbrauch steigern oder die Deaminierung stickstoffhaltiger Verbindungen

verringern [142]. Zudem vermindern Ballaststoffe durch die pH-Wert-Senkung indirekt die Aktivität der Aminosäuren-Decarboxylase, so dass die Bildung stickstoffhaltiger Verbindungen vermindert wird [143]. Stickstoffhaltige Verbindungen können mit Nitrit zu *N*-Nitroso-Verbindungen reagieren, für die im Kolon ein kanzerogenes Potential beschrieben wurde [8]. Durch die Fermentation der Weizenfraktionen konnte die Ammoniakkonzentration allerdings nicht gesenkt werden (**Publikationen II**). Vielmehr führte der bakterielle Abbau der Inhaltsstoffe des Weizens im Vergleich zur Fäzeskontrolle zu einem Anstieg an Ammoniak, wobei die Konzentration mit dem Proteingehalt der einzelnen Fraktionen korrelierte: das Weizenaleuron besaß den höchsten Protein- und Ammoniakgehalt. Auch Cummings et al. konnten nachweisen, dass proteinreiche Ballaststoffquellen (Weizen) zu keiner reduzierten luminalen Ammoniakkonzentration führen (fäkaler Ammoniakgehalt nach Verzehr einer proteinreichen Kost: 30 mM, nach Verzehr einer mit Weizenfaser angereicherten proteinreichen Kost: 28 mM) [142]. Vergleichbar mit der fäkalen Ammoniakkonzentration bei einer proteinarmer Ernährungsweise (15 mM) [142] waren im FÜ der Fäzeskontrolle bereits zu Beginn der Dickdarmsimulation (0 h) 13 mM Ammoniak enthalten, so dass ein Teil des Ammoniaks im FÜ aus den Fäzesproben resultieren könnte.

Insgesamt könnte, übertragen auf die *in vivo* Situation, ein erhöhter Verzehr von Weizenaleuron die Darmgesundheit fördern: zum einen über eine direkte Bindung bzw. einer Verminderung der Bildung von Gallensäuren durch die Inhaltsstoffe von Weizenaleuron oder zum anderen durch die vermehrte Produktion an gesundheitsfördernden SCFA.

4.2. Zytotoxizität und Genotoxizität

In allen durchgeführten Untersuchungen wurde in beiden Zelllinien eine zeit- und konzentrationsabhängige Inhibierung des Zellwachstums durch die Inkubation mit fermentiertem Weizenaleuron nachgewiesen, wobei dieser Effekt größtenteils auf die gebildeten SCFA, im Speziellen Butyrat, zurückgeführt werden konnte (**Publikationen II, III, IV**). Die in Analogie hergestellten synthetischen SCFA-Gemische bzw. Butyrat allein folgten in beiden Zelllinien einem vergleichbaren Verlauf der Wachstumsretardierung wie die komplexen FÜ, allerdings auf einem signifikant

niedrigeren Niveau (*Publikationen II, III*). Damit bestätigen die vorliegenden Ergebnisse Befunde von Beyer-Sehlmeyer et al. [134], in denen verschiedene Ballaststoffquellen (z. B. Weizen, Inulin, Soja, verschiedene Gemüsesorten) auf ihr zytotoxisches Potential in HT29-Zellen untersucht wurden. Zudem vermuteten sowohl Beyer-Sehlmeyer et al. [134] als auch Gamet et al. [144], dass neben Butyrat auch Propionat für eine wachstumsinhibierende Wirkung verantwortlich ist. In den vorliegenden Untersuchungen konnte diese Annahme jedoch nicht bestätigt werden. Die in 20 % FÜ Aleuron enthaltene durchschnittliche Propionatkonzentration von 2,0 mM in Kombination mit Butyrat (4,6 mM) erzielte gegenüber Butyrat allein keine zusätzliche Wirkung. Durch Butyrat wurde vergleichbar mit Ergebnissen von Coradini et al. [145] das Wachstum nach 72 h um 70-80 % (Adenomzellen) bzw. um 60-70 % (Adenokarzinomzellen) inhibiert. Die komplexen FÜ des Aleurons bewirkten nach 72 h sogar eine 95 %-ige Reduktion der Zellzahl von LT97- und HT29-Zellen (*Publikationen II, III, IV*). Da auch die FÜ der Fäzeskontrollen zytotoxisch wirkten, in denen nur niedrige Konzentrationen an SCFA und im Speziellen Butyrat enthalten waren, muss davon ausgegangen werden, dass neben den genannten SCFA für die zytotoxische Wirkung weitere bisher nicht identifizierte Fermentationsmetabolite verantwortlich sind, die womöglich aus unverdauten Nahrungsbestandteilen der Fäzesproben (z.B. Phytoprotektanten wie Phytinsäure, Lignane, Flavonoide [69,99], aber auch Amine, Sulfate, bakterielle Abbauprodukte [52]) resultieren. Gleil et al. [104] vermuteten, dass im FÜ enthaltene Gallensäuren zytotoxisch wirken. In den vorliegenden Untersuchungen konnte allerdings für DCA (7 μ M), enthalten in 20 % FÜ Blank (Fäzeskontrolle), nur in LT97-Zellen eine zytotoxische Wirkung nachgewiesen werden (Inhibierung nach 72 h: 17 % in LT97; 6 % in HT29).

Zwischen der wachstumsinhibierenden Wirkung der einzelnen Weizenfraktionen (Aleuron, Mehl und Kleie) sowie der Weizensorten (EU und US) war kein signifikanter Unterschied nachweisbar. Die Aleuronschicht des Weizens beträgt zwar nur ca. 7-9 % des Weizenkorns und ca. 45-50 % der Kleiefraktion, allerdings sind in dieser Schicht die Substanzen mit einer möglichen hohen biologischen Aktivität (z. B. Ballaststoffe, sekundäre Pflanzenstoffe) konzentriert [93]. So könnte ein Großteil der wachstumsinhibierenden Wirkung der Fermentationsprodukte der Weizenfraktionen auf die Inhaltsstoffe des Aleurons zurückgeführt werden (*Publikation II*).

Nach einer 48-stündigen Inkubation mit den FÜ Aleuron oder den synthetischen SCFA-Gemischen reagierten die Adenomzellen bezüglich der Wachstumsinhibierung 1,6-fach (**Publikation II, III**) bzw. 2,2-fach (**Publikation IV**) sensitiver als die Adenokarzinomzellen. Nach 72 h war die Wirkung der FÜ in beiden Zelllinien vergleichbar. Untersuchungen von Munjal et al. [133], in denen Synergy1 als Ballaststoffquelle für die Fermentation verwendet wurde, reagierten LT97-Zellen ebenfalls empfindlicher auf eine Inkubation mit dem FÜ Synergy1 als HT29-Zellen. Eine erhöhte Sensitivität der Adenomzellen gegenüber den Fermentationsprodukten könnte vermutlich in einer variierenden Butyrat-Aufnahme durch die epitheliale Zellmembran begründet sein [146]. In Tumorzellen sind die Monocarboxylat-Transporter MCT1 und SMCT1 niedriger exprimiert als in nicht-transformierten Kolonzellen, so dass in entarteten Zellen die Absorption und der Metabolismus von Propionat und Butyrat reduziert sind [53,147]. Lambert et al. konnten zeigen, dass die reduzierte mRNA- und Proteinexpression von MCT1 in entdifferenzierten Karzinomzellen am stärksten nachweisbar waren, Adenomzellen besaßen ein höheres Expressionsniveau [148]. Da LT97-Adenomzellen im Gegensatz zu HT29-Adenokarzinomzellen ein frühes Stadium der Kolonkanzerogenese repräsentieren [149], könnten die Monocarboxylat-Transporter auf einem höheren Niveau exprimiert sein als in HT29-Zellen. Unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Empfindlichkeit beider Zelllinien wurden in den nachfolgenden Untersuchungen zur Charakterisierung des chemopräventiven Potentials von fermentiertem Weizenaleuron für LT97-Zellen die Konzentrationen 2,5 % und 5 % und für HT29-Zellen 5 % und 10 % ausgewählt, um in einem subtoxischen Konzentrationsbereich zu arbeiten.

Unter physiologischen Bedingungen werden Ballaststoffe täglich zu mehreren Mahlzeiten durch den Verzehr von Vollkornprodukten, Gemüse und Obst aufgenommen. Das luminale Kolonepithel ist demnach kontinuierlich den daraus resultierenden Fermentationsprodukten ausgesetzt. Für Weizenkleie konnte gezeigt werden, dass die Transitzeit im humanen Darm nach einer täglichen Gabe von ca. 30 g zwischen 32 h und 76 h variieren kann [150]. Die *in vitro* nachgewiesene wachstumshemmende Wirkung des fermentierten Weizenaleurons über einen Zeitraum von 72 h könnte somit auch *in vivo* relevant sein. Übertragen auf die *in vivo* Situation könnten die Fermentationsprodukte des Weizenaleurons möglicherweise effizient das Wachstum vor

allem früherer Krebsstadien vermindern und somit die Ausbildung bösartiger Tumore inhibieren.

DNA-Schädigungen in den Kolonepithelzellen stellen im Organismus einen Risikofaktor für das vermehrte Auftreten von Kolonkrebs dar, da sie die Basis für Mutationen bilden [7]. So wurde auch das DNA-schädigende Potential der FÜ untersucht. Die mittels Comet Assay [151] durchgeführten Untersuchungen belegen, dass von den FÜ der Weizenfraktionen und der Fäzeskontrolle keine DNA-schädigenden Effekte zu erwarten sind (**Publikation II**). Vergleichbare Befunde wurden auch für FÜ aus Arabinoxylanen der Weizenkleie [104] sowie aus Weizen- und Sojamehl [134] mitgeteilt.

4.3. Modulation des Zellzyklus

Die Inhibierung der Proliferation ist ein wichtiger Mechanismus der Sekundärprävention [18]. Es wurde untersucht, ob fermentiertes Weizenaleuron in der Lage ist, den Zellzyklus zu modulieren.

Butyrat als ein Hauptmetabolit des FÜ Aleurons konnte in entarteten Zellen das Wachstum über einen Zellzyklusarrest in der G_0/G_1 -Phase inhibieren [86]. In den eigenen Untersuchungen konnte mittels FÜ Aleuron in HT29-Zellen ebenfalls ein Zellzyklusstopp in der G_0/G_1 -Phase nachgewiesen werden (**Publikation II, IV**). In LT97-Zellen war aus methodischen Gründen eine Untersuchung der Zellzyklusmodulation nicht möglich, da für das verwendete Verfahren eine sehr hohe Zellvereinzellung nötig ist, LT97-Zellen allerdings nur in Aggregaten (5-10 Zellen) überlebensfähig sind (eigene unveröffentlichte Ergebnisse). Der Wachstumsarrest in der G_0/G_1 -Phase des Zellzyklus von HT29-Zellen konnte auf die enthaltene Butyratkonzentration des FÜ Aleurons (2-2,4 mM) zurückgeführt werden, da die synthetischen SCFA-Gemische und Butyrat allein mit einer vergleichbaren Effektivität agierten wie der komplexe FÜ (**Publikation II**). Im Gegensatz hierzu zeigten die Fäzeskontrollen mit einer Konzentration von 0,5 mM Butyrat keinen Einfluss auf den Zellzyklus (**Publikation II**) bzw. sogar eine Zunahme der Zellen in der S-Phase (**Publikation IV**). Vergleichbare Untersuchungen zur Wirkung komplexer FÜ liegen in der Literatur nicht vor.

Hamer et al. belegten, dass ein durch Butyrat-induzierter Wachstumsstopp in der G₀/G₁-Phase aus einer Inhibierung von Histondeacetylasen resultiert, wodurch die Synthese des CDK-Inhibitorproteins p21 induziert wird [53]. Das CDK-Inhibitorprotein p21 bindet an Cyclin D-CDK4- und Cyclin D-CDK6-Komplexen [86], so dass die Phosphorylierung des Retinoblastoma-Proteins verhindert wird. In Folge findet keine Aktivierung der Transkription von Zielgenen statt, die ein Voranschreiten des Zellzyklus ermöglichen. Da keine Informationen bezüglich einer Modulation von *p21* durch komplexe FÜ verfügbar waren, sollte in den vorliegenden Untersuchungen geklärt werden, ob durch Fermentationsprodukte vergleichbar mit Butyrat ein p21-induzierter Wachstumsstopp eingeleitet wird. Die Inkubation von Adenom- und Adenokarzinomzellen mit dem fermentierten Aleuron führte zu einer signifikanten Induktion von *p21* auf mRNA-Ebene (**Publikationen III, IV**), wodurch vermutlich der nachgewiesene Zellzyklusarrest und die damit einhergehende Wachstumsinhibierung ausgelöst wurden. In HT29-Zellen konnten auch die Fäzeskontrollen die Expression von *p21* erhöhen (**Publikationen III, IV**), möglicherweise durch unverdaute Nahrungsbestandteile oder bakterielle Abbauprodukte [52]. Da der FÜ Aleuron einen stärkeren Effekt als die Positivkontrolle Butyrat (4 mM) zeigte, müssen neben Butyrat weitere, bisher nicht identifizierte Fermentationsmetabolite, für den induktiven Effekt verantwortlich sein. Denkbar wären beispielsweise sekundäre Pflanzenstoffe wie Phytinsäure, Lignane und Flavonoide [98]. Interessanterweise war die *p21*-Induktion durch den FÜ Aleuron in den Adenomzellen geringer als in den Adenokarzinomzellen, was sich vermutlich partiell durch die unterschiedlich verwendeten Konzentrationen begründen lässt (LT97: 5 % FÜ, HT29: 10 % FÜ). Darüber hinaus war die Basalexpression von *p21* in LT97-Zellen auf einem höheren Niveau als in HT29-Zellen (eigene unveröffentlichte Ergebnisse), so dass die Adenomzellen möglicherweise geringer stimulierbar waren als die Adenokarzinomzellen.

4.4. Modulation der Apoptose

Viele Studien deuten darauf hin, dass Butyrat in transformierten Kolonozyten über extrinsische, aber auch intrinsische Wege die Apoptose induziert, wenngleich die molekularen Mechanismen noch nicht vollständig geklärt sind [78,82]. Im Gegensatz

hierzu gibt es nur wenige Studien, die sich mit dem apoptotischen Potential komplexer FÜ oder synthetischer SCFA-Gemische befassen [133].

In Untersuchungen zur Induzierbarkeit der Apoptose durch fermentiertes Aleuron wurde gezeigt, dass bei beiden Zelllinien der Anteil an frühapoptotischen Zellen, gekennzeichnet durch die Externalisierung des Phosphatidylserins, gesteigert werden konnte (**Publikation II, III, IV**). Zusätzlich war in beiden Zelllinien nachweisbar, dass die Aktivität der Caspase-3 – einer Effektorcaspase, die innerhalb der Apoptose eine zentrale Rolle spielt – durch die Inkubation mit dem FÜ Aleuron induziert wurde. Interessanterweise variierten die Effekte im Vergleich zur Fäzeskontrolle zwischen den verschiedenen Fermentationsserien. So war die apoptotische Wirkung des FÜ Aleuron der einen Fermentation signifikant höher als der Einfluss der Fäzeskontrolle (**Publikationen II, III**). Demgegenüber konnte in einer weiteren Fermentationsserie der FÜ Aleuron die Apoptoserate gegenüber der Fäzeskontrolle nicht erhöhen (**Publikation IV**). Diese divergierenden Effekte resultierten möglicherweise aus der unterschiedlichen Komposition der Fäzesproben beider Fermentationsserien, da für jeden Versuchsansatz frische Fäzes von drei gesunden Spendern verwendet wurden und die Beschaffenheit der Fermentationsprodukte durch unverdaute Nahrungsbestandteile und durch die Zusammensetzung der Darmflora beeinflusst wird [70]. Aus diesem Grund könnten bereits in den Fäzes enthaltenen Substanzen Einfluss auf die Induzierbarkeit der Apoptose genommen haben, so dass ein mögliches apoptotisches Potential des fermentierten Aleurons maskiert wurde.

Die synthetischen SCFA-Gemische und Butyrat allein, die die Konzentrationen in den komplexen FÜ widerspiegeln, induzierten nach 24 h die frühe Apoptose in LT97-Zellen in gleicher Weise wie die FÜ (1,0-1,2 mM Butyrat in 5 % FÜ Aleuron) (**Publikation III**). Demgegenüber waren die SCFA-Gemische in HT29-Zellen nicht in der Lage, die Anzahl an apoptotischen Zellen zu erhöhen (2,0-2,4 mM Butyrat in 10 % FÜ Aleuron) (**Publikation II**). Vergleichbare Resultate lieferten die Untersuchungen von Munjal et al., in denen ein SCFA-Gemisch (Konzentration an Butyrat: 1,3 mM bzw. 2,6 mM) die PARP-Spaltung als Marker der Apoptoseinduktion in LT97-Zellen, jedoch nicht in HT29-Zellen induzierte [133]. Eine mögliche Ursache hierfür könnte sein, dass in Kolonkarzinomzellen erst ab einer Butyratkonzentration von 4 mM Apoptose

induziert wurde [89]. Die vorliegenden Ergebnisse deuten auf das chemopräventive Potential von fermentiertem Weizenaleuron vor allem in früheren Stadien der Krebsentstehung hin.

Die chemopräventive Wirkung des Butyrats ist zumindest teilweise auf die Wirkung als Histondeacetylasen-Inhibitor zurückzuführen, wodurch die DNA für Transkriptionsfaktoren zugänglicher wird [152]. Hierdurch kann die Expression von Genen moduliert werden, die in die Prozesse der Zellproliferation, der Differenzierung und der Apoptose eingreifen [53]. Kim et al. vermuteten, dass Butyrat in Adenokarzinomzellen die TRAIL-vermittelte Apoptose auslöst, indem der Transkriptionsfaktor Sp1 an die DNA bindet, wodurch eine Induktion des Todesrezeptors DR5 veranlasst wird [82], was in HT29-Zellen gezeigt werden konnte. Butyrat (4 mM) induzierte die mRNA-Expression von *DR5* auf ein 2,4-faches [82]. Die zugrunde liegenden Mechanismen einer Apoptoseinduktion durch komplexe FÜ sind bisher nicht geklärt. Da durch die Fermentationsprodukte des Aleurons weder die Aktivität der Caspase-9 noch die Aktivität der Casapse-8 induziert werden konnte, lieferten die Untersuchungen zunächst keinen Hinweis, ob der extrinsische oder der intrinsische Weg der Apoptose in die Wirkungsweise des fermentierten Aleurons involviert ist. Da sich in Adenomzellen Butyrat als ein effektiver Metabolit des Aleurons erwiesen hat, wurde in den vorliegenden Untersuchungen die Induzierbarkeit von *DR5* auf der mRNA-Ebene nach Inkubation mit fermentiertem Aleuron analysiert.

Dabei zeigte sich, dass sich die nachgewiesenen apoptotischen Effekte des fermentierten Aleurons sowohl in LT97- als auch in HT29-Zellen nicht auf eine erhöhte Expression von *DR5* zurückführen lassen (***Publikationen III, IV***). Möglicherweise waren einerseits die Konzentrationen an Butyrat (5 % FÜ 1,0-1,2 mM, 10 % FÜ: 2,0-2,4 mM) in den FÜ zu gering, um die Expression vergleichbar den Ergebnissen von Kim et al, die erst ab einer Konzentration von 4 mM einen solchen Effekt nachweisen konnten [82], zu modulieren. Andererseits könnte ein ungünstig gewähltes Zeitfenster von 24 h ursächlich sein. So belegten Medina et al., dass in Kolonkarzinomzellen durch eine Butyratinkubation zeitnah die Histondeacetylierung inhibiert wurde, wodurch nach 16 h eine erhöhte Caspase-3-Aktivität zu verzeichnen war, gefolgt von einem apoptotischen Abbau der Zellen innerhalb von 24 h [89]. Demzufolge könnte womöglich nach einer verkürzten Inkubationszeit die mRNA-Expression von *DR5* als

ein frühes Ereignis der Apoptose gesteigert sein. So deuten erste noch unveröffentlichte Ergebnisse darauf hin, dass Butyrat (2 und 10 mM) in HT29-Zellen bereits nach einer Inkubation über 6 h die mRNA-Expression von *DR5* im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle auf ein Fünffaches induzierte (Scharlau, persönliche Mitteilung).

Aktuelle Studien konnten zeigen, dass durch eine erhöhte Aktivierung des WNT- β -Catenin-Signalweges in transformierten Kolonzellen Apoptose ausgelöst werden kann [68]. Durch eine Inkubation mit dem fermentierten Aleuron wurde die Expression von *WNT2B* auf mRNA-Ebene in den Adenomzellen (**Publikation III**) und den Adenokarzinomzellen (**Publikationen III, IV**) induziert. WNT2B ist ein Ligand, der an Membran-gebundene Rezeptoren der Frizzled-Familie binden kann, wodurch der WNT- β -Catenin-Signalweg ausgelöst wird [68]. In LT97-Zellen konnte die *WNT2B*-Expression im Gegensatz zu HT29-Zellen durch den FÜ Aleuron nur tendenziell induziert werden. Da allerdings in beiden Zelllinien eine apoptotische Wirkung (Externalisierung des Phosphatidylserins und Erhöhung der Caspase-3-Aktivität) nachgewiesen wurde, konnte nicht eindeutig belegt werden, dass die erhöhte Anzahl an apoptotischen Zellen in einer Aktivierung des WNT- β -Catenin-Signalweges begründet ist. Somit sind weitere Untersuchungen notwendig, um die molekularen Mechanismen der apoptotischen Wirkung der Fermentationsprodukte des Aleurons zu klären und herauszufinden, welche Metabolite, neben Butyrat, für diese Wirkung verantwortlich sind.

4.5. Modulation der Zelldifferenzierung

Bereits Weiser konnte in isoliertem Dünndarmgewebe der Ratte nachweisen, dass die Aktivität der alkalischen Phosphatase in den Enterozyten von der Kryptbasis zur Villuszone hin zunahm und einhergeht mit einem erhöhten Differenzierungsgrad [153]. Kolonozyten im oberen Drittel der Darmkrypten weisen ebenfalls einen differenzierteren Phänotyp als Zellen der Kryptbasis auf [154,155].

Die intestinale alkalische Phosphatase als ein Marker der Differenzierung wird in neoplastischen, entdifferenzierten Zellen auf einem sehr niedrigen Niveau exprimiert [156]. Verschiedene Untersuchungen bestätigen, dass Butyrat, aber auch Propionat und Valerat das Potential besitzen, in Adenokarzinomzellen die Aktivität der alkalischen Phosphatase zu steigern [53,157,158]. Bisher sind kaum Studien bekannt, in denen die

differenzierende Wirkung komplexer FÜ untersucht wurde [134]. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass der FÜ Aleuron in HT29-Zellen die Aktivität der alkalischen Phosphatase induzierte, wohingegen die Fäzeskontrolle nur einen geringen Einfluss ausübte (**Publikationen III, IV**). Dieses Ergebnis reflektiert vermutlich den Einfluss des enthaltenen Butyrats.

Interessant ist, dass die Enzymaktivität in Adenomzellen durch Butyrat und den FÜ im Wesentlichen nicht gesteigert werden konnte (**Publikation III**). Kolonozyten unterliegen den Schritten der physiologischen Abfolge: Proliferation, Differenzierung, Apoptose und Abschilferung ins Darmlumen. Demzufolge kann Butyrat zunächst die Differenzierung stimulieren, wonach anschließend apoptotische Prozesse induziert werden [154]. Orchel et al. belegten, dass Butyrat in einer Konzentration von > 5 mM in HT29- und CaCo2-Zellen Apoptose induzierte, wobei eine Differenzierung der Zellen ausblieb [157]. So könnte zum einen aufgrund einer möglichen erhöhten Sensitivität der Adenomzellen gegenüber Butyrat ein Großteil der Zellen bereits apoptotisch sein. Zum anderen repräsentieren Adenomzellen ein frühes Krebsstadium, so dass sie vermutlich noch einen höheren Differenzierungsgrad aufweisen als Adenokarzinomzellen. Da die basale Aktivität der alkalischen Phosphatase in LT97-Zellen auf einem höheren Niveau lag als in HT29-Zellen, könnte sich eine erhöhte Resistenz gegenüber Differenzierungsmarkern ergeben haben [159].

4.6. Zusätzlicher Wert des Aleurons gegenüber reinen Ballaststoffquellen

In den hier dargestellten Untersuchungen zur Wirkung von Fermentationsmetaboliten des Weizenaleurons im Vergleich zu Synergy1 konnte kein erhöhtes chemopräventives Potential in entarteten Kolonozyten nachgewiesen werden (**Publikation III**). Sowohl fermentiertes Weizenaleuron als auch der FÜ Synergy1 waren in gleicher Weise in der Lage, in entarteten Kolonozyten Apoptose zu induzieren, die Aktivität der alkalischen Phosphatase als einen Differenzierungsmarker zu steigern und Gene zu induzieren, die in der Zellproliferation (*p21*) und in apoptotischen Prozessen (*WNT2B*) eine Rolle spielen.

Die ähnliche Wirkung beider Ballaststoffquellen deutet auf die Vermittlung der Effekte durch die vergleichbar gebildeten SCFA-Konzentrationen hin (**Publikation III**). Durch die Fermentation von Weizenaleuron konnte der Gehalt an Gallensäuren in

vergleichbarer Weise reduziert werden wie durch Synergy1, so dass die zugrunde liegenden Mechanismen wie die Hemmung der 7α -Dehydroxylase oder Bindung primärer und sekundärer Gallensäuren offensichtlich unabhängig von der eingesetzten Ballaststoffquelle sind. Allerdings konnte durch eine Fermentation von Synergy1 im Gegensatz zur proteinhaltigen Ballaststoffquelle Weizenaleuron die Ammoniakbildung reduziert werden. Dieser Effekt von Synergy1 hatte aber keinen zusätzlichen nachweisbaren Einfluss auf das chemopräventive Potential in entarteten Kolonzellen.

Im Gegensatz zu reinen Ballaststoffquellen wie Synergy1 (Oligofruktose-angereichertes Inulin) enthält Weizenaleuron neben einem hohen Anteil an Ballaststoffen auch gesundheitsfördernde Inhaltsstoffe (Hydroxyzimtsäuren, Flavonoide), die nach der Freisetzung im Dickdarm ein antioxidatives Potential entfalten können [93,160]. Dadurch könnten beide Substanzgruppen den Kolonepithelzellen in hohen Konzentrationen zur Verfügung stehen und eventuell additiv oder synergistisch eine chemopräventive Wirkung entfalten. In den unfermentierten Ausgangssubstanzen (Aleuron, Kleie und Mehl) korrelierte der Gehalt an Antioxidantien (ausgedrückt als Messung der antioxidativen Kapazität) und im Speziellen an gebundener Ferulasäure mit dem Anteil der enthaltenen Ballaststoffe.

Hingegen waren nach der Fermentation in allen FÜ ähnliche Konzentrationen an Antioxidantien zu verzeichnen, wobei die Fäzeskontrolle den höchsten Gesamtphenolgehalt aufwies. Diesem Resultat könnte die Ursache zugrunde liegen, dass während der Aufbereitung der FÜ nach Beendigung der Dickdarmsimulation der Phenolgehalt nachträglich verändert wurde. So könnten unverdaute Komponenten möglicherweise phenolische Substanzen binden, so dass diese innerhalb der einzelnen Zentrifugationsschritte aus dem FÜ abgetrennt wurden. Allerdings gibt es derzeit keine Untersuchungen, die diesen Zusammenhang belegen können.

Zusätzlich konnte nur in den Fermentationspellets Ferulasäure nachgewiesen werden. Die innerhalb der bakteriellen Fermentation freigesetzte Ferulasäure könnte zügig zu weiteren Abbauprodukten (vor allem Phenylpropionsäuren) verstoffwechselt worden sein [96,161]. In den durchgeführten Untersuchungen war die im System eingesetzte synthetische Ferulasäure bereits nach 4 h nicht mehr nachweisbar, demgegenüber nahm der Anteil des Metabolits 3-(4-Hydroxy-3-methoxyphenyl)-propionsäure stetig zu. Dieser kann anschließend über weitere bakterielle

Stoffwechselprozesse zu 3-Phenylpropionsäure abgebaut werden [96,131], was aber im vorliegenden Experiment nicht nachweisbar war. Die FÜ, die in Zellkulturuntersuchungen eingesetzt wurden, enthielten demnach keine freie Ferulasäure, die zusätzlich ein antioxidatives oder antikanzerogenes Potential hätte ausüben können. Allerdings könnte unter *in vivo* Bedingungen die aus Weizenaleuron freigesetzte Ferulasäure durchaus chemopräventiv wirken. So zeigten Untersuchungen zur Fermentationskinetik, dass die Konzentration an Ferulasäure in den Fermentationspellets stetig abnahm, woraus zu schließen ist, dass Ferulasäure von den Arabinoxylanen abgespalten wurde. Freie Ferulasäure könnte anschließend direkt über passive Diffusion oder aktive Transportsysteme von den Kolonzellen des Dickdarmepithels aufgenommen werden [97] und dort vor oxidativen Stressoren und kanzerogenen Stoffen schützen [108].

Resümierend stellt das Weizenaleuron zu dem bereits ausführlich untersuchten Synergy1 eine äquivalente Ballaststoffquelle dar und ist darüber hinaus ein natürlicher Bestandteil eines bedeutenden Grundnahrungsmittels, dem Weizenvollkornbrot.

4.7. Kofermentation von Aleuron durch die Probiotika LGG und Bb12

Durch die Kofermentation von Weizenaleuron mit probiotischen Kulturen und der fäkalen Mikroflora sollte untersucht werden, ob das Potential von Weizenaleuron noch gesteigert werden kann, indem die Fermentierbarkeit durch die Probiotika erhöht wird.

Eine gezielte Zugabe der Probiotikastämme LGG und Bb12 konnte die Bildung kurzkettiger Fettsäuren im Vergleich zur alleinigen Fermentation des Aleurons durch die bakterielle Mikroflora weiter steigern (**Publikation IV**). Dies bedeutet, dass die Ballaststoffe des Aleurons, vergleichbar mit weiteren Studien [114,117], aber auch andere im Fäzes enthaltene Nahrungsbestandteile durch die probiotischen Kulturen verwertet wurden. Darüber hinaus führten die gebildeten SCFA zu einer Senkung des pH-Werts von 6,38 auf 5,45, wodurch das Wachstum acidophiler Bakterienspezies gefördert werden könnte (**Publikationen II, IV**), was von Blaut bereits belegt wurde [162]. Milchsäurebakterien in der Darmflora produzieren vornehmlich Acetat und Lactat, die durch butyratbildende Bakterienarten der Gattungen *Roseburia* und *Faecalibacteria* metabolisiert werden [162]. Durch Zugabe von LGG und Bb12 zu den

Weizenfraktionen könnte somit indirekt die Bildung von Butyrat erhöht werden, was zu einer Verminderung der Tumorprogression im Kolon führen könnte [53].

Die Konzentration der sekundären Gallensäure DCA konnte durch die zusätzliche Gabe der Probiotikastämme LGG und Bb12 im Vergleich zu den Proben ohne Probiotika (Fäzeskontrolle bzw. Aleuron) um ein 4,1- bzw. 2,8-faches gesenkt werden. Dies ist vermutlich einerseits auf eine reduzierte Aktivität der 7 α -Dehydroxylase in Milchsäurebakterien zurückzuführen, wodurch die Umwandlung primärer in sekundäre Gallensäuren vermindert wird [163]. Andererseits konnte gezeigt werden, dass Probiotika direkt Gallensäuren binden können [164,165]. Da Gallensäuren die Tumorprogression begünstigen [166] und in der Lage sind, die antiproliferative Wirkung von Butyrat zu vermindern [163,167], ist die Senkung der Konzentration an Gallensäuren im Sinne der Krebsprävention als positiv zu bewerten.

Eine Addition der probiotischen Stämme verminderte die Ammoniakbildung im Vergleich zu den Proben ohne Probiotika. Vermutlich ist dieser Effekt auf die vermehrte SCFA-Bildung und die damit verbundene pH-Wert-Senkung zurückzuführen, wodurch die Bildung stickstoffhaltiger Verbindungen, bedingt durch eine gesenkte Aktivität der Aminosäuren-Decarboxylase, vermindert wird [143]. Dies kann auch die Entstehung von tumorpromovierenden *N*-Nitroso-Verbindungen reduzieren [8].

Insgesamt kann eingeschätzt werden, dass durch die gezielte Kofermentation mit den probiotischen Kulturen die Fermentierbarkeit des Weizenaleurons gesteigert wurde, was sich vor allem in den erhöhten SCFA-Konzentrationen widerspiegelt und auch funktionelle Konsequenzen haben könnte.

Die vorliegenden Untersuchungen diesbezüglich zeigten, dass die zusätzliche Gabe von LGG und Bb12 die zytotoxische Wirkung des FÜ Aleuron erhöhte, wobei die Inhibierung des Zellwachstums mit den enthaltenen SCFA-Konzentrationen korrelierte: kombiniertes Produkt (Aleuron + Probiotika) > Aleuron > probiotisches Produkt > Fäzeskontrolle ohne Zugabe der Probiotika (**Publikation IV**). Dabei kann die zytotoxische Wirkung der FÜ teilweise auf einen induzierten Wachstumsarrest in der G₀/G₁-Phase des Zellzyklus zurückgeführt werden. Vergleichbare Resultate zeigten Untersuchungen, in denen Oligofruktose-angereichertes Inulin gemeinsam mit den probiotischen Stämmen LGG und Bb12 fermentiert wurde, wonach das Wachstum von

Adenokarzinomzellen inhibiert [47] und die Proliferationsrate in den Kolonkrypten von Ratten [61] und polypösen Krebspatienten [62] reduziert wurden. Probiotischen Kulturen, beispielsweise der Gattung *Bifidobacterium*, wurden ebenfalls antiproliferative Eigenschaften sowohl *in vitro* (HT29-Zellen) als auch *in vivo* (Ratte) zugesprochen [41,168].

In experimentellen Tierstudien konnten sowohl für verschiedene Präbiotika (Oligofruktose, Inulin [55] und resistente Stärke [169]) als auch für Synbiotika (*Bifidobacterium longum*/Inulin [60] bzw. resistente Stärke/*Bifidobacterium lactis* [170]) ein apoptotisches Potential nachgewiesen und auf die luminal gebildeten erhöhten Konzentrationen an SCFA zurückgeführt werden. Zusätzlich konnten Rowland et al. belegen [60], dass das Synbiotikum (*Bifidobacterium longum*/Inulin) effektiver als seine Einzelkomponenten wirkte. Die vorliegenden *in vitro* Ergebnisse in humanen Zelllinien bestätigen dieses allerdings nicht (**Publikation IV**).

Die Aktivität der alkalischen Phosphatase als ein Differenzierungsmarker wurde durch fermentiertes Aleuron induziert, die Wirkung war vermutlich in den enthaltenen Butyratkonzentrationen begründet (**Publikation III, IV**). Ein Synbiotikum bestehend aus Oligofruktose-angereichertem Inulin und Bb12 induzierte in HT29-Zellen die Aktivität der alkalischen Phosphatase signifikant effektiver als das Präbiotikum allein, was wiederum auf den erhöhten Gehalt an Butyrat zurückgeführt wurde [135]. Der FÜ der Kofermentation von Aleuron durch die fäkale Mikroflora mit den probiotischen Bakterien LGG und Bb12, in dem 3 mM Butyrat enthalten waren, wirkte in der vorliegenden Studie gleichermaßen effektiv wie der FÜ Aleuron (2,4 mM Butyrat) (**Publikation IV**). Die alkalische Phosphatase konnte auch durch die Kofermentation der Fäzesprobe mit den Probiotika (1,4 mM Butyrat) auf einem niedrigeren Niveau induziert werden. Diese Ergebnisse deuten im Hinblick auf die Induzierbarkeit der alkalischen Phosphatase innerhalb eines definierten Zeitraumes auf ein enges Wirkspektrum von Butyrat hin.

Insgesamt belegen die vorliegenden Untersuchungen, dass durch eine gezielte Kofermentation des Aleurons durch LGG und Bb12 vor allem die antiproliferative Wirkung des fermentierten Aleurons gesteigert werden konnte, vermutlich auf den erhöhten Gehalt SCFA, im Speziellen Butyrat, zurückzuführen.

4.8. Zusammenfassende Schlussfolgerungen

Zusammenfassend können aus den Untersuchungen dieser Arbeit folgende Schlussfolgerungen abgeleitet werden:

- Die Erweiterung eines *in vitro* Fermentationsmodells um die Simulation des oberen Verdauungstraktes sowie die Anpassung der zugesetzten Konzentration von Gallensäuren an den Verzehr einer ballaststoffreichen Kost sind Voraussetzung, die Wirkung aktiver Fermentationsmetabolite komplexer Lebensmittel oder Nahrungsbestandteile in *in vitro* Zellmodellen zu untersuchen.
- Eine *in vitro* Fermentation von Weizenaleuron durch die bakterielle Darmflora führt zu erhöhten Konzentrationen an gesundheitsfördernden SCFA, im Speziellen Butyrat, und einem niedrigeren Gehalt der tumorpromovierenden Gallensäure DCA.
- Proteinarme oder -freie Ballaststoffe besitzen eine höhere Effizienz, lumenale Konzentrationen an Ammoniak zu senken als proteinreichere Ballaststoffe aus Weizenvollkornprodukten.
- Die Aleuronschicht als eine ballaststoffreiche, fermentierbare Subfraktion des Weizenkorns könnte für eine gesundheitsfördernde Wirkung im Kolon verantwortlich sein, da Fermentationsprodukte im *in vitro* Zellkulturmodell verschiedene Mechanismen der sekundären Krebsprävention induzieren.
- Fermentiertes Weizenaleuron ist in der Lage, das Wachstum von Adenom- und Adenokarzinomzellen zu inhibieren, indem die Proliferation gehemmt und die Apoptose induziert wird.
- Eine Proliferationshemmung geht mit einer erhöhten Expression des CDK-Inhibitorproteins *p21* auf mRNA-Ebene einher, wodurch ein Wachstumsstopp in der G₀/G₁-Phase des Zellzyklus ausgelöst wird.
- Auch wenn die molekularen Mechanismen einer apoptotischen Wirkung des fermentierten Weizenaleurons noch nicht vollständig geklärt sind, erscheint es wahrscheinlich, dass durch eine erhöhte Aktivierung des WNT-β-Catenin-Signalweges Apoptose induziert werden kann, da die Fermentationsprodukte des Aleurons die mRNA-Expression von *WNT2B* steigern. Eine TRAIL-vermittelte Apoptoseinduktion, ausgelöst durch eine erhöhte mRNA-Expression von *DR5*, kann für das untersuchte Zeitfenster ausgeschlossen werden.

- Fermentiertes Weizenaleuron ist in der Lage, in Adenokarzinomzellen die Aktivität der alkalischen Phosphatase als einen Marker der Differenzierung zu induzieren.
- Das chemopräventive Potential des Weizenaleurons ist größtenteils auf den Fermentationsmetaboliten Butyrat zurückzuführen.
- Eine unterstützende Kofermentation mit den probiotischen Bakterienstämmen LGG und Bb12 verstärkt die gesundheitsfördernde Wirkung des Weizenaleurons, indem die Konzentration an SCFA erhöht und der Gehalt an tumorpromovierender DCA im Darm weiter gesenkt wird. Durch den erhöhten Gehalt an SCFA, im Speziellen Butyrat, kann die antiproliferative Wirkung des fermentierten Aleurons gesteigert werden.
- Mittels der verwendeten Fermentationsmethode ist es nicht möglich, einen zusätzlichen gesundheitsfördernden Einfluss weiterer Fermentationsprodukte des Weizenaleurons gegenüber reinen Ballaststoffquellen wie Synergy1 nachzuweisen, da aus dem Aleuron freigesetzte Ferulasäure durch bakterielle Abbauprozesse zügig metabolisiert wird.
- Die vorliegenden Ergebnisse lassen vermuten, dass der erhöhte Verzehr ballaststoffreicher Lebensmittel, vor allem von Aleuron-angereicherten Vollkornprodukten und einer gleichzeitigen täglichen Aufnahme von probiotischen Kulturen einen effizienten Ansatz bieten, einerseits die Darmgesundheit zu fördern und andererseits das Wachstum transformierter Kolonzellen zu hemmen.

4.9. Ausblick

Zunächst ist es von großem Interesse, die spezifischen molekularen Mechanismen der apoptotischen Wirkung der Fermentationsprodukte des Weizenaleurons zu identifizieren. Hierzu wäre es sinnvoll, die Expression weiterer Proteine auf transkriptioneller Ebene und Proteinebene zu untersuchen, die innerhalb der Apoptose den extrinsischen (TNFR1, FasR) bzw. intrinsischen (Bak, Bax) Weg einleiten.

Es konnte gezeigt werden, dass eine gezielte Fermentation des Weizenaleurons durch Zugabe der probiotischen Bakterienstämme LGG und Bb12 die Konzentration gesundheitsfördernder SCFA zusätzlich steigert, was auf eine Verwertung der Ballaststoffe des Aleurons durch die Probiotika schließen lässt. Projektpartner am

Forschungszentrum Karlsruhe konnten nachweisen, dass Aleuron durch LGG und Bb12 metabolisiert wird, allerdings war ein Anstieg der Bakterienpopulation der Gattungen *Lactobacillus* und *Bifidobacterium* nach einer 24-stündigen Fermentation des Aleurons bisher noch nicht belegbar. Um die präbiotische Wirkung des Weizenaleurons nachweisen zu können, müsste die Entwicklung des Bakterienwachstums nach einer wiederholten Gabe des Weizenaleurons in einem Fermentationsmodell über einen längeren Zeitraum untersucht werden.

Um zu klären, ob die hier beschriebenen Effekte auch *in vivo* zu beobachten sind, wäre es sinnvoll, in Tierstudien oder besser in einer humanen Ernährungs-Interventionsstudie den Einfluss des Weizenaleurons auf ausgewählte Parameter der Krebsprävention sowie der Vorbeugung bzw. Minderung chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen zu untersuchen.

5. Zusammenfassung

Einleitung: Das kolorektale Karzinom stellt weltweit in beiden Geschlechtern eine der häufigsten Krebserkrankungen dar. Einige epidemiologische Studien deuten darauf hin, dass mit der Nahrung aufgenommene Ballaststoffe das Risiko senken, an Dickdarmkrebs zu erkranken. Allerdings bedarf es weiterer Forschung, um die Ursachen dieser Wirkung zu klären. Eine Fermentation von Ballaststoffen durch die Darmflora kann die Konzentration an aktiven Metaboliten wie beispielsweise kurzkettigen Fettsäuren (SCFA) steigern, die möglicherweise vor Kolorektalkrebs schützen. Weizenaleuron enthält einen großen Anteil an Ballaststoffen und anderen potentiell gesundheitsfördernden Substanzen, die über Mechanismen der Sekundärprävention der Kolonkanzerogenese entgegen wirken könnten. Eine unterstützende Kofermentation mit probiotischen Kulturen könnte das Potential von Aleuron durch eine erhöhte Fermentierbarkeit zusätzlich steigern.

Zielstellung: Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, den Effekt von fermentiertem Weizenaleuron – zum Teil angereichert mit den probiotischen Bakterienstämmen LGG und Bb12 – auf Zellwachstum, Apoptose und Differenzierung zu untersuchen. Hierzu wurden zwei humane Kolonzelllinien verwendet, die ein frühes (LT97) und spätes (HT29) Stadium der Kolonkanzerogenese repräsentieren.

Methoden: Zunächst wurde Weizenvollkornmehl unter Zugabe unterschiedlicher Konzentrationen an Gallensäuren (41,6 und 0,6 g/l) *in vitro* verdaut und fermentiert, um ein geeignetes Fermentationsmodell zur Anwendung in Zellexperimenten zu etablieren. Weizenaleuron mit/ohne Zugabe von LGG und Bb12 wurde mittels des modifizierten Fermentationsmodells *in vitro* verdaut und fermentiert. Vergleichend wurden Weizenvollkornmehl, Weizenkleie und Synergy1 (Oligofruktose-angereichertes Inulin) einer *in vitro* Fermentation unterzogen. In den gebildeten Fermentationsüberständen (FÜ) wurde die Konzentration ausgewählter Metabolite (SCFA, Gallensäuren, Ammoniak und freie Ferulasäure) bestimmt. Die Zellen wurden für 24-72 h mit den FÜ oder synthetischen Gemischen, die den Gehalt an SCFA, Butyrat und Deoxycholsäure (DCA) widerspiegeln, inkubiert und der Einfluss auf das Zellwachstum mittels DAPI-Assay untersucht. Zusätzlich wurde das genotoxische Potential der FÜ mittels Comet Assay bestimmt. Um die sekundär chemopräventive Wirkung des Weizenaleurons (\pm LGG/Bb12) im Vergleich zu Synergy1 zu

charakterisieren, wurde die Modulation des Zellzyklus (NIM-DAPI-Färbung und Durchflusszytometrie), der Apoptose (Annexin V-7-AAD-Färbung und Durchflusszytometrie sowie Bestimmung der Enzymaktivität der Caspase-3, -8, -9) und der Differenzierung (Bestimmung der Enzymaktivität der alkalischen Phosphatase) untersucht. Ergänzend wurde der Einfluss von fermentiertem Aleuron (\pm LGG/Bb12) im Vergleich zu Synergy1 auf die mRNA-Expression von *p21*, *DR5* und *WNT2B* mittels *real-time* qPCR analysiert.

Ergebnisse: Durch die Anpassung der Konzentration an eingesetzten Gallensäuren konnte ein Fermentationsmodell etabliert werden, um die Wirkung komplexer FÜ in Zellexperimenten zu untersuchen. Die Fermentation der Weizenfraktionen, vor allem von Weizenaleuron nach Zugabe von LGG/Bb12, und Synergy1 führte im Vergleich zu der Fäzeskontrolle zu zwei- bis dreifach erhöhten Konzentrationen an SCFA und verminderten Gehalten an Gallensäuren. Die Konzentration an Ammoniak wurde in Korrelation zum Proteingehalt erhöht. In den FÜ konnte keine freigesetzte Ferulasäure nachgewiesen werden, was größtenteils auf einen zügigen bakteriellen Abbau schließen lässt. Fermentiertes Aleuron war in der Lage, die Zellzahl von LT97- und HT29-Zellen zu senken, wobei die FÜ effektiver reagierten als die korrespondierenden SCFA-Gemische oder die Fäzeskontrolle. Generell reagierten LT97-Zellen sensitiver auf eine Inkubation mit fermentiertem Aleuron (\pm LGG/Bb12) als HT29-Zellen, wobei die Inhibierung des Zellwachstums auf einen Wachstumsstopp in der G₀/G₁-Phase durch das enthaltene Butyrat zurückgeführt werden konnte. Die Anzahl an apoptotischen Zellen wurde signifikant erhöht, wobei die Effekte in LT97-Zellen stärker waren als in HT29-Zellen. Vor allem in HT29-Zellen wurde die Aktivität der alkalischen Phosphatase als ein Marker der Differenzierung nach einer Inkubation mit fermentiertem Aleuron gesteigert. Gene, die bei der Regulation der Zellproliferation und der Apoptose eine Rolle spielen, wie *p21* und *WNT2B*, konnten durch den FÜ Aleuron (\pm LGG/Bb12) und Synergy1 gleichermaßen induziert werden.

Schlussfolgerung: Die Fermentation von Weizenaleuron, vor allem nach Zugabe der Probiotika, führt zu einer niedrigeren Konzentration der tumorpromovierenden sekundären Gallensäure DCA und erhöhten Gehalten an chemopräventiven SCFA. Fermentiertes Aleuron und die Kombination aus Aleuron und LGG/Bb12 sind in der Lage, Mechanismen der Sekundärprävention zu fördern, indem

das Zellwachstum und -überleben vermindert werden, wobei Kolonzellen eines früheren Transformationsgrades sensitiver reagieren. Übertragen auf die *in vivo* Situation könnte der erhöhte Verzehr ballaststoffreicher Lebensmittel, vor allem von Aleuron-angereicherten Vollkornprodukten, verbunden mit einer gleichzeitigen täglichen Aufnahme von probiotischen Kulturen, das Risiko senken, an Dickdarmkrebs zu erkranken.

5. Abstract

Introduction: Colorectal cancer is one of the most common types of cancer worldwide. Some epidemiological studies suggest that dietary fiber may help to reduce colorectal cancer risk, but definitive scientific evidence is still lacking. Fermentation of dietary fiber by colonic microflora enhances the concentration of effective metabolites such as short-chain fatty acids (SCFA) which are potentially protective against colorectal cancer. Wheat aleurone contains high amounts of dietary fibers and other health-promoting compounds which may prevent cancer by modulating mechanisms of secondary chemoprevention. Furthermore, the addition of probiotics may trigger the functional value of wheat aleurone by increasing its fermentability.

Aim: The aim of this work was to investigate the effects of fermented aleurone, partially enriched with probiotics LGG and Bb12, on cell growth, apoptosis and differentiation using two different colon cell lines representing an earlier (LT97) and a late (HT29) stage of carcinogenesis.

Methods: First of all, wholemeal wheat flour was digested and fermented *in vitro* with a fermentation model using different bile acid concentrations (41.6 and 0.6 g/l) to establish a model which is suitable for following cell culture experiments. Wheat aleurone with/without probiotic strains LGG and Bb12, wholemeal wheat flour, wheat bran and Synergy1 (oligofructose-enriched inulin) were digested and fermented *in vitro* using the modified fermentation model. The resulting fermentation supernatants (fs) were analyzed for the main metabolites (SCFA, bile acids, ammonia and free ferulic acid). Cells were treated for 24-72 h with the fs or synthetic mixtures mimicking the fs in SCFA, butyrate or deoxycholic acid (DCA) contents, and the effect on cell growth using the DAPI assay was determined. Furthermore, the genotoxic potential of the fs was studied using the comet assay. The modulation of cell cycle (NIM-DAPI staining

and flow cytometry), apoptosis (annexin V-7-AAD staining and flow cytometry as well as determination of enzyme activity of caspase-3, -8, -9), and differentiation (determination of enzyme activity of alkaline phosphatase) by the fs aleurone (\pm LGG/Bb12) was characterized and compared to Synergy1. Finally, effects of fermented aleurone (\pm LGG/Bb12) was analyzed and compared to effects of Synergy1 on expression of *p21*, *DR5* and *WNT2B* on mRNA level using *real-time* qPCR.

Results: By lowering the bile acid concentration a suitable fermentation model was established allowing the use of the samples in cell culture experiments. The fermented wheat samples, especially aleurone enriched with LGG and Bb12, and Synergy1 contained two- to threefold higher amounts of SCFA than the feces control, but reduced levels of bile acids and increased concentrations of ammonia in correlation to protein content. Free ferulic acid was not detectable probably due to its immediate degradation. Fs aleurone reduced cell growth of LT97 and HT29 more effectively than the corresponding feces control and SCFA mixtures. In comparison to HT29, LT97 cells were more sensitive towards the growth inhibitory activities of fermented aleurone (\pm LGG/Bb12), which was related to a cell cycle arrest in the G_0/G_1 phase caused by butyrate. The level of apoptotic cells was significantly higher in LT97 than in HT29 cells. Mostly in HT29 cells, the alkaline phosphatase as a marker of differentiation was enhanced. Cell growth and apoptosis-related genes, namely *p21* and *WNT2B*, were induced by the fs.

Conclusions: Fermentation of wheat aleurone, especially supported by probiotics, results in a reduced level of tumor-promoting DCA and higher levels of potentially chemopreventive SCFA. Fermented aleurone and aleurone enriched with LGG/Bb12 are able to act as secondary chemopreventive agents by modulating parameters of cell growth and survival. Noteworthy, cells of an early transformation stage were more sensitive than cells of a later stage. These findings indicate that the consumption of wheat based products, especially enriched with wheat aleurone, combined with a daily intake of probiotics, may possess a chemopreventive potential.

Literaturangaben

- [1] Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Murray T, Thun MJ. Cancer statistics, 2008. *CA Cancer J Clin* **2008**;58(2):71-96.
- [2] Garcia M, Jemal A, Ward EM, Center MM, Hao Y, Siegel RL, Thun MJ. Global Cancer Facts & Figures 2007. *Atlanta, GA: American Cancer Society* **2007**.
- [3] RKI, GEDIK. Krebs in Deutschland 2003-2004. Häufigkeiten und Trends. *Robert Koch-Institut, Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e V* **2008**;6. überarbeitete Auflage, Berlin.
- [4] Das D, Arber N, Jankowski JA. Chemoprevention of colorectal cancer. *Digestion* **2007**;76(1):51-67.
- [5] Jacobs ET, Thompson PA, Martinez ME. Diet, gender, and colorectal neoplasia. *J Clin Gastroenterol* **2007**;41(8):731-46.
- [6] Pan MH, Ho CT. Chemopreventive effects of natural dietary compounds on cancer development. *Chem Soc Rev* **2008**;37(11):2558-74.
- [7] Arends JW. Molecular interactions in the Vogelstein model of colorectal carcinoma. *J Pathol* **2000**;190(4):412-6.
- [8] Salminen S, Bouley C, Boutron-Ruault MC, Cummings JH, Franck A, Gibson GR, Isolauri E, Moreau MC, Roberfroid M, Rowland I. Functional food science and gastrointestinal physiology and function. *Br J Nutr* **1998**;80 Suppl 1:S147-S171.
- [9] Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* **1990**;61(5):759-67.
- [10] Mendelsohn J. The epidermal growth factor receptor as a target for cancer therapy. *Endocr Relat Cancer* **2001**;8(1):3-9.
- [11] Fearnhead NS, Wilding JL, Bodmer WF. Genetics of colorectal cancer: hereditary aspects and overview of colorectal tumorigenesis. *Br Med Bull* **2002**;64:27-43.
- [12] Li FY, Lai MD. Colorectal cancer, one entity or three. *J Zhejiang Univ Sci B* **2009**;10(3):219-29.
- [13] Fodde R, Smits R, Clevers H. APC, signal transduction and genetic instability in colorectal cancer. *Nat Rev Cancer* **2001**;1(1):55-67.
- [14] Vogelstein B, Kinzler KW. Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med* **2004**;10(8):789-99.
- [15] Marian B. In vitro models for the identification and characterization of tumor-promoting and protective factors for colon carcinogenesis. *Food Chem Toxicol* **2002**;40(8):1099-104.
- [16] Martinez ME, Jacobs ET, Ashbeck EL, Sinha R, Lance P, Alberts DS, Thompson PA. Meat intake, preparation methods, mutagens and colorectal adenoma recurrence. *Carcinogenesis* **2007**;28(9):2019-27.
- [17] Potter JD. Colorectal cancer: molecules and populations. *J Natl Cancer Inst* **1999**;91(11):916-32.

- [18] Surh YJ. Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nat Rev Cancer* **2003**;3(10):768-80.
- [19] Johnson IT, Williamson G, Musk SR. Anticarcinogenic factors in plant foods: a new class of nutrients? *Nutr Res Rev* **1994**;7(1):175-204.
- [20] Marshall, J. R. Prevention of Colorectal Cancer: Diet, Chemoprevention and Lifestyle. *Gastroenterol Clin North Am.* 37(1), 73-81. **2008**.
- [21] World Cancer Research Fund. Food, Nutrition, Physical Activity, and the Prevention of Cancer: a Global Perspective. *Washington DC: American Institute for Cancer Research* **2007**.
- [22] Schulze J, Sonnenborn U, Ölschläger T, Kruis W. *Probiotika*. Stuttgart: *Hippokrates Verlag*, **2008**.
- [23] DiBaise JK, Zhang H, Crowell MD, Krajmalnik-Brown R, Decker GA, Rittmann BE. Gut microbiota and its possible relationship with obesity. *Mayo Clin Proc* **2008**;83(4):460-9.
- [24] Topping DL, Clifton PM. Short-chain fatty acids and human colonic function: roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. *Physiol Rev* **2001**;81(3):1031-64.
- [25] Damaskos D, Kolios G. Probiotics and prebiotics in inflammatory bowel disease: microflora 'on the scope'. *Br J Clin Pharmacol* **2008**;65(4):453-67.
- [26] Adlerberth I, Wold AE. Establishment of the gut microbiota in Western infants. *Acta Paediatr* **2009**;98(2):229-38.
- [27] Pai R, Kang G. Microbes in the gut: a digestible account of host-symbiont interactions. *Indian J Med Res* **2008**;128(5):587-94.
- [28] Kolida S, Gibson GR. Prebiotic capacity of inulin-type fructans. *J Nutr* **2007**;137(11 Suppl):2503S-6S.
- [29] Mai V, Draganov PV. Recent advances and remaining gaps in our knowledge of associations between gut microbiota and human health. *World J Gastroenterol* **2009**;15(1):81-5.
- [30] Huycke MM, Gaskins HR. Commensal bacteria, redox stress, and colorectal cancer: mechanisms and models. *Exp Biol Med (Maywood)* **2004**;229(7):586-97.
- [31] Schulz S, Kunz C. Probiotika, Präbiotika, Colonic Food. *Monatsschrift Kinderheilkunde* **2002**;150(7):808-16.
- [32] Gibson GR. Prebiotics as gut microflora management tools. *J Clin Gastroenterol* **2008**;42 Suppl 2:S75-S79.
- [33] Ferguson LR. Nutrigenomics approaches to functional foods. *J Am Diet Assoc* **2009**;109(3):452-8.
- [34] Fotiadis CI, Stoidis CN, Spyropoulos BG, Zografos ED. Role of probiotics, prebiotics and synbiotics in chemoprevention for colorectal cancer. *World J Gastroenterol* **2008**;14(42):6453-7.
- [35] Gupta V, Garg R. Probiotics. *Indian J Med Microbiol* **2009**;27(3):202-9.
- [36] Gronlund MM, Lehtonen OP, Eerola E, Kero P. Fecal microflora in healthy infants born by different methods of delivery: permanent changes in intestinal flora after cesarean delivery. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* **1999**;28(1):19-25.

- [37] Gill HS, Guarner F. Probiotics and human health: a clinical perspective. *Postgrad Med J* **2004**;80(947):516-26.
- [38] Minocha, A. Probiotics for Preventive Health. *Nutr Clin Pract* 24(2), 227-241. **2009**.
- [39] Morotomi M, Mutai M. In vitro binding of potent mutagenic pyrolysates to intestinal bacteria. *J Natl Cancer Inst* **1986**;77(1):195-201.
- [40] Lee JW, Shin JG, Kim EH, Kang HE, Yim IB, Kim JY, Joo HG, Woo HJ. Immunomodulatory and antitumor effects in vivo by the cytoplasmic fraction of *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium longum*. *J Vet Sci* **2004**;5(1):41-8.
- [41] Baricault L, Denariatz G, Houri JJ, Bouley C, Sapin C, Trugnan G. Use of HT-29, a cultured human colon cancer cell line, to study the effect of fermented milks on colon cancer cell growth and differentiation. *Carcinogenesis* **1995**;16(2):245-52.
- [42] Rafter J. The effects of probiotics on colon cancer development. *Nutr Res Rev* **2004**;17(2):277-84.
- [43] Gorbach SL. Probiotics and gastrointestinal health. *Am J Gastroenterol* **2000**;95(1 Suppl):S2-S4.
- [44] de Vrese M, Marteau PR. Probiotics and prebiotics: effects on diarrhea. *J Nutr* **2007**;137(3 Suppl 2):803S-11S.
- [45] Fukushima Y, Kawata Y, Hara H, Terada A, Mitsuoka T. Effect of a probiotic formula on intestinal immunoglobulin A production in healthy children. *Int J Food Microbiol* **1998**;42(1-2):39-44.
- [46] Ouwehand AC. Antiallergic effects of probiotics. *J Nutr* **2007**;137(3 Suppl 2):794S-7S.
- [47] Klinder A, Forster A, Caderni G, Femia AP, Pool-Zobel BL. 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* **2004**;49(2):144-55.
- [48] Gibson GR, Probert HM, Loo JV, Rastall RA, Roberfroid MB. Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. *Nutr Res Rev* **2004**;17(2):259-75.
- [49] Roberfroid M. Prebiotics: the concept revisited. *J Nutr* **2007**;137(3 Suppl 2):830S-7S.
- [50] Liong MT. Roles of Probiotics and Prebiotics in Colon Cancer Prevention: Postulated Mechanisms and In-vivo Evidence. *Int J Mol Sci* **2008**;9(5):854-63.
- [51] Boutron-Ruault MC, Marteau P, Lavergne-Slove A, Myara A, Gerhardt MF, Franchisseur C, Bornet F. Effects of a 3-mo consumption of short-chain fructo-oligosaccharides on parameters of colorectal carcinogenesis in patients with or without small or large colorectal adenomas. *Nutr Cancer* **2005**;53(2):160-8.
- [52] Pool-Zobel BL, Sauer J. Overview of experimental data on reduction of colorectal cancer risk by inulin-type fructans. *J Nutr* **2007**;137(11 Suppl):2580S-4S.
- [53] Hamer HM, Jonkers D, Venema K, Vanhoutvin S, Troost FJ, Brummer RJ. Review article: the role of butyrate on colonic function. *Aliment Pharmacol Ther* **2008**;27(2):104-19.

- [54] Reddy BS, Hamid R, Rao CV. Effect of dietary oligofructose and inulin on colonic preneoplastic aberrant crypt foci inhibition. *Carcinogenesis* **1997**;18(7):1371-4.
- [55] Hughes R, Rowland IR. Stimulation of apoptosis by two prebiotic chicory fructans in the rat colon. *Carcinogenesis* **2001**;22(1):43-7.
- [56] Van Loo J. The specificity of the interaction with intestinal bacterial fermentation by prebiotics determines their physiological efficacy. *Nutr Res Rev* **2004**;17(1):89-98.
- [57] Verghese M, Walker LT, Shackelford L, Chawan CB. Inhibitory effects of nondigestible carbohydrates of different chain lengths on azoxymethane-induced aberrant crypt foci in Fisher 344 rats. *Nutrition Research* **2005**;25:859-68.
- [58] Pool-Zobel BL. Inulin-type fructans and reduction in colon cancer risk: review of experimental and human data. *Br J Nutr* **2005**;93 Suppl 1:S73-S90.
- [59] Gallaher DD, Khil J. The effect of synbiotics on colon carcinogenesis in rats. *J Nutr* **1999**;129(7 Suppl):1483S-7S.
- [60] Rowland IR, Rumney CJ, Coutts JT, Lievens LC. Effect of *Bifidobacterium longum* and inulin on gut bacterial metabolism and carcinogen-induced aberrant crypt foci in rats. *Carcinogenesis* **1998**;19(2):281-5.
- [61] Femia AP, Luceri C, Dolara P, Giannini A, Biggeri A, Salvadori M, Clune Y, Collins KJ, Paglierani M, Caderni G. Antitumorigenic activity of the prebiotic inulin enriched with oligofructose in combination with the probiotics *Lactobacillus rhamnosus* and *Bifidobacterium lactis* on azoxymethane-induced colon carcinogenesis in rats. *Carcinogenesis* **2002**;23(11):1953-60.
- [62] Rafter J, Bennett M, Caderni G, Clune Y, Hughes R, Karlsson PC, Klinder A, O'Riordan M, O'Sullivan GC, Pool-Zobel B, Rechkemmer G, Roller M, Rowland I, Salvadori M, Thijs H, Van Loo J, Watzl B, Collins JK. Dietary synbiotics reduce cancer risk factors in polypectomized and colon cancer patients. *Am J Clin Nutr* **2007**;85(2):488-96.
- [63] Young GP, Hu Y, Le Leu RK, Nyskohus L. Dietary fibre and colorectal cancer: a model for environment-gene interactions. *Mol Nutr Food Res* **2005**;49(6):571-84.
- [64] Slavin JL, Martini MC, Jacobs DR, Jr., Marquart L. Plausible mechanisms for the protectiveness of whole grains. *Am J Clin Nutr* **1999**;70(3 Suppl):459S-63S.
- [65] Tan KY, Seow-Choen F. Fiber and colorectal diseases: separating fact from fiction. *World J Gastroenterol* **2007**;13(31):4161-7.
- [66] Schatzkin A, Kipnis V. Could exposure assessment problems give us wrong answers to nutrition and cancer questions? *J Natl Cancer Inst* **2004**;96(21):1564-5.
- [67] Lupton JR. Microbial degradation products influence colon cancer risk: the butyrate controversy. *J Nutr* **2004**;134(2):479-82.
- [68] Bordonaro M, Lazarova DL, Sartorelli AC. Butyrate and Wnt signaling: a possible solution to the puzzle of dietary fiber and colon cancer risk? *Cell Cycle* **2008**;7(9):1178-83.
- [69] Ferguson LR, Harris PJ. The dietary fibre debate: more food for thought. *Lancet* **2003**;361(9368):1487-8.
- [70] Wong JM, de SR, Kendall CW, Emam A, Jenkins DJ. Colonic health: fermentation and short chain fatty acids. *J Clin Gastroenterol* **2006**;40(3):235-43.

- [71] Morrison DJ, Mackay WG, Edwards CA, Preston T, Dodson B, Weaver LT. Butyrate production from oligofructose fermentation by the human faecal flora: what is the contribution of extracellular acetate and lactate? *Br J Nutr* **2006**;96(3):570-7.
- [72] Tsukahara T, Koyama H, Okada M, Ushida K. Stimulation of butyrate production by gluconic acid in batch culture of pig cecal digesta and identification of butyrate-producing bacteria. *J Nutr* **2002**;132(8):2229-34.
- [73] Saulnier DM, Spinler JK, Gibson GR, Versalovic J. Mechanisms of probiosis and prebiosis: considerations for enhanced functional foods. *Curr Opin Biotechnol* **2009**;20(2):135-41.
- [74] Lim CC, Ferguson LR, Tannock GW. Dietary fibres as "prebiotics": implications for colorectal cancer. *Mol Nutr Food Res* **2005**;49(6):609-19.
- [75] Scheppach W, Weiler F. The butyrate story: old wine in new bottles? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* **2004**;7(5):563-7.
- [76] Hague A, Singh B, Paraskeva C. Butyrate acts as a survival factor for colonic epithelial cells: further fuel for the in vivo versus in vitro debate. *Gastroenterology* **1997**;112(3):1036-40.
- [77] Hinnebusch BF, Meng S, Wu JT, Archer SY, Hodin RA. The effects of short-chain fatty acids on human colon cancer cell phenotype are associated with histone hyperacetylation. *J Nutr* **2002**;132(5):1012-7.
- [78] Williams EA, Coxhead JM, Mathers JC. Anti-cancer effects of butyrate: use of micro-array technology to investigate mechanisms. *Proc Nutr Soc* **2003**;62(1):107-15.
- [79] Della Ragione F, Criniti V, Della P, V, Borriello A, Oliva A, Indaco S, Yamamoto T, Zappia V. Genes modulated by histone acetylation as new effectors of butyrate activity. *FEBS Lett* **2001**;499(3):199-204.
- [80] Spurling CC, Suhl JA, Boucher N, Nelson CE, Rosenberg DW, Giardina C. The short chain fatty acid butyrate induces promoter demethylation and reactivation of RARbeta2 in colon cancer cells. *Nutr Cancer* **2008**;60(5):692-702.
- [81] Ebert MN, Beyer-Sehlmeyer G, Liegibel UM, Kautenburger T, Becker TW, Pool-Zobel BL. Butyrate induces glutathione S-transferase in human colon cells and protects from genetic damage by 4-hydroxy-2-nonenal. *Nutr Cancer* **2001**;41(1-2):156-64.
- [82] Kim YH, Park JW, Lee JY, Kwon TK. Sodium butyrate sensitizes TRAIL-mediated apoptosis by induction of transcription from the DR5 gene promoter through Sp1 sites in colon cancer cells. *Carcinogenesis* **2004**;25(10):1813-20.
- [83] Pajak B, Orzechowski A, Gajkowska B. Molecular basis of sodium butyrate-dependent proapoptotic activity in cancer cells. *Adv Med Sci* **2007**;52:83-8.
- [84] Sengupta S, Muir JG, Gibson PR. Does butyrate protect from colorectal cancer? *J Gastroenterol Hepatol* **2006**;21(1 Pt 2):209-18.
- [85] Comalada M, Bailon E, de HO, Lara-Villoslada F, Xaus J, Zarzuelo A, Galvez J. The effects of short-chain fatty acids on colon epithelial proliferation and survival depend on the cellular phenotype. *J Cancer Res Clin Oncol* **2006**.
- [86] Blottiere HM, Buecher B, Galmiche JP, Cherbut C. Molecular analysis of the effect of short-chain fatty acids on intestinal cell proliferation. *Proc Nutr Soc* **2003**;62(1):101-6.
- [87] Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature* **2000**;407(6805):770-6.

- [88] Chirakkal H, Leech SH, Brookes KE, Prais AL, Waby JS, Corfe BM. Upregulation of BAK by butyrate in the colon is associated with increased Sp3 binding. *Oncogene* **2006**;25(54):7192-200.
- [89] Medina V, Edmonds B, Young GP, James R, Appleton S, Zalewski PD. Induction of caspase-3 protease activity and apoptosis by butyrate and trichostatin A (inhibitors of histone deacetylase): dependence on protein synthesis and synergy with a mitochondrial/cytochrome c-dependent pathway. *Cancer Res* **1997**;57(17):3697-707.
- [90] Gewies A. Introduction to Apoptosis. *ApoReview* **2003**;1-26.
- [91] Nguyen KA, Cao Y, Chen JR, Townsend CM, Jr., Ko TC. Dietary fiber enhances a tumor suppressor signaling pathway in the gut. *Ann Surg* **2006**;243(5):619-25.
- [92] Slavin J. Why whole grains are protective: biological mechanisms. *Proc Nutr Soc* **2003**;62(1):129-34.
- [93] Buri RC, von Reding W, Gavin MH. Description and Characterization of Wheat Aleurone. *Cereal Foods World* **2004**;49(5):274-81.
- [94] Bohm A, Bogoni C, Behrens R, Otto T. Method for the extraction of aleurone from bran. *World Patent* **2002**;WO 02/15711A2.
- [95] Amrein TM, Gränicher P, Arrigoni E, Amadò R. In vitro digestibility and colonic fermentability of aleurone isolated from wheat bran. *Lebensm -Wiss U -Technol* **2003**;36:451-60.
- [96] Anson NM, Selinheimo E, Havenaar R, Aura AM, Mattila I, Lehtinen P, Bast A, Poutanen K, Haenen GR. Bioprocessing of wheat bran improves in vitro bioaccessibility and colonic metabolism of phenolic compounds. *J Agric Food Chem* **2009**;57(14):6148-55.
- [97] Andreassen MF, Kroon PA, Williamson G, Garcia-Conesa MT. Intestinal release and uptake of phenolic antioxidant diferulic acids. *Free Radic Biol Med* **2001**;31(3):304-14.
- [98] Lupton JR, Turner ND. Potential protective mechanisms of wheat bran fiber. *Am J Med* **1999**;106(1A):24S-7S.
- [99] Ferguson LR, Harris PJ. Protection against cancer by wheat bran: role of dietary fibre and phytochemicals. *Eur J Cancer Prev* **1999**;8(1):17-25.
- [100] Ferguson LR, Tasman-Jones C, Englyst H, Harris PJ. Comparative effects of three resistant starch preparations on transit time and short-chain fatty acid production in rats. *Nutr Cancer* **2000**;36(2):230-7.
- [101] Reddy BS. Role of dietary fiber in colon cancer: an overview. *Am J Med* **1999**;106(1A):16S-9S.
- [102] McIntosh GH, Royle PJ, Pointing G. Wheat aleurone flour increases cecal beta-glucuronidase activity and butyrate concentration and reduces colon adenoma burden in azoxymethane-treated rats. *J Nutr* **2001**;131(1):127-31.
- [103] Femia AP, Salvadori M, Broekaert WF, Francois IE, Delcour JA, Courtin CM, Caderni G. Arabinoxylan-oligosaccharides (AXOS) reduce preneoplastic lesions in the colon of rats treated with 1,2-dimethylhydrazine (DMH). *Eur J Nutr* **2009**.
- [104] 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**;54(6):2088-95.
- [105] Helsby NA, Zhu S, Pearson AE, Tingle MD, Ferguson LR. Antimutagenic effects of wheat bran diet through modification of xenobiotic metabolising enzymes. *Mutat Res* **2000**;454(1-2):77-88.
- [106] Kirilin WG, Cai J, DeLong MJ, Patten EJ, Jones DP. Dietary compounds that induce cancer preventive phase 2 enzymes activate apoptosis at comparable doses in HT29 colon carcinoma cells. *J Nutr* **1999**;129(10):1827-35.
- [107] Drankhan K, Carter J, Madl R, Klopfenstein C, Padula F, Lu Y, Warren T, Schmitz N, Takemoto DJ. Antitumor activity of wheats with high orthophenolic content. *Nutr Cancer* **2003**;47(2):188-94.
- [108] Baublis AJ, Lu C, Clydesdale FM, Decker EA. Potential of wheat-based breakfast cereals as a source of dietary antioxidants. *J Am Coll Nutr* **2000**;19(3 Suppl):308S-11S.
- [109] Jenab M, Thompson LU. Phytic acid in wheat bran affects colon morphology, cell differentiation and apoptosis. *Carcinogenesis* **2000**;21(8):1547-52.
- [110] Van Craeyveld V, Swennen K, Dornez E, Van de Wiele T, Marzorati M, Verstraete W, Delaedt Y, Onagbesan O, Decuypere E, Buyse J, De KB, Broekaert WF, Delcour JA, Courtin CM. Structurally different wheat-derived arabinoxylooligosaccharides have different prebiotic and fermentation properties in rats. *J Nutr* **2008**;138(12):2348-55.
- [111] Neyrinck AM, De BF, Cani PD, Bindels LB, Stroobants A, Portetelle D, Delzenne NM. Immunomodulatory properties of two wheat bran fractions - aleurone-enriched and crude fractions - in obese mice fed a high fat diet. *Int Immunopharmacol* **2008**;8(10):1423-32.
- [112] Costabile A, Klinder A, Fava F, Napolitano A, Fogliano V, Leonard C, Gibson GR, Tuohy KM. Whole-grain wheat breakfast cereal has a prebiotic effect on the human gut microbiota: a double-blind, placebo-controlled, crossover study. *Br J Nutr* **2008**;99(1):110-20.
- [113] Cloetens L, Broekaert WF, Delaedt Y, Ollevier F, Courtin CM, Delcour JA, Rutgeerts P, Verbeke K. Tolerance of arabinoxylan-oligosaccharides and their prebiotic activity in healthy subjects: a randomised, placebo-controlled cross-over study. *Br J Nutr* **2009**;1-11.
- [114] Hughes SA, Shewry PR, Li L, Gibson GR, Sanz ML, Rastall RA. In vitro fermentation by human fecal microflora of wheat arabinoxylans. *J Agric Food Chem* **2007**;55(11):4589-95.
- [115] Pastell H, Westermann P, Meyer AS, Tuomainen P, Tenkanen M. In vitro fermentation of arabinoxylan-derived carbohydrates by bifidobacteria and mixed fecal microbiota. *J Agric Food Chem* **2009**;57(18):8598-606.
- [116] Napolitano A, Costabile A, Martin-Pelaez S, Vitaglione P, Klinder A, Gibson GR, Fogliano V. Potential prebiotic activity of oligosaccharides obtained by enzymatic conversion of durum wheat insoluble dietary fibre into soluble dietary fibre. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* **2009**;19(4):283-90.
- [117] Vardakou M, Palop CN, Christakopoulos P, Faulds CB, Gasson MA, Narbad A. Evaluation of the prebiotic properties of wheat arabinoxylan fractions and induction of hydrolase activity in gut microflora. *Int J Food Microbiol* **2008**;123(1-2):166-70.
- [118] Barry JL, Hoebler C, Macfarlane GT, Macfarlane S, Mathers JC, Reed KA, Mortensen PB, Nordgaard I, Rowland IR, Rumney CJ. Estimation of the fermentability of dietary fibre in vitro: a European interlaboratory study. *Br J Nutr* **1995**;74(3):303-22.

- [119] Macfarlane GT, Macfarlane S, Gibson GR. Validation of a Three-Stage Compound Continuous Culture System for Investigating the Effect of Retention Time on the Ecology and Metabolism of Bacteria in the Human Colon. *Microb Ecol* **1998**;35(2):180-7.
- [120] Molly K, Vande WM, Verstraete W. Development of a 5-step multi-chamber reactor as a simulation of the human intestinal microbial ecosystem. *Appl Microbiol Biotechnol* **1993**;39(2):254-8.
- [121] Minekus M, Marteau P, Havenaar R, Huis i, V. A Multicompartmental Dynamic Computer-controlled Model Simulating the Stomach and Small Intestine. *ATLA* **1995**;23:197-209.
- [122] Minekus M, Smeets-Peeters M, Bernalier A, Marol-Bonnin S, Havenaar R, Marteau P, Alric M, Fonty G, Huis i, V. A computer-controlled system to simulate conditions of the large intestine with peristaltic mixing, water absorption and absorption of fermentation products. *Appl Microbiol Biotechnol* **1999**;53(1):108-14.
- [123] Macfarlane GT, Macfarlane S. Models for intestinal fermentation: association between food components, delivery systems, bioavailability and functional interactions in the gut. *Curr Opin Biotechnol* **2007**;18(2):156-62.
- [124] Scharlau D, Borowicki A, Stein K, Gleit M. Use of In-Vitro Digestion and fermentation Models to Study Health Effects of Dietary Fibres in Cultured Cells. In: Klein F, Möller G, editors. *Dietary Fiber, Fruit and Vegetable Consumption and Health*. Nova Publishers, **2010**.
- [125] Fassler C, Gill CI, Arrigoni E, Rowland I, Amado R. Fermentation of resistant starches: influence of in vitro models on colon carcinogenesis. *Nutr Cancer* **2007**;58(1):85-92.
- [126] De Boever P, Wouters R, Verschaeve L, Berckmans P, Schoeters G, Verstraete W. Protective effect of the bile salt hydrolase-active *Lactobacillus reuteri* against bile salt cytotoxicity. *Appl Microbiol Biotechnol* **2000**;53(6):709-14.
- [127] Wang JF, Zhu YH, Li DF, Wang Z, Jensen BB. In vitro fermentation of various fiber and starch sources by pig fecal inocula. *J Anim Sci* **2004**;82(9):2615-22.
- [128] Burkard I, von Eckardstein A, Rentsch KM. Differentiated quantification of human bile acids in serum by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **2005**;826(1-2):147-59.
- [129] Chaney AL, Marbach EP. Modified reagents for determination of urea and ammonia. *Clin Chem* **1962**;8:130-2.
- [130] Mattila P, Pihlavan JM, Hellstrom J. Contents of phenolic acids, alkyl- and alkenylresorcinols, and avenanthramides in commercial grain products. *J Agric Food Chem* **2005**;53(21):8290-5.
- [131] Chesson A, Provan GJ, Russell WR, Scobbie L, Richardson AJ, Stewart C. Hydroxycinnamic acids in the digestive tract of livestock and humans. *J Sci Food Agric* **1999**;79:373-8.
- [132] Bingham SA, Day NE, Luben R, Ferrari P, Slimani N, Norat T, Clavel-Chapelon F, Kesse E, Nieters A, Boeing H, Tjonneland A, Overvad K, Martinez C, Dorronsoro M, Gonzalez CA, Key TJ, Trichopoulou A, Naska A, Vineis P, Tumino R, Krogh V, Bueno-De-Mesquita HB, Peeters PH, Berglund G, Hallmans G, Lund E, Skeie G, Kaaks R, Riboli E. Dietary fibre in food and protection against colorectal cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC): an observational study. *Lancet* **2003**;361(9368):1496-501.
- [133] Munjal U, Gleit M, Pool-Zobel BL, Scharlau D. Fermentation products of inulin-type fructans reduce proliferation and induce apoptosis in human colon tumour cells of different stages of carcinogenesis. *Br J Nutr* **2009**;102(5):663-71.

- [134] Beyer-Sehlmeyer G, Glei M, Hartmann E, Hughes R, Persin C, Bohm V, Rowland I, Schubert R, Jahreis G, Pool-Zobel BL. Butyrate is only one of several growth inhibitors produced during gut flora-mediated fermentation of dietary fibre sources. *Br J Nutr* **2003**;90(6):1057-70.
- [135] Klinder A, Gietl E, Hughes R, Jonkers N, Karlsson P, McGlynn H, Pistoli S, Tuohy K, Rafter J, Rowland I, van Loo J, Pool-Zobel BL. Gut fermentation products of inulin-derived prebiotics beneficially modulate markers of tumour progression in human colon tumour cells. *International Journal of Cancer Prevention* **2004**;1(1):19-32.
- [136] Mortensen PB, Holtug K, Rasmussen HS. Short-chain fatty acid production from mono- and disaccharides in a fecal incubation system: implications for colonic fermentation of dietary fiber in humans. *J Nutr* **1988**;118(3):321-5.
- [137] Lebet V, Arrigoni E, Amado R. Digestion procedure using mammalian enzymes to obtain substrates for in vitro fermentation studies. *Lebensm -Wiss U -Technol* **1998**;31:509-15.
- [138] Shiraki K, Ito T, Sugimoto K, Fuke H, Inoue T, Miyashita K, Yamanaka T, Suzuki M, Nabeshima K, Nakano T, Takase K. Different effects of bile acids, ursodeoxycholic acid and deoxycholic acid, on cell growth and cell death in human colonic adenocarcinoma cells. *Int J Mol Med* **2005**;16(4):729-33.
- [139] Bhagavan NV. Gastrointestinal Digestion and Absorption. *Medical Biochemistry fourth ed S Harcourt Science and Technology Company, Academic Press, Canada edn* **2002**;216-7.
- [140] Owen RW. The metabolism of bile acids. In: Hill MJ, editor. *Microbial metabolism in the digestive tract*. Boca Raton, FL: *CRC Press*, **1986**. p. 51-65.
- [141] Hughes R, Magee EA, Bingham S. Protein degradation in the large intestine: relevance to colorectal cancer. *Curr Issues Intest Microbiol* **2000**;1(2):51-8.
- [142] Cummings JH, Hill MJ, Bone ES, Branch WJ, Jenkins DJ. The effect of meat protein and dietary fiber on colonic function and metabolism. II. Bacterial metabolites in feces and urine. *Am J Clin Nutr* **1979**;32(10):2094-101.
- [143] Cummings JH, Englyst HN. Fermentation in the human large intestine and the available substrates. *Am J Clin Nutr* **1987**;45(5 Suppl):1243-55.
- [144] Gamet L, Daviaud D, is-Pouxviel C, Remesy C, Murat JC. Effects of short-chain fatty acids on growth and differentiation of the human colon-cancer cell line HT29. *Int J Cancer* **1992**;52(2):286-9.
- [145] Coradini D, Pellizzaro C, Marimpietri D, Abolafio G, Daidone MG. Sodium butyrate modulates cell cycle-related proteins in HT29 human colonic adenocarcinoma cells. *Cell Prolif* **2000**;33(3):139-46.
- [146] Sauer J, Richter KK, Pool-Zobel BL. Physiological concentrations of butyrate favorably modulate genes of oxidative and metabolic stress in primary human colon cells. *J Nutr Biochem* **2007**;18(11):736-45.
- [147] Ganapathy V, Thangaraju M, Gopal E, Martin PM, Itagaki S, Miyauchi S, Prasad PD. Sodium-coupled monocarboxylate transporters in normal tissues and in cancer. *AAPS J* **2008**;10(1):193-9.
- [148] Lambert DW, Wood IS, Ellis A, Shirazi-Beechey SP. Molecular changes in the expression of human colonic nutrient transporters during the transition from normality to malignancy. *Br J Cancer* **2002**;86(8):1262-9.

- [149] Richter M, Jurek D, Wrba F, Kaserer K, Wurzer G, Karner-Hanusch J, Marian B. Cells obtained from colorectal microadenomas mirror early premalignant growth patterns in vitro. *Eur J Cancer* **2002**;38(14):1937-45.
- [150] Lewis SJ, Heaton KW. Increasing butyrate concentration in the distal colon by accelerating intestinal transit. *Gut* **1997**;41(2):245-51.
- [151] Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu JC, Sasaki YF. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen* **2000**;35(3):206-21.
- [152] Davie JR. Inhibition of histone deacetylase activity by butyrate. *J Nutr* **2003**;133(7 Suppl):2485S-93S.
- [153] Weiser MM. Intestinal epithelial cell surface membrane glycoprotein synthesis. I. An indicator of cellular differentiation. *J Biol Chem* **1973**;248(7):2536-41.
- [154] Heerdt BG, Houston MA, Augenlicht LH. Potentiation by specific short-chain fatty acids of differentiation and apoptosis in human colonic carcinoma cell lines. *Cancer Res* **1994**;54(12):3288-93.
- [155] Reya T, Clevers H. Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature* **2005**;434(7035):843-50.
- [156] Herz F, Schermer A, Halwer M, Bogart LH. Alkaline phosphatase in HT-29, a human colon cancer cell line: influence of sodium butyrate and hyperosmolality. *Arch Biochem Biophys* **1981**;210(2):581-91.
- [157] Orchel A, Dzierzewicz Z, Parfiniewicz B, Weglarz L, Wilczok T. Butyrate-induced differentiation of colon cancer cells is PKC and JNK dependent. *Dig Dis Sci* **2005**;50(3):490-8.
- [158] Siavoshian S, Blottiere HM, Le FE, Kaeffer B, Cherbut C, Galmiche JP. Comparison of the effect of different short chain fatty acids on the growth and differentiation of human colonic carcinoma cell lines in vitro. *Cell Biol Int* **1997**;21(5):281-7.
- [159] Mariadason JM, Velcich A, Wilson AJ, Augenlicht LH, Gibson PR. Resistance to butyrate-induced cell differentiation and apoptosis during spontaneous Caco-2 cell differentiation. *Gastroenterology* **2001**;120(4):889-99.
- [160] Anson NM, van den Berg R, Havenaar R, Bast A, Haenen GR. Ferulic acid from aleurone determines the antioxidant potency of wheat grain (*Triticum aestivum* L.). *J Agric Food Chem* **2008**;56(14):5589-94.
- [161] Braune A, Bunzel M, Yonekura R, Blaut M. Conversion of dehydrodiferulic acids by human intestinal microbiota. *J Agric Food Chem* **2009**;57(8):3356-62.
- [162] Blaut M. Relationship of prebiotics and food to intestinal microflora. *Eur J Nutr* **2002**;41 Suppl 1:I11-I16.
- [163] Zampa A, Silvi S, Fabiani R, Morozzi G, Orpianesi C, Cresci A. Effects of different digestible carbohydrates on bile acid metabolism and SCFA production by human gut micro-flora grown in an in vitro semi-continuous culture. *Anaerobe* **2004**;10(1):19-26.
- [164] Kodali VP, Sen R. Antioxidant and free radical scavenging activities of an exopolysaccharide from a probiotic bacterium. *Biotechnol J* **2008**;3(2):245-51.

- [165] Pigeon RM, Cuesta EP, Gililliand SE. Binding of free bile acids by cells of yogurt starter culture bacteria. *J Dairy Sci* **2002**;85(11):2705-10.
- [166] Pai R, Tarnawski AS, Tran T. Deoxycholic acid activates beta-catenin signaling pathway and increases colon cell cancer growth and invasiveness. *Mol Biol Cell* **2004**;15(5):2156-63.
- [167] McMillan L, Butcher S, Wallis Y, Neoptolemos JP, Lord JM. Bile acids reduce the apoptosis-inducing effects of sodium butyrate on human colon adenoma (AA/C1) cells: implications for colon carcinogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* **2000**;273(1):45-9.
- [168] Singh J, Rivenson A, Tomita M, Shimamura S, Ishibashi N, Reddy BS. Bifidobacterium longum, a lactic acid-producing intestinal bacterium inhibits colon cancer and modulates the intermediate biomarkers of colon carcinogenesis. *Carcinogenesis* **1997**;18(4):833-41.
- [169] Bauer-Marinovic M, Florian S, Muller-Schmehl K, Glatt H, Jacobasch G. Dietary resistant starch type 3 prevents tumor induction by 1,2-dimethylhydrazine and alters proliferation, apoptosis and dedifferentiation in rat colon. *Carcinogenesis* **2006**;27(9):1849-59.
- [170] Le Leu RK, Brown IL, Hu Y, Bird AR, Jackson M, Esterman A, Young GP. A synbiotic combination of resistant starch and Bifidobacterium lactis facilitates apoptotic deletion of carcinogen-damaged cells in rat colon. *J Nutr* **2005**;135(5):996-1001.

Lebenslauf

Anke Borowicki geboren am 08. Dezember 1981 in Magdeburg
Familienstand: ledig

POSTGRADUALE AUSBILDUNG

seit 09/2006 Wissenschaftliche Mitarbeiterin / Hilfskraft im Rahmen einer
Promotion am Lehrstuhl für Ernährungstoxikologie, Institut für
Ernährungswissenschaften der Friedrich-Schiller-Universität Jena

AUSBILDUNG UND STUDIUM

29.08.2006 Abschluss als Diplom-Trophologin

10/2000-08/2006 Studium der Ernährungswissenschaften an der Friedrich-Schiller-
Universität Jena

Diplomarbeit am Lehrstuhl für Ernährungstoxikologie, Institut für
Ernährungswissenschaften der Friedrich-Schiller-Universität Jena

„*In vitro* Charakterisierung von Inhaltsstoffen aus
Johannisbrotbaumschoten in humanen Leukozyten – Suche nach
Wirkparametern zur Biomarkeretablierung“

Auszeichnung für hervorragende Diplomarbeiten (Apfel e.V.)

09/2004-01/2005 Auslandssemester in Großbritannien an der University of
Nottingham, School of Bioscience

07.07.2000 Abitur am Georgius-Agricola-Gymnasium Chemnitz

PRAKTIKA

01/2005-02/2005 Praktikum am Universitätsklinikum Düsseldorf, Abteilung
Gastroenterologie

09/2003-10/2003 Praktikum an der Friedrich-Schiller-Universität Jena, Institut für
Ernährungswissenschaften, Lehrstuhl für Ernährungstoxikologie

-
- 08/2003-09/2003 Praktikum bei Bodymed AG, Kirkel, Abteilung Marketing und Öffentlichkeitsarbeit
- 02/2003-03/2003 Praktikum an der Friedrich-Schiller-Universität Jena, Institut für Ernährungswissenschaften, Lehrstuhl für Lebensmittelchemie
- 08/2002-09/2002 Praktikum in der Klinik Nordseeküste GmbH&Co.KG, Cuxhaven

PUBLIKATIONEN

“Effects of Synbiotic Fermentation Products on Primary Chemoprevention in human colon cells.”

Katrin Stein, **Anke Borowicki**, Anika Schettler, Daniel Scharlau, Kerstin Scheu, Ursula Obst, Michael Glei. Manuskript in Vorbereitung für die Zeitschrift *Journal of Nutritional Biochemistry*. **2010**.

“Modification of an *in vitro* model simulating the whole digestive process to investigate cellular endpoints of chemoprevention.”

Katrin Stein, **Anke Borowicki**, Daniel Scharlau, Kerstin Scheu, Gerald Brenner-Weiss, Ursula Obst, Jürgen Hollmann, Meinolf Lindhauer, Norbert Wachter, Michael Glei. In Begutachtung bei der Zeitschrift *European Journal of Nutrition*. Mai **2010**.

“Fermented wheat aleurone induces enzymes involved in detoxification of carcinogens and in antioxidative defence in human colon cells.”

Katrin Stein, **Anke Borowicki**, Daniel Scharlau, Michael Glei. Zur Publikation angenommen für die Zeitschrift *British Journal of Nutrition*. 12.04.**2010**

“Fermented wheal aleurone enriched with probiotic strains LGG and Bb12 modulates markers of tumor progression in human colon cells.”

Anke Borowicki, Anke Michelmann, Katrin Stein, Daniel Scharlau, Kerstin Scheu, Ursula Obst, Michael Glei. In Begutachtung bei der Zeitschrift *Nutrition and Cancer*. März **2010**.

“Fermentation supernatants of wheat (*Triticum aestivum* L.) aleurone beneficially modulate cancer progression in human colon tumor cells.”

Anke Borowicki, Katrin Stein, Daniel Scharlau Michael Glei. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 58:2001-7, **2010**

“Fermented wheat aleurone inhibits growth and induces apoptosis in human HT29 colon adenocarcinoma cells.”

Anke Borowicki, Katrin Stein, Daniel Scharlau, Kerstin Scheu, Gerald Brenner-Weiss, Ursula Obst, Jürgen Hollmann, Meinolf Lindhauer, Norbert Wachter, Michael Glei. *British Journal of Nutrition*. 103(3):360-9, **2010**

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

Thomas Hofmann, Stefanie Klenow, **Anke Borowicki**, Chris Gill, Beatrice L. Pool-Zobel, Michael Glei. Zur Publikation angenommen bei der Zeitschrift *Genes and Nutrition*. 18.01.2010

“Use of in vitro fermentation models to study health effects of dietary fiber in cultured cells.”

Daniel Scharlau, **Anke Borowicki**, Katrin Stein, Michael Glei. Zur Publikation angenommen in “*Dietary Fiber: Sources, Functions and Benefits*”, Verlag Nova Publishers, **2009**

“Mechanisms of primary cancer prevention by butyrate and other products formed during gut flora-mediated fermentation of dietary fibre.”

Daniel Scharlau, **Anke Borowicki**, Nina Habermann, Thomas Hofmann, Stefanie Klenow, Claudia Miene, Umang Munjal, Katrin Stein, Michael Glei. *Mutation Research*. 682(1):39-53, **2009**

„Chemopräventive Eigenschaften von fermentiertem Weizenaleuron – apoptotische und proliferationshemmende Wirkung in humanen Kolonozyten.“

Anke Borowicki, Katrin Stein, Daniel Scharlau, Michael Glei. Tagungsband **4.Symposium „Funktionelle Lebensmittel“** an der Christian-Albrechts-Universität Kiel, 23./24.04.2009

VORTRÄGE

„Chemopräventive Eigenschaften von Ballaststoffen aus dem Weizenkorn.“

Anke Borowicki. **Tag der offenen Tür**, Institut für Ernährungswissenschaften, Friedrich-Schiller-Universität Jena, 13.05.2009

„Chemopräventive Eigenschaften von fermentiertem Weizenaleuron – apoptotische und proliferationshemmende Wirkung in humanen Kolonozyten.“

Anke Borowicki, Michael Glei. **4.Symposium „Funktionelle Lebensmittel“** an der Christian-Albrechts-Universität Kiel, 23./24.04.2009

POSTER

“Chemopreventive activity of fermented wheat aleurone enriched with probiotics (LGG/Bb12) – Inhibition of growth and induction of apoptosis in colon cancer cells.”

Anke Borowicki, Anke Michelmann, Katrin Stein, Daniel Scharlau, Kerstin Scheu, Norbert Wachter, Michael Glei. **“4th International Dietary Fibre Conference 2009”** in Wien, Österreich, 01.-03.07.2009

“Gut fermentation products of wheat aleurone suppress cell growth and survival of human adenocarcinoma cells.”

Anke Borowicki, Katrin Stein, Daniel Scharlau, Michael Glei, Kerstin Scheu, Gerald Brenner-Weiß, Michael Gusko, Beatrice L. Pool-Zobel. **“TNO Beneficial Microbes Conference”** in Amsterdam, Niederlande, 29.-30.05.2008

Selbständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Arbeit selbständig, ohne unzulässige Hilfe Dritter, sowie ohne Verwendung anderer als der angegebenen Literatur und Hilfsmittel verfasst zu haben.

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

Jena, den 11.05.2010

Anke Borowicki

Danksagung

In Erinnerung an Frau Prof. Beatrice L. Pool-Zobel möchte ich mich für die Überlassung des interessanten Projektes und ihr aufrichtiges Engagement innerhalb des ersten Jahres meiner Promotion bedanken.

Herrn PD Dr. Michael Gleis danke ich für die hervorragenden Arbeitsbedingungen, die intensive wissenschaftliche Betreuung und wertvolle Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit. Ebenso möchte ich mich bei Herrn Dr. Daniel Scharlau für die freundschaftliche Zusammenarbeit bedanken. Durch sein außerordentliches Engagement und seine wertvollen Anregungen hat er wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Katrin Stein danke ich für eine hervorragende Zusammenarbeit, die motivierenden Worte und die liebenswerte Art, durch die die gemeinsam beschrittenen Jahre unvergesslich bleiben. Frau Dr. Julia Sauer danke ich für ihre stetige Motivation und die gemeinsamen fachlichen Dialoge.

Allen Kollegen des Lehrstuhls für Ernährungstoxikologie der Friedrich-Schiller-Universität Jena danke ich für ihre konstruktive Zusammenarbeit und das hervorragende Arbeitsklima. Mein besonderer Dank gilt hierbei Esther Woschee für ihre große Hilfsbereitschaft und die gute Zusammenarbeit im Labor. Anke Michelmann, Johanna Paak und Markus Weise danke ich für die hilfreiche und tatkräftige Unterstützung im Rahmen der Versuchsdurchführung.

Beim Bundesministerium für Bildung und Forschung möchte ich mich für die finanzielle Unterstützung des Projektes „Triple plus functional food“ (BMBF 0313829A) bedanken. In diesem Zusammenhang danke ich allen Projektpartnern von Kampffmeyer Food Innovation GmbH, des Max-Rubner Instituts Detmold und des Forschungszentrums Karlsruhe, insbesondere Kerstin Scheu und Anke Neidig, für die hervorragende und erfolgreiche Zusammenarbeit. Bei Herrn Walter von Reding (Bühler AG, Schweiz) und Frau Dr. Anne Franck (Orafti, Belgien) bedanke ich mich für die Bereitstellung der Ausgangssubstanzen Weizenaleuron und Synergy1.

Meiner Familie danke ich für ihre unentwegte Unterstützung und ihren Glauben an mich. Von Herzen danke ich ganz besonders meinem Freund André für seine Unterstützung in jeglicher Hinsicht, für seine Zuversicht und seine Liebe.