
Begutachtungsfähiger Schlussbericht

Zuwendungsempfänger	Friedrich-Schiller-Universität Jena Institut für Ernährungswissenschaften Lehrstuhl für Ernährungstoxikologie PD Dr. M. Glei Prof. B. L. Pool-Zobel†
Projektbezeichnung	Teilprojekt 1 Dreifach funktionelle Eigenschaften von Lebensmitteln durch präbiotische Ballaststoffe, Antioxidantien des Weizen-Aleurons und probiotische Butyratbildner
Förderkennzeichen	0313829A
Laufzeit des Vorhabens	1. August 2006 – 30. September 2009

1 Kurze Darstellung

1.1 Aufgabenstellung

Der Kolonkrebs stellt weltweit eine der häufigsten Krebsformen dar. Er tritt meist sporadisch auf, wobei der Lebensstil eine bedeutende Rolle als Risikofaktor einnimmt. So bestätigen zahlreiche Studien einen Zusammenhang zwischen Ernährung und Krebsrisiko. Es ist anzunehmen, dass bis zu 70 % der Darmkrebserkrankungen durch eine bewusste Ernährung vermeidbar wären. Insbesondere ein erhöhter Verzehr an Ballaststoffen steht in Verbindung mit einer Risikoreduktion. Die bakterielle Fermentation der Ballaststoffe im Darm führt zu einem Anstieg von kurzkettigen Fettsäuren (SCFA; Azetat, Propionat und Butyrat), denen chemopräventive Eigenschaften zugesprochen werden. Im Rahmen der Chemoprävention durch Butyrat könnten zum einen gesunde Krebszellen vor Schäden durch reaktive Metabolite geschützt werden indem eine Aktivierung von Schutzmechanismen wie die Glutathion S-Transferasen (GST) und anderer Phase II Enzyme, die zur Entgiftung von Fremdstoffen beitragen, erfolgt. Zum anderen wäre es möglich der Transformation bereits initiiertes Zellen durch Mechanismen der Wachstumshemmung wie Zellzyklusarrest, Apoptoseinduktion und der Differenzierung entgegenzuwirken. Somit wäre denkbar, dass pflanzliche Lebensmittel durch Genaktivierung in gesunden wie in entarteten Zellen eine Erhöhung der Entgiftungskapazität und der Wachstumshemmung bewirken und somit einen Beitrag zur Reduktion des Kolonkrebsrisikos leisten. Ziel dieses Projektes war zu untersuchen, ob verschiedene Weizenfraktionen (Vollkornmehl, Kleie und Aleuron) und

deren Fermentationsmetabolite in Zellen unterschiedlichen Transformationsgrades chemopräventiv wirken und welche Mechanismen hierfür verantwortlich sind. Dazu wurde untersucht, welche Gene der Chemoprotektion im Kolon induzierbar sind und welche funktionellen Konsequenzen daraus resultieren. Darüber hinaus wurde untersucht, ob eine Steigerung möglicher chemopräventiver Effekte durch Zugabe von zwei probiotischen Bakterienstämmen zu erreichen ist.

1.2 Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde

Projektbezogene Forschungsschwerpunkte der Arbeitsgruppe Prof. Pool-Zobel / PD Dr. Gleis sind die Kolonkarzinogenese, Ernährungsprävention und entsprechende Biomarker, welche über mögliche Risiken oder Schutzpotentiale Auskunft geben können. Die Gruppe arbeitet seit Jahren mit verschiedenen Modellzellen der Kolonkarzinogenese (von frühen Adenom- bis zu Karzinomzellen) und hat darüber hinaus intensive Kontakte zum Klinikum der FSU. So stehen regelmäßig Resektionsproben zur Verfügung, die zur Gewinnung primärer und noch nicht entarteter Darmzellen dienen. Einen wichtigen Schwerpunkt bildet die Untersuchung des protektiven Potentials pflanzlicher Lebensmittel bzw. Lebensmittelinhaltsstoffe, was Aussagen über deren Eignung als Bestandteil funktioneller Lebensmittel erlaubt. *In vitro* konnten so u. a. wesentliche Ergebnisse zu Interaktionen zwischen Genen und innerhalb der Verdauung von Weizen gebildeter Metabolite (Genexpression, Genotoxizität, Chemoprotektion) generiert werden. So ist die Fragestellung, ob Butyrat als wichtiges Darmfermentationsprodukt das GST/Glutathion-Schutzsystem der Zellen modulieren kann und so zu einer erhöhten Chemoresistenz der Zellen gegenüber endogenen oder exogenen Risikosubstanzen führt von zentraler Bedeutung. Darüber hinaus zeichnet die Gruppe eine besondere Expertise auf dem Gebiet der Entwicklung und Anwendung von Biomarkern aus, eine weitere wichtige Grundlage für das Vorhaben.

Die technische Ausstattung des Lehrstuhles Ernährungstoxikologie erlaubte den sofortigen Beginn der angedachten Projektarbeiten. Alle wichtigen apparativen Voraussetzungen für die molekularbiologischen Arbeiten waren vorhanden. Ein wichtiges Geräte, der Zellzähler (CASY-Modell TT) zur objektiven Zellzahl- und Vitalitätsbestimmung, wurde aus Projektmitteln erworben. Die Techniken waren überwiegend zu Projektbeginn etabliert. Dazu zählt auch eine in früheren Projekten etablierte und validierte Methode zur Fermentation von faserhaltigen Rohstoffen (one-batch model), die um eine Simulation des Verdauungstraktes erweitert wurde. Zur Untersuchung des apoptotischen Potentials des fermentierten Weizenaleurons wurde ein Assay zur Bestimmung der Enzymaktivität verschiedener Caspasen in der Arbeitsgruppe etabliert.

Die Arbeitsgruppe war bereits Partner in verschiedenen EU-Projekten zu Funktionellen Lebensmitteln (Phenolic Phytoprotectants, The Comet Assay, 2nd Generation Functional Foods, Seasonal Dietary Antioxidant Levels, SYNCAN, PHYTOPREVENT, SEAFOODPLUS) und in verschiedenen konzertierten Aktionen (BIOMARKERS, FOSIE, PASSCLAIM, PHYTOHEALTH). Gegenwärtig arbeitet sie in nationalen (u. a. NutritionNET, BMBFT, FlavoNET) und internationalen (Food Standards Agency, UK (BIOMICS) und University of Maryland,

Baltimore, USA) Projekten mit, auf deren Ergebnisse dieses Projekt ebenfalls aufbauen konnte.

Ausgewählte eigene Literatur:

Wollowski, S.Ji, A.T.Bakalinsky, C.Neudecker, B.L.Pool-Zobel. Bacteria used for the production of yogurt inactivate carcinogens and prevent DNA damage in the colon of rats, *J Nutr* 129 (1999) 77-82.

M.N.Ebert, A.Klinder, A.Schäferhenrich, W.H.M.Peters, W.Sendt, J.Scheele, B.L.Pool-Zobel. Expression of glutathione S-transferases (GST) in human colon cells and inducibility of GSTM2 by butyrate, *Carcinogenesis* 24 (2003) 1637-1644.

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

Schäferhenrich, W.Sendt, J.Scheele, A.Kuechler, T.Liehr, U.Claussen, A.Rapp, K.O.Greulich, B.L.Pool-Zobel. Endogenously formed cancer risk factors induce damage-of p53 in human colon cells obtained from surgical samples, *Fd Chem Toxicol* 41 (2003) 655-664.

A.Klinder, E.Gietl, R.Hughes, N.Jonkers, P.Karlsson, H.McGlyn, s.Pistoli, K.M.Tuohy, J.Rafter, I.R.Rowland, J.Van Loo, B.L.Pool-Zobel. Gut fermentation products of inulin-derived prebiotics inhibit markers of tumour progression in human colon tumour cells, *International Journal of Cancer Prevention* 1 (2004) 19-32.

M. Glei, N. Habermann, K. Osswald, Ch. Seidel, Ch. Persin, G. Jahreis, B. L. Pool-Zobel. Assessment of DNA damage and its modulation by dietary and genetic factors in smokers using the comet assay: a biomarker model, *Biomarkers*, March-June 2005; 10(2-3): 203-217.

B.L.Pool-Zobel, R.Veeriah, T.Kautenburger, J.Kiefer, K.K.Richter, J.Sauer, M.Soom, S.Wölfl. Butyrate may enhance toxicological defence in primary, adenoma and tumour human colon cells by favourably modulating expression of glutathione S-transferases genes, *Carcinogenesis* 26 (2005) 1064-1076.

B.L.Pool-Zobel, R.Veeriah, F.D.Böhmer. Modulation of xenobiotic metabolising enzymes by anticarcinogens - focus on glutathione S-transferases and their role as targets of dietary chemoprevention in colorectal carcinogenesis, *Mutat Res.* 2005 Dec 11;591(1-2):74-92.

B.L.Pool-Zobel. Inulin-type fructans and reduction in colon cancer risk: Review of experimental and human data, *Br J Nutr* 93 (2005) S73-S90.

M. Glej, T. Hofmann, K. Küster, J. Hollmann, M. G. Lindauer, B. L. Pool-Zobel. Both wheat (*triticum aestivum*) bran arabinoxylans and gut flora-mediated fermentation products protect human colon cells from genotoxic activities of 4-hydroxynonenal and hydrogen peroxide, J Agric Food Chem. 2006 Mar 22; 54(6):2088-2095.

S.Veeriah, T.Kautenburger, J.Sauer, H.Dietrich, F.Will, B.L.Pool-Zobel. Apple flavonoids inhibit growth of HT29 human colon cancer cells and modulate expression of genes involved in the biotransformation of xenobiotics, Mol Carcinog. 2006 Mar;45(3):164-74.

1.3 Planung und Ablauf des Vorhabens

Wenig ist über die ernährungsabhängige Modulation von Entgiftungsenzymen und Wachstumshemmung nach Verzehr von komplexen Lebensmitteln wie Weizen im humanen Kolon bekannt. Es war deshalb Ziel des vorliegenden Projektes, einen Beitrag zur Entwicklung von so genanntem „Functional Food“ mit gesundheitsfördernden Inhaltsstoffen zu leisten. Zu diesem Zweck sollten die chemoprotektiven Eigenschaften der Weizenfraktionen Vollkornmehl, Kleie und im Besonderen Aleuron in humanen Kolonzellen unterschiedlichen Transformationsgrades *in vitro* erforscht werden. Im Folgenden sind die Aufgaben und Ziele des Teilprojektes als Meilensteine formuliert:

	1. Jahr				2. Jahr				3. Jahr			
	I	II	III	IV	I	II	III	IV	I	II	III	IV
Ziel 1: Bereitstellung der Rohmaterialien												
Weizenextrakte												
Probiotika												
Inulin (Kontrolle)												
Erste Proben zur weiteren Analyse verfügbar		!										
Ziel 2: Gewinnung der Testproben												
Präfermentation des Weizenaleuron												
Präfermentationsproben verfügbar				!								
Präparation der Referenzproben												
Erste Referenzproben verfügbar				!								
Durchführung der <i>in vitro</i> Fermentation												
Erste Fermentationsüberstände verfügbar				!								
Biofilme: Selektion der geeigneten Bakterienstämme												
Auswahl der am besten geeigneten Bakterienstämme								!				
Etablierung der Biofilme in Kolon Zellkultur												
Neues <i>in vitro</i> Modell (Biofilm) ist etabliert											!	
Ziel 3: Messung der Parameter												
Analytik												
Mikrobiologie												
Chemoprotektion												
Kenntnis der Funktionellen Effekte synbiotischer Gemische												!
Ziel 4: Entwicklung funktioneller Lebensmittel												
Recherche und Marktbeobachtung												
Kenntnis der lokalen Angebots- und Wettbewerbssituation				!								
Austestung des ersten Rohstoffes												
Erste Rezeptur zur Marketing Überprüfung liegt vor								!				
Kenntnis der globalen Angebots- und Wettbewerbssituation								!				
Verbraucherbefragung mit Zwischenprodukt												
Endgültige Rezeptur für den klinischen Test												!
Rezeptur für die Markteinführung												!
Verbraucherbefragung mit Endprodukt												
Projekttreffen												
Meilensteine !		!	!	!		!	!			!	!	!

1.4 Wissenschaftlicher und technischer Stand zur Anknüpfung des Vorhabens

Dickdarmkrebs ist ursächlich mit der Ernährung verbunden. Diese kann Risikofaktoren enthalten, die Mutationen auslösen und Krebs initiieren, oder mittels genetischer oder epigenetischer Mechanismen das Wachstum von Krebszellen verstärken können ⁽⁹⁾. Die Ernährung liefert aber auch Stoffe, die den Risikofaktoren entgegen wirken ⁽¹⁵⁾. Ein wichtiger Vertreter der protektiven Nahrungsinhaltsstoffe dürften die Ballaststoffe (z. B. Nichtstärkepolysaccharide) aus pflanzlichen Lebensmitteln sein. Während einige sehr große Studien ^(5; 6) belegen, dass sie das Risiko für Dickdarmkrebs vermindern, konnten andere Untersuchungen ⁽¹³⁾ dies nicht bestätigen. Gründe für diese Kontroverse sind vielfältig und resultieren möglicherweise aus der begrenzten Aussagekraft epidemiologischer Studien ⁽²⁴⁾. Andere Gründe für das Fehlen von nachweisbaren, positiven Effekten im Darm könnten eine zu geringe Aufnahme (< 30 g Ballaststoffe/Tag), die Qualität der verzehrten Faserstoffe (Fermentierbarkeit durch die Darmflora und dadurch Bildung von kurzkettigen Fettsäuren),

oder die An- bzw. Abwesenheit von weiteren pflanzlichen Bestandteilen (Phytoprotektanten mit antioxidativem Potential) in der Nahrung sein ^(4; 10; 22).

Als eine Grundlage für die Durchführung des Projektes diene eine *in vitro* Fermentationsmethode nach Barry et al. ^(3; 4) zur Gewinnung von Fermentationsüberständen, welche anschließend in zellkulturbasierten Untersuchungen eingesetzt werden können. Diese Methode wurde bisher erfolgreich in Untersuchungen am Lehrstuhl verwendet ^(4; 11; 20). Weitere Grundlagen für die Konzipierung des Projektes stellten folgende Ergebnisse aus *in vivo* Untersuchungen unter Verwendung von Weizenprodukten dar:

- Weizenkleie (+ Lipide) reduziert AOM (Azoxymethan)-induzierte Kolontumore ⁽²³⁾
- Weizenaleuronmehl reduziert AOM-induzierte Kolontumore ⁽¹⁹⁾
- Resistente Stärke Typ III und Fructooligosaccharide reduzieren AOM-induzierte Kolontumore ⁽²¹⁾
- Vorfermentierter Weizenkeimextrakt reduziert AOM-induzierte Kolontumore ⁽²⁸⁾
- Weizenvollkornmehl reduziert AOM-induzierte Kolontumore ⁽²⁷⁾
- Weizenmehl, Vollkorn und Kleie reduzieren Mutagenität von IQ (2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline) ⁽²⁷⁾
- Verschiedene Weizenkornarten, verschiedene Weizenkleie reduzieren Tumore ⁽⁷⁾
- Kleie reduziert die Plasmakonzentration von IQ ⁽¹⁶⁾
- Weizenkleie induziert Apoptose und Differenzierung in Kolonkrypten AOM-induzierter Kolontumore ⁽¹⁴⁾

Aus diesen Studien lässt sich jedoch nicht ableiten, welcher Anteil der Weizenfraktion am effektivsten als antikarzinogener Bestandteil von funktionellen Lebensmitteln wirken könnte. Außerdem ist keine Aussage darüber möglich, ob die antikarzinogene Aktivität von Weizenprodukten möglicherweise noch erhöht werden kann, wenn Subfraktionen mit besonders hohem antioxidativem Potential, also die Aleuronfraktion, eingesetzt werden. Deshalb beabsichtigten wir, das chemoprotektive Potential der Aleuronfraktion, der Kleie und des Weizenkorns zu vergleichen und nachfolgend spezifische Untersuchungen mit Aleuron durchzuführen.

1.5 Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Die Zusammenarbeit im Verbundprojekt erfolgte im Wesentlichen zwischen der Friedrich-Schiller-Universität Jena (FSU Jena), dem Forschungszentrum Karlsruhe (FZK), dem MRI Detmold und dem Industriepartner Kampffmeyer Food Innovation GmbH. ORAFIT, Belgien lieferte die Vergleichssubstanz Synergy1 und die Bühler AG lieferte die hochreine Aleuronfraktion. Die Aufgabenbeschreibung und -verteilung zeigt die nachfolgende Zusammenstellung:

Tab. 1: Zusammenstellung der Aufgabenverteilung

Bereitstellung der Rohstoffe	<ul style="list-style-type: none"> -Weizenfraktionen (Vollkornmehl, Kleie, Aleuron) -Synergy1 -Probiotika (LGG/Bb12), Clostridium butyricum 	<p>Kampffmeyer</p> <p>ORAFIT</p> <p>FZK</p>
Gewinnung der Testproben	<ul style="list-style-type: none"> -Präfermentation und Fermentation der Weizenfraktionen (mit und ohne Zugabe ausgewählter Bakterien) zur Gewinnung der Fermentationsüberstände (FÜ) -probiotische Biofilme -Isolierung und Charakterisierung der Referenzsubstanzen 	<p>FSU Jena</p> <p>MRI Detmold</p>
Messung der Parameter	<ul style="list-style-type: none"> -Analytik: SCFA und Gallensäuren -Analytik: Proteine, Aminosäuren, Fett, Mineralstoffgehalt, Glukose, Stärke, Ballaststoffe, Arabinoxylane, Arabinose, Xylose, Fruktose, Galactose, Glucane, Ferulasäure und deren Metabolit, Antioxidative Kapazität -Analytik: Ammoniak -Mikrobiologie: Zusammensetzung Bakterienflora, probiotische Biofilme -Mikrobiologie: probiotische Biofilme in humanen Kolonzenellen -Chemoprävention: Hemmung Initiation, Unterdrückung Progression → molekulare Marker 	<p>FZK</p> <p>MRI Detmold</p> <p>FSU Jena</p> <p>FZK</p> <p>FSU Jena</p> <p>FSU Jena</p>
Entwicklung funktioneller Lebensmittel	<ul style="list-style-type: none"> -Recherche und Marktbeobachtung -Rohstoff-Prozess-Analytik Verfahrens- und Rezeptentwicklung -nationale Umsetzung des Konzeptes 	<p>Kampffmeyer</p>

2 Eingehende Darstellung

2.1 Verwendung der Zuwendung und des erzielten Ergebnisses im Einzelnen, mit Gegenüberstellung der vorgegebenen Ziele

Es ist von besonderer Bedeutung, dass die Weizenproben analog der natürlichen Verdauung im Gastrointestinaltrakt auch *in vitro* ausreichend in kleinere Nahrungsbestandteile zersetzt werden, da hauptsächlich Spaltprodukte der Weizenproben mit Kolonozyten interagieren. Somit war die Etablierung einer geeigneten Methode für die *in vitro* Fermentation der Proben mit Simulation der gastrointestinalen Passage eine Grundlage zur Gewinnung von Fermentationsüberständen (FÜ) der verschiedenen Weizenfraktionen. Eine bereits am Lehrstuhl angewendete *in vitro* Fermentationsmethode zur Simulation des Dickdarms⁽³⁾ wurde um die Simulation des oberen Verdauungstraktes, orientiert am Protokoll nach Aura et al.⁽²⁾, erweitert. Dabei wurden die Konzentrationen der benötigten Verdauungsenzyme und Gallensäuren auf die Bestandteile des Weizens und somit auf annähernd physiologische Bedingungen angepasst. Große Aufmerksamkeit galt hierbei den Gallensäuren, welche für die zytotoxischen Eigenschaften von Fermentationsproben einiger *in vitro* Verdauungssysteme in Zellkulturexperimenten verantwortlich gemacht wurden⁽⁸⁾. Die Aussagen konnten wir bei der Verwendung einer hohen nicht physiologischen Gallensäurekonzentration, welche in der Methode nach Aura et al. eingesetzt wurde, bestätigen. Durch die Anpassung an eine physiologische Gallensäurekonzentration konnten die zytotoxischen Effekte im Zellkultursystem beseitigt werden. Dadurch war es möglich, *in vitro* die biologischen Effekte der komplexen FÜ zu untersuchen, ohne dass diese durch Bestandteile des Verdauungssystems beeinflusst und/oder maskiert wurden. Auch die in die Methode integrierte Simulation der Aufnahme von absorbierbaren Bestandteilen unter Verwendung einer Dialyse zur Annäherung an den physiologischen Verdauungsprozess trug zur Optimierung der Methode maßgeblich bei. Der Ablauf der gesamten *in vitro* Fermentation ist in Abb. 1 aufgeführt.

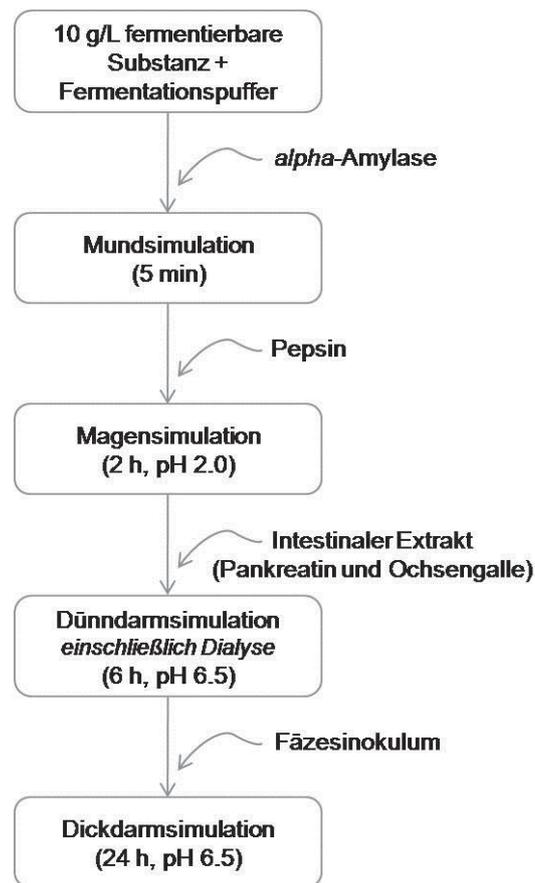


Abb. 1: Schematische Darstellung des *in vitro* Fermentationssystems

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.

Tab. 2: Erläuterung der durchgeführten Fermentationsserien

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

Innerhalb dieses Projektes wurden aus den zur Verfügung stehenden Projektgeldern 1 Gerät angeschafft (**CASY-Zellzähler**), welches für folgende Anwendungen eingesetzt wurde: Die Vitalitäts- und Zellzahlbestimmung der LT97- und HT29-Zellen für jede Aussaat sowie nach jeder Zellernte erfolgte unter Verwendung des **CASY-Zellzählers** (CASY-Model TT, Roche Innovatis AG CASY Technology, Bielefeld).

Die Tab. 3 liefert Informationen über die Verwendung von Methoden, Zelltypen und Testsubstanzen sowie deren Konzentrationen hinsichtlich der zu untersuchenden Parameter:

Tab. 3:Übersicht über die Verwendung von Methoden, Zelltypen und Testsubstanzen sowie deren Konzentrationen hinsichtlich der zu untersuchenden Parameter zur Erfassung der biologischen Aktivität der FÜ.

	Parameter	Methode	Testsubstanz	Konzentration	Zeit	Zellen
	Zytotoxizität	Trypanblau-Ausschlusstest	FÜ der Fermentation II und III	2,5-20 %	1-12 h	Primärzellen
Primärprävention	Expression von Genen der Biotransformation und Stressantwort	Custom Array, real-time qPCR	FÜ der Fermentation II und III	5 und 10 %	24 h	HT29, Primärzellen
	Enzymaktivitäten (GST und Katalase)	Photometrische Messung nach Habig et al. ⁽¹²⁾ bzw. Aebi et al. ⁽¹⁾	FÜ der Fermentation II und III	5 und 10 %	24, 48 & 72 h (HT29); 10 h (Primärzellen)	HT29, Primärzellen
			Synthetische Mischungen der SCFA der FÜ	5 und 10 %		24, 48 & 72 h
	Geno-/Antigenotoxizität	Comet Assay	FÜ der Fermentation II und III	5 und 10 %	24 & 48 h	HT29
Sekundärprävention	Expression von Genen der Zellproliferation und Apoptose	Custom Array, real-time qPCR	FÜ der Fermentation II und III	5 und 10 %	24 h	HT29, LT97
	Proliferation/ Zellwachstum	DAPI Assay	Wässrige Extrakte der Weizenfraktionen (EU und US)	0,05-40 g/l	24, 48 & 72 h	HT29, LT97
			FÜ der Fermentation I, II und III	2,5-20 %		
			Synthetische Mischungen der SCFA und DCA der FÜ	2,5-20 %		
	Apoptose	Durchflusszytometrie, Caspase Assay	FÜ der Fermentation II und III	5 und 10 % (HT29); 2,5 und 5 % (LT97)	24, 48 & 72 h	HT29, LT97
			Synthetische Mischungen der SCFA der FÜ	5 und 10 % (HT29); 2,5 und 5 % (LT97)		
	Differenzierung	Photometrische Messung der alkalischen Phosphatase	FÜ der Fermentation II und III	5 und 10 % (HT29); 2,5 und 5 % (LT97)	24, 48 & 72 h	HT29, LT97
Zellzyklus	Durchflusszytometrie	FÜ der Fermentation II und III	5 und 10 %	24 & 48 h	HT29	
		Synthetische Mischungen der SCFA der FÜ	5 und 10 %			

2.1.1 Quantitative Vergleichbarkeit biologischer Wirkungen von Inhaltsstoffen aus Weizengesamtkorn, Weizenkleie und Weizenaleuron

2.1.1.1 Chemische Analytik der Ausgangssubstanzen

Innerhalb des Projektes wurden verschiedene Weizenfraktionen (Vollkornmehl, Kleie, Aleuron) sowie zwei Sorten dieser (EU, europäisch; US, amerikanisch), welche als Ausgangssubstanzen für anschließende Versuchen verwendet wurden, durch das MRI in Detmold chemisch charakterisiert (Tab. 4). Das Vollkornmehl enthielt den höchsten Gehalt an Stärke (66 %), gefolgt von dem Gehalt an Protein (16 %), Ballaststoffen (15 %), Fett (3 %) und Asche (<2 %). Die Analytik der aus dem Weizenvollkorn isolierten Kleie verwies im Allgemeinen auf eine Zunahme der aufgeführten Inhaltstoffe mit Ausnahme des Stärkegehalts, welcher mit 14 % deutlich unter dem des Vollkornmehls lag. Außerdem kam es im Aleuron zu einer weiteren Konzentrierung an Protein, Fett und Asche. Auffällig war ebenso der hohe Gehalt an Ballaststoffen sowohl in der Kleie (56 %) als auch im Aleuron (47 %). Während die Konzentration des Gesamtballaststoffgehalts im Aleuron im Vergleich zur Kleie leicht abnahm, erhöhte sich der Gehalt an wasserlöslichen Ballaststoffen. Die Arabinoxylane machten hierbei mit 55 % den größten Anteil an den Gesamtballaststoffen aus, gefolgt von einem geringen Teil an β -Glucanen (9 %). Zwischen beiden Sorten gab es keine wesentlichen Unterschiede.

Die einzelnen Weizenfraktionen – 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. 5). 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. 4: Chemische Zusammensetzung der Weizenfraktionen von Aleuron, Vollkornmehl und Kleie von zwei verschiedenen Weizensorten.

	EU (g/100 g TM)			US (g/100 g TM)		
	Aleuron	Vollkorn	Kleie	Aleuron	Vollkorn	Kleie
Ballaststoffe, davon	47,4	13,4	57,1	46,6	16,7	53,9
wasserunlöslich	42,8	11,2	54,0	41,3	14,6	50,9
wasserlöslich	4,5	2,2	3,2	5,4	2,1	3,0
Arabinoxylane	26,1	6,4	29,8	25,3	6,3	29,8

β-Glucane	4,2	0,6	2,4	4,7	0,7	7,5
Stärke	8,9	69,1	13,9	3,8	62,3	13,8
Protein	19,4	13,3	16,2	22,6	18,4	17,9
Fett	6,6	3,1	5,1	6,1	2,7	4,4
Mineralstoffe	8,6	1,5	5,8	10,6	1,8	6,8
	[mg/g]			[mg/g]		
Antioxidative Kapazität (GAE)	3,3	0,9	1,8	2,9	1,0	1,7
Ferulasäure <i>gebunden</i>	4,8	0,8	3,5	4,4	0,8	3,4
<i>frei</i>	0,2	0,2	0,2	0,2	0,1	0,2

2.1.1.2 Isolation oder chemische Synthese und chemisch-analytische Charakterisierung der Referenzsubstanzen (Dehydrodiferulasäuren, feruloylierte Arabinoxyloligosaccharide) aus Getreide

Die Isolierung bzw. die chemische Synthese der Referenzsubstanzen des Weizenaleurons (Dehydrodiferulasäuren, feruloylierte Arabinoxyloligosaccharide) am Max-Rubner Institut Detmold führte zu keinen verwertbaren Ergebnissen.

2.1.1.3 Biologische Wirkung sowie antioxidative Kapazität wässriger Extrakte

Um die biologische Wirkung löslicher Bestandteile der Weizenfraktionen näher zu charakterisieren, wurden wässrige Extrakte aus Vollkornmehl, Kleie und Aleuron der unterschiedlichen geographischen Regionen hinsichtlich ihrer wachstumsmodulierenden Eigenschaften in Kolonkrebzellen (LT97- und HT29-Zellen) untersucht. Darüber hinaus wurde auch das antioxidative Potential der wässrigen Extrakte durch den Projektpartner MRI Detmold bestimmt (Tab. 5).

Innerhalb einer Sorte wies Aleuron die stärkste antioxidative Kapazität auf, wobei regionale Unterschiede (EU > US) detektiert wurden ($P < 0,05$; überprüft mittels Two-way ANOVA und Bonferroni Post Tests).

Tab. 5: Antioxidative Kapazität (GAE) der wässrigen Extrakte der Weizenfraktionen (Vollkornmehl, Kleie, Aleuron) verschiedener Regionen (EU und US).

	Antioxidative Kapazität (GAE) [mg/l]			
	EU Weizen		US Weizen	
	HT29-Medium	LT97-Medium	HT29-Medium	LT97-Medium
Vollkornmehl	78	184	125	212
Kleie	219	278	171	270

Aleuron	453	541	182	336
---------	-----	-----	-----	-----

In LT97- und HT29-Zellen zeigten alle wässrigen Extrakte eine konzentrationsabhängige Wachstumshemmung ($P < 0,05$; überprüft mittels one-way ANOVA und Bonferroni Post Test) (Tab. 6). Das Zellwachstum von HT29-Zellen wurde am effektivsten durch EU Aleuron gehemmt. Nur für diese Sorte konnte ein signifikanter Unterschied der Wirkung des Aleurons zum Vollkornmehl nachgewiesen werden ($P < 0,05$; überprüft mittels Two-way ANOVA und Bonferroni Post Tests), wobei der Extrakt des Vollkornmehls den geringsten antiproliferativen Effekt hatte. In LT97-Zellen zeigte Kleie die größte Zytotoxizität. Außerdem wirkte EU Aleuron besonders effektiv. Generell reagierten LT97-Zellen sensitiver auf eine Inkubation mit den wässrigen Extrakten der Weizenproben als HT29-Zellen.

Tab. 6: EC₅₀-Werte [%]* der wässrigen Extrakte der Weizenfraktionen (Vollkornmehl, Kleie, Aleuron) verschiedener Regionen (EU und US) nach Inkubation der HT29- und LT97-Zellen.

	EC ₅₀ [%]							
	EU Weizen				US Weizen			
	HT29		LT97		HT29		LT97	
	48 h	72 h	48 h	72 h	48 h	72 h	48 h	72 h
Vollkornmehl	43,4	29,2	36,9	36,1	-	14,8	20,8	16,9
Kleie	31,2	24,7	20,9	18,2	40,3	28,7	24,9	16,8
Aleuron	22,7	21,0	26,7	23,3	33,9	27,9	38,1	21,1

* EC₅₀ ist definiert als die effektive Konzentration, bei welcher die vitale Zellzahl um 50 % gesenkt wurde.

2.1.2 Fermentation der Weizenproben mit und ohne Zugabe von Inulin als „Fermentations-trigger“ und zelluläre Effekte der FÜ

2.1.2.1 Analytik der Fermentationsüberstände

Unter Verwendung der am Lehrstuhl Ernährungstoxikologie etablierte Fermentationsmethode wurden in der Fermentationserie I EU Aleuron und im Vergleich hierzu EU Kleie und EU Vollkornmehl sowie als Referenzsubstanz Synergy1 *in vitro* verdaut und fermentiert. Als Kontrolle diente eine Probe ohne Zugabe einer Ballaststoffquelle (Blank). Um die biologisch aktiven Inhaltsstoffe in den resultierenden FÜ zu charakterisieren, wurde die Konzentration an gebildeten SCFA, Gallensäuren (Chol- (CA) und Desoxycholsäure (DCA)), Ammoniak und Ferulasäure bestimmt. Die Erhöhung der SCFA (Tab. 7) in den FÜ aller Weizenproben und Synergy1 im Vergleich zum FÜ Blank auf das Zwei- bis Dreifache deutet darauf hin, dass eine bakterielle Fermentation stattgefunden hat und die Ballaststoffe, vor allem die Arabinoxylanfraktionen, der Weizenproben oder die Oligofruktanketten des Synergy1 verstoffwechselt wurden. Dabei kam es besonders zu einem Konzentrationsanstieg an Butyrat, wobei die Azetatbildung deutlich abnahm. Ebenso spiegelt sich die Verschiebung der SCFA hinzu Butyrat im Verhältnis der SCFA wider. Im Vergleich zu Synergy1 lässt sich

erkennen, dass die bakterielle Fermentation des Vollkornmehls ähnliche Gehalte an SCFA lieferte. Dahingegen wiesen Kleie und Aleuron deutlich niedrigere Konzentrationen auf. Die Verhältnisse der SCFA waren hingegen annähernd vergleichbar.

Tab. 7: Dargestellt sind die absoluten Konzentrationen der kurzkettigen Fettsäuren (SCFA) sowie deren Verhältnisse in den FÜ der Fermentation I.

FÜ	SCFA [mM]			Verhältnis der SCFA[%]
	Azetat	Propionat	Butyrat	
Blank	15,24	4,54	5,82	59:18:23
Synergy1	33,31	7,25	26,39	50:11:39
EU Vollkornmehl	43,77	9,68	29,72	53:11:36
EU Kleie	22,90	8,47	18,42	46:17:37
EU Aleuron	27,56	12,20	24,41	43:19:38

Alle fermentierten Weizenproben und Synergy1 zeigten gegenüber FÜ Blank einen verringerten Gehalt an CA (1,3- bis 2,2-fach) und vor allem an DCA (3,5- bis 13,8-fach) (Tab. 8).

Die Konzentration an Ammoniak wurde in Korrelation mit der enthaltenen Proteinkonzentration (siehe Tab. 4) der Ausgangsstoffe erhöht (Tab. 8). Der bereits im FÜ Blank enthaltene Ammoniakgehalt resultierte wahrscheinlich aus dem Proteingehalt der Fäzes der einzelnen Spender. Dieser wurde durch die Fermentation des Synergy1 vollständig beseitigt. Ferulasäure war aufgrund der vorliegenden Detektionsgrenzen in keinem der FÜ nachweisbar.

Tab. 8: Dargestellt sind die Konzentrationen der Gallensäuren Chol- (CA) und Desoxycholsäure (DCA) sowie der Gehalt an Ammoniak in den FÜ der Fermentation I.

FÜ	Gallensäuren [μ M]		Ammoniak [mM]
	CA	DCA	
Blank	0,24	35,41	10,87
Synergy1	0,14	2,60	0,00
EU Vollkornmehl	0,11	2,57	11,64
EU Kleie	0,18	9,10	14,56
EU Aleuron	0,18	10,26	18,53

In der Fermentationsserie II wurden EU Aleuron, US Aleuron, Synergy1 sowie ein "getriggertes" Ansatz ($\frac{1}{2}$ EU Aleuron + $\frac{1}{2}$ Synergy1: FÜ Trigger) *in vitro* verdaut und fermentiert. Als Kontrolle diente wiederum der Blank. Die in Tab. 9 dargestellten Werte zeigen, dass alle Ballaststoffquellen zu einer Zunahme der Konzentration an SCFA in den FÜ im Vergleich zur Kontrolle (FÜ Blank) führten. Vergleichend zu FÜ EU Aleuron stieg die Konzentration der SCFA durch Zugabe des Synergy1 zu EU-Aleuron (FÜ Trigger) auf das

gleiche Niveau des FÜ Synergy1 an. Auch die Fermentation des US Aleurons resultierte in einem höheren Gehalt an SCFA im Vergleich zum EU-Aleuron. Jedoch zeigten alle Ballaststoffquellen annähernd gleiche Butyratkonzentrationen. Das molare Verhältnis von Azetat:Propionat:Butyrat wurde durch alle Ballaststoffquellen zugunsten des Butyrats verschoben. Zwischen den Testsubstanzen variierte das Verhältnis nur unbedeutend. Die Fermentierbarkeit des EU-Aleurons konnte durch die Zugabe von Synergy1 verbessert werden. Außerdem gab es nur unwesentliche Unterschiede zwischen beiden Aleuronsorten.

Tab. 9: Dargestellt sind die absoluten Konzentrationen der kurzkettigen Fettsäuren (SCFA) sowie deren Verhältnisse in den FÜ der Fermentation II.

FÜ	SCFA [mM]			Verhältnis der SCFA [%]
	Azetat	Propionat	Butyrat	
Blank	10,75	4,56	4,56	54:23:23
EU Aleuron	21,01	7,12	20,32	43:15:42
US Aleuron	25,41	9,06	24,23	43:16:41
Synergy1	31,78	7,09	25,19	50:11:39
Trigger	30,52	8,67	25,71	47:13:40

Alle fermentierten Ballaststoffquellen führten zur Verminderung sowohl der primären (CA; 1,5-2,2-fach) als auch der sekundären Gallensäurekonzentration (DCA; 7,9-38,9-fach), wobei der FÜ Trigger den größten Effekt aufwies (Tab. 10).

Die Konzentration an Ammoniak wurde in Korrelation mit der enthaltenen Proteinkonzentration (siehe Tab. 4) der Ausgangsstoffe im Vergleich zum FÜ Blank erhöht (Tab. 10). Der bereits im FÜ Blank enthaltene Ammoniak resultiert wahrscheinlich aus dem Proteingehalt der Fäzes der einzelnen Spender. Dieser wurde durch die Fermentation des getriggerten Ansatzes und Synergy1 sehr stark reduziert.

Ferulasäure war aufgrund der vorliegenden methodischen Nachweisgrenze in keinem der FÜ nachweisbar.

Tab. 10: Dargestellt sind die Konzentrationen der Gallensäuren Chol- (CA) und Desoxycholsäure (DCA) sowie der Gehalt an Ammoniak in den FÜ der Fermentation II.

FÜ	Gallensäuren [μ M]		Ammoniak [mM]
	CA	DCA	
Blank	0,35	46,65	11,92
EU Aleuron	0,20	5,04	16,63
US Aleuron	0,23	5,93	21,28
Synergy1	0,16	4,11	3,95

2.1.2.2 Modulation der Zellproliferation

Fermentationsserie I

Alle FÜ inhibierten zeit- und konzentrationsabhängig das Zellwachstum von HT29- und LT97-Zellen. Nach 48 und 72 h führten alle FÜ zu einer 50 %igen Reduktion der Zellzahl wobei EC₅₀-Werte in Abhängigkeit der Testsubstanzen und der Inkubationszeit in HT29-Zellen im Bereich von 6,1-19,0 % und in LT97-Zellen von 3,5-12,0 % zu detektieren waren (Tab. 11). LT97-Zellen reagierten demnach sensitiver auf eine Inkubation mit den FÜ als HT29-Zellen. Die FÜ der verschiedenen Weizenfraktionen sowie des Synergy1 waren in beiden Zelllinien effektiver als der FÜ Blank ($P < 0,05$; überprüft mittels Two-way ANOVA und Bonferroni Post Tests). Innerhalb der Weizenfraktionen konnten keine Unterschiede gezeigt werden. Da die gebildeten Metabolite des fermentierten EU Aleurons in der Lage sind, die Zellzahl in vergleichbarer Weise wie die Metabolite der Kleie und des Vollkornmehls zu reduzieren, kann hieraus geschlossen werden, dass die hauptsächliche Wirkung des Vollkornmehls und der Kleie auf die enthaltene Aleuronfraktion zurückzuführen ist. Die biologische Aktivität des FÜ EU-Aleuron unterschied sich nicht von der Referenzsubstanz Synergy1. Ein potentiell wachstumsmodulierender Effekt des FÜ Aleuron durch aus Arabinonxylenen abgespaltene Antioxidantien wie beispielsweise freier Ferulasäure dürfte daher auszuschließen oder zumindest durch andere Inhaltsstoffe unterbunden worden sein. Möglicherweise ist auch die Konzentration an freigesetzten Antioxidantien zu gering, um einen antiproliferativen Effekt ausüben zu können.

Um festzustellen, welche Fermentationsmetabolite im komplexen FÜ des Aleurons im Vergleich zur Fäzeskontrolle (FÜ Blank) und des Vollkornmehls für die zellmodulierende Wirkung verantwortlich sind, wurden synthetische Mischungen (SCFA, Propionat + Butyrat, Butyrat als Einzelsubstanz), welche die Konzentrationen der entsprechenden SCFA des jeweiligen FÜ widerspiegeln (siehe Tab. 7), hergestellt und bezüglich ihrer wachstumsmodulierenden Wirkung in HT29-Zellen untersucht. Darüber hinaus wurden in LT97-Zellen die synthetischen Mischungen (SCFA, Propionat + Butyrat, Butyrat als Einzelsubstanz) des komplexen FÜ des Aleurons im Vergleich zur Fäzeskontrolle (FÜ Blank) untersucht. Die korrespondierenden Substanzen und Gemische aller untersuchten FÜ hemmten zeit- und konzentrationsabhängig das Wachstum der HT29- und LT97-Zellen, allerdings auf einem niedrigeren Niveau als die komplexen FÜ (Tab. 11). Die korrespondierenden SCFA-Mischungen und Butyrat des FÜ EU Aleuron wirkten analog denen des FÜ EU Vollkornmehl in HT29-Zellen (getestet im zweiseitigen, ungepaarten t-Test). Eine höhere Butyratkonzentration von 5,9 mM in 20 % FÜ des EU-Vollkornmehls hatte keinen größeren Einfluss auf die Reduktion der Zellzahl der HT29-Zellen als 4,9 mM Butyrat im FÜ des EU-Aleurons. Generell ist der hemmende Effekt der komplexen FÜ in beiden Zelllinien also vor allem auf Butyrat zurückzuführen. Propionat und Azetat hatten nur einen geringen zusätzlichen Effekt.

Der komplexe FÜ des Blanks, aber auch die korrespondierenden SCFA-Mischungen und Butyrat als Einzelkomponente wirkten signifikant geringer wachstumshemmend als die FÜ und synthetischen Mischungen der fermentierten Weizenproben in HT29- und LT97-Zellen (zweiseitiger, ungepaarter t-Test: $P < 0,05$). Die Inhibierung des Zellwachstums durch den FÜ Blank ist vermutlich nur partiell (ungefähr 50%) auf die Wirkung von Butyrat zurückzuführen, da nur sehr geringe Butyratkonzentrationen (1,2 mM) in 20 % FÜ Blank nachzuweisen waren. Propionat und Azetat zeigten keinen zusätzlichen wachstumsmodulierenden Effekt.

Tab. 11: EC₅₀-Werte [%]* der FÜ des Blank, Synergy1, EU Vollkornmehl, EU Kleie und EU Aleuron sowie der synthetischen Gemische (SCFA, Propionat + Butyrat) und Butyrat als Einzelsubstanz des FÜ EU Aleurons und EU Vollkornmehls, nach Inkubation der HT29- und LT97-Zellen (Fermentationsserie I).

		EC ₅₀ [%]			
		HT29-Zellen		LT97-Zellen	
		48 h	72 h	48 h	72 h
FÜ					
	<i>Blank</i>	19,0	13,4	12,0	11,5
	<i>Synergy1</i>	11,4	7,8	3,6	3,5
	<i>EU Vollkornmehl</i>	10,2	6,1	4,0	2,9
	<i>EU Kleie</i>	14,5	10,9	5,6	4,8
	<i>EU Aleuron</i>	12,0	9,4	3,9	4,1
SCFA					
	<i>Blank</i>	x	x	x	x
	<i>EU Vollkornmehl</i>	13,4	8,5	n.b.	n.b.
	<i>EU Aleuron</i>	13,5	7,2	5,1	5,7
Propionat + Butyrat					
	<i>Blank</i>	x	x	x	x
	<i>EU Vollkornmehl</i>	14,6	8,6	n.b.	n.b.
	<i>EU Aleuron</i>	15,6	8,8	7,7	6,8
Butyrat					
	<i>Blank</i>	x	x	x	x
	<i>EU Vollkornmehl</i>	20,0	9,4	n.b.	n.b.
	<i>EU Aleuron</i>	15,4	9,6	6,6	7,0

* EC₅₀ ist definiert als die effektive Konzentration bei welcher die vitale Zellzahl um 50 % gesenkt wurde.

x weist daraufhin, dass der EC₅₀ nicht erreicht wurde.

n.b. bedeutet, dass die Werte für die Testsubstanz nicht bestimmt wurden.

Fermentationsserie II

LT97 und HT29-Zellen

Alle FÜ hemmten signifikant zeit- und konzentrationsabhängig das Wachstum von HT29- und LT97-Zellen, wobei der FÜ Blank die geringste Wirksamkeit besaß und sich signifikant von den Testsubstanzen unterschied ($P < 0,05$; überprüft mittels Two-way ANOVA und Bonferroni Post Tests). Nach 48 und 72 h führten alle FÜ zu einer 50 %igen Reduktion der Zellzahl wobei EC₅₀-Werte in Abhängigkeit der Testsubstanzen und der Inkubationszeit in HT29-Zellen in

dem Bereich von 7,1-19,1 % und in LT97-Zellen von 5,9-15,7 % zu detektieren waren (Tab. 12). Zwischen den beiden Weizensorten sowie zum Trigger und zur Referenzsubstanz Synergy1 konnten keine Unterschiede aufgezeigt werden.

Die synthetischen SCFA Gemische sowie Butyrat aller FÜ hemmten zeit- und konzentrationsabhängig das Wachstum der HT29- und LT97-Zellen, wobei diese Wirkung geringer war als die der korrespondierenden komplexen FÜ. Innerhalb einer Testsubstanz waren die synthetischen Gemische und Butyrat gleich effektiv, so dass ausschließlich Butyrat für die Wirkung der synthetischen SCFA-Mischungen verantwortlich gemacht werden kann. Zwischen den beiden Weizensorten (EU und US) gab es keine signifikanten Unterschiede (getestet mittels Two-way ANOVA). Der komplexe FÜ des Blanks aber auch die korrespondierenden SCFA-Mischungen und Butyrat als Einzelkomponente wirkten signifikant geringer wachstumshemmend als die FÜ und synthetischen Mischungen der FÜ Aleuron (EU und US) (getestet mittels Two-way ANOVA und Bonferroni Post Tests: $P < 0,01$). Die geringere Effektivität begründet sich vor allem mit der niedrigen Konzentration an Butyrat im FÜ Blank (siehe Tab. 9).

Tab. 12: EC₅₀-Werte [%]* der FÜ des Blank, EU und US Aleuron, Synergy1 und Trigger nach Inkubation (48 und 72 h) der HT29- und LT97-Zellen (Fermentationsserie II).

		EC ₅₀ [%]			
		HT29-Zellen		LT97-Zellen	
		48 h	72 h	48 h	72 h
FÜ					
	<i>Blank</i>	19,1	14,1	15,8	15,5
	<i>EU Aleuron</i>	13,6	8,8	8,3	7,9
	<i>US Aleuron</i>	11,7	8,2	7,6	7,4
	<i>Synergy1</i>	10,9	7,1	7,0	5,9
	<i>Trigger</i>	11,3	7,7	6,8	6,1
SCFA					
	<i>Blank</i>	x	x	x	x
	<i>EU Aleuron</i>	x	14,4	13,7	13,0
	<i>US Aleuron</i>	x	14,6	10,7	11,3
Propionat + Butyrat					
	<i>Blank</i>	x	x	x	x
	<i>EU Aleuron</i>	x	17,4	x	17,0
	<i>US Aleuron</i>	x	13,8	18,3	14,9
Butyrat					
	<i>Blank</i>	x	x	x	x
	<i>EU Aleuron</i>	x	17,3	14,8	13,7
	<i>US Aleuron</i>	x	14,8	12,2	12,2

* EC₅₀ ist definiert als die effektive Konzentration bei welcher die vitale Zellzahl um 50 % gesenkt wurde.

x weist daraufhin, dass der EC₅₀ nicht erreicht wurde.

Primärzellen

Aufgrund der geringen Verfügbarkeit (Material aus humanen Darm-Operationen) und der Größe der Gewebeprobe wurde der Einfluss auf die Zellzahl und Vitalität nur für FÜ Blank und Aleuron bestimmt.

Alle FÜ hatten zeit- (0-12 h) und konzentrationsabhängig (0-40 %) in Bezug auf die Mediumkontrolle (MK) keinen Einfluss auf die Vitalität und ZZ von Primärzellen, auch zwischen den Testsubstanzen gab es keine Unterschiede (Daten nicht gezeigt). Allerdings zeigte bereits die MK eine zeitabhängige Reduktion der Vitalität um 17-51 % und der ZZ um 17-89 %. Eine Inkubation über 24 h (analog den HT29-Zellen) war nicht zu realisieren, da die Primärzellen unter *in vitro* Bedingungen nur eine sehr geringe Überlebensfähigkeit besitzen. Eine Verbesserung der Arbeitsbedingungen mit humanen Primärproben ist gegenwärtig Gegenstand eines DFG-Projektes.

2.1.3 Fermentation des Weizenaleurons unter Zugabe probiotischer Mikroorganismen

2.1.3.1 Umsetzung der Aleuronfraktion durch ausgewählte Bakterien

Die Untersuchungen zur Umsetzung der Aleuronfraktion durch *Lactobacillus rhamnosus* (LGG), *Bifidobacterium lactis* (Bb12) und *Clostridium butyricum* wurden durch den Projektpartner des FZK durchgeführt. Die Ergebnisse sind in deren Abschlussbericht enthalten und werden aufgrund dessen im Folgenden nur kurz aufgeführt:

- LGG bildete bei der Inkubation mit Aleuron die 2,5-fache Menge an Azetat im Vergleich zur Probe ohne Aleuron
- Bb12 bildete bei der Inkubation mit Aleuron die 1,9-fache Menge an Azetat im Vergleich zur Probe ohne Aleuron
- *Clostridium butyricum* bildet bei Inkubation mit Aleuron die 2,2-fache Menge an Butyrat im Vergleich zur Probe ohne Aleuron

Hieraus wird ersichtlich, dass die Probiotika (LGG und Bb12) nur zur Azetatbildung befähigt sind, wohingegen *Clostridium butyricum* ein reiner Butyratbildner ist. Eine Kombination der Bakterien während der Fermentationsversuche könnte möglicherweise die Butyratbildung begünstigen.

2.1.3.2 Biofilmbildung

Die hierfür notwendigen Untersuchungen wurden ebenso durch den Projektpartner FZK durchgeführt. Daher werden die Resultate nur kurz vorgestellt. Die Versuche zu Wachstum/Biofilmbildung wurden ohne die Inkubation der Bakterien mit Aleuron durchgeführt. Hierbei wurden die bereits erwähnten Bakterien eingesetzt: LGG, Bb12 und *Clostridium butyricum*.

LGG zeigt bereits nach 7 Tagen eine deutliche Biofilmbildung nach der Färbung mit FITC Con A (Abb. 2 A), während sich sowohl bei *Clostridium butyricum* als auch bei Bb12 nach 7 bzw. 21 Tagen keine deutliche Biofilmbildung nachweisen ließ (Abb. 2 B und C).

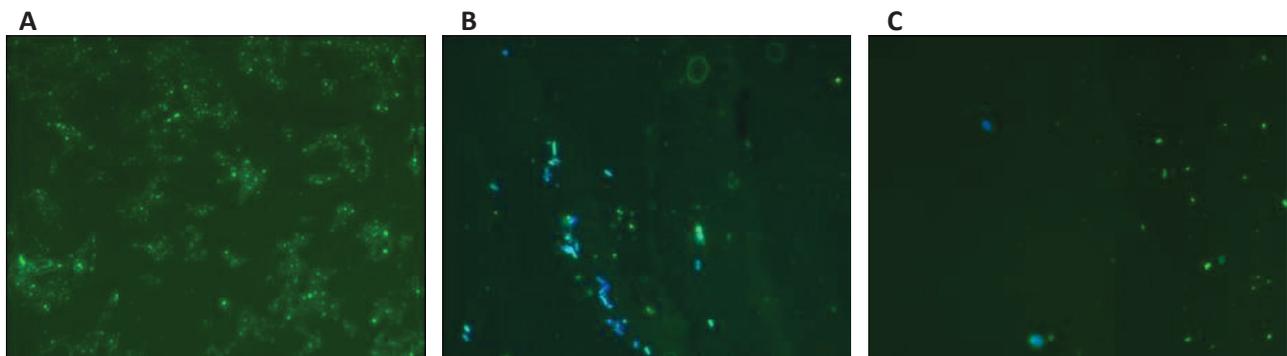


Abb. 2: Ergebnisse der Biofilmfärbung (A: *Lactobacillus rhamnosus* (LGG) nach 7 Tagen mit FITC Con A (grün) gefärbt; B: *Bifidobacterium lactis* (Bb12) nach 21 Tagen mit DAPI (blau) und FITC Con A (grün) gefärbt; C: *Clostridium butyricum* nach 7 Tagen mit DAPI (blau) und FITC Con A (grün) gefärbt).

2.1.3.3 Konsequenz einer kombinierten Fermentation der Weizenaleuronfraktion mit Probiotika und mit der Darmmikroflora

Unter Verwendung der Fermentationsmethodik wurde EU Aleuron mit und ohne Zugabe der Probiotikastämme, LGG und Bb12 sowie dem Butyratbildner *Clostridium butyricum*, verdaut und fermentiert (Fermentation III). Um die biologisch aktiven Inhaltsstoffe in den resultierenden FÜ aus 10 verschiedenen Ansätzen (Tab. 13) zu charakterisieren, wurde die Konzentration an gebildeten SCFA, Gallensäuren (CA und DCA) und Ammoniak bestimmt. Die Auswahl der Probiotikastämme wurde von der Tatsache gestützt, dass diese bereits Bestandteil zahlreicher funktioneller Lebensmittel sind. Die Kombination beider Stämme unterschiedlicher Spezies wurde gewählt, da eine Vielzahl von Studien zeigt haben, dass ein Gemisch von Bakterienstämmen von mehr als einer Gattung effektiver wirken (z. B. durch eine bessere Kolonisation des Darms) als ein Stamm oder die Kombination mehrere Stämme der gleichen Gattung ⁽²⁵⁾. Des Weiteren wurde als Butyratbildner *Clostridium butyricum* eingesetzt, welcher bisher noch keine Verwendung als Probiotika findet.

Tab. 13: Bezeichnung der resultierenden FÜ aus den verschiedenen Fermentationsansätzen.

Ansatz	Bezeichnung
FÜ Blank -	Blank Fäzes
FÜ Blank +	Blank Fäzes+ Probiotika (LGG & Bb12)
FÜ Blank ++	Blank Fäzes+ Probiotika + <i>Clostridium butyricum</i>
FÜ Aleuron -	EU-Aleuron Fäzes
FÜ Aleuron +	EU-Aleuron Fäzes + Probiotika (LGG & Bb12)

FÜ Aleuron + ohne Fäzes	EU-Aleuron nur Probiotika
FÜ Aleuron ++	EU-Aleuron Fäzes + Probiotika + <i>Clostridium butyricum</i>
FÜ Aleuron ++ ohne Fäzes	EU-Aleuron nur Probiotika + <i>Clostridium butyricum</i>
2× FÜ Aleuron +	2× EU-Aleuron Fäzes + Probiotika
2× FÜ Aleuron ++	2× EU-Aleuron Fäzes + Probiotika + <i>Clostridium butyricum</i>

Analytik der Fermentationsüberstände

Durch die bakterielle Fermentation von EU Aleuron konnte die Konzentration an SCFA auf ein Zweifaches erhöht werden, besonders die Butyratbildung wurde gesteigert (Tab. 14). Eine unterstützende Fermentation durch die Probiotika sowohl ohne als auch mit Aleuron konnte ebenfalls die SCFA-Produktion steigern. *Clostridium butyricum* hatte wiederum keinen weiteren Effekt. Durch den Einsatz der doppelten Menge an fermentierbarer Substanz des EU Aleuron konnte die Produktion von SCFA zusätzlich gesteigert werden. Eine alleinige bakterielle Fermentation durch die Probiotika führte zu einer Bildung von Azetat, da beide Stämme nicht in der Lage sind, Butyrat zu bilden. Hingegen konnte *Clostridium butyricum* wahrscheinlich das Azetat oder weitere Fermentationsmetabolite verstoffwechseln, so dass Butyrat gebildet werden konnte.

Generell konnte nur in FÜ Aleuron + ohne Fäzes und FÜ Aleuron ++ ohne Fäzes – CA nachgewiesen werden, so dass die Probiotikastämme wahrscheinlich nicht in der Lage sind, primäre Gallensäuren (enthalten in der zugesetzten Ochsen-galle während der Dünndarmsimulation) in tumor-promovierende sekundäre Gallensäuren umzuwandeln (Tab. 14). Die Fermentation von EU Aleuron führte zu einem deutlich geringeren Gehalt an DCA. Die Umwandlung von primären zu sekundären Gallensäuren wurde durch die Zugabe der Probiotika zum EU Aleuron zusätzlich vermindert. Die Ammoniakkonzentration in den gebildeten FÜ korrelierte wiederum mit der Proteinkonzentration der Ausgangsstoffe, wobei diese Bildung durch die Zugabe von Probiotika reduziert wurde (Tab. 14). Da bei einer alleinigen Fermentation durch die Probiotika kein Ammoniak nachgewiesen wurde, sind diese Stämme wahrscheinlich nicht in der Lage, die Proteine des Aleurons zu fermentieren. Ferulasäure war in keinem der FÜ nachweisbar.

Tab. 14: Dargestellt sind die absoluten Konzentrationen der kurzkettigen Fettsäuren (SCFA), deren Verhältnisse, der Gallensäuren (CA, Cholsäure; DCA, Deoxycholsäure) sowie des Ammoniaks in den FÜ.

	SCFA [mM]			Verhältnis der SCFA [%]	Gallensäuren [µM]		Ammoniak [mM]
	Azetat	Propionat	Butyrat		CA	DCA	
FÜ Blank -	12,80	5,90	6,27	51:24:25	0,00	30,70	16,33

FÜ Blank +	14,69	7,98	14,21	40:22:38	0,00	7,47	12,96
FÜ Blank ++	11,88	6,96	13,24	37:22:41	0,11	9,42	14,24
FÜ Aleuron -	20,71	11,20	23,80	37:20:43	0,00	5,02	22,42
FÜ Aleuron +	21,59	12,01	29,73	34:19:47	< 0,10	1,81	20,58
FÜ Aleuron + ohne Fäzes	12,81	0,00	0,00	100:0:0	14,90	1,76	0,00
FÜ Aleuron ++	23,84	11,91	32,05	35:18:47	< 0,10	2,49	21,98
FÜ Aleuron ++ ohne Fäzes	3,64	0,00	2,14	63:0:37	8,85	1,42	0,00
2× FÜ Aleuron +	25,08	12,85	34,18	35:18:47	< 0,10	0,89	23,90
2× FÜ Aleuron ++	33,78	15,84	37,47	39:18:43	< 0,10	< 0,10	26,32

Funktionelle Konsequenzen – Einfluss auf die Zellzahl humaner Kolonozyten

HT29- Und LT97-Zellen

Alle FÜ inhibierten zeit- und konzentrationsabhängig das Zellwachstum von HT29-Zellen und LT97-Zellen (Tab. 15). Die Proben, bei denen Aleuron fermentiert wurde, wirkten signifikant zytotoxischer als die entsprechenden Kontroll-Fäzesproben. Eine Zugabe der Probiotika (FÜ Aleuron +) konnte diesen Effekt verstärken, so dass bereits bei einer Konzentration von 9,5 % (HT29) bzw. 4,2 % (LT97) nach 48 h und von 5,9 % (HT29) bzw. 4,0 % (LT97) nach 72 h der Anteil der vitalen Zellen um 50 % gesunken war. Die 2× FÜ Aleuron + und 2× FÜ Aleuron ++ hatten den stärksten Einfluss auf die Zellzahl. Die Aleuronproben, die nur durch die Bakterien fermentiert wurden (FÜ Aleuron + ohne Fäzes und FÜ Aleuron ++ ohne Fäzes), zeigten die geringsten Effekte. In LT97-Zellen wirkten FÜ Blank + und FÜ Blank ++ signifikant stärker als FÜ Blank -, so dass die Fermentation mit den Probiotika die Zytotoxizität der FÜ erhöhte. Der Bakterienstamm *Clostridium butyricum* hatte weder in HT29-Zellen noch in LT97-Zellen einen zusätzlichen Effekt.

Generell reagierten LT97-Zellen sensitiver auf eine Behandlung mit den FÜ als HT29-Zellen.

Tab. 15: EC₅₀-Werte [%]* der FÜ der 10 verschiedenen Ansätze nach Inkubation der HT29- und LT97-Zellen.

EC ₅₀ [%]			
HT29		LT97	
48 h	72 h	48 h	72 h

FÜ Blank -	16,2	12,5	10,8	11,6
FÜ Blank +	16,9	11,6	7,7	7,6
FÜ Blank ++	16,6	11,8	7,9	8,2
FÜ Aleuron -	11,8	7,4	5,1	5,1
FÜ Aleuron +	9,6	5,9	4,1	4,0
FÜ Aleuron + ohne Fäzes	×	×	×	×
FÜ Aleuron ++	9,0	5,5	3,7	3,6
FÜ Aleuron ++ ohne Fäzes	×	×	×	26,5
2× FÜ Aleuron +	8,5	5,0	3,2	2,7
2× FÜ Aleuron ++	7,0	4,1	3,1	2,3

*EC₅₀ ist definiert als effektive Konzentration, bei der die Zellzahl auf 50 % an vitalen Zellen gesunken ist.

× weist daraufhin, dass der EC₅₀ nicht erreicht wurde.

Primärzellen

Aufgrund der geringen Verfügbarkeit (Material aus humanen Darm-Operationen) und der Größe der Gewebeprobe wurde der Einfluss auf die Zellzahl und Vitalität nur für FÜ Blank –, Blank +, Aleuron – und Aleuron + bestimmt.

Alle FÜ hatten zeit- (0-12 h) und konzentrationsabhängig (0-40 %) in Bezug auf die Mediumkontrolle (MK) keinen Einfluss auf die Vitalität und ZZ von Primärzellen, auch zwischen den Testsubstanzen gab es keine Unterschiede (Daten nicht gezeigt). Allerdings zeigte bereits die MK eine zeitabhängige Senkung der Vitalität um 14-47 % und der ZZ um 51-89 %. Eine Inkubation über 24 h (analog den HT29-Zellen) war nicht zu realisieren, da die Primärzellen unter *in vitro* Bedingungen nur eine sehr geringe Überlebensfähigkeit besitzen.

2.1.3.4 Entstehung von Fermentationsmetaboliten (Mengen/Kinetiken)

Für die Untersuchungen, zur Bildung (Kinetiken und Mengen) der Fermentationsmetabolite, wurden die FÜ Blank –, Blank +, Aleuron – und Aleuron + (Tab. 13) ausgewählt. Zur Gewinnung der FÜ wurden nach verschiedenen Zeitpunkten (0-24 h) der Dickdarmsimulation Aliquote entnommen.

Bereits im Ausgangsmaterial (Fäzes) wurden SCFA nachgewiesen (~20 mM) (Tab. 16), deren Konzentration sich nach 16 h geringfügig erhöhte. Die Produktion von SCFA durch eine bakterielle Fermentation von Aleuron konnte schon nach 2 h gezeigt werden. Durch die Zugabe der Probiotika wurde die Bildung deutlich beschleunigt.

Die Konzentration an DCA verringerte sich zeitabhängig. Bereits zu Beginn der Dickdarmsimulation waren in FÜ Aleuron – niedrigere Gehalte nachzuweisen, so dass die

Ballaststoffe direkt sekundäre Gallensäuren, welche in den Fäzes enthalten waren, binden konnten. Eine Zugabe der Probiotika (FÜ Aleuron +) unterstützte deutlich diesen reduzierenden Effekt.

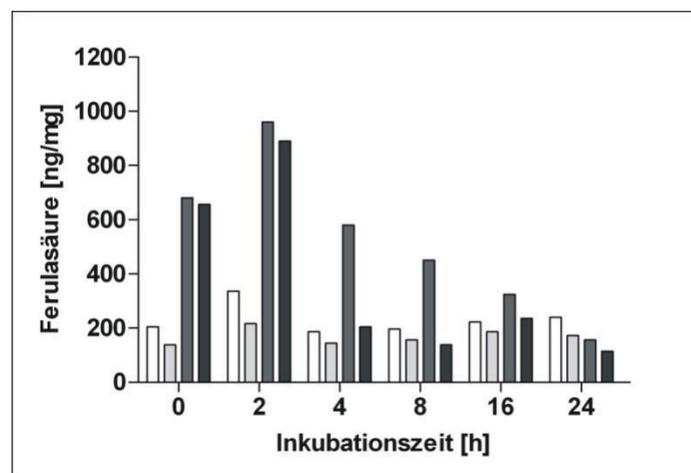
Schon in den Fäzes war Ammoniak nachweisbar, welches über die Zeit zunahm. Die zeitabhängige Ammoniakproduktion sowohl im FÜ Blank – als auch im FÜ Aleuron – während der Dickdarmsimulation konnte durch die Zugabe der Probiotika (FÜ Blank + und FÜ Aleuron +) verringert werden. Ferulasäure war in keinem der FÜ nachweisbar.

Tab. 16: Dargestellt sind die absoluten Konzentrationen der kurzkettigen Fettsäuren (SCFA), deren Verhältnisse, der Gallensäuren (CA, Cholsäure; DCA, Deoxycholsäure) sowie des Ammoniaks in den Fermentationsüberständen (FÜ) nach unterschiedlichen Zeitpunkten.

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

	FÜ Blank -	13,79	5,91	5,19	55:24:21	n.n.	40,53	24,72
16 h	FÜ Blank +	14,16	7,29	11,32	43:22:35	n.n.	12,48	23,04
	FÜ Aleuron -	30,99	14,57	17,93	49:23:28	n.n.	2,94	31,16
	FÜ Aleuron +	31,17	13,80	19,85	48:21:31	n.n.	1,63	21,74
	<hr/>							
	FÜ Blank -	17,50	8,24	7,44	53:25:22	n.n.	37,20	28,29
24 h	FÜ Blank +	17,03	9,23	13,23	43:23:34	n.n.	7,57	24,13
	FÜ Aleuron -	27,19	13,78	11,59	52:26:22	n.n.	7,79	43,66
	FÜ Aleuron +	27,86	13,19	18,66	47:22:31	n.n.	1,60	31,21
	<hr/>							

Zusätzlich wurde der Gehalt an gesamter Ferulasäure nach definierten Zeitpunkten in den Fermentationspellets der Kinetikstudie bestimmt (Abb. 3). 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. 3: Gehalt an gesamter Ferulasäure in den Fermentationspellets von Blank – (□), Blank + (■), Aleuron – (■) und Aleuron + (■) nach definierten Zeitpunkten.

2.1.4 Chemopräventives Potential von fermentiertem Weizenaleuron (mit und ohne Probiotika) in humanen Kolonzellen

Für die Untersuchungen zum chemopräventiven Potential von fermentiertem Weizenaleuron wurden humane Kolonzellen (Primärzellen, LT97-Adenomzellen, HT29-Adenokarzinomzellen) mit verschiedenen Fermentationsprodukten der Fermentationsserien II und III inkubiert.

Fermentation II

- Europäisches Weizenaleuron (FÜ EU Aleuron)
- Amerikanisches Weizenaleuron (FÜ US Aleuron)
- Fäzeskontrolle (FÜ Blank)
- und für ausgewählte Endpunkte die korrespondierenden synthetischen Gemische der kurzkettigen Fettsäuren Azetat, Propionat und Butyrat (SCFA) sowie Butyrat als Einzelsubstanz.

Fermentation III

- Weizenaleuron ohne Zugabe der Probiotika LGG/Bb12 (FÜ Aleuron –)
- Weizenaleuron mit Zugabe der Probiotika LGG/Bb12 (FÜ Aleuron +)
- Kontrolle ohne Zugabe der Probiotika LGG/Bb12 (FÜ Blank –)
- Kontrolle mit Zugabe der Probiotika LGG/Bb12 (FÜ Blank +)

Der FÜ aus der Fermentation des Weizenaleurons mit den probiotischen Kulturen ohne Zugabe des Fäzes-Inoculums wurde in diesen Untersuchungen nicht verwendet, da der FÜ nur eine geringe biologische Aktivität im DAPI-Assay zeigte (siehe Tab. 15). Dies könnte vermutlich aus der alleinigen Bildung von Azetat nach der Fermentation des Weizenaleurons resultieren.

2.1.4.1 Einfluss auf die mRNA-Expression (Custom Array)

Zur Analyse von Veränderungen der mRNA-Expression von 306 Genen wurde ein Custom Array der Firma Miltenyi Biotec verwendet. Die gespotteten cDNA-Sonden enthalten Sequenzen unterschiedlicher funktioneller Gengruppen, welche dem Fremdstoffmetabolismus, der Stressantwort und Signaltransduktion sowie der Apoptose zugehörig sind⁽²⁶⁾. Die Auswertung der erhaltenen Rohdaten erfolgte durch die Normalisierung auf GAPDH und durch die anschließende Ermittlung des Verhältnisses Behandlung/Mediumkontrolle (n-fache Erhöhung).

Die Untersuchungen wurden mit HT29-Zellen durchgeführt, die mit 10 % FÜ EU Aleuron der Fermentationsreihe II im Vergleich zum FÜ Blank für 24 h inkubiert wurden. Die Expression von 10 (Kriterien: n-fache Veränderung $>1,5$ oder $<0,6$) der untersuchten 306 Gene wurden durch 10 % fermentiertes Weizenaleuron signifikant reguliert ($P < 0,05$), wobei alle Gene hoch-reguliert wurden. Von besonderem Interesse waren hierbei die *CAT* ($5,19 \pm 4,07$), *SULT2B1* ($4,37 \pm 1,83$), *MAF2* ($4,73 \pm 1,84$) und *WNT2B* ($5,72 \pm 0,79$) (Tab. 17). Der FÜ Blank hatte hinsichtlich der Expression dieser Gene keinen Einfluss. *CAT*, *SULT2B1* und *MAF2* sind

im Rahmen der Primärprävention interessant, da ihr Enzymprodukt in der Lage ist, potentiell kanzerogene Substanzen durch einen Abbau bzw. einer Konjugation mit einer funktionellen Gruppe unschädlich zu machen. Die Aktivierung des Wnt-Signalweges ist normalerweise in die Karzinogenese des Dickdarms involviert. Allerdings konnte gezeigt werden, dass nach einer Butyratbehandlung der Wnt-Signalweg verstärkt induziert wurde, einhergehend mit apoptotischen Prozessen ⁽¹⁷⁾. Die Induktion der Apoptose ist ein relevanter Marker der sekundären Chemoprävention.

Tab. 17: Zusammenfassung regulierten Gene und deren Funktion

Gen	Funktion
<i>MAF2</i>	Transkriptionsfaktor, bindet an „antioxidative-response-elements (ARE)“ eines Promotors von Genen der Entgiftungsenzyme
<i>SULT2B1</i>	Sulfotransferase, Übertragung eines Sulfonylrestes vom Co-Faktor PAPS auf das Substrat
<i>CAT</i>	Katalase, katalysiert den Abbau von H ₂ O ₂ zu H ₂ O und O ₂
<i>WNT2B</i>	Ligand für Mitglieder der „frizzled family“ von sieben transmembranen Rezeptoren. Involviert sowohl in der normalen Entwicklung oder Differenzierung als auch in der Karzinogenese

2.1.4.2 Einfluss auf die mRNA-Expression (*Real-time* qPCR)

Ziel der Untersuchungen mittels *real-time* qPCR war zum einen, die Modulation der mRNA-Expression der interessanten Gene aus den Custom Array-Untersuchungen zu verifizieren. Zum anderen waren weitere Gene von Interesse, die in molekulare Mechanismen sowohl der Primärprävention als auch der Sekundärprävention involviert sind. Für die Primärprävention wurde zusätzlich die mRNA-Expression von *GSTP1* untersucht, da es die hauptsächlich exprimierte Isoform der GST im Kolon darstellt. Um Marker der Sekundärprävention näher zu beleuchten, wurden zusätzlich Gene untersucht, die bei der Regulation des Zellzyklus (*p21*) und innerhalb der Apoptose (*DR5*) eine Rolle spielen.

Primärprävention

In HT29-Zellen konnte die Induktion der mRNA-Expression von *CAT* und *SULT2B1* nach 24 h durch eine Inkubation mit fermentiertem Weizenaleuron (FÜ EU Aleuron) bestätigt werden (Tab. 18). Da für *MAF2* kein geeignetes Primerpaar etabliert werden konnte, war es nicht möglich, die mRNA-Expression von *MAF2* mittels *real-time* qPCR zu untersuchen.

Der FÜ US Aleuron und der FÜ Synergy1, die im Custom Array nicht untersucht wurden, zeigten einen vergleichbar induktiven Effekt wie FÜ EU Aleuron. Interessanterweise wirkte der FÜ Blank effektiver auf die *SULT2B1*-Expression als die FÜ Aleuron (EU & US) und FÜ Synergy1.

Darüber hinaus waren die FÜ Aleuron beider Weizensorten und der FÜ Synergy1 in der Lage, die mRNA-Expression von *GSTP1* zu steigern. Sowohl für *CAT* als auch für *GSTP1* zeigten die FÜ Aleuron einen stärkeren Effekt als die Fäzeskontrolle (FÜ Blank). Der FÜ Synergy1 war nur bei der Expressionsmodulation von *CAT* tendenziell effektiver als die Fäzeskontrolle.

Tab. 18: Einfluss der Inkubation (24 h) mit den FÜ der Fäzeskontrolle (Blank), des EU Aleurons, des US Aleurons und von Synergy1 auf die mRNA Expression von *CAT*, *GSTP1* und *SULT2B1* in HT29-Zellen nach Inkubation mit den. Die Ergebnisse wurden normalisiert zu GAPDH und anschließend das Verhältnis (fold change) zur Mediumkontrolle (=1) ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte (MW) des fold change und deren Standardabweichungen (SD) (n=3). Der Student's *t*-Test wurde zur Bestimmung der Unterschiede zur Mediumkontrolle (a $P < 0,05$) und zum jeweiligen FÜ Blank (b $P < 0,05$) verwendet. Die Werte in Klammern weisen darauf hin, dass der Effekt nur als Trend nachweisbar war ($P < 0,10$).

	fold change								
	<i>CAT</i>			<i>GSTP1</i>			<i>SULT2B1</i>		
	MW	SD		MW	SD		MW	SD	
FÜ Blank	1,18	0,16		1,16	0,22		2,49	0,13	a
FÜ EU Aleuron	1,48	0,03	a,b	1,72	0,26	a,b	1,58	0,20	a,b
FÜ US Aleuron	1,93	0,36	a,b	1,79	0,19	a,b	1,49	0,34	(a),b
FÜ Synergy1	1,51	0,27	a,(b)	1,50	0,11	(a)	1,35	0,12	a,b

Humane Primärzellen wurden verwendet, um den Einfluss der FÜ auf die mRNA-Expression von *CAT* und *GSTP1* nach 10 h in normalen, nicht-transformierten Kolonzellen zu untersuchen. Aufgrund einer sehr begrenzt zur Verfügung stehenden Menge an primärem Kolongewebe konnte nur der Einfluss ausgewählter FÜ wie FÜ Blank und FÜ EU untersucht werden.

Im Vergleich zu HT29-Zellen konnte nur die mRNA-Expression von *GSTP1* durch eine Inkubation mit dem FÜ EU Aleuron signifikant auf ein 1,6-faches (10 %) bzw. 1,8-faches (20 %) gesteigert werden, wobei sich der Effekt tendenziell zum FÜ Blank unterschied (Abb. 4). Der FÜ Blank (20 %) war in der Lage, die *GSTP1*-Expression auf ein 1,5-faches zu erhöhen.

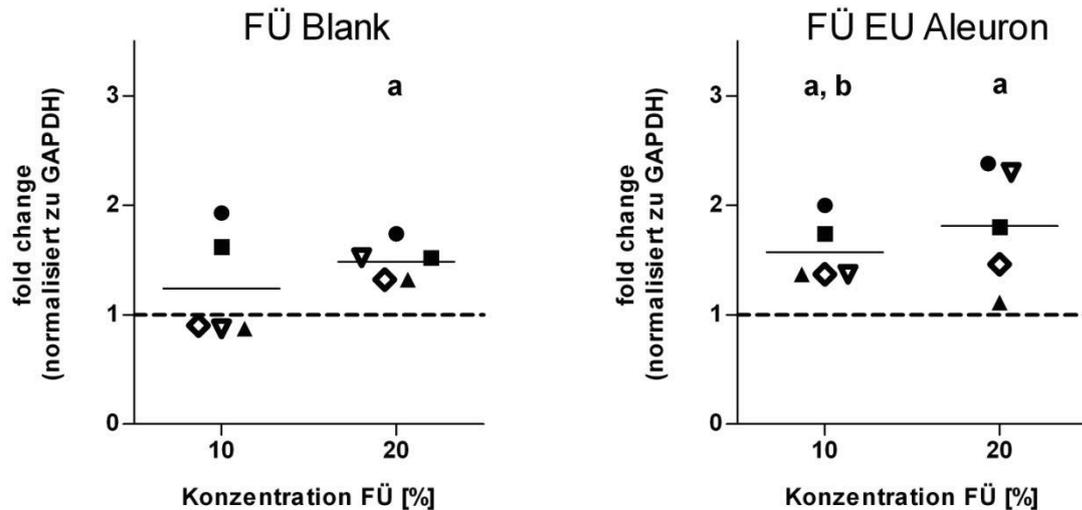


Abb. 4: Einfluss der Inkubation (10 h) mit den FÜ der Fäzeskontrolle (Blank) und dem EU Aleuron der Fermentation II auf die mRNA-Expression von *GSTP1* in humanen Primärzellen. Die Ergebnisse wurden normalisiert auf *GAPDH* und anschließend das Verhältnis (*fold change*) zur Mediumkontrolle (=1, gestrichelte Linie) ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte des *fold change* von 5 Spendern sowie deren Streuung. Der Student's *t*-Test wurde zur Bestimmung der Unterschiede zur Mediumkontrolle (a $P < 0,05$) und zum FÜ Blank (b $P < 0,05$) verwendet. Die gleichen Symbole repräsentieren 1 Spender.

Die mRNA-Expression von *CAT* konnte durch die FÜ in Primärzellen nicht moduliert werden (Abb. 5).

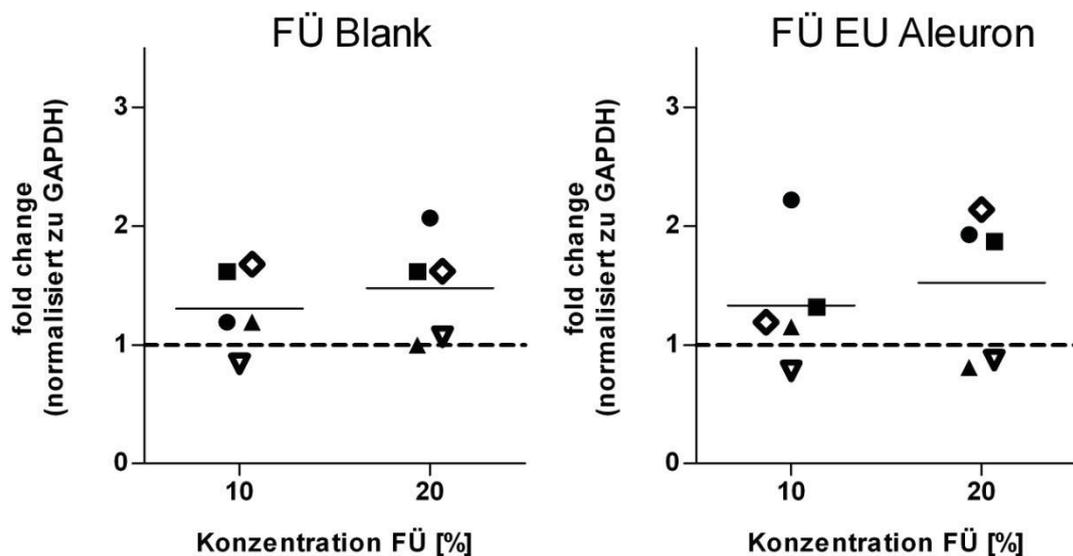


Abb. 5: Einfluss der Inkubation mit den FÜ der Fäzeskontrolle (Blank) und dem EU Aleuron der Fermentation II auf die mRNA-Expression von *CAT* in humanen Primärzellen. Die Ergebnisse wurden normalisiert auf *GAPDH* und anschließend das Verhältnis (*fold change*) zur Mediumkontrolle (=1, gestrichelte Linie) ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte des *fold change* von 5 Spendern sowie deren Streuung. Der Student's *t*-Test wurde zur Bestimmung der Unterschiede zur Mediumkontrolle (a $P < 0,05$) und zum FÜ Blank (b $P < 0,05$) verwendet. Die gleichen Symbole repräsentieren 1 Spender.

Darüber hinaus wurde das Potential von fermentiertem Weizenaleuron nach Zugabe der probiotischen Kulturen (FÜ der Fermentationsserie III) untersucht, die mRNA-Expression von *CAT*, *GSTP1* und *SULT2B1* zu induzieren.

In HT29-Zellen wurde die mRNA-Expression von *CAT* nur durch den FÜ Blank – tendenziell 1,8-fach induziert (Tab. 19).

Die FÜ Aleuron ± waren in der Lage, die *GSTP1*-Expression zu steigern und unterschieden sich von der jeweiligen Fäzeskontrolle (FÜ Blank – bzw. FÜ Blank +).

Mit Ausnahme des FÜ Aleuron + induzierten alle FÜ die mRNA-Expression von *SULT2B1*, wobei sich die Wirkung der einzelnen FÜ nicht voneinander unterschied.

Tab. 19: Einfluss der Inkubation mit den FÜ der Fäzeskontrolle (Blank ±) und Aleuron ± auf die mRNA Expression von *CAT*, *GSTP1* und *SULT2B1* in HT29-Zellen. Die Ergebnisse wurden normalisiert auf *GAPDH* und anschließend das Verhältnis (*fold change*) zur Mediumkontrolle (=1) ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte (MW) des *fold change* und deren Standardabweichungen (SD) (n=3). Der Student's *t*-Test wurde zur Bestimmung der Unterschiede zur Mediumkontrolle (a $P < 0,05$) und zum jeweiligen FÜ Blank (b $P < 0,05$) verwendet. Die Werte in Klammern weisen darauf hin, dass der Effekt nur als Trend nachweisbar war ($P < 0,10$).

	fold change								
	<i>CAT</i>		<i>GSTP1</i>		<i>SULT2B1</i>				
	MW	SD	MW	SD	MW	SD			
FÜ Blank –	1,30	0,23	0,88	0,17	2,96	0,76	a		
FÜ Blank +	1,77	0,36	(a)	1,17	0,44	3,01	1,17	a	
FÜ Aleuron –	2,06	0,73		1,92	0,45	(a),b	2,76	1,07	a
FÜ Aleuron +	1,88	1,00		2,45	0,90	(a,b)	2,15	1,30	

In humanen Primärzellen wurde vergleichbar mit den Ergebnissen der FÜ der Fermentation II nur *GSTP1* durch FÜ Blank + und FÜ Aleuron ± signifikant induziert, wobei die FÜ allerdings nicht stärker wirkten als die Fäzeskontrolle ohne Probiotika (FÜ Blank –) (Abb. 6).

Eine Inkubation mit den FÜ der Fermentation III hatte keinen Einfluss auf die mRNA-Expression von *CAT*.

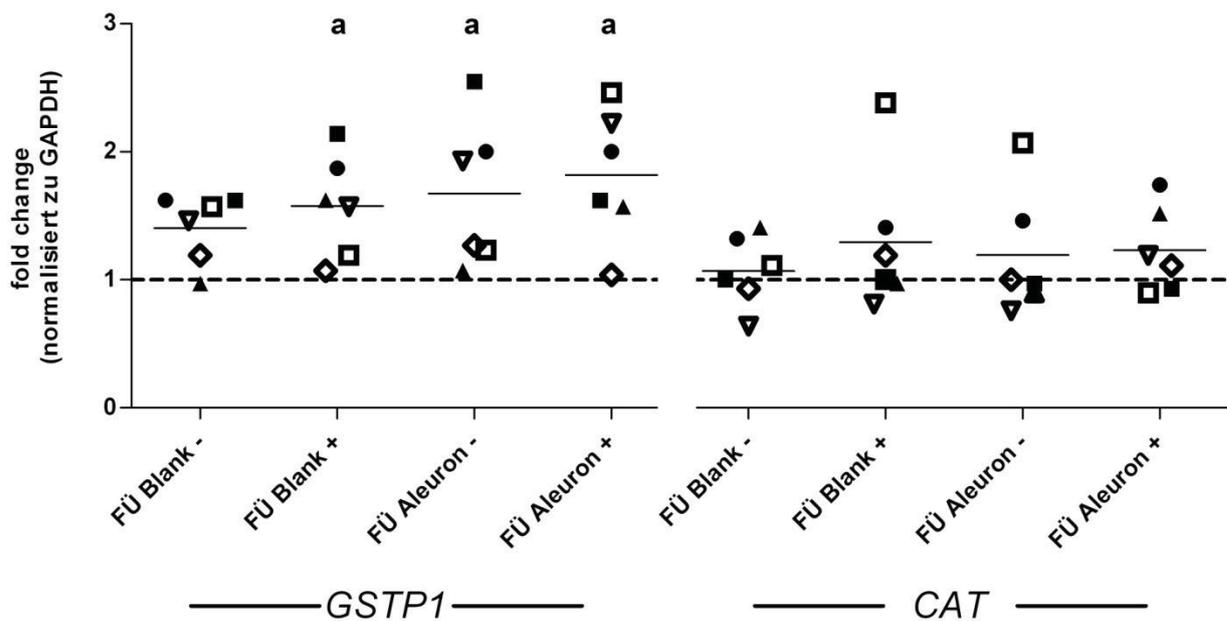


Abb. 6: Einfluss der Inkubation mit den FÜ (10 %) der Fäzeskontrolle (Blank ±) und EU Aleuron ± auf die mRNA-Expression von *CAT* und *GSTP1* in humanen Primärzellen. Die Ergebnisse wurden normalisiert auf *GAPDH* und anschließend das Verhältnis (*fold change*) zur Mediumkontrolle (=1, gestrichelte Linie) ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte des *fold change* von 6 Spendern sowie deren Streuung. Der Friedman-Test mit Dunn's Post Test wurde zur Bestimmung der Unterschiede zur Mediumkontrolle ($a P < 0.05$) verwendet. Die gleichen Symbole repräsentieren 1 Spender.

Sekundärprävention

In LT97-Zellen wurde die mRNA-Expression von *p21* sowohl durch die FÜ Aleuron beider Weizensorten als auch durch den FÜ Synergy1 der Fermentation II induziert, allerdings nur für FÜ US Aleuron auf einem signifikanten Niveau (Tab. 20). Die Fäzeskontrolle (FÜ Blank) war nicht in der Lage, die mRNA-Expression von *p21* zu modulieren. In HT29-Zellen wurde durch alle FÜ die *p21*-Expression signifikant induziert, wobei die FÜ der Ballaststoffquellen (FÜ EU Aleuron, FÜ US Aleuron und FÜ Synergy1) gleichermaßen effektiver waren als der FÜ Blank. Nur in HT29-Zellen konnte die *p21*-Expression durch Butyrat (4 mM, Positivkontrolle) signifikant gesteigert werden. Im Allgemeinen wurden die Expression in LT97-Zellen auf einem niedrigeren Niveau moduliert als in HT29-Zellen, möglicherweise bedingt durch die unterschiedlich verwendeten Konzentrationen (LT97: 5 %, HT29: 10 %).

Tab. 20: Modulation der mRNA-Expression von *p21*, *DR5* und *WNT2B* in LT97-and HT29-Zellen nach einer Behandlung mit den FÜ (5 % und 10 %) der Fermentation II und Butyrat (4 mM) für 24 h. Dargestellt sind die Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (SD) (n=3) als n-fache Erhöhung im Verhältnis zur Mediumkontrolle, welche gleich 1,0 gesetzt wurde. Der Student's *t*-Test wurde verwendet, um die Unterschiede zur jeweiligen Mediumkontrolle ($a P < 0,05$) und zum FÜ Blank ($b P < 0,05$) zu ermitteln. Werte in Klammern verdeutlichen einen Trend ($P \leq 0,1$).

		LT97 (5 % FÜ)		HT29 (10 % FÜ)		
		MW	SD	MW	SD	
<i>p21</i>	Butyrat, 4 mM	4,02	1,97	13,95	2,67	a

	FÜ Blank	1,11	0,12		10,38	3,86	a
	FÜ EU Aleuron	3,34	1,34	(a),b	19,25	4,85	a,(b)
	FÜ US Aleuron	3,26	0,87	a,b	22,24	5,15	a,b
	FÜ Synergy1	2,32	0,69	(a),b	20,45	1,91	a,b
	Butyrat, 4 mM	3,09	1,35		1,26	0,31	
<i>DR5</i>	FÜ Blank	0,81	0,13		0,86	0,29	
	FÜ EU Aleuron	1,20	0,59		1,11	0,19	
	FÜ US Aleuron	1,80	0,41	(a),b	1,31	0,07	a,(b)
	FÜ Synergy1	1,03	0,52		1,38	0,24	(b)
	Butyrat, 4 mM	2,17	0,37	a	9,54	0,85	a
<i>WNT2B</i>	FÜ Blank	0,85	0,10		3,36	2,02	
	FÜ EU Aleuron	1,80	0,34	(a),b	7,90	1,35	a,b
	FÜ US Aleuron	1,72	0,44	(a),b	8,34	2,58	a,(b)
	FÜ Synergy1	1,62	0,00	a,b	9,20	0,64	a,b

Die mRNA-Expression von *DR5* konnte sowohl in LT97- als auch in HT29-Zellen nur durch den FÜ US Aleuron induziert werden, wobei dieser FÜ effektiver wirkte als die Fäzeskontrolle (FÜ Blank). Zwischen dem FÜ Synergy1 und den FÜ Aleuron (EU & US) war kein Unterschied nachweisbar. Butyrat (4 mM) war bedingt durch hohe Standardabweichungen nicht in der Lage, die *DR5*-Expression signifikant zu modulieren.

Die mRNA-Expression von *WNT2B* wurde in beiden Zelllinien durch die FÜ der Ballaststoffquellen (FÜ EU Aleuron, FÜ US Aleuron und FÜ Synergy1) gleichermaßen induziert. Die Fäzeskontrolle (FÜ Blank) hatte keinen Einfluss auf die *WNT2B*-Expression. Butyrat (4 mM) steigerte sowohl in LT97- als auch in HT29-Zellen die Expression von *WNT2B*. Im Allgemeinen wurde die Expression in LT97-Zellen auf einem niedrigeren Niveau moduliert als in HT29-Zellen, möglicherweise bedingt durch die unterschiedlich verwendeten Konzentrationen (LT97: 5 %, HT29: 10 %).

Auch das Potential der FÜ der Fermentationsserie III wurde untersucht, die mRNA-Expression von *p21*, *DR5* und *WNT2B* zu modulieren.

In LT97-Zellen wurde die mRNA-Expression von *p21* durch fermentiertes Weizenaleuron mit/ohne Zugabe der Probiotika (FÜ Aleuron ±) gesteigert, allerdings nur für den FÜ Aleuron – auf einem signifikanten Niveau (Tab. 21). Dieser FÜ war signifikant effektiver als der FÜ Blank –, der die *p21*-Expression nicht moduliert. In HT29-Zellen wurde die mRNA-Expression von *p21* durch alle FÜ induziert, wobei nur der FÜ Aleuron – signifikant effektiver wirkte als die Fäzeskontrolle (FÜ Blank –). Eine zusätzliche Gabe der Probiotika (FÜ Aleuron +) konnte die *p21*-Expression nicht beeinflussen. Generell konnte durch die FÜ die *p21*-Expression in LT97-Zellen wiederum geringer moduliert werden als in HT29-Zellen.

Tab. 21: Modulation der mRNA-Expression von *p21*, *DR5* und *WNT2B* in LT97-and HT29-Zellen nach einer Behandlung mit den FÜ (5 % und 10 %) der Fermentation III für 24 h. Dargestellt sind die Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (SD) (n=3) als n-fache Erhöhung im Verhältnis zur Mediumkontrolle, welche gleich 1,0 gesetzt wurde. Der Student's t-Test wurden verwendet, um die

Unterschiede zur jeweiligen Mediumkontrolle (a $P < 0,05$) und zum jeweiligen Blank (b $P < 0,05$) zu ermitteln. Werte in Klammern verdeutlichen einen Trend ($P \leq 0,1$).

		LT97 (5 % FÜ)		HT29 (10 % FÜ)		
		MW	SD	MW	SD	
<i>p21</i>	FÜ Blank –	1,10	0,38	10,57	2,11	a
	FÜ Blank +	1,22	0,60	13,41	3,10	a
	FÜ Aleuron –	2,05	0,37	17,75	0,00	a,b
	FÜ Aleuron +	2,23	0,66	18,12	5,44	(a) a
<i>DR5</i>	FÜ Blank –	0,75	0,28	1,04	0,28	
	FÜ Blank +	0,60	0,23	1,16	0,22	
	FÜ Aleuron –	1,32	0,44	1,59	0,62	
	FÜ Aleuron +	1,46	0,62	1,60	0,61	(b)
<i>WNT2B</i>	FÜ Blank –	0,68	0,46	3,99	0,62	a
	FÜ Blank +	1,17	0,79	7,09	2,52	(a)
	FÜ Aleuron –	2,15	1,31	14,32	2,99	a,b
	FÜ Aleuron +	1,60	1,44	15,54	3,60	a,b

Weder in LT97-Zellen noch in HT29-Zellen konnte die *DR5*-Expression durch eine Inkubation mit den FÜ signifikant moduliert werden. In LT97 senkten die Fäzeskontrollen (FÜ Blank – und FÜ Blank +) geringfügig die mRNA-Expression, wohingegen der FÜ des fermentierten Aleurons mit/ohne Zugabe der Probiotika (FÜ Aleuron – und FÜ Aleuron +) die *DR5*-Expression in beiden Zelllinien marginal steigerten.

Die Expression von *WNT2B* konnte nur in HT29-Zellen durch alle FÜ induziert werden, wobei die FÜ Aleuron ± signifikant stärker wirkten als die jeweiligen Fäzeskontrollen.

2.1.4.3 Einfluss auf die Enzymaktivität (funktionelle Konsequenzen) und auf zelluläre Ereignisse

Primärprävention

Modulation der Enzymaktivität von GST und Katalase

Die FÜ EU und US Aleuron induzierten die GST-Aktivität bereits nach 48 h, wobei der FÜ Blank keinen Einfluss auf die Aktivität hatte (Tab. 22). Nur für den FÜ US Aleuron wirkte das fermentierte Aleuron signifikant stärker als die Fäzeskontrolle (FÜ Blank).

Die enzymatische Aktivität der Katalase konnte durch die FÜ EU und US Aleuron signifikant gesteigert werden, wobei der FÜ Blank keinen Einfluss auf die Aktivität hatte. Außerdem wirkte das fermentierte Aleuron zum Teil signifikant stärker als die Fäzeskontrolle (FÜ Blank).

Tab. 22: Einfluss der Inkubation mit den FÜ der Fermentationsserie II und deren korrespondierenden synthetischen SCFA-Gemischen (Azetat, Propionat und Butyrat) und Butyrat als Einzelsubstanz auf die Aktivität der Glutathion S-Transferasen (GST) nach 48 h und der Katalase nach 72 h in HT29-Zellen. Die Daten sind dargestellt als das Verhältnis (fold change) zur Mediumkontrolle (=1) und werden als Mittelwert (MW) und deren Standardabweichung (SD) angegeben. Der Student's *t*-Test

wurde zur Bestimmung der Unterschiede zur Mediumkontrolle (a $P < 0,05$), zum FÜ Blank (b $P < 0,05$) und zum entsprechenden FÜ (c $P < 0,05$) verwendet. Die Werte in Klammern weisen darauf hin, dass der Effekt nur als Trend nachweisbar war ($P < 0,10$).

	fold change					
	relative GST-Aktivität			relative Katalase-Aktivität		
	MW	SD		MW	SD	
FÜ Blank	1,3	0,6		1,4	0,7	
SCFA	1,1	0,2		1,0	0,1	
Butyrat	1,2	0,2		1,0	0,2	
FÜ EU Aleuron	2,2	1,0	(a)	2,6	0,6	a,b
SCFA	1,1	0,3		1,5	0,3	a,c
Butyrat	1,2	0,2		1,3	0,3	
FÜ US Aleuron	2,2	0,5	a,(b)	3,7	1,7	a,(b)
SCFA	1,3	0,1	a,c	1,4	0,1	a,(c)
Butyrat	1,5	0,3	a,(c)	1,5	0,3	a,(c)

Die korrespondierenden SCFA-Gemische und Butyrat allein waren mit Ausnahme des FÜ US Aleuron nicht in der Lage, die GST-Aktivität zu steigern. Allerdings wirkte der komplexe FÜ US Aleuron signifikant stärker als das korrespondierende SCFA-Gemisch und Butyrat.

Die korrespondierenden SCFA-Gemische des FÜ EU und US Aleuron induzierten die Katalase-Aktivität. Nur die korrespondierende Butyratkonzentration des FÜ US Aleuron übte einen aktivitätssteigernden Effekt aus. Allerdings wirkten die komplexen FÜ signifikant stärker als die synthetischen Gemische.

Die gezeigte Wirkung der FÜ war somit nicht allein in den enthaltenen SCFA begründet, so dass andere Inhaltsstoffe oder synergistische Einflüsse für diese Effekte verantwortlich sein müssen.

In Primärzellen wurde die Enzymaktivität der Katalase durch beide FÜ (10 %) nach 10 h signifikant induziert, wobei der FÜ EU Aleuron effektiver wirkte als die Fäzeskontrolle (FÜ Blank) (Abb. 7).

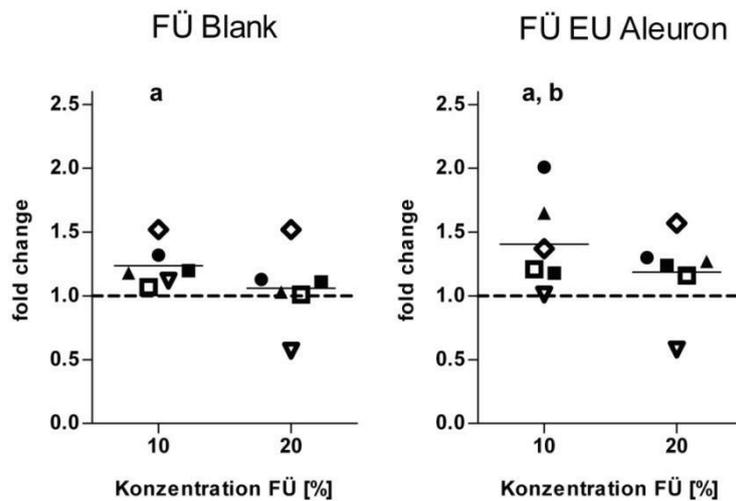


Abb. 7: Einfluss der Inkubation (10 h) mit den FÜ der Fäzeskontrolle (Blank) und EU Aleuron auf die Enzymaktivität von Katalase in humanen Primärzellen. Dargestellt sind die Mittelwerte des Verhältnisses (*fold change*) zur Mediumkontrolle (=1, gestrichelte Linie) von 6 Spendern sowie deren Streuung. Der Student's *t*-Test wurde zur Bestimmung der Unterschiede zur Mediumkontrolle (a $P < 0.05$) und zum FÜ Blank (b $P < 0,05$) verwendet. Die gleichen Symbole repräsentieren 1 Spender.

Die GST-Enzymaktivität wurde in Primärzellen nach 10 h durch beide FÜ (10 %) gesteigert, wobei sich die Effekte nicht unterschieden (Abb. 8).

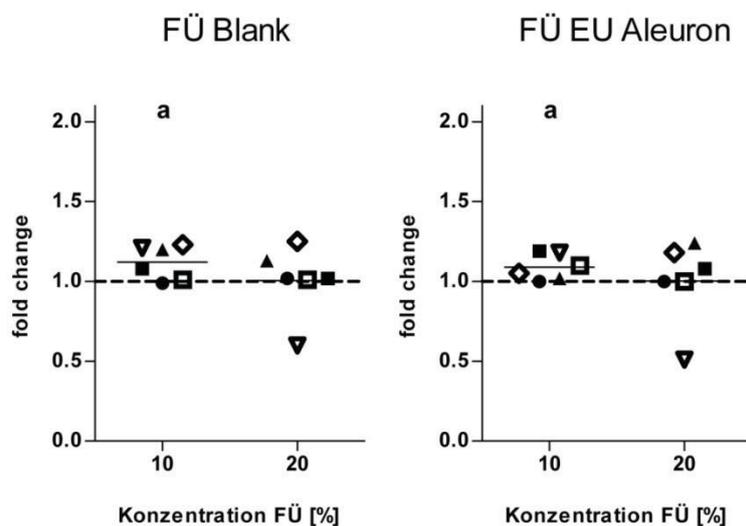


Abb. 8: Einfluss der Inkubation (10 h) mit den FÜ der Fäzeskontrolle (Blank) und EU Aleuron auf die Enzymaktivität von GST in humanen Primärzellen. Dargestellt sind die Mittelwerte des Verhältnisses (*fold change*) zur Mediumkontrolle (=1, gestrichelte Linie) von 6 Spendern sowie deren Streuung. Der Student's *t*-Test wurde zur Bestimmung der Unterschiede zur Mediumkontrolle (a $P < 0.05$) verwendet. Die gleichen Symbole repräsentieren 1 Spender.

Alle FÜ der Fermentationsserie III induzierten mit Ausnahme von FÜ Blank – die GST-Aktivität nach 72 (Tab. 23). Die Inkubation der HT29 mit FÜ Aleuron – und FÜ Aleuron +

wirkte stärker aktivitätssteigernd als die Behandlung mit deren entsprechenden Fäzeskontrollen (FÜ Blank – bzw. FÜ Blank +). Die Zugabe der Probiotika (FÜ Blank +) zeigte einen geringen steigernden Effekt auf die GST-Aktivität.

FÜ Aleuron – und FÜ Aleuron + erhöhten signifikant die Katalase-Aktivität. Zudem wirkte der FÜ Aleuron – signifikant stärker als die Fäzeskontrolle. Eine Steigerung der Katalase-Aktivität aufgrund einer unterstützenden Fermentation durch Probiotika (FÜ Blank +) konnte nicht nachgewiesen werden.

Tab. 23: Einfluss der Inkubation (72 h) mit den FÜ (10 %) der Fermentationsserie III auf die Aktivität der Glutathion S-Transferasen (GST) und der Katalase in HT29-Zellen. Die Daten sind dargestellt als das Verhältnis (fold change) zur Mediumkontrolle (=1) und werden als Mittelwert (MW) und deren Standardabweichung (SD) angegeben. Der Student's *t*-Test wurde zur Bestimmung der Unterschiede zur Mediumkontrolle (a $P < 0,05$), zum jeweiligen FÜ Blank (b $P < 0,05$) und zum FÜ ohne Probiotika (c $P < 0,05$) verwendet.

	fold change					
	relative GST-Aktivität			relative Katalase-Aktivität		
	MW	SD		MW	SD	
FÜ Blank –	1,4	0,2		1,6	0,3	
FÜ Blank +	2,1	0,5	a,c	2,4	1,0	
FÜ Aleuron –	3,6	0,9	a,b	3,6	1,4	a,b
FÜ Aleuron +	1,5	0,3	a,b	3,0	0,4	a

In humanen Primärzellen wurde weder die GST-Aktivität noch die Katalase-Aktivität durch eine Inkubation mit den FÜ der Fermentationsserie III beeinflusst, so dass auf eine Darstellung der Ergebnisse verzichtet wurde.

Antigenotoxizität gegenüber Wasserstoffperoxid (H₂O₂)

In den Versuchen mit den FÜ der Fermentationsserie II erhöhte eine Inkubation (15 min) mit 75 µM H₂O₂ (PK) signifikant den Anteil geschädigter DNA (% DNA im Schweif) in HT29-Zellen. Allgemein gelten Zellen mit einer Schädigung der DNA kleiner als 6 % als intakt und somit ungeschädigt. Alle untersuchten FÜ wirkten weder genotoxisch noch zytotoxisch. Alle FÜ konnten in Abhängigkeit der Konzentration (0-10 %) den Anteil geschädigter DNA signifikant senken, allerdings wirkten die Ballaststoffquellen (FÜ EU und US Aleuron, FÜ Synergy1) nicht effektiver als die Fäzeskontrolle (FÜ Blank) (Abb. 9).

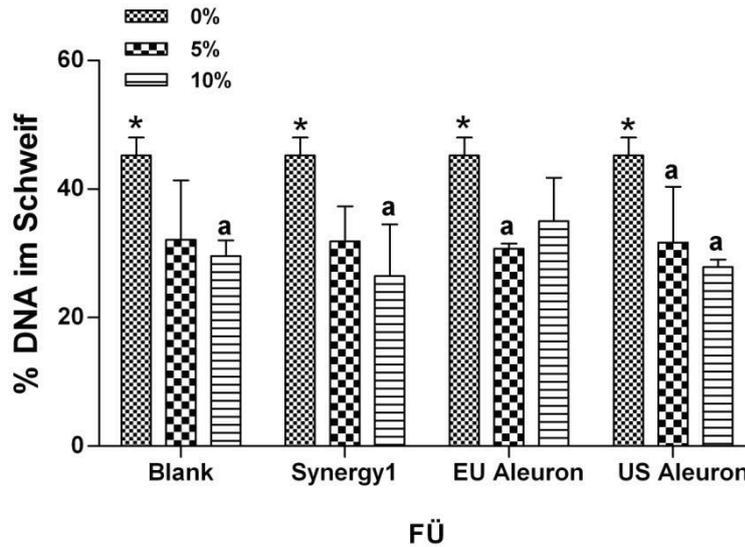


Abb. 9: Modulation von H₂O₂-induzierten DNA-Schäden durch die Vorinkubation (48 h) mit den FÜ (0-10 %) von Blank, Synergy1 sowie EU und US Aleuron in HT29-Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte sowie deren Standardabweichungen (n=3). Mittels one-way ANOVA mit Bonferroni Post Test wurden die Unterschiede zur H₂O₂-Kontrolle (a *P*<0,05) bestimmt. Der Student's *t*-Test gibt die Unterschiede der H₂O₂-Kontrolle (0 %) zur Mediumkontrolle (* *P*<0,05) an.

In den Versuchen mit den FÜ der Fermentationsserie III erhöhte eine Inkubation (15 min) mit 75 µM H₂O₂ (PK) signifikant den Anteil geschädigter DNA (% DNA im Schweif) in HT29-Zellen von 1,15 ± 0,54 % (Mediumkontrolle) auf 33,07 ± 1,43 % (PK). Alle untersuchten FÜ wirkten wiederum nicht genotoxisch. Die Vitalität der HT29-Zellen nach der Inkubation mit den komplexen FÜ lag über 80 %, so dass die FÜ in den verwendeten Konzentrationen keine zytotoxischen Effekte zeigten.

Eine Reduktion H₂O₂-induzierter DNA-Schäden konnte für den FÜ Aleuron – sowie für den FÜ Aleuron + als signifikant detektiert werden (

Abb. 10), wobei der Effekt einen signifikant stärkeren war. Der FÜ Blank + wirkte signifikant geringer als FÜ Blank –. Fermentiertes Aleuron weist somit ein antigenotoxisches Potential gegenüber H₂O₂ auf, welches durch Zugabe der Probiotika verstärkt wurde.

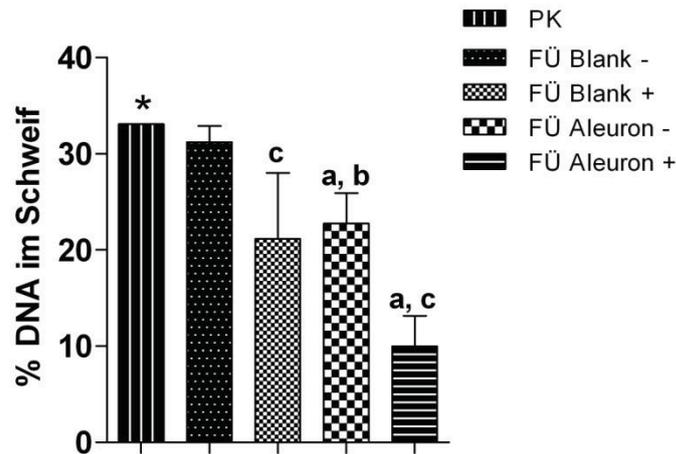


Abb. 10: Modulation von H_2O_2 -induzierten DNA-Schäden durch die Vorinkubation (48 h) mit den FÜ (10 %) von Blank \pm und Aleuron \pm in HT29-Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte sowie deren Standardabweichungen (n=3). Mittels one-way ANOVA mit Bonferroni Post Test wurden die Unterschiede zur H_2O_2 -Kontrolle (a $P < 0,05$) bestimmt. Die two-way ANOVA mit Bonferroni Post Test diente zur Erfassung der Unterschiede zum jeweiligen FÜ Blank (b $P < 0,05$) und zum korrespondierenden FÜ ohne Probiotika (c $P < 0,05$). Der Student's t-Test gibt die Unterschiede der H_2O_2 -Kontrolle (PK) zur Mediumkontrolle (* $P < 0,05$) an.

Sekundärprävention

Modulation des Zellzyklus

Der FÜ Aleuron (10 %) beider Weizensorten der Fermentation II führte nach 48 h zu einem signifikanten Zellzyklusarrest in der G_0/G_1 -Phase einhergehend mit einer Abnahme der Zellen in der S- und G_2/M -Phase (Abb. 11). Im Vergleich hierzu konnten FÜ Blank (10 %), geringere Konzentrationen (5 %) und kürzere Inkubationszeiten (24 h) die Verteilung der Zellen in den einzelnen Phasen nicht verändern (Daten nicht gezeigt). Die Inkubation mit den analogen SCFA-Gemischen und Butyrat hatte den gleichen Effekt wie der jeweilige komplexe FÜ.

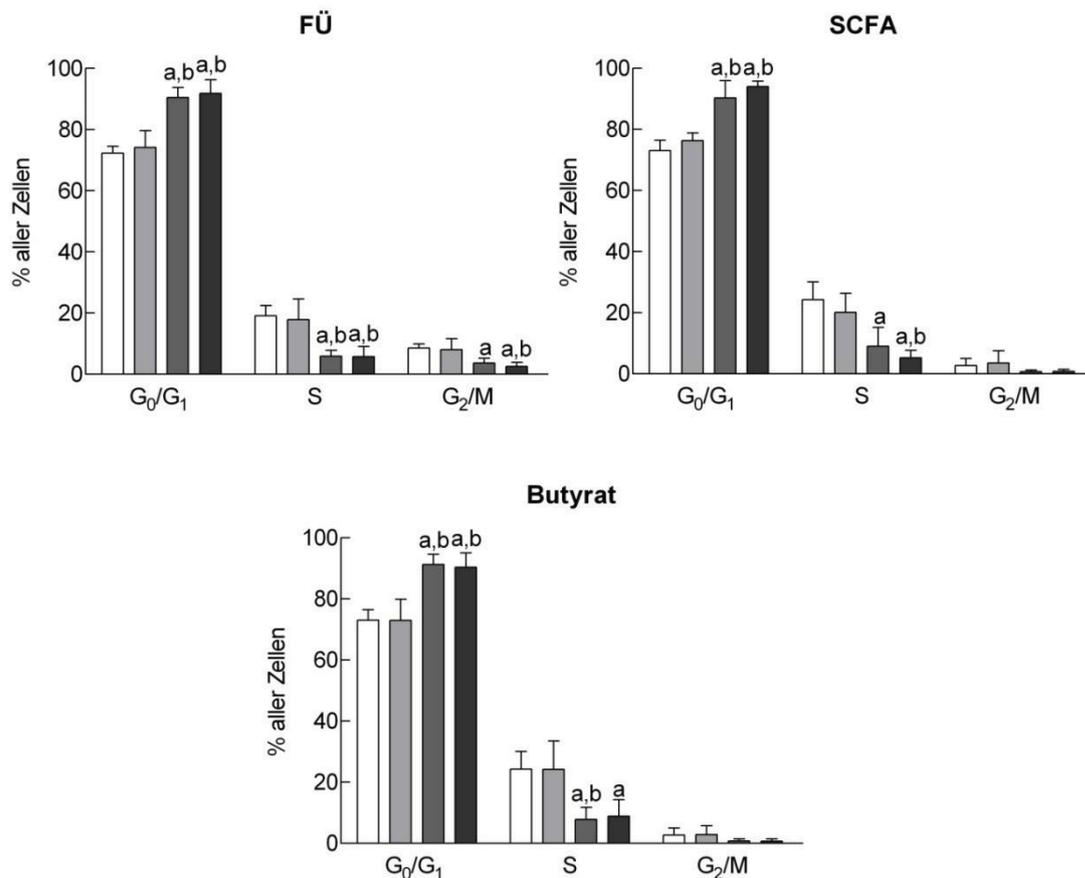


Abb. 11: Einfluss der Inkubation (48 h) mit den FÜ (10 %), den korrespondierenden SCFA-Gemischen (Azetat, Propionat und Butyrat) und Butyrat als Einzelsubstanz der Mediumkontrolle (□), des Blanks (■), des EU Aleurons (■) und des US Aleurons (■) der Fermentation II auf die Zellzyklusphasen (G₀/G₁; S; G₂/M) in HT29-Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen (n=3) der Zellen in den einzelnen Zellzyklusphasen. Der Student's *t*-Test wurde verwendet, um die Unterschiede zur jeweiligen Mediumkontrolle (a *P*<0,05) und zum Blank (b *P*<0,05) zu ermitteln.

Die FÜ der Fermentation des Aleurons mit Zugabe der Probiotika (Fermentation III) zeigten ebenfalls einen modulierenden Effekt auf den Zellzyklus. FÜ Aleuron – und FÜ Aleuron + (5 und 10 %) führten bereits nach 24 h zu einem signifikanten Zellzyklusarrest in der G₀/G₁-Phase einhergehend mit einer Abnahme der Zellen in der S- und G₂/M-Phase (Abb. 12). Dieser Effekt blieb über eine Inkubationszeit von 48 h erhalten (Daten nicht gezeigt). Sie unterschieden sich signifikant von der jeweiligen Fäzeskontrolle (FÜ Blank – bzw. FÜ

Blank +). Interessanterweise wurden die HT29-Zellen zunächst nach 24 h durch die Fäzeskontrolle (FÜ Blank –) signifikant in ihrem Wachstum gefördert. Dieser Effekt war nach 48 h nicht mehr nachweisbar.

Die FÜ einer unterstützenden Fermentation des Weizenaleurons durch die Probiotika (FÜ Aleuron +) sowie die Probiotika allein (FÜ Blank +) führten in einer Konzentration von 10 % zu einem geringen, aber signifikant zusätzlichen G₀/G₁-Arrest.

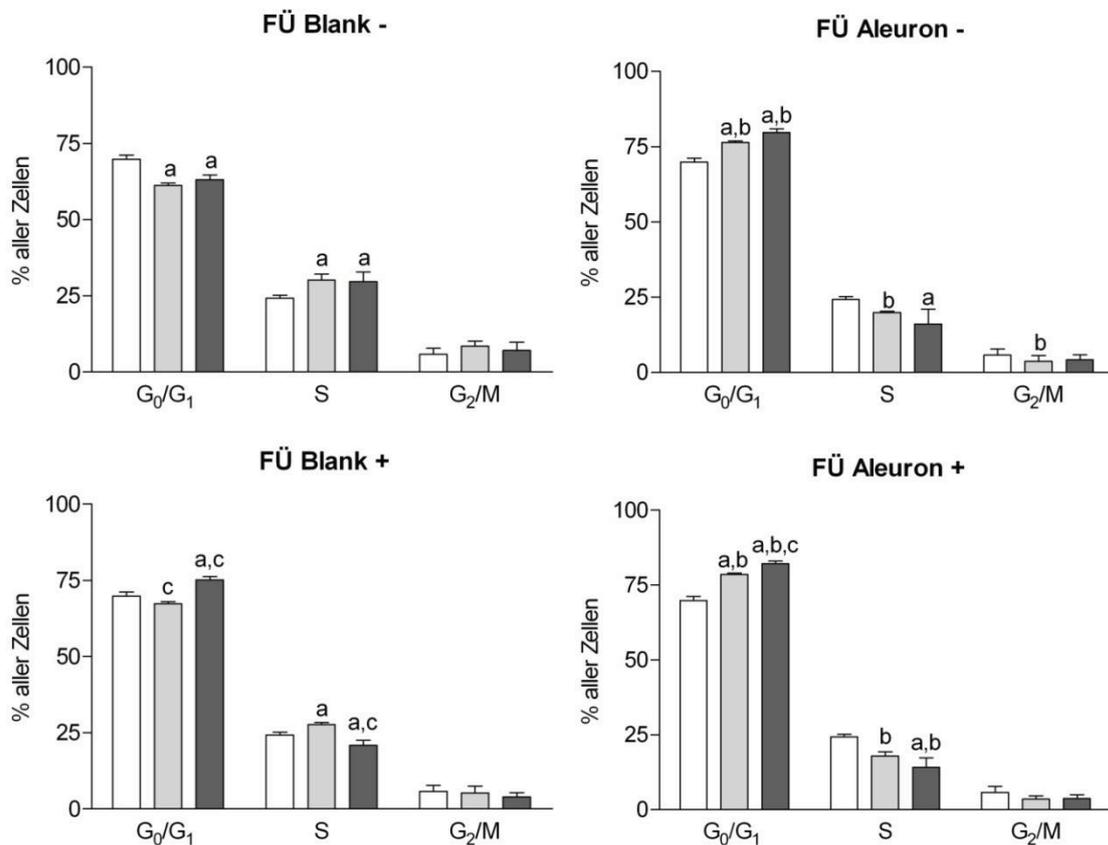


Abb. 12: Einfluss der Inkubation (24 h) mit dem FÜ Blank –, dem FÜ Blank +, dem FÜ Aleuron – und dem FÜ Aleuron + (0 % (□), 5 % (■) und 10 % (■)) auf die Zellzyklusphasen (G₀/G₁; S; G₂/M) in HT29-Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen (n=3) der Zellen in den einzelnen Zellzyklusphasen. Mittels One-way ANOVA mit Bonferroni Post Test wurden die Unterschiede zur jeweiligen Mediumkontrolle (a *P*<0,05) bestimmt. Die Two-way ANOVA mit Bonferroni Post Test diente zur Erfassung der Unterschiede zum jeweiligen FÜ Blank (b *P*<0,05) und zum korrespondierenden FÜ ohne Probiotika (c *P*<0,05).

Induktion der alkalischen Phosphatase als Differenzierungsmarker

Die FÜ der Fermentationsserie II hatten keinen eindeutigen Einfluss auf die Enzymaktivität der alkalischen Phosphatase in LT97-Zellen, so dass auf die Darstellung der Ergebnisse verzichtet wurde.

Demgegenüber induzierten die FÜ Aleuron (10 %) der Fermentationsserie II gleichermaßen wie Synergy1 in HT29-Zellen nach 48 h bzw. nach 72 h 2,5-fach bzw. 3,3-fach die Aktivität der alkalischen Phosphatase (Abb. 13). Der FÜ Blank blieb ohne Wirkung.

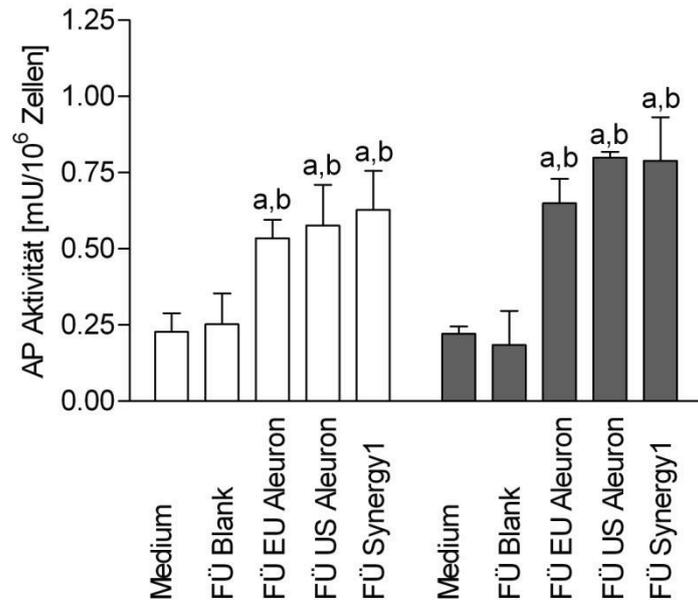


Abb. 13: Einfluss der Inkubation (48 h (□) und 72 h (■)) mit 10 % der FÜ Blank, FÜ EU Aleuron, FÜ US Aleuron und FÜ Synergy1 der Fermentation II auf die Enzymaktivität der alkalischen Phosphatase (Marker der Differenzierung) in HT29-Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen (n=3) der relativen Aktivität in Bezug auf die Zellzahl. Der Student's *t*-Test wurde verwendet, um die Unterschiede zur jeweiligen Mediumkontrolle (a $P < 0,05$) und zum Blank (b $P < 0,05$) zu ermitteln.

Auch die FÜ der Fermentationsserie III hatten keinen signifikanten Einfluss auf die Enzymaktivität der alkalischen Phosphatase in LT97-Zellen, so dass ebenfalls auf die Darstellung der Ergebnisse verzichtet wurde.

In HT29-Zellen induzierten FÜ Aleuron – und FÜ Aleuron + (10 %) nach 48 h bzw. 72 h signifikant die Aktivität der alkalischen Phosphatase (1,6-fach bzw. 2,8-fach) und waren effektiver als die jeweiligen Fäzeskontrollen (FÜ Blank – bzw. FÜ Blank +) (Abb. 14). Beide Fäzeskontrollen (FÜ Blank ±) konnten auf einem geringen Niveau die Aktivität der alkalischen Phosphatase nach 72 h induzieren. Die unterstützende Fermentation durch die Probiotika hatte nur einen leichten aber signifikanten zusätzlichen Effekt, so dass nach 72 h FÜ Blank + signifikant stärker die Enzymaktivität beeinflusste als FÜ Blank –. Die Wirkung des FÜ Aleuron – konnte durch die Probiotika nicht gesteigert werden.

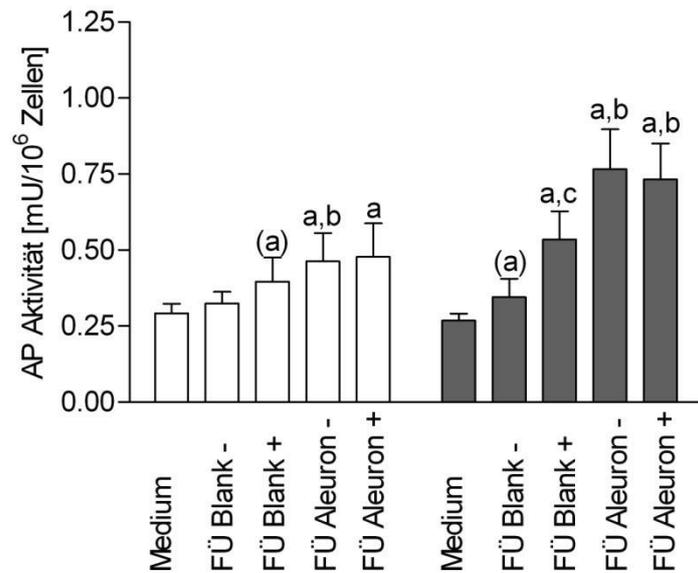


Abb. 14: Einfluss der Inkubation (48 h (□) und 72 h (■)) mit der 10 % FÜ Blank –, FÜ Blank +, FÜ Aleuron – und FÜ Aleuron + der Fermentation III auf die Enzymaktivität der alkalischen Phosphatase (Marker der Differenzierung) in HT29-Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen (n=3) der relativen Aktivität in Bezug auf die Zellzahl. Der Student's *t*-Test wurde verwendet, um die Unterschiede zur jeweiligen Mediumkontrolle (a $P < 0,05$), zum jeweiligen Blank (b $P < 0,05$) und zum FÜ ohne Probiotika (c $P < 0,05$) zu ermitteln. Werte in Klammern verdeutlichen einen Trend ($P = 0,08$).

Induktion der Apoptose

Die Untersuchungen der frühen Apoptose mittels Durchflusszytometrie unter Verwendung der FÜ der Fermentation II zeigten eine Basalrate an frühapoptotischen Zellen der Zelllinie LT97 nach 24 h in Höhe von $10,81 \pm 3,79 \%$ und nach 48 h in Höhe von $11,26 \pm 6,40 \%$. In LT97-Zellen induzierten die FÜ Aleuron (5 %) der beiden Weizensorten vergleichbar mit dem FÜ Synergy1 bereits nach 24 h signifikant die Apoptose (2,1-2,8-fach) (Abb. 15). Allerdings wirkten die FÜ der Ballaststoffquellen nicht stärker als die Fäzeskontrolle (FÜ Blank). Die korrespondierenden SCFA-Gemische und Butyrat (1-1,25 mM) erhöhten ebenfalls die Apoptoserate in LT97-Zellen, wobei die Wirkung des FÜ hauptsächlich auf das enthaltene Butyrat zurückzuführen war (Daten nicht gezeigt). Propionat und Azetat hatten keinen zusätzlichen proapoptotischen Effekt.

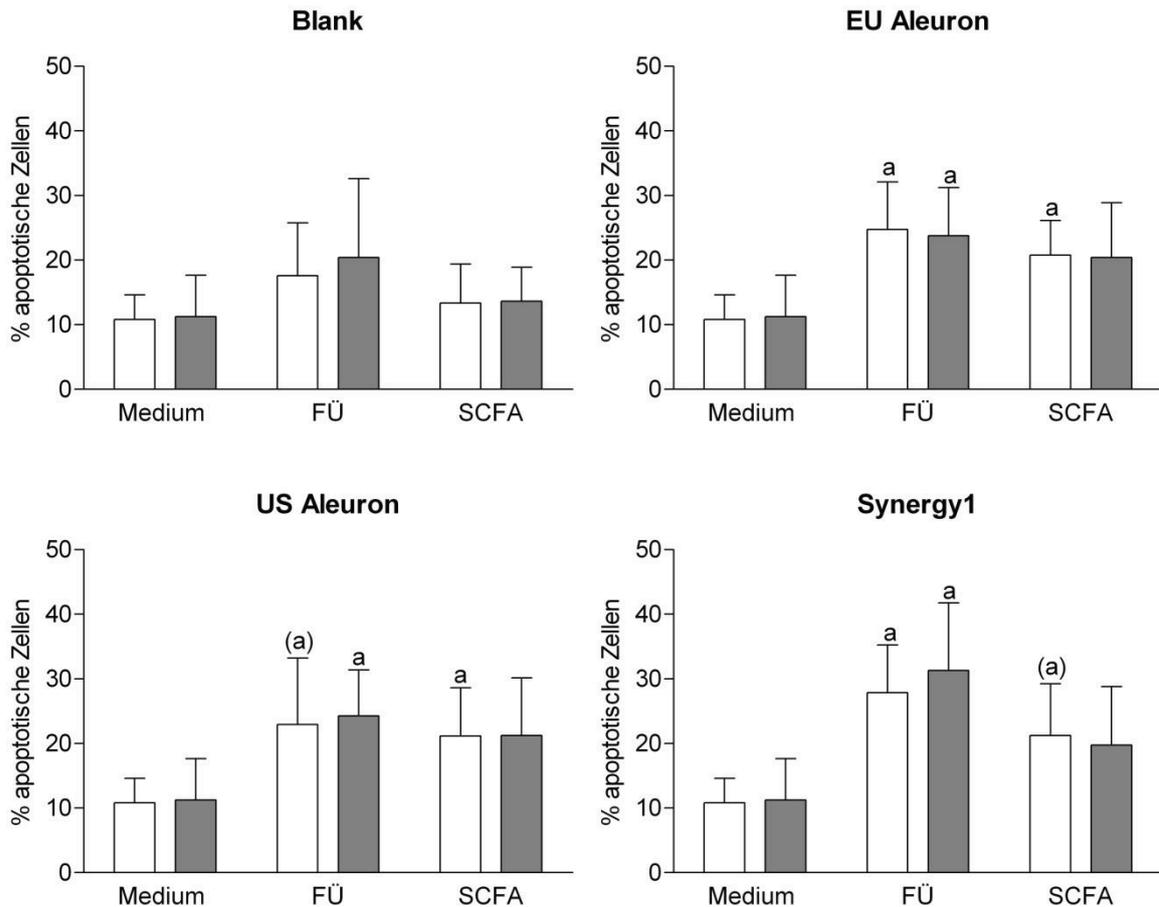


Abb. 15: Einfluss der Inkubation (24 h (□) und 48 h (■)) mit 5 % der FÜ Blank, FÜ EU Aleuron, FÜ US Aleuron und FÜ Synergy1 der Fermentation II und der korrespondierenden SCFA-Gemische (Azetat, Propionat und Butyrat) auf die frühe Apoptose in LT97-Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen (n=4) des Anteils apoptotischer Zellen. Der Student's *t*-Test wurde verwendet, um die Unterschiede zur jeweiligen Mediumkontrolle (*a* *P*<0,05) zu ermitteln. Werte in Klammern verdeutlichen einen Trend (*P*<0,07).

In HT29-Zellen betrug die Basalrate an frühapoptotischen Zellen nach 24 h $3,36 \pm 0,89$ % und nach 48 h $4,02 \pm 1,03$ %. In HT29-Zellen induzierten alle FÜ (10 %) die Apoptose, wobei der FÜ Blank erst nach 48 h die Anzahl an frühapoptotischen Zellen signifikant steigern konnte (Abb. 16). Der FÜ Aleuron beider Weizensorten und der FÜ Synergy1 wirkten überwiegend signifikant stärker als die Fäzeskontrolle (FÜ Blank). Die korrespondierenden SCFA-Gemische sowie Butyrat (2-2,5 mM) als Einzelsubstanz konnten die Apoptoserate in HT29-Zellen nicht erhöhen und unterschieden sich signifikant von den jeweiligen FÜ. Die gezeigte apoptotische Wirkung der FÜ war somit nicht in den enthaltenen SCFA begründet, so dass andere Inhaltsstoffe oder synergistische Einflüsse für diese Effekte verantwortlich sein müssen.

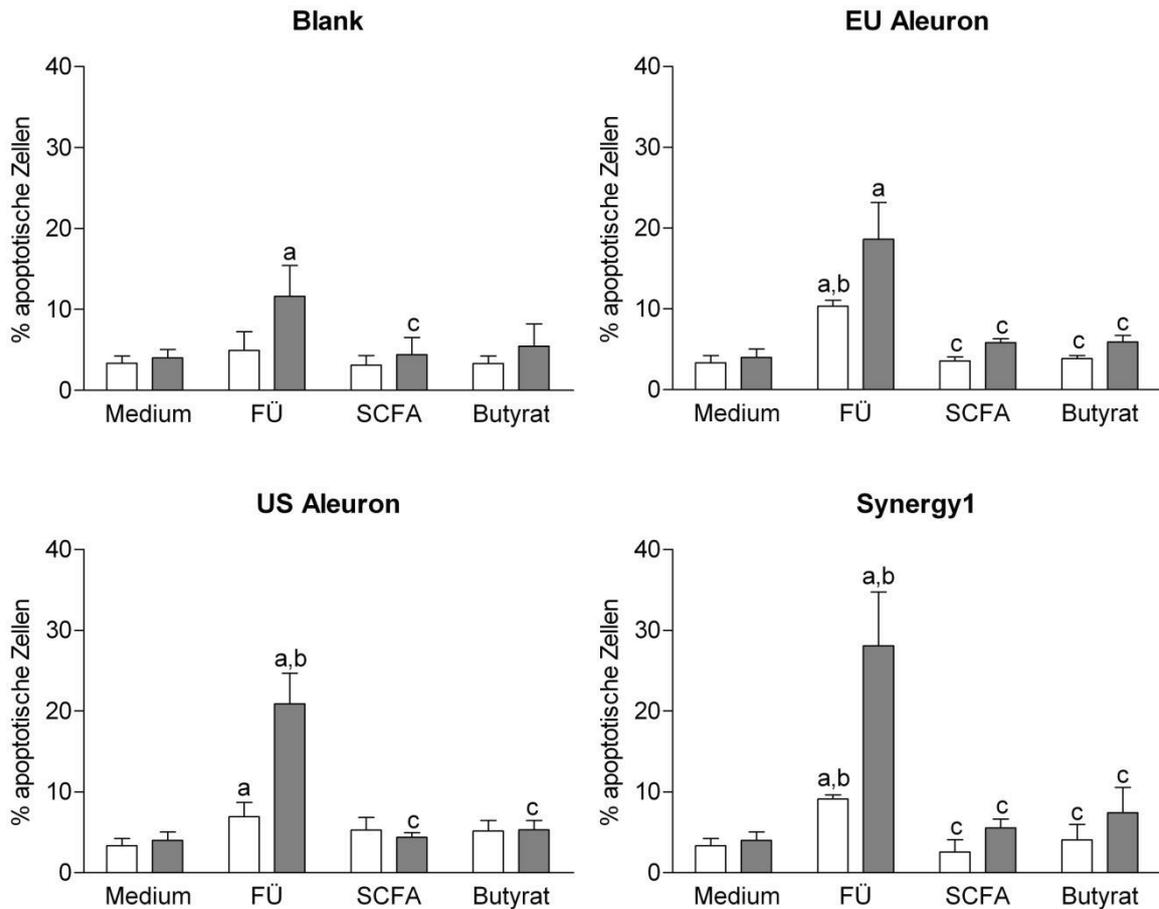


Abb. 16: Einfluss der Inkubation (24 h (□) und 48 h (■)) mit 10⁶ der FÜ Blank, FÜ EU Aleuron, FÜ US Aleuron und FÜ Synergy1 der Fermentation II, der korrespondierenden SCFA-Gemische (Azetat, Propionat und Butyrat) und Butyrat allein auf die frühe Apoptose in HT29-Zellen nach. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen (n=3) des Anteils apoptotischer Zellen. Der Student's *t*-Test wurde verwendet, um die Unterschiede zur jeweiligen Mediumkontrolle (a *P*<0,05), zum Blank (b *P*<0,05) und zum jeweiligen FÜ (c *P*<0,05) zu ermitteln.

In der Versuchsserie mit den FÜ der Fermentation III betrug die Basalrate an frühapoptotischen Zellen in der Zelllinie LT97 nach 24 h $7,54 \pm 2,50$ % und nach 48 h $9,08 \pm 4,93$ %. In LT97-Zellen induzierten der FÜ Aleuron – und der FÜ Aleuron + (5%) bereits nach 24 h signifikant die Anzahl frühapoptotischer Zellen (Abb. 17), allerdings wirkten diese nicht stärker als die jeweiligen Fäzeskontrollen (FÜ Blank – bzw. FÜ Blank +). Eine Steigerung des Apoptose-induzierenden Effekts aufgrund einer unterstützenden Fermentation durch die Probiotika konnte nicht gezeigt werden.

Die Basalrate an frühapoptotischen Zellen in der Zelllinie HT29 betrug nach 24 h $2,56 \pm 0,85$ % und nach 48 h $4,22 \pm 0,21$ %. In HT29-Zellen induzierten alle FÜ (10 %) signifikant die Apoptose (Abb. 17). Nur der FÜ Aleuron + wirkte nach 48 h signifikant stärker als die Fäzeskontrolle (FÜ Blank +). Das heißt, dass ein apoptotischer Effekt der FÜ nicht vornehmlich auf Metabolite zurückgeführt werden kann, die spezifisch bei der Fermentation von Aleuron entstehen. Vielmehr ist es wahrscheinlicher, dass mehrere Inhaltsstoffe für die

Wirkung des FÜ verantwortlich sind. Eine Steigerung des Apoptose-induzierenden Effekts aufgrund einer unterstützenden Fermentation durch die Probiotika konnte nicht gezeigt werden.

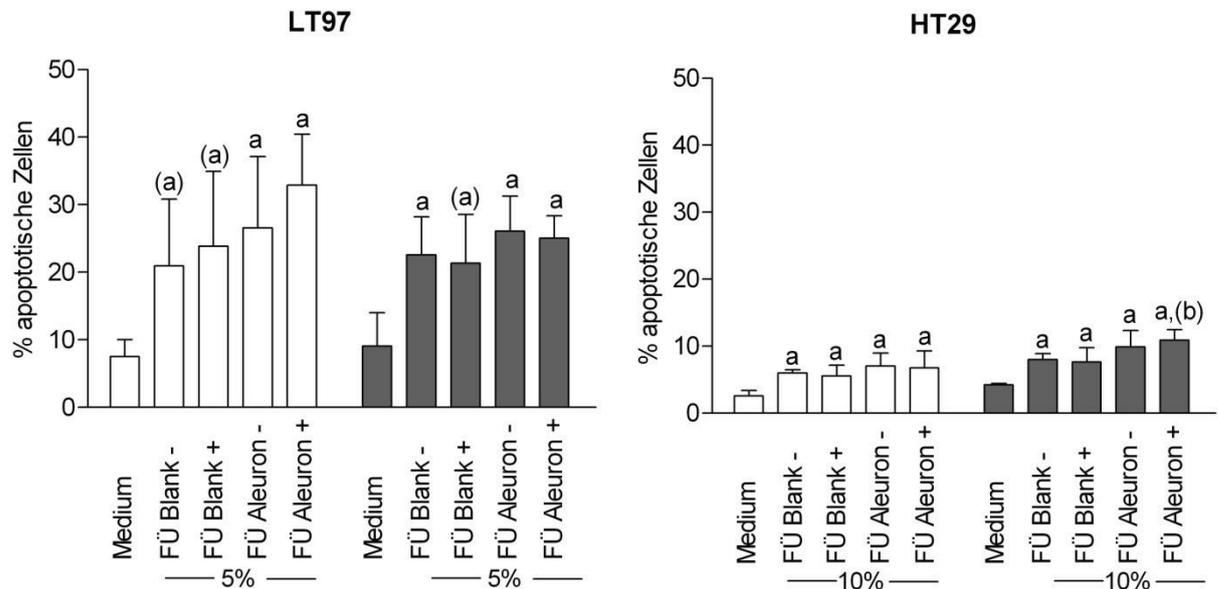


Abb. 17: Einfluss der Inkubation (24 h (□) und 48 h (■)) mit dem FÜ Blank -, FÜ Blank +, FÜ Aleuron - und FÜ Aleuron + FÜ (LT97: 5%; HT29: 10%) der Fermentation III auf die frühe Apoptose in LT97- und HT29-Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen (n=3) des Anteils apoptotischer Zellen. Der Student's *t*-Test wurde verwendet, um die Unterschiede zur jeweiligen Mediumkontrolle (a $P < 0,05$) und zum jeweiligen Blank (b $P < 0,05$) zu ermitteln. Werte in Klammern verdeutlichen einen Trend ($P \leq 0,1$).

Um diese mittels der Durchflusszytometrie generierten Ergebnisse zu bestätigen und detaillierte Informationen über die zugrunde liegenden Mechanismen zu erhalten, wurde zusätzlich der Einfluss von fermentiertem Weizenaleuron auf die Enzymaktivität von Caspase-3, -8 und -9 bestimmt.

In LT97-Zellen induzierten die FÜ Aleuron (5%) beider Weizensorten und FÜ Synergy1 gleichermaßen signifikant die Aktivität von Caspase-3 (Abb. 18). Im Gegensatz zu den Ergebnissen der Durchflusszytometrie zeigte in dieser Versuchsserie der FÜ Blank keinen apoptotischen Effekt. Weder die Aktivität von Caspase-9 noch von Caspase-8 konnte signifikant gesteigert werden (Daten nicht gezeigt).

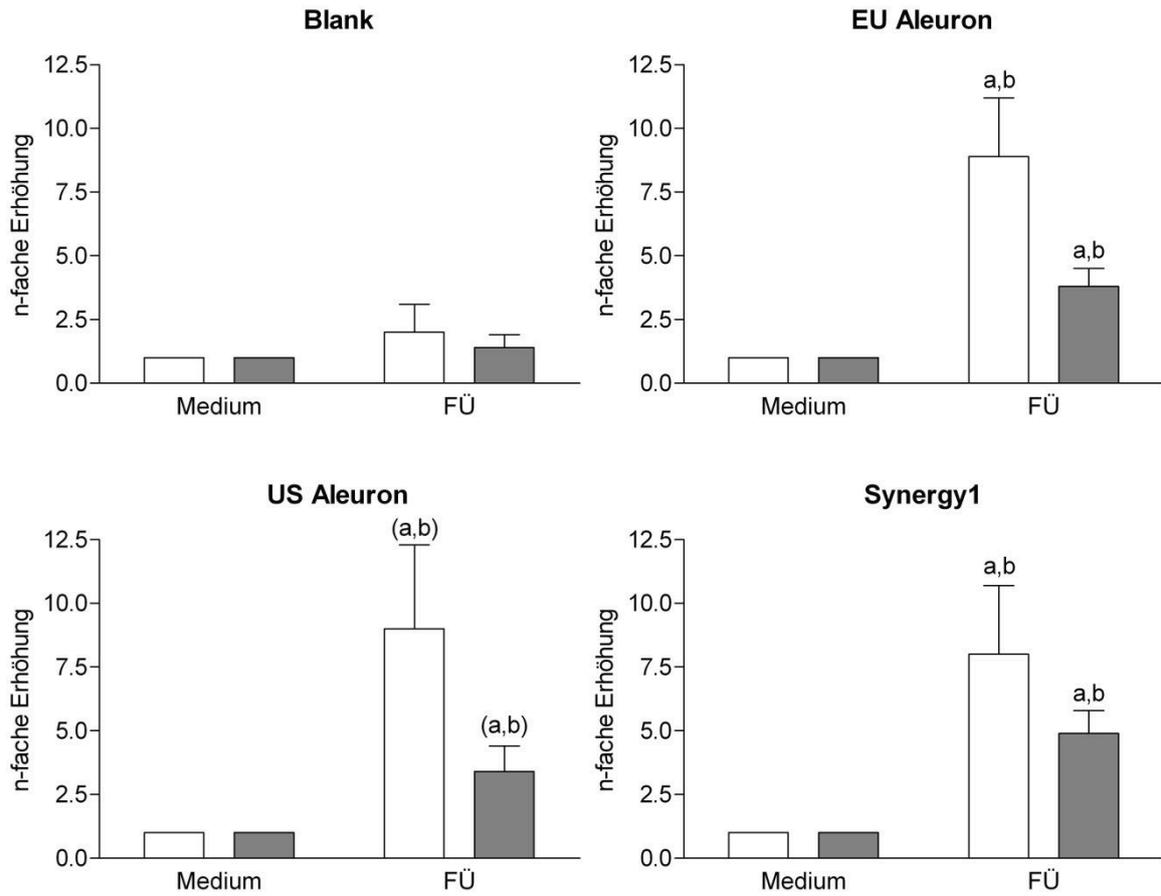


Abb. 18: Einfluss der Inkubation (24 h (□) und 48 h (■)) mit 5 % der FÜ Blank, FÜ EU Aleuron, FÜ US Aleuron und FÜ Synergy1 FÜ (5 %) der Fermentation II auf die Enzymaktivität der Caspase-3 (Marker für apoptotische Effekte) in LT97-Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen (n=3) als n-fache Erhöhung im Verhältnis zur Mediumkontrolle, welche gleich 1,0 gesetzt wurde. Der Student's *t*-Test wurde verwendet, um die Unterschiede zur jeweiligen Mediumkontrolle (a $P < 0,05$) und zum Blank ($P < 0,05$) zu ermitteln. Werte in Klammern verdeutlichen einen Trend ($P = 0,05$).

In HT29-Zellen induzierten die FÜ Aleuron (10 %) und der FÜ Synergy1 (10 %) nach 48 h signifikant die Aktivität von Caspase-3 (Abb. 19). Dabei konnte die Aktivität der Caspase-3 durch den FÜ Synergy1 bereits nach 24 h gesteigert werden. Die FÜ Aleuron beider Weizensorten und der FÜ Synergy1 wirkten signifikant stärker als der FÜ Blank. Weder die Aktivität von Caspase-9 noch von Caspase-8 konnte signifikant gesteigert werden (Daten nicht gezeigt).

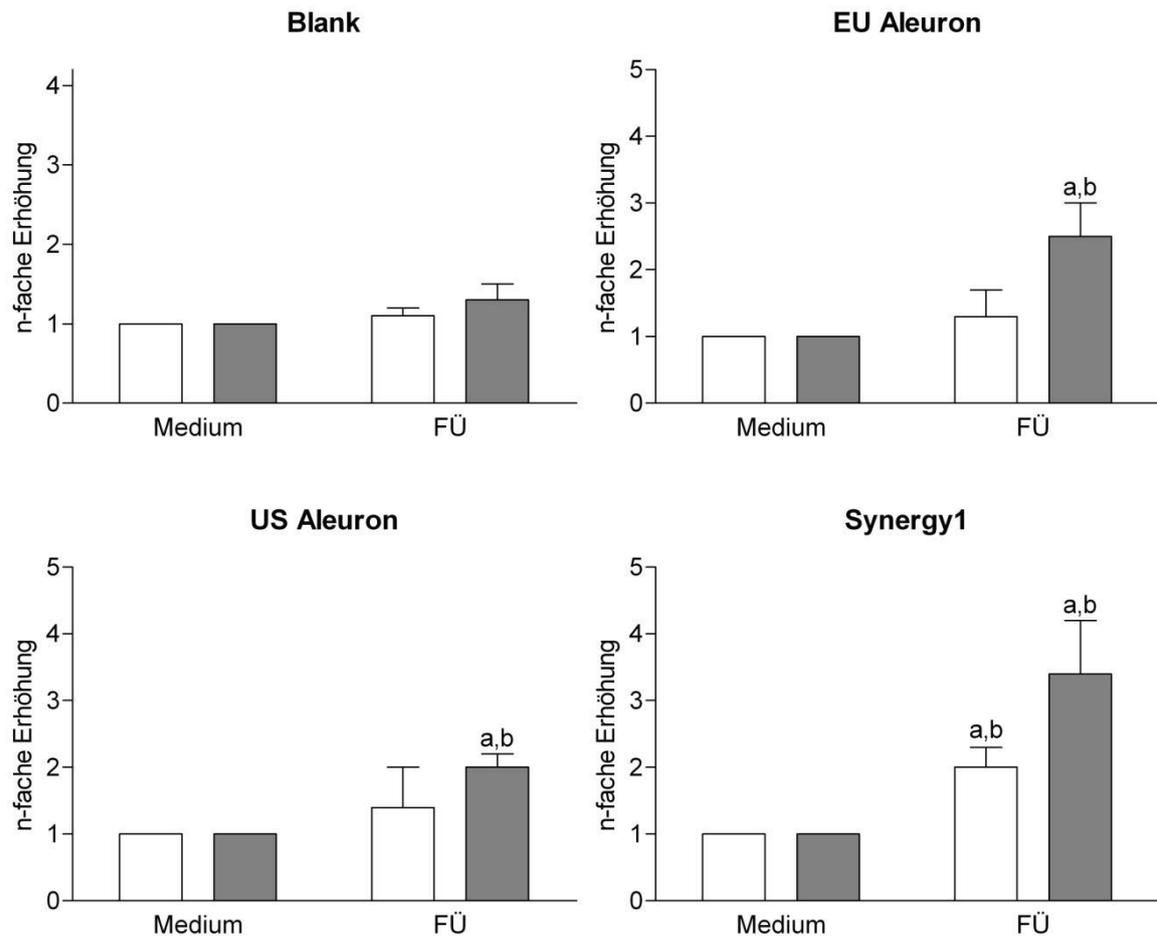


Abb. 19: Einfluss der Inkubation (24 h (□) und 48 h (■)) mit 10 % der FÜ Blank, FÜ EU Aleuron, FÜ US Aleuron und FÜ Synergy1 der Fermentation II auf die Enzymaktivität der Caspase-3 (Marker für apoptotische Effekte) in HT29-Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen (n=3) als n-fache Erhöhung im Verhältnis zur Mediumkontrolle, welche gleich 1,0 gesetzt wurde. Der Student's t-Test wurde verwendet, um die Unterschiede zur jeweiligen Mediumkontrolle (a $P < 0,05$) und zum Blank ($P < 0,05$) zu ermitteln.

2.1.5 Kombinationswirkungen durch die einzelnen im Darm entstehenden Metabolite

2.1.5.1 Kombinationswirkungen zwischen kurzkettigen Fettsäuren und Gallensäuren

Die korrespondierenden synthetischen Gemische (SCFA, SCFA + DCA sowie DCA allein) des FÜ Aleuron und Vollkornmehl der Fermentation I wurden hinsichtlich ihres Einflusses auf das Zellwachstum der HT29- und LT97-Zellen untersucht, wobei in LT97-Zellen nur die Gemische des FÜ Aleuron verwendet wurden. Das Zellwachstum beider Zelltypen wurde zeit- und konzentrationsabhängig durch die SCFA-Gemische reduziert, wobei die Wirkung vorrangig durch Butyrat ausgelöst wurde (siehe Tab. 11). Nach 48 h zeigte sich bei einer Konzentration von 13,1-14,7 % (HT29-Zellen) (Tab. 24) bzw. 5,1-6,5 % (LT97-Zellen) (Tab. 25) eine Abnahme

der vitalen Zellen um 50 %. DCA allein besaß keine wachstumsmodulierende Wirkung. So zeigte eine Kombination der Metabolite SCFA und DCA weder einer Reduktion noch Verstärkung der Effekte ($p < 0,05$; überprüft mittels Two-way ANOVA und Bonferroni Post Tests). In HT29-Zellen gab es zwischen den Fraktionen keine Unterschiede.

Tab. 24: EC₅₀-Werte [%]^{*} der synthetischen Gemische (SCFA, SCFA + DCA, DCA) der FÜ der Fermentation I in HT29-Zellen.

		EC ₅₀ [%]	
		48 h	72 h
SCFA			
	<i>Blank</i>	x	x
	<i>EU Aleuron</i>	13,5	7,2
	<i>Vollkornmehl</i>	13,4	8,5
SCFA + DCA			
	<i>Blank</i>	x	x
	<i>EU Aleuron</i>	14,7	9,0
	<i>Vollkornmehl</i>	13,1	8,8
DCA			
	<i>Blank</i>	x	x
	<i>EU Aleuron</i>	x	x
	<i>Vollkornmehl</i>	x	x

* EC₅₀ ist definiert als die effektive Konzentration bei welcher die vitale Zellzahl um 50 % gesenkt wurde.

x weist daraufhin, dass der EC₅₀ nicht erreicht wurde.

Tab. 25: EC₅₀-Werte der synthetischen Gemische (SCFA, SCFA + DCA, DCA) der FÜ der Fermentation I in LT97-Zellen.

		EC ₅₀ [%]	
		48 h	72 h
SCFA			
	<i>Blank</i>	x	x
	<i>EU Aleuron</i>	5,1	5,7
SCFA + DCA			
	<i>Blank</i>	x	x
	<i>EU Aleuron</i>	6,5	5,4
DCA			
	<i>Blank</i>	x	x
	<i>EU Aleuron</i>	x	x

* EC₅₀ ist definiert als die effektive Konzentration bei welcher die vitale Zellzahl um 50 % gesenkt wurde.

x weist daraufhin, dass der EC₅₀ nicht erreicht wurde.

2.1.5.2 Kombinationswirkungen zwischen kurzkettigen Fettsäuren und Antioxidantien

Als antioxidative Markersubstanz wurde Ferulasäure gewählt, welche in hohen Mengen gebunden an Arabinoxylane im Aleuron vorkommt. Obwohl laut Literatur bis zu 95 % der gebundenen Ferulasäure durch die Enzyme der Mikroflora im Dickdarm freigesetzt werden kann, war in den FÜ aufgrund zu niedriger Konzentrationen an Ferulasäure keine Quantifizierung möglich. Die Ergebnisse der Kinetikstudie (siehe Abb. 3) lieferten erste Hinweise darauf, dass durch die Fermentation tatsächlich Ferulasäure freigesetzt wird. Allerdings könnten die nicht quantifizierbaren Gehalte der freien Ferulasäure in den FÜ aus einer raschen bakteriellen Metabolisierung oder einer geringen Stabilität der Ferulasäure resultieren.

Aufgrund der nicht quantifizierbaren Konzentrationen an Ferulasäure in den FÜ war es nicht möglich, Untersuchungen zur Kombinationswirkung zwischen SCFA und Antioxidantien auf Grundlage der Gehalte in den FÜ durchzuführen.

2.1.5.3 Kombinationswirkungen zwischen Probiotika und Darmbakterien

Die Konsequenzen einer kombinierten Fermentation der Weizenaleuronfraktion mit ausgewählten Bakterien (Probiotika und *Clostridium butyricum*) und/oder mit der Darmmikroflora wurden hinsichtlich des Metabolitenmusters bereits vorgestellt (Tab. 14). Die Ergebnisse der Untersuchungen zur biologischen Aktivität der entsprechenden FÜ wurden bereits aufgeführt, so dass hier nur eine kurze Auflistung der bedeutenden Ergebnisse erfolgt:

1. Die Reduktion der tumor-promovierenden sekundären Gallensäure (DCA) durch das fermentierte Aleuron wurde durch die Zugabe der Probiotika (LGG/Bb12) (FÜ Aleuron +) begünstigt.
2. Darmbakterien des Fäzes und die Probiotika wirken synergistisch, so dass die Bildung der SCFA, besonders des Butyrats, während die Fermentation des Aleurons durch die Zugabe der Probiotika (FÜ Aleuron +) gesteigert wurde.
3. Eine Zugabe des *Clostridium butyricum* konnte diesen Effekt der SCFA-Bildung nicht steigern.
4. Die Fermentation des Aleurons allein durch die Probiotika (FÜ Aleuron + ohne Fäzes) resultierte nicht in hohen Mengen an SCFA, wobei hier auch nur die Bildung des Azetats nachweisbar war.
5. Der reduzierende Effekt des fermentierten Aleurons (FÜ Aleuron -) auf das Zellwachstum der HT29- und LT97-Zellen verstärkte sich durch die Zugabe der Probiotika (FÜ Aleuron +), wobei die Probiotika allein (ohne Fäzes) keine zellwachstumsmodulierende Eigenschaften aufwiesen.
6. Die Ergebnisse zum antigenotoxischen Potential gegenüber H₂O₂ weisen wahrscheinlich auf synergistische Effekte der Probiotika und der im Fäzes enthaltenen Darmbakterien hin, indem der FÜ Aleuron + einen stärkeren Einfluss auf die Reduktion der DNA-Schäden als der FÜ Aleuron – nimmt.

7. Die unterstützende Fermentation des Weizenaleurons durch die Probiotika (FÜ Aleuron +) sowie die Fermentation mit den Probiotika allein (FÜ Blank +) führte zu einem geringen, aber signifikant zusätzlichen G₀/G₁-Arrest im Vergleich zu den Proben ohne Probiotika (FÜ Blank – und Aleuron –).
8. Die Probiotika sind in der Lage die Effizienz der Fermentation des Aleurons zu steigern, was sich in einer erhöhten Konzentration an Butyrat in dem FÜ Aleuron + widerspiegelte, wodurch ein zusätzlicher antiproliferativer Effekt nachzuweisen war.

Die Folgen der Fermentation im Hinblick auf die Probiotika wurden durch den Projektpartner FZK untersucht. Dadurch wird hier nur auf wesentliche Ergebnisse hingewiesen:

1. Erhöhung der Zellzahl der Bifidobakterien und der Laktobazillen durch Fermentation des Aleurons
2. Zusatz von Probiotika (Bb12) hatte keinen Effekt auf Laktobazillen und Bifidobakterien
3. Erhöhung der Zellzahl der Clostridien durch Fermentation des Aleurons mit Probiotika; durch *Clostridium butyricum* leichter Zusatzeffekt
4. Erhöhung der Zellzahl der Enterokokken durch Fermentation des Aleurons
5. Keine Verschiebung der Gesamtbakterienzusammensetzung

2.1.5.4 Kombinationswirkungen zwischen den Probiotika und Kolonzenellen – Kokultur

Zur Untersuchung der Kombinationswirkung zwischen dem Kolonepithel und probiotischen Kulturen wurde *in vitro* eine Kurzzeitinkubation über 1,5 h von HT29-Zellen ($0,75 \times 10^6$ Zellen/Well) mit dem probiotischen Stamm LGG ($1,2 \times 10^8$ KBE/Well) nach Zugabe von EU Aleuron (26 mg/Well) durchgeführt. Alle Untersuchungen erfolgten nach Aussaat der HT29-Zellen auf Deckgläschen in einer 12-Well-Platte. Für einige Probenansätze wurde zusätzlich ein Companion-Membranfilter (Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ, USA) verwendet, um eine direkte Interaktion des Aleurons mit den HT29-Zellen zu vermeiden.

Im Anschluss wurde zum einen durch den Projektpartner FZK im Überstand die Konzentration an gebildeten SCFA (Azetat, Propionat und Butyrat) quantifiziert, zum anderen wurden der pH-Wert, die Zellzahl und die Vitalität bestimmt sowie eine Gram-Färbung zur mikroskopischen Betrachtung durchgeführt.

Durch die Kokultur von HT29-Zellen mit dem probiotischen Stamm LGG über 1,5 h wurde die Zellzahl und Vitalität der Kolonzenellen signifikant gesenkt (Tab. 26), was auf eine zytotoxische Wirkung hindeutet. Die Bakterien waren in der Lage, Azetat zu bilden, was ebenso in einem niedrigeren pH-Wert ersichtlich ist. Weiterhin bestätigen die Versuche, dass LGG als ein Vertreter der Milchsäurebakterien nicht in der Lage ist, Propionat und Butyrat zu bilden.

Interessanterweise wirkte auch EU Aleuron zytotoxisch, so dass sowohl eine signifikant niedrigere Zellzahl als auch eine reduzierte Vitalität nachgewiesen werden konnten, allerdings war dieser Effekt geringer als durch LGG.

Eine kombinierte Kokultur der HT29-Zellen mit LGG und EU Aleuron wirkte ebenfalls zytotoxisch. Darüber hinaus wurde eine signifikant höhere Konzentration an Azetat gebildet als durch die alleinige Kokultur mit LGG, was auf eine Verwertung des Aleurons durch LGG hindeutet.

Die Kokultur der HT29-Zellen mit LGG und EU Aleuron unter Verwendung des Membranfilters (Companion) zeigte eine signifikant niedrigere Konzentration an Azetat wie die Kokultur ohne Verwendung des Membranfilters, so dass vermutlich durch den Filter die Verwertung des Aleurons gehemmt wurde.

Tab. 26: Übersicht der untersuchten Parameter zur Bestimmung der Kombinationswirkung von LGG und HT29-Zellen nach Zugabe von EU Aleuron nach 1,5 h. Dargestellt sind die Mittelwerte von 3 unabhängigen Versuchen. Der Student's *t*-Test wurde durchgeführt, um die Unterschiede zur Mediumkontrolle (a $P < 0,05$), zu LGG-Probe (b $P < 0,05$), zur EU Aleuron-Probe (c $P < 0,05$) und zur LGG + EU Aleuron-Probe (d $P < 0,05$) zu ermitteln. n.b., nicht bestimmt.

	Zellzahl (10^6 /ml)		Vitalität (%)		pH-Wert		Azetat (mM)	
Mediumkontrolle	1,20		92,80		8,00		0,00	
LGG	0,04	a	4,31	a	5,00	a	184,28	a
EU Aleuron	0,38	a,b	89,27	a,b	8,00	b	0,00	b
LGG + EU Aleuron	0,02	a,c	12,13	a,c	5,00	a,c	240,55	a,b,c
LGG + EU Aleuron (Companion)	n.b.		n.b.		5,00	a,c	198,68	a,c,d

Aus der mikroskopischen Auswertung nach der Gram-Färbung ist ersichtlich, dass sich Bakterien des Stammes LGG an den HT29-Zellen anlagerten (Abb. 20).

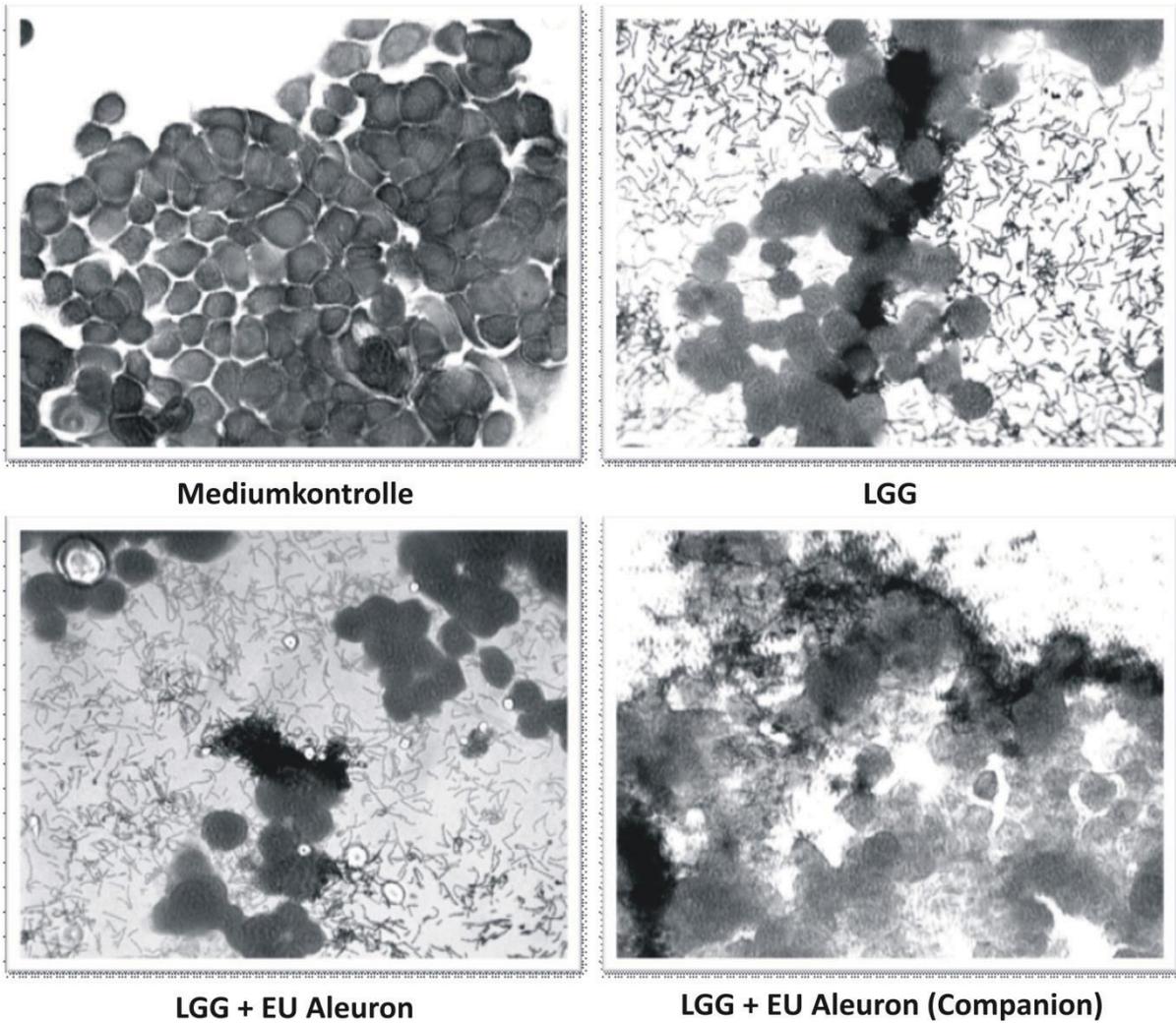


Abb. 20: Gramfärbung von LGG nach der Kokkultur mit HT29-Zellen für 1,5 h unter Zugabe von EU Aleuron (40-fache Vergrößerung)

2.1.6 Umsetzung der gewonnenen Erkenntnisse für die Entwicklung, Vermarktung und Produktion von funktionellen Lebensmitteln

Diese Aufgabenstellung wurde durch den Projektpartner Kampffmeyer Food Innovation GmbH bearbeitet.

2.2 Wichtigste Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

Der Verwendungsnachweis für alle Zuwendungen auf Ausgabenbasis und die Gerätebestandsliste inklusive der Bestätigung zur Geräteweiterverwendung wurden dem Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) bereits am 13.11.09 zugeleitet.

Die wesentlichen Positionen betrafen das Personal mit 214.195,21 €, die Verbrauchsmaterialien mit 120.921,86 €, die Auftragsvergabe an MRI Detmold 160.736,07, die Reisekosten mit 6.544,13 € sowie die Investitionen/Großgeräte mit 21.656,73 €. Damit betrug der Kassenbestand zum 30.09.2009 0,00 €.

2.3 Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit

Die Planung des Versuchsvorhabens und die Teilaufgaben der Meilensteine, wie im Antrag ausgeführt, waren strikte Leitlinie aller Arbeiten. Zu allen geplanten Meilensteinen wurden umfangreiche Untersuchungen durchgeführt, aussagefähige Daten erhalten und diese in Berichten und Publikationen dokumentiert. Teilweise wurde zusätzlich interessanten Fragestellungen vertiefend nachgegangen, die in der ursprünglichen Planung des Gesamtvorhabens noch nicht berücksichtigt werden konnten (z. B.: Testung verschiedener synthetische Mischungen der SCFA für eine Vielzahl untersuchter Parameter). Die verfügbaren personellen und finanziellen Ressourcen wurden vollständig ausgeschöpft. Es wird eingeschätzt, dass die erbrachten Ergebnisse den Zielstellungen des Vorhabens vollkommen entsprechen und die Angemessenheit der geleisteten Forschungen sehr überzeugend belegen.

2.4 Voraussichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse

Bezüglich der wirtschaftlichen, wissenschaftlichen und/oder technischen Erfolgsaussichten der Verwertung nach Projektende haben sich keine Änderungen ergeben. Dabei sind die wirtschaftlichen Erfolgsaussichten vor allem abhängig von einer weiterführenden Ernährungs-Interventionsstudie, um die *in vitro* gezeigten Daten für ausgewählte Parameter auf *in vivo* Ebene zu verifizieren.

Neben der Entwicklung eines funktionellen Lebensmittels ergeben sich aus den Ergebnissen aufgrund einer wissenschaftlichen Argumentation für den Verzehr von Weizenprodukten höhere Chancen für den Absatzmarkt, da sich Weizenaleuron als eine effektive Subfraktion des Weizenkorns erwiesen hat.

Die im Rahmen des Projektes erarbeiteten Ergebnisse liefern wichtige Ansatzpunkte für die Entwicklung eines funktionellen Lebensmittels. In einer weiterführenden humanen Interventionsstudie und/oder in Tierstudien könnte das Potential von Weizenaleuron in Kombination mit probiotischen Kulturen weiter untersucht werden, was einen weiteren wichtigen Schritt zur Entwicklung von funktionellen Lebensmitteln darstellen würde.

2.5 Während der Durchführung des Vorhabens bekannt gewordener Fortschritt auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen

Im Zeitraum 2006-2010 sind unter dem Stichwort „wheat aleurone“ in der Datenbank PubMed 43 relevante Publikationen auffindbar, wobei nur 5 Publikationen im engeren Sinne das bearbeitete Themengebiet betreffen. Von diesen 5 Publikationen stammen 2 Arbeiten von der Arbeitsgruppe FSU Jena. Darüber hinaus sind 4 weitere Publikationen mit Ergebnissen aus diesem Projekt fertiggestellt und (davon 3) bei renommierten wissenschaftlichen Fachzeitschriften eingereicht.

Betrachtet man die Veröffentlichungen unter dem Stichwort „wheat aleurone and colon cancer“ findet man in der Datenbank PubMed nur 3 Publikationen, wobei wiederum 2 Arbeiten von der Arbeitsgruppe FSU Jena stammen. Die 3. Veröffentlichung wurde bereits 2001 publiziert⁽¹⁸⁾. Hieraus wird deutlich, welche hohe Relevanz die generierten Daten für den derzeitigen Wissensstand besitzen.

2.6 Erfolgte und geplante Veröffentlichungen der Ergebnisse

PUBLIKATIONEN

“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**

“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 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 erneuter Begutachtung bei der Zeitschrift *Nutrition and Cancer*. **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 *BioFactors*. Dezember **2009**.

“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. In erneuter Begutachtung bei der Zeitschrift *British Journal of Nutrition*. **2010**

“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**.

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

„Prebiotics to reduce the risk of colorectal cancer.“

Michael Glei. Annual Probiotic Symposium, GI Detoxification: Probiotics, Enzymes & Complementary Agents, Salt Lake City, Utah, 12.-15.11.2009

POSTER

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

Katrin Stein, Anke Borowicki, 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

“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

“Fermentation Products of Wheat Aleurone Increase Activity of Catalase and Glutathion-S-Transferases in HT29 Cells.”

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

“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

“Fermentationsüberstände von Weizenaleuron und Probiotika (LGG/Bb12) beeinflussen fremdstoffmetabolisierende Enzyme in humanen Kolonzellen.”

Katrin Stein, Anke Borowicki, Daniel Scharlau, Michael Glei. **“47. Wissenschaftlicher Kongress der DGE”** in Jena, 11.-12.03.2010

Literaturverzeichnis

1. Aebi H (1984) Catalase in vitro. *Methods Enzymol* **105**, 121-126.
2. Aura AM, Härkönen H, Fabritius M & Poutanen K (1999) Development of an in vitro enzymatic digestion method for removal of starch and protein and assessment of its performance using rye and wheat breads. *Journal of Cereal Science* **29**, 139-152.
3. 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.
4. Beyer-Sehlmeyer G, Glei 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.
5. Bingham SA & Riboli E (2004) Diet and cancer - the European prospective investigation into cancer and nutrition. *Nat Rev Cancer* **4**, 206-215.
6. Bingham SA, Norat T, Moskal A, *et al.* (2005) Is the Association with Fiber from Foods in Colorectal Cancer Confounded by Folate Intake? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **14**, 1552-1556.
7. Drankhan K, Carter J, Madl R, Klopfenstein C, Padula F, Lu Y, Warren T, Schmitz N & Takemoto DJ (2003) Antitumor activity of wheats with high orthophenolic content. *Nutr Cancer* **47**, 188-194.
8. Fassler C, Arrigoni E, Venema K, Hafner V, Brouns F & Amado R (2006) Digestibility of resistant starch containing preparations using two in vitro models. *Eur J Nutr* **45**, 445-453.
9. Ferguson LR (1999) Natural and man-made mutagens and carcinogens in the human diet. *Mutat Res* **443**, 1-10.
10. Ferguson LR & Harris PJ (2003) The dietary fibre debate: more food for thought. *Lancet* **361**, 1487-1488.
11. Glei M, Hofmann T, Kuster K, Hollmann J, Lindhauer MG & Pool-Zobel BL (2006) Both wheat (*Triticum aestivum*) bran arabinoxylans and gut flora-mediated fermentation products protect human colon cells from genotoxic activities of 4-hydroxynonenal and hydrogen peroxide. *J Agric Food Chem* **54**, 2088-2095.
12. Habig WH, Pabst MJ & Jakoby WB (1974) Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem* **249**, 7130-7139.

13. Hung HC, Joshipura KJ, Jiang R, Hu FB, Hunter D, Smith-Warner SA, Colditz GA, Rosner B, Spiegelman D & Willett WC (2004) Fruit and vegetable intake and risk of major chronic disease. *JNCI Cancer Spectrum* **96**, 1577-1584.
14. Jenab M & Thompson LU (2000) Phytic acid in wheat bran affects colon morphology, cell differentiation and apoptosis. *Carcinogenesis* **21**, 1547-1552.
15. Johnson IT, Williamson G & Musk SRR (1994) Anticarcinogenic factors in plant foods: A new class of nutrients? *Nutrition Research Reviews* **7**, 175-204.
16. Kestell P, Zhao L, Zhu S, Harris PJ & Ferguson LR (1999) Studies on the mechanism of cancer protection by wheat bran: effects on the absorption, metabolism and excretion of the food carcinogen 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline (IQ). *Carcinogenesis* **20**, 2253-2260.
17. Lazarova DL, Bordonaro M, Carbone R & Sartorelli AC (2004) Linear relationship between Wnt activity levels and apoptosis in colorectal carcinoma cells exposed to butyrate. *Int J Cancer* **110**, 523-531.
18. McIntosh GH, Royle PJ & Pointing G (2001) Wheat aleurone flour increases cecal beta-glucuronidase activity and butyrate concentration and reduces colon adenoma burden in azoxymethane-treated rats. *J Nutr* **131**, 127-131.
19. McIntosh GH, Royle PJ & Pointing G (2001) Wheat aleurone flour increases cecal beta-glucuronidase activity and butyrate concentration and reduces colon adenoma burden in azoxymethane-treated rats. *J Nutr* **131**, 127-131.
20. Munjal U, Gleis M, Pool-Zobel BL & Scharlau D (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* **102**, 663-671.
21. Perrin P, Pierre F, Patry Y, Champ M, Berreur M, Pradal G, Bornet F, Meflah K & Menanteau J (2001) Only fibres promoting a stable butyrate producing colonic ecosystem decrease the rate of aberrant crypt foci in rats. *Gut* **48**, 53-61.
22. Pool-Zobel BL (2005) Inulin-type fructans and reduction in colon cancer risk: review of experimental and human data. *Br J Nutr* **93 Suppl 1**, S73-S90.
23. Reddy BS, Hirose Y, Cohen LA, Simi B, Cooma I & Rao CV (2000) Preventive potential of wheat bran fractions against experimental colon carcinogenesis: implications for human colon cancer prevention. *Cancer Res* **60**, 4792-4797.
24. Schatzkin A & Kipnis V (2004) Could Exposure Assessment Problems Give Us Wrong Answers to Nutrition and Cancer Questions? *JNCI Cancer Spectrum* **96**, 1564-1565.
25. Timmerman HM, Koning CJ, Mulder L, Rombouts FM & Beynen AC (2004) Monostrain, multistain and multispecies probiotics--A comparison of functionality and efficacy. *Int J Food Microbiol* **96**, 219-233.

26. Veeriah S, Miene C, Habermann N, Hofmann T, Klenow S, Sauer J, Bohmer F, Wolf S & Pool-Zobel BL (2008) Apple polyphenols modulate expression of selected genes related to toxicological defence and stress response in human colon adenoma cells. *Int J Cancer* **122**, 2647-2655.
27. Yu Z, Xu M, Santana-Rios G, Shen R, Izquierdo-Pulido M, Williams DE & Dashwood RH (2001) A comparison of whole wheat, refined wheat and wheat bran as inhibitors of heterocyclic amines in the Salmonella mutagenicity assay and in the rat colonic aberrant crypt focus assay. *Food Chem Toxicol* **39**, 655-665.
28. Zalatnai A, Lapis K, Szende B, Raso E, Telekes A, Resetar A & Hidvegi M (2001) Wheat germ extract inhibits experimental colon carcinogenesis in F-344 rats. *Carcinogenesis* **22**, 1649-1652.