

ANTIOXIDATIVE WIRKUNGEN VON APFELPOLYPHENOLEN *IN-VITRO*

Volker Blust^a, Matthias Roth^a, Elena Maser^a, Matthias Fromm^b, Dietmar Kammerer^b,
Reinhold Carle^b, Doris Marko^a

^aInstitut für Lebensmittelchemie und Toxikologie, Universität Wien,
1090 Wien, Österreich

^bInstitut für Lebensmittelwissenschaft und Biotechnologie, Fg. Lebensmittel
pflanzlicher Herkunft, Universität Hohenheim, 70599 Stuttgart, Deutschland

Mit zunehmendem Gesundheitsbewusstsein der Verbraucher sind sekundäre Pflanzenstoffe verstärkt in den Fokus des Interesses gerückt. So erfreuen sich Obst und Gemüse sowie daraus hergestellte Produkte steigender Beliebtheit, zumal zahlreiche epidemiologische Studien eine positive Korrelation zwischen einer betont vegetarischen Ernährung und einer verminderten Inzidenz bestimmter degenerativer Erkrankungen, wie verschiedene Krebsformen, aufgezeigt haben.

Gerade Produkte aus Äpfeln sind bei den Verbrauchern besonders beliebt. So stellt der Apfel in Österreich mit einem jährlichen pro Kopf Verbrauch von ca. 29 kg die am meisten konsumierte Frucht dar. Rund ein Drittel der Apfelernte wird für die Produktion von Apfelsaft verwendet, bei der ca. 60.000 t an Apfeltrester als Nebenprodukt anfallen. Dieser Trester beinhaltet beträchtliche Mengen an sekundären Inhaltsstoffen, insbesondere Polyphenole.

Bislang wurden vor allem drei hervorstechende Eigenschaften für die beobachtete biologische Wirkung von Apfelinhaltsstoffen verantwortlich gemacht. Zum einen scheinen Apfelpolyphenole in zelluläre Signalwege einzugreifen, die das Zellwachstum modulieren. So konnten Apfelpolyphenole als potente Hemmstoffe des epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors (EGFR) identifiziert werden. Dessen Hemmung bewirkt eine Unterdrückung der nachgeschalteten Mitogen-aktivierten Protein Kinase Kaskade (MAPKK), einer für das Zellwachstum wichtigen Signalkaskade, welche in Tumorzellen verstärkt aktiv ist [1,2,3]. Andererseits besitzen die phenolischen

Substanzen des Apfels das Potential zur verstärkten Bildung von zelleigenen, entgiftenden Enzymen des Phase-II-Metabolismus.

In HT29 Kolonkrebszellen führte die Inkubation mit Apfelphenolen zu einer Erhöhung der Transkription für diverse Glutathion-S-Transferasen [4]. Des Weiteren scheinen die Flavonoide des Apfels die DNA der Zellen vor oxidativen Schädigungen zu bewahren. Schaefer et al. konnten zeigen, dass eine Vorbehandlung mit Polyphenolextrakten die durch den Redoxcyclus Menadion verursachten oxidativen Schäden in HT29- und Caco-2-Zellen vermindern kann [5,6].

Ziel dieses Forschungsvorhabens ist es, Inhaltsstoffe aus Apfeltrester, welcher bei der Apfelpektinengewinnung und der Saftherstellung anfällt, hinsichtlich ihres Wirkpotentials *in vitro* zu charakterisieren, um Möglichkeiten für die ganzheitliche Verwertung des Apfels aufzuzeigen.

Der Schwerpunkt liegt dabei auf der Optimierung bestehender Verfahren zur quantitativen Extraktion der wertgebenden Inhaltsstoffe aus den entpektinisierten Trestern, welche bei der Apfelsaftgewinnung anfallen. Die gewonnenen Extrakte werden anschließend für die *in vitro*-Charakterisierung der biofunktionellen Eigenschaften herangezogen, um so die wirksamen Prinzipien des Apfels bzw. der Nebenprodukte der Apfelsaftgewinnung aufzuklären. Ferner gilt es, mittels aktivitätsgeleiteter Fraktionierung bioaktive Einzelsubstanzen der komplexen Extrakte zu identifizieren.

Zur Untersuchung der antioxidativen Wirkung der Apfeltresterextrakte in HT29 Kolonkarzinomzellen wurde der Dichlorofluorescein-Assay (DCF) gewählt. Hierbei handelt es sich um einen fluorimetrisch kinetischen Assay, der aufgrund eines relativen Fluoreszenzanstiegs durch Oxidation des Fluoreszenzfarbstoffs Dichlorofluorescein-Diacetat, die Bestimmung des Gehalts an reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) in der Zelle ermöglicht. Durch eine zusätzliche Behandlung der Zellen mit dem Redoxcyclus Menadion (20 μM) kann eine Modulation intrazellulär generierter ROS durch die polyphenolreichen Flavonoidextrakte untersucht werden.

Ein mit Ethylacetat gewonnener Apfeltresterextrakt (E1) zeigte nach 24h Substanzinkubation eine starke Verringerung Menadion-induzierter ROS im Vergleich

zur Lösungsmittelkontrolle, die nicht mit Menadion behandelt wurde. Dieser Anstieg der zellulären antioxidativen Kapazität ist möglicherweise auf eine Aktivierung des Nrf2/ARE Signalwegs zurückzuführen.

Eine Reihe von Genprodukten, die in ihrer Expression durch das antioxidativ-responsive Element (ARE) reguliert werden, spielen für die Regulation des endogenen Redoxstatus eine bedeutende Rolle. Ein Schlüsselregulator für die Transkription ARE-abhängiger Gene ist der nukleäre Transkriptionsfaktor „erythroid 2p45 (NF-E2)-related factor 2“ (Nrf-2) [7].

Daher könnten Substanzen, die zu einer Erhöhung des Nrf-2-Gehaltes im Zellkern führen, in der Chemoprävention eine wichtige Rolle übernehmen. Zu den ARE-abhängigen Genen zählen beispielsweise die Hämoxxygenase-1 (HO1), γ -Glutamylcysteinyligase (γ -GCL) und einige Glutathion-S-transferasen (GST).

Eine Aktivierung des Nrf2/ARE Signalwegs konnte in weiteren Untersuchungen mittels Westernblot Analyse und Detektion mit spezifischem Antikörper bestätigt werden. Der Extrakt E1 führte nach 3 h Inkubation im Konzentrationsbereich von 0,1 – 50 μ g/ml zu einer Translokation von Nrf2 in den Zellkern.

Ob und inwieweit eine gesteigerte Translokation von Nrf2 zu einer verstärkten Transkription ARE abhängiger Gene führt, wurde mittels quantitativer Realtime PCR bestimmt. Untersucht wurden die Transkripte der HO1, NADP(H)-Chinon-Oxidoreductase1 (NQO1) und γ -GCL. Für alle drei Gene zeigte sich nach 24 h Inkubation mit E1 konzentrationsabhängig eine signifikante Erhöhung der entsprechenden Transkriptmengen.

Die γ -GCL stellt ein Schlüsselenzym der Biosynthese von Glutathion (GSH) dar. In seiner reduzierten Form ist GSH ein zelluläres Antioxidans und spielt eine bedeutende Rolle bei Entgiftungsreaktionen der Zelle. Um zu überprüfen, ob eine gesteigerte Transkription der γ -GCL auch mit einem Anstieg des GSH-Spiegels einhergeht, wurde der zelluläre Gesamtglutathionspiegel nach Tietze et al. bestimmt. Der Tresterextrakt E1 bewirkte im Bereich von 100 bis 250 μ g/ml eine konzentrationsabhängige Zunahme des zellulären GSH Levels und trägt somit zur Erhöhung der antioxidativen Kapazität der Zelle bei.

Dieses Vorhaben wurde aus Mitteln der industriellen Gemeinschaftsforschung (Bundesministerium für Wirtschaft und Technologie, BMWi) via AiF über den Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI) gefördert. Projekt AiF 15617 N

[1] Kern, M.; Tjaden, Z.; Ngiewih, Y.; Puppel, N.; Will, F.; Dietrich, H.; Pahlke, G.; Marko, D. (2005) Inhibitors of the epidermal growth factor receptor in apple juice extract. *Molecular Nutrition & Food Research* **49**, 317-328.

[2] Marais, R.; Marshall, C.J. (1996) Control of the ERK MAP kinase cascade by Ras and Raf. *Cancer Surveys* **27**, 101-125.

[3] Lewis, T.S.; Shapiro, P.S.; Ahn, N.G. (1998) Signal transduction through MAP kinase cascades. *Advances in Cancer Research* **74**, 49-139.

[4] Veeriah, S.; Kautenberger, T.; Habermann, N.; Sauer, J.; Dietrich, H.; Will, F.; Pool-Zobel, B.L. (2006) Apple flavonoids inhibit growth of HT29 human colon cancer cells and modulate expression of genes involved in the biotransformation of xenobiotics. *Molecular Carcinogenesis* **45**, 164-174.

[5] Schaefer, S.; Baum, M.; Eisenbrand, G.; Dietrich, H.; Will, F.; Janzowski, C. (2006) Polyphenolic apple juice extracts and their major constituents reduce oxidative damage in human colon cell lines. *Molecular Nutrition & Food Research* **50**, 24-33.

[6] Schaefer, S.; Baum, M.; Eisenbrand, G.; Janzowski, C. (2006) Modulation of oxidative cell damage by reconstituted mixtures of phenolic apple juice extracts in human colon cancer cell lines. *Molecular Nutrition & Food Research* **50**, 413-417.

[7] Lee, J.S.; Surh, Y.J. (2005) Nrf2 as a novel molecular target for chemoprevention. *Cancer Letters* **224**, 171-184.