



Wirkung von Flavonoiden auf den redoxsensitiven Nrf2-Signalweg in Säugerzellen

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Ricarda Rohrig

aus Mönchengladbach

Düsseldorf, April 2010

aus dem Institut für Toxikologie
der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: PD Dr. W. Wätjen
Koreferent: Prof. Dr. P. Proksch

Tag der mündlichen Prüfung: 18.05.2010

"Daß ich nicht mehr mit saurem Schweiß
Rede von dem, was ich nicht weiß.
Daß ich erkenne, was die Welt
Im Innersten zusammenhält."

(Johann Wolfgang von Goethe, Faust)

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Flavonoide	1
1.1.1 Strukturcharakteristika	1
1.1.2 Allgemeine Wirkweise von Flavonoiden	4
1.2 Flavonoide und Oxidativer Stress	6
1.2.1 ROS und oxidativer Stress	6
1.2.2 Oxidative Schädigung biologischer Systeme	7
1.2.3 Zelluläre Schutzmechanismen	8
1.3 Flavonoide und Signaltransduktion	12
1.3.1 Wirkung von Flavonoiden auf Kinasen	12
1.3.2 Kinase Kaskaden.....	13
1.4 Flavonoide und Nuclear factor erythroid related factor 2 (Nrf2)	15
1.4.1 Allgemeiner Verlauf der Nrf2 Aktivierung	15
1.4.2 ECH-kelch-like-activator-protein1 (Keap I).....	15
1.4.3 ARE.....	19
1.4.4 Proteasomale Degradation.....	20
1.5 Flavonoide als Nahrungsergänzungsmittel	22
1.6 Zielsetzung	23
2. Material & Methoden:	25
2.1 Abkürzungen	25
2.2 Material	26
2.2.1 Bakterienstämme und Zelllinien	26
2.2.2 Plasmide	27
2.2.3 Medien & Antibiotika	27
2.2.4 Lösungen & Puffer	27
2.2.5 Molekulargewichtsstandards	29
2.2.6 Synthetische Primer	29
2.2.7 Antikörper	30
2.2.8 Enzyme & Substrate.....	30
2.2.9 Transfektionsreagenzien	31
2.2.10 Chemikalien	31
2.2.11 Geräte	33
2.2.12 Sonstige Materialien	35
2.2.13 Computersoftware	35
2.3 Methoden	35
2.3.1 Zellkultur	35
2.3.2 Inkubation/Schädigung der Zellen	37
2.3.3 Einfrieren & Auftauen von Zellen	37
2.3.4 Mikroskopie von Zellen.....	37

Inhaltsverzeichnis

2.3.5 Antioxidative Kapazität	37
2.3.6 Zytotoxizität	38
2.3.7 Transiente Transfektion	39
2.3.8 Reporter Assays	39
2.3.9 Proteasom-Inhibitor-Assay (Cali, Niles et al., 2008).....	40
2.3.10 Nachweis von ROS (H ₂ DCF-DA) (Burow und Valet, 1987)	40
2.3.11 Nukleinsäuren.....	41
2.3.12 Bakterien	45
2.3.13 Proteine	46
2.3.14 Densitometrische Auswertung	50
2.3.15 Statistische Auswertung.....	50
3. Ergebnisse	51
3.1 Strukturcharakteristika von Flavonoiden	51
3.1.1 Antioxidatives Potential (TEAC)	51
3.1.2 Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (DCF)	55
3.1.3 Einfluss von Flavonoiden und Induktoren auf die Viabilität	59
3.2 Nrf2 Translokation	64
3.2.1 Nukleäre Nrf2-Akkumulation durch tBHQ.....	65
3.2.2 Nukleäre Nrf2-Akkumulation durch Flavonoide	66
3.2.3 Klonierung des Nrf2-GFP-Reporter-gen-Konstrukts.....	72
3.2.3.1 Einfluss von Flavonoiden auf die Nrf2-Translokation	77
3.2.4 Transkriptionelle Nrf2-Regulation durch tBHQ	78
3.2.5 Posttranslationale Stabilisierung von Nrf2 (Proteasomen-Inhibition)	79
3.3 ARE-Aktivierung	83
3.3.1 ARE Aktivierung durch tBHQ	84
3.3.2 ARE Aktivierung durch Flavonoide	85
3.4 Regulation antioxidativer Enzyme	86
3.4.1 Regulation der HO-1.....	86
3.4.2 Regulation der GST	92
4. Diskussion	96
4.1 Strukturbedingte Eigenschaften der Flavonoide	97
4.1.1 Antioxidative Eigenschaften.....	97
4.1.2 Wirkung auf die Viabilität	102
4.2 Wirkung auf den Nrf2-ARE-Signalweg	105
4.2.1 Wirkung auf die Nrf2 Translokation	105
4.2.2 Transkriptionelle Regulation von Nrf2	112
4.2.3 Proteasomale Degradation.....	113
4.2.4 Wirkung auf die ARE-Aktivierung	115
4.3 Induktion antioxidativer und fremdstoffmetabolisierender Enzyme	116
4.4 Wirkmechanismus von Flavonoiden auf den Nrf2-Signalweg	120

Inhaltsverzeichnis

4.4.1 Regulation des Nrf2 Signalwegs durch Modifikation von Keap I.....	121
4.4.2 Regulation des Nrf2-Signalwegs durch Kinasen	123
4.5 Wirkung von Flavonoiden als Nahrungsergänzungsmittel	126
4.6 Ausblick	127
4.7 Zusammenfassung.....	128
4.8 Summary	130
5. Literatur	132
6. Anhang	147
Rohdatentabellen	147
Veröffentlichungen	172
Danksagung	174
Eidesstattliche Erklärung	175

1. Einleitung

1.1 Flavonoide

1.1.1 Strukturcharakteristika

Die Flavonoide gehören zu der großen Gruppe der Polyphenole. Allen Flavonoiden gemeinsam ist das Flavan-Gerüst (Abb.1.1). Pflanzen synthetisieren Flavonoide durch die Kondensation eines aktivierten Zimtsäurederivates mit drei aktivierten Malonyl-CoA. Auf Grund des Maßes der Oxidation am C-Ring des Grundgerüsts können Flavonoide in verschiedene Untergruppen eingeteilt werden. Innerhalb einer Klasse werden die verschiedenen Vertreter anhand der Hydroxylgruppen an Ring A und B sowie am

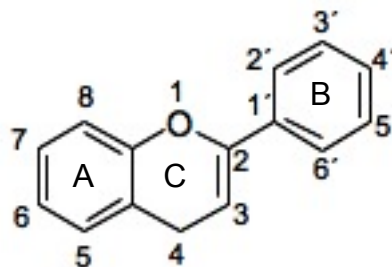


Abb.1.1: Flavan-Grundgerüst der Flavonoide

heterozyklischen Ring C unterschieden. Weitere Strukturunterschiede bestehen im Auftreten von verschiedenen Substituenten des Grundgerüsts wie die Bindung an unterschiedliche Zucker, Methylierungen oder Kondensationsprodukte der einzelnen Vertreter. Einige exemplarische Vertreter der Unterklassen Flavonole, Flavanole, Flavanone, Flavone und Isoflavonoide sowie ihr Vorkommen sind in Tabelle 1 dargestellt. Neben diesen Gruppen gibt es noch weitere phenolische Verbindungen, welche separat in die Gruppen der Lignane, Tannine oder Pro-/Anthocyanidine

Tab. 1: Einige Verbindungsklassen der Flavonoide

Gezeigt sind verschiedene Verbindungsklassen und ihr Vorkommen

Verbindung	Beispiele	Vorkommen
Flavonole	Quercetin/ Kaempferol	Zwiebeln/ Endivie
Flavanole	Catechin/ Epicatechin	Rotwein/ Grüner Tee
Flavanone	Hesperetin/ Narigenin	Orange/ Grapefruit
Flavone	Apigenin/ Luteolin	Paprika/ Sellerie
Isoflavonoide	Daidzein/ Genistein	Sojabohnen

Caffeate, Coumarine, Chalcone und Stilbene eingeteilt werden.

Laut der Deutschen Gesellschaft für Ernährung existieren über 6000 verschiedene Verbindungen (Harborne und Williams, 2000).

Flavonoide finden sich in fast allen höheren Pflanzen als glukosidische Verbindungen in den Vakuolen der äußeren Pflanzenteile und erfüllen die verschiedensten Aufgaben.

Sie sind für die kräftige Färbung von Blüten aber auch Früchten verantwortlich (Anthocyane), welche aus der Anhäufung von Flavonoiden in den äußeren Teilen der Pflanze resultiert. Durch ihre auffallenden Farben können sie als Signalgeber für bestäubende Insekten dienen. Des Weiteren absorbieren diese Farben Licht im UV-Bereich und bieten so einen Schutz vor UV Strahlung. Auf Grund der adstringierenden Wirkung mancher Vertreter (Catechin) dienen sie als Schutz vor Fraßfeinden (Pietta, 2000). Eine weitere charakteristische Eigenschaft vieler Flavonoide ist die antioxidative Kapazität. Auf Grund ihrer Struktur sind sie in der Lage reaktive Verbindungen zu neutralisieren und die Pflanze vor Schäden zu schützen. Da Flavonoide im Pflanzenreich so weit verbreitet sind, werden sie mit der täglichen Nahrung aufgenommen. Die Konzentration der polyphenolischen Verbindungen, welche pro Tag aufgenommen wird, ist stark vom persönlichen Lebensstil abhängig. Neben der Menge

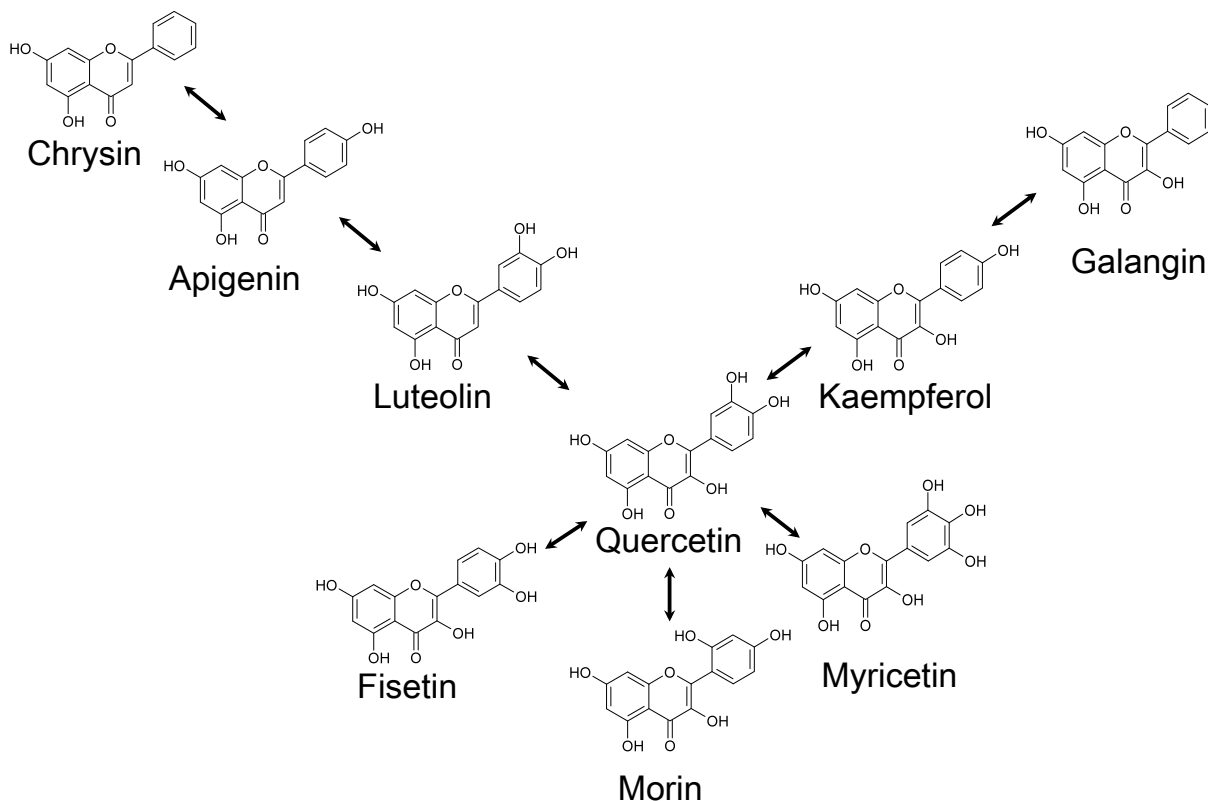


Abb.1.2: Strukturen der untersuchten Flavonoide

Die Strukturen der untersuchten Flavonoide weisen starke Ähnlichkeiten mit der Leitstruktur Quercetin auf. Durch die Stellung und die Substitution von Hydroxylgruppen an Ring A und B als auch am Heterozyklus entstehen Flavonoide mit unterschiedlichen Wirkungen.

an pflanzlicher Nahrung ist auch die Bioverfügbarkeit des Flavonoids von entscheidender Bedeutung für die Vermittlung der antioxidativen Effekte. Zu den am weitesten verbreiteten Flavonoiden gehören die Flavonole Kaempferol und Quercetin, welche in höheren Konzentrationen in Zwiebeln, Broccoli oder Blaubeeren vorkommen (Manach, Scalbert et al., 2004). In Aufnahmestudien konnten Unterschiede in Quercetin Konzentrationen festgestellt werden, die durch die Aufnahme flavonoidarmer Nahrung vor der Supplementierung bedingt waren. Zudem waren die Plasmakonzentrationen an Quercetin durch die Supplementierung mit $> 1\text{g/Tag}$ Quercetin über 28 Tage mit $1,5\ \mu\text{M}$ vergleichsweise gering. Die Plasmakonzentration liegt im nM-Bereich wenn die Quercetin-Dosis auf $80\ \text{mg/Tag}$ reduziert wird und die Verabreichungsdauer nur 1 Woche beträgt (Manach, Williamson et al., 2005).

In Abbildung 1.2 ist Quercetin mit den in dieser Arbeit untersuchten Strukturanaloga gezeigt. Zu ihnen gehören die Flavonole Kaempferol, Galangin, Morin, Fisetin und Myricetin sowie die Flavone Luteolin, Apigenin und Chrysin. Gekennzeichnet sind diese Verbindungen durch eine Ketogruppe an Ring C und eine oder mehrere Hydroxylgruppen an Ring B sowie im Fall der Flavonole durch eine weitere Hydroxylgruppe an Ring C. Diese Strukturmerkmale sind maßgeblich für das antioxidative Potential dieser Flavonoide verantwortlich (Bors und Michel, 2002). Nach der Abgabe eines H-Atoms sind sie durch das konjugierte π -Elektronen-System des Ringsystems in der Lage, Elektronen zu delokalisieren und somit radikalische Verbindungen durch die Abgabe eines ungepaarten Elektrons zu neutralisieren. Weiter können polyphenolische Verbindungen mit Metallionen reagieren. Es entstehen Chelatkomplexe, welche jedoch durch Redoxcycling zu der prooxidativen Form der Metallionen und der chinoiden Form der Flavonoide weiterreagieren können (Rice-Evans, 2001). Die Reaktion des Flavonoid B-Rings zu einem Chinon ist in Abbildung 1.3 dargestellt.

Durch ihr Reduktionspotential vermindern Flavonoide nicht nur die Menge der reaktiven Verbindungen, sie können selbst reaktiv werden und in einem hohen Maße die Bildung von oxidativem Stress fördern (Wätjen, Chovolou et al., 2006). Werden reaktive Verbindungen in Zellen akkumuliert, so kann es zu einer Beeinflussung von Mechanismen und Signalen in der Zelle kommen, welche zu pathologischen Zuständen und letztendlich auch zum Zelltod führen können. Durch den Einfluss auf die Menge an reaktiven Verbindungen in der Zelle wirken Flavonoide sowohl direkt als auch indirekt auf bestimmte Zellfunktionen. Die flavonoidvermittelte Reduktion des intrazellulären Redoxstatus führt zu Veränderungen von Signalwegen.

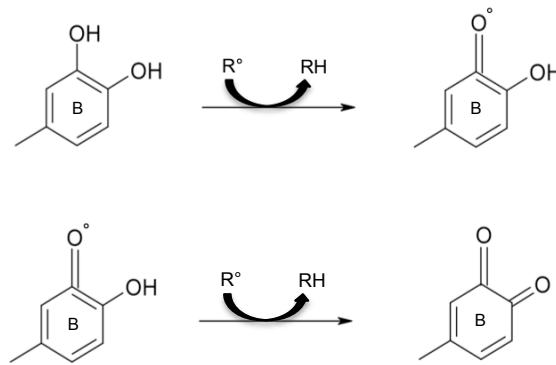


Abb. 1.3 Radikalreaktion des Flavonoid B-Rings

Durch die Aufnahme eines ungepaarten Elektrons und die Abgabe eines H-Atoms reagiert der Ring B zu einer Semichinonstruktur. Dieser Vorgang wiederholt sich mit einer weiteren radikalischen Verbindung und es entsteht ein Chinon.

1.1.2 Allgemeine Wirkweise von Flavonoiden

Nachdem der positive Einfluss bestimmter Nahrungsmittel, wie Rotwein, grüner Tee, Olivenöl (Masella, Vari et al., 2004) oder dunkler Schokolade (Fraga, Actis-Goretta et al., 2005), auf die Gesundheit durch *in vitro* Versuche nachgewiesen werden konnte, haben Flavonoide als Nahrungsergänzungsmittel hohe Beliebtheit erlangt. In epidemiologischen Studien konnte gezeigt werden, dass eine hohe Aufnahme von Flavonoiden mit der Nahrung einen protektiven Effekt bezüglich kardiovaskulärer Erkrankungen vermittelt (Arts und Hollman, 2005). Zudem belegen weitere epidemiologische Untersuchungen einen protektiven Einfluss von Flavonoiden auf Erkrankungen, die mit Entzündungsreaktionen einhergehen (Manthey, Grohmann et al., 2001) sowie eine inverse Korrelation zwischen Krebserkrankungen des Verdauungs- und des respiratorischen Trakts (Hertog, Feskens et al., 1994). Des Weiteren wurde die Wirkung von Flavonoiden auf die Entstehung von Lungen- und Prostatakrebs sowie chronische Erkrankungen wie Typ 2 Diabetes untersucht und ein schützender Effekt vermutet (Knekt, Kumpulainen et al., 2002).

In Untersuchungen *in vitro* und *in vivo* konnten einige der Mechanismen, welche für den positiven Einfluss der Flavonoide verantwortlich sind, nachgewiesen werden. Es konnte gezeigt werden, dass Flavonoide einen Einfluss auf intrazelluläre Glutathionmengen und die Induktion Glutathion-regulierender Enzyme besitzen (Masella, Di Benedetto et al., 2005; Masella, Vari et al., 2004) In Ratten wurde der positive Einfluss von Flavonoiden auf die Erhaltung von Organfunktionen nach operativen Eingriffen festgestellt, dabei verminderte sich die Menge an oxidativem Stress gemessen an der

Menge an Plasma-Malondialdehyd im Vergleich zu nicht supplementierten Tieren (Van Hoorn, Nijveldt et al., 2006).

Polyphenole besitzen einen Einfluss auf die Funktionen des endokrinen Systems, wie auf Steroidrezeptoren (Maggiolini, Recchia et al., 2005; Monteiro, Faria et al., 2008). Weiter konnte ein protektiver Effekt gegenüber Genotoxizität gefunden werden (Najafzadeh, Reynolds et al., 2009; Snyder und Gillies, 2003). Untersuchungen des Einflusses von Flavonoiden auf die Expression DNA-Reparatur-vermittelnder Gene zeigten eine negative Korrelation zwischen Flavonoidaufnahme und Induktion dieser Gene (Guarrera, Sacerdote et al., 2007). Im Gegensatz zu den zuvor gefundenen protektiven Eigenschaften zeigten (Kulling und Metzler, 1997) eine isoflavonoid-vermittelte Genotoxizität in V79 Nagerzellen.

Die Wirkweise von Flavonoiden ist stark von der Konzentration abhängig. In geringen Konzentrationen schützen sie die Zelle vor Stresszuständen oder Zelltod, in höheren Konzentrationen können sie schädigend wirken (Matsuo, Sasaki et al., 2005; Tsuji und Walle, 2008). Dabei ist der potentiell prooxidative Charakter dieser Verbindungen und die Erzeugung von oxidativem Stress ausschlaggebend.

Flavonoide vermitteln in niedrigen Konzentrationen auch vielfältige Wirkungen auf die Signaltransduktion, u.a. auf Rezeptoren (Puppala, Gairola et al., 2007) und Kinasen (Yao, Zhang et al., 2008); sie beeinflussen unter anderem zelluläre Transportvorgänge (ABC-Transporter, Glucosetransporter) (Brand, Padilla et al., 2010; Kwon, Eck et al., 2007) und können die Aktivität von Phase I und Phase II Enzymen verändern (Moon, Wang et al., 2006; Nikolic und Van Breemen, 2004).

Die Induktion von Phase II Enzymen durch die Aktivierung des Antioxidantien responsiven Elements (ARE) wurde für Grüntee Polyphenole sowohl *in vitro* (Xu, Li et al., 2005), in der Maus (Patel und Maru, 2008; Yuan, Li et al., 2008) als auch in *C.elegans* (Zhang, Jie et al., 2009) beschrieben. Neben Phase-II Enzymen können auch andere fremdstoffmetabolisierende Enzyme, wie die Hämoxygenase 1 (HO-1) oder die NADPH-Oxidochinon-Reduktase 1 (NQO 1), durch Flavonoide reguliert werden (Abate, Yang et al., 2005; Andreadi, Howells et al., 2006; Lee-Hilz, Boerboom et al., 2006).

Nicht nur auf den ARE-Signalweg ist ein regulierender Einfluss von Flavonoiden beschrieben worden. Der Arylhydrokarbon-Rezeptor (AhR) kann ebenfalls durch Flavonoide aktiviert (Ciolino, Daschner et al., 1999) oder reprimiert werden (Murray, Yang et al., 2006)

Da die antioxidative Eigenschaft von Flavonoiden und die daraus resultierende Änderung des Redoxstatus für den Einfluss auf unterschiedliche Signalwege und Zellfunktionen verantwortlich gemacht wird, sollen im Folgenden die Ereignisse, welche zu oxidativem Stress führen, näher erläutert werden.

1.2 Flavonoide und Oxidativer Stress

1.2.1 ROS und oxidativer Stress

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) werden in allen aeroben Organismen bei der Reduktion von Sauerstoff zu Wasser im Zuge der Energiegewinnung produziert (Fridovich, 1978). Bei diesem mehrstufigen Prozess finden Ein-Elektronen-Übergänge statt, die reaktive Zwischenverbindungen erzeugen können. Eine der Hauptquellen von reaktiven Sauerstoffspezies ist die Atmungskette in den Mitochondrien. Während der Glykolyse und dem Citratzyklus werden energiereiche Moleküle, wie FADH_2 und NADH , die jeweils ein Elektronenpaar mit einem hohen Übertragungspotential besitzen, gebildet. Die Elektronen werden sukzessive über verschiedene Elektronencarrier auf molekularen Sauerstoff übertragen.

ROS entstehen vor allem am Atmungsketten-Komplex III, dem Ubichinon-Cytochrom-c-Reduktase-Komplex. Die Elektronen der NADH-Q-Reduktase-Untereinheit werden auf Ubichinon übertragen. Das reduzierte Ubichinon, Ubichinol (QH_2), überträgt sukzessive die Elektronen auf Cytochrom c. Bei dieser Reaktion können durch Ein-Elektronen-Übertragungen Superoxidradikalanionen entstehen. Die Menge der Radikale ist dabei abhängig von der Stoffwechselrate und der Sauerstoffkonzentration (Finkel und Holbrook, 2000).

Das Superoxidradikalanion ist reaktiv, weshalb es leicht durch die Aufnahme von Wasserstoff zu dem stabileren Wasserstoffperoxid (H_2O_2) reagiert. Wasserstoffperoxid besitzt oxidierende Eigenschaften und reagiert mit Metallionen zu Hydroxylradikalen (Fenton-/Haber-Weiss-Reaktion, Abb. 1.4). Die ebenfalls sehr reaktiven Hydroxylradikale können in einem finalen Schritt durch die Aufnahme eines Elektrons und Abgabe eines Protons zu Wasser reduziert werden.

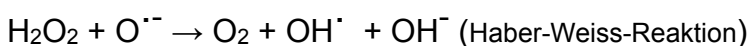
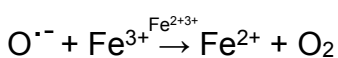


Abb.1.4: Reaktion von ROS (Fenton/Haber-Weiss-Reaktion)

Neben den Enzymen der mitochondrialen Atmungskette gibt es noch weitere Enzyme, welche die Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies bewirken.

Die Superfamilie der Cytochrom-P450-Oxidasen katalysiert die Oxidation von vielen Fremdstoffen, wobei NADPH als Reduktionsäquivalent verbraucht wird (Bondy und Naderi, 1994). Dabei werden häufig aktive oxidierte Verbindungen gebildet, die ihrerseits dann die Bildung von ROS fördern. In den Peroxisomen entsteht H_2O_2 und auch die Übertragung von Elektronen und Protonen auf Sauerstoff durch die Aktivierung der Acetyl-CoA-Oxidase gehört zu den ROS generierenden Prozessen (Keller, Dreyer et al., 1993). ROS entstehen aber nicht nur als schädliche Nebenprodukte des Metabolismus, sondern werden auch für physiologische Funktionen gebraucht. Bei der unspezifischen Immunabwehr werden ROS von den Phagozyten gebildet (Forman und Torres, 2002; Forman, Torres et al., 2002; Kaul und Forman, 1996). Die durch die NADPH-Oxidase innerhalb des *respiratory burst* gebildeten ROS, sind essentiell für die bakterizide Wirkung der Phagozyten. Weiterhin übernehmen sie in physiologischen Konzentrationen die Rolle von Signalmediatoren in verschiedenen Signaltransduktionswegen oder Modulatoren der Genexpression (Allen und Tresini, 2000; Forman und Torres, 2001; Luepertz, Chovolou et al., 2008).

Eine schädliche Wirkung entwickeln ROS nur, wenn das physiologische Gleichgewicht zwischen der Generierung von ROS und dessen Abbau zugunsten der reaktiven Verbindungen verschoben wird und die Zelle in oxidativen Stress gerät (Sies, 1997). ROS entstehen nicht nur endogen, sondern auch durch exogene Strahlungen, Hitze oder Chemikalien. Zu den Chemikalien zählen auch Chemotherapeutika. Durch den Metabolismus entstehen aus ihnen reaktive elektrophile Verbindungen, welche sowohl ROS generieren können als auch selbst radikalische Reaktionen eingehen können (Valko, Rhodes et al., 2006).

1.2.2 Oxidative Schädigung biologischer Systeme

ROS können biologische Systeme auf unterschiedliche Art schädigen. Sie sind an unspezifischen Reaktionen mit Molekülen der Zelle, z. B. DNA, RNA, Proteinen und Lipiden, beteiligt. Dabei entziehen Sauerstoffradikale den zelleigenen Molekülen ein Elektron, um das mit einem Elektron besetzte Orbital zu füllen und übertragen so den Radikalcharakter auf die Reaktionsprodukte. Durch die Reaktion mit Nukleinsäuren können durch Einzelstrangbrüche oder Modifikationen der DNA-Basen, Mutationen im Genom oder Chromosomenaberrationen hervorgerufen werden (Burkhardt, Reiter et al., 2001; Dizdaroglu, 1992; Halliwell und Dizdaroglu, 1992). Bei der Interaktion von

ROS mit Proteinen wird das aktive Zentrum von Enzymen verändert oder zerstört, was zum Funktionsverlust des Proteins führt. Die Peroxidation von Phospholipiden stellt eine weitere Möglichkeit der Reaktion dar. Sie kann zur Deformation von Membranen oder zum Verlust der Kompartimentierung führen (Davies, 1995; Girotti, 1998). Die entstandenen reaktiven Oxidationsprodukte können ihrerseits wieder mit zelleigenen Molekülen reagieren und eine Kettenreaktion initiieren, die zu einer massiven Schädigung der Zelle und schließlich auch zum Zelltod führen kann.

Auch die Aktivierung von Signalkaskaden kann neben den protektiven Wirkungen schädliche Effekte, wie chronische Inflammationen oder Krebs, zur Folge haben. Dabei werden häufig die redoxsensitiven Transkriptionsfaktoren NF κ B (*nuclear factor κ B*) und AP-1 (*activator protein-1*) für diese pathologischen Bedingungen verantwortlich gemacht (Surh, Kundu et al., 2005; Wong, Bray et al., 2009) da sie die Ausschüttung von Entzündungsmediatoren initiieren.

Um sich vor den Auswirkungen massiver oxidativer Schäden zu schützen, bedient sich die Zelle enzymatischer und nicht-enzymatischer Schutzmechanismen, wie sie im Folgenden aufgeführt sind.

1.2.3 Zelluläre Schutzmechanismen

Zum Schutz vor der Akkumulation von ROS und dem daraus resultierenden oxidativen Stress existieren in der Zelle zwei unterschiedliche Arten von Schutzsystemen. Durch die Induktion von Enzymen, die der Konjugation von reaktiven hydrophilen Verbindungen dienen (Phase II) und durch den Einsatz von nicht-enzymatischen Antioxidantien wird ein Ungleichgewicht des Redoxstatus der Zelle verhindert. Neben antioxidativen Enzymen wie den Superoxiddismutasen, welche das Superoxid-anionradikal zu H₂O₂ und Sauerstoff diproportioniert oder der Katalase, die das generierte H₂O₂ zu Sauerstoff und Wasser umsetzt und der Glutathionperoxidase, welche H₂O₂ oder Peroxide (ROOH), unter Verwendung von Glutathion als Kofaktor, reduziert, sind Enzyme, die Konjugationsreaktionen katalysieren von essentieller Bedeutung. In Phase II Reaktionen werden durch die Konjugation von polaren Resten an reaktive Verbindungen hydrophile und gut ausscheidbare Verbindungen erzeugt. Zu den Phase-II-Enzymen gehören die Glutathion-S-Transferasen (GSTs), die UDP-Glucuronyltransferasen (UGTs), die Sulfotransferasen (SULTs) oder die N-Acetyltransferasen (NATs). Neben den Enzymen des Phase-II-Metabolismus werden reaktive Verbindungen noch durch andere Enzyme neutralisiert, welche das Substrat nicht durch Konjugation detoxifizieren und deshalb nicht zu den Phase-II Enzymen

gezählt werden. Zu diesen Enzymen gehören die Hämoxxygenase-1 (HO-1) oder NAD (P)H-Chinon-Oxidoreduktase (NQO 1). Neben den enzymatischen Schutzmechanismen gibt es noch die nicht-enzymatischen zellulären antioxidativen Verbindungen, wie Glutathion und Thioredoxin sowie Antioxidantien, welche mit der Nahrung aufgenommen werden, wie Vitamin C oder Vitamin E (Valko, Leibfritz et al., 2007). Weitere chemische Verbindungen mit antioxidativem Potential wie Bilirubin, Harnsäure, Steroide und Ubichinone dienen ebenfalls als Schutz vor oxidativem Stress. Die Detoxifizierungsenzyme HO-1, NQO 1 und GST werden im nächsten Abschnitt näher erläutert.

1.2.3.1 Hämoxxygenase-1 (HO-1)

Die HO-1 katalysiert den Abbau von Häm zu äquimolaren Mengen Biliverdin, Kohlenmonoxid und Eisen in der folgenden Form (Farombi und Surh, 2006):



Der Abbau von Häm ist essentieller Bestandteil des Schutzes vor oxidativem Stress. Durch die Freisetzung von Biliverdin und nachfolgend Bilirubin sowie die Freisetzung von Kohlenmonoxid wird die Zelle vor ROS geschützt (Sikorski, Hock et al., 2004). Bei dem Abbau des Häms entsteht allerdings auch Fe^{2+} , welches in geringen Mengen schon zytotoxische Effekte zeigt. Dieses Eisen wird von Ferritin abgefangen und neutralisiert. Wird die HO-1 induziert, steigt auch die Menge an Ferritin in der Zelle (Farombi und Surh, 2006). Es sind zwei Isoformen beim Menschen bekannt.

HO-1 wird ubiquitär in den Mikrosomen und dem endoplasmatischen Retikulum exprimiert und kann durch Häm, Porphyrine oder Übergangsmetalle, durch tert-Butylhydrochinon (tBHQ) (Keum, Han et al., 2006; Li, Zhong et al., 2007; Rushmore und Kong, 2002) oder auch Naturstoffe wie das in Kreuzblütlern vorkommende Sulforaphan oder Flavonoide (Chen, Jeng et al., 2006; Xu, Li et al., 2005; Yao, Nussler et al., 2007) induziert werden. In seiner 5'-*untranslated region* (UTR) wurden mehrere regulatorische Konsensus-Sequenzen entdeckt, darunter metallresponsive- und antioxidantresponsive Elemente sowie Bindestellen für das *activator protein 1* (AP-1) und andere regulatorische Proteine (Camhi, Alam et al., 1998; Elbirt und Bonkovsky, 1999).

Die Hämoxxygenase 2 (HO-2) ist hauptsächlich im Gehirn und in den Testes konstitutiv exprimiert und nicht induzierbar (Shibahara, Han et al., 2007). Allerdings führt eine Nullmutation der HO-2 in Astrozyten und auch *in vivo* bei Mäusen zu einer erhöhten

Sensitivität gegenüber Hemin oder oxidativem Stress (Chen und Regan, 2004; Shibahara, Han et al., 2007).

Die Induktion der HO-1 verläuft über die Aktivierung des Transkriptionsfaktors Nrf2. Die Initiierung dieses Nrf2 vermittelten Signalwegs kann über unterschiedliche Kaskaden verlaufen. Neben der Nrf2-vermittelten Induktion der HO-1 durch tBHQ ist auch bekannt, dass die HO-1 durch ein weiteres regulatorisches Protein in seiner Transkription inhibiert wird. Das reprimierende Protein *BTB and CNC homology 1* (Bach 1) reguliert die Transkription ähnlich wie Nrf2. Es bindet mehrere ARE Motive in einem Komplex mit Maf-Proteinen und inhibiert die HO-1 Transkription (Igarashi und Sun, 2006). Die Repression durch Bach 1 findet nicht bei allen durch Nrf2 regulierten Genen statt. Zudem muss die Bindung von Bach 1 an die DNA über mehrere transkriptionsverstärkende Elemente (*enhancer*) stattfinden, um die Transkription zu reprimieren. Für eine Repression ist es nicht ausreichend, im Gegensatz zu der Regulation durch Nrf2, wenn einzelne Elemente erkannt und gebunden werden. Die Inhibition der HO-1 Transkription kann durch Hemin oder Arsenit wiederum reprimiert werden (Reichard, Motz et al., 2007; Reichard, Sartor et al., 2008; Sun, Brand et al., 2004; Zenke-Kawasaki, Dohi et al., 2007). Die Arbeitsgruppe von Reichard et al. (2008) geht davon aus, dass es unter physiologischen Bedingungen eine geringe Menge Nrf2 im Nukleus gibt, die aber nicht ausreicht, um die Transkription der HO-1 zu induzieren. Bach 1 muss erst durch seine Inhibitoren (Hemin, Arsenit) gebunden werden, damit Nrf2 mehrere ARE Elemente binden kann. Durch die Stabilisierung von Nrf2 kann zwar die Menge an Nrf2 im Nukleus gesteigert werden, jedoch ist die Affinität von Bach 1 zu den regulierenden DNA Elementen stärker und es muss zusätzlich inaktiviert werden. Hemin bindet Bach 1 an C-terminalen Cystein-Prolin reiche Motive (CP-Motiven), wodurch sich die Konformation der *bzip*-Domäne ändert, welche für die Bindung an die DNA essentiell ist. Bach 1 löst sich von der Bindestelle und ermöglicht Nrf2 die Bindung. Bach 1 wird dabei nur von Verbindungen inhibiert, welche Eisen chelatieren. Protoporphyrine sind nicht in der Lage, Bach 1 zu inhibieren (Ogawa, Sun et al., 2001). Ist Bach 1 inaktiviert, kann Nrf2 das responsive Element binden und die Transkription der HO-1 induzieren.

1.2.3.2 NADPH-Chinon-oxidoreduktase 1

Ein weiteres Enzym zum Schutz vor oxidativem Stress ist die NQO 1. Die NQO 1, welche reaktive Chinone und auch lipophile Antioxidantien in einer Ein-Schritt 2e-Übertragung reduziert, stabilisiert zudem p53 und nimmt somit auch Einfluss auf die

Proliferation einer geschädigten Zelle (Nioi und Hayes, 2004). Bei oxidativem Stress wird die NQO 1 über die Aktivierung des ARE in der Promotorregion des NQO 1-Gens induziert. Die NQO 1 wird nach klassischer Definition zu den Phase-I Enzymen gezählt, da sie ihre Substrate nicht konjugiert und wie andere Oxidasen, Hydrolasen und Reduktasen, eine funktionelle Gruppe einführt. Da die funktionelle Gruppe jedoch nicht bei inerten lipophilen Verbindungen angefügt wird, zeigt sich in der Literatur auch die Zuordnung zu den Phase-II Enzymen (Nioi und Hayes, 2004). Im Menschen existiert neben der NQO 1 noch die zytosolische NRH (Dihyronicotinamid-ribosid-abhängige) Oxidoreduktase (NQO2). Die NQO2 ist 43 Aminosäuren kürzer als die NQO 1. Beide Enzyme werden über 4 Genloci kodiert. Die NQO2 katalysiert 4e-Übertragungen effektiver als die NQO 1 und ist resistenter gegenüber Inhibitoren der NQO 1. Zu den Inhibitoren der NQO2 zählen neben Benzo(a)pyren auch Flavone, wie Quercetin (Long und Jaiswal, 2000). Des Weiteren überlappen die Substratspezifitäten der beiden Enzyme weitestgehend, nur die Affinitäten zu diesen Substraten variieren (Jaiswal, 2000). Die NQO2 besitzt wie die NQO 1 in ihrer Promotorregion unterschiedliche responsive Elemente. Darunter AREs wie auch *xenobiotic response elements* (XRE). Auch die NQO2 kann über Nrf2 reguliert werden und lässt sich durch tBHQ induzieren (Wang und Jaiswal, 2006). Zu den Naturstoffen, welche die NQO 1 induzieren, gehören Anthocyanine (Shih, Yeh et al., 2007), Quercetin (Tanigawa, Fujii et al., 2007) und Isoorientin (Luteolin-6-C-beta-D-Glukosid) (Lim, Park et al., 2007).

1.2.3.3 Glutathion-S-Transferasen (GST)

Die Glutathion-S-Transferasen (GST) katalysieren die Konjugation von Glutathion an oxidierte Makromoleküle. Die entstehenden Konjugate sind weniger reaktiv und hydrophiler als die oxidierten Ausgangsverbindungen und können über Membrantransporter aus der Zelle ausgeschleust werden (Hayes und McLellan, 1999; Ishikawa, 1992). Die Konjugation an Glutathion ist eine der wichtigsten Detoxifizierungsreaktionen gegen exogene und endogene Elektrophile. Die Superfamilien der GSTs werden in zwei Supergenfamilien unterteilt, die grosse zytosolisch exprimierte Superfamilie und die Superfamilie der membrangebundenen GSTs (Strange, Spiteri et al., 2001). Die zytosolische Superfamilie der GSTs stellt etwa 5 % des gesamten Leberproteingehaltes (Wilce und Parker, 1994). Die lösliche Superfamilie der GSTs kann in weitere 8 Klassen unterteilt werden. Die Unterklassen unterscheiden sich sowohl in ihren Substraten als auch in bis zu 40 % ihrer Aminosäuresequenz. Sie sind dimere Enzyme mit je einer Bindungsstelle für das

Glutathion und einer Bindungsstelle für das Substrat. Alle GSTs sind induzierbar. Für einige Gruppen von GSTs konnte die Induktion über die Aktivierung von Nrf2 nachgewiesen werden (Zhang, Munday et al., 2006). Zu ihnen zählen vornehmlich die GSTs der α -Familie aber auch der μ - und π -Familie (Kusano, Horie et al., 2008; McMahon, Itoh et al., 2001; Zhang, Lu et al., 2006). Es ist allerdings auch möglich die GSTs über andere Signalwege wie den Arylhydrokarbon-Rezeptor-vermittelten Signalweg zu induzieren (Dewa, Nishimura et al., 2008). In Untersuchungen *in vivo* konnte die Induktion der GST durch eine Nullmutation des Nrf2 Inhibitors Keap I auf die vermehrte Nrf2 Aktivierung zurückgeführt werden (Reisman, Yeager et al., 2009). Durch die hohe Homologie und Konservierung der GSTs konnte die Regulation der Expression gut in Nagern untersucht werden (Wasserman und Fahl, 1997). Allerdings ist der genaue Verlauf der Induktion durch die hohe Homologie der GST-Familien schwer darzustellen. Durch die Redundanz sind einzelne Vertreter in der Lage bei einem Ausfall einer bestimmten Isoform die Metabolisierung der Substrate zu übernehmen. Die Induktion der GST durch Antioxidantien konnte für tBHQ wie auch für 2'-Amino-3'-Methoxyflavon (Kang, Park et al., 2003; Nguyen, Sherratt et al., 2003) und für bestimmte Naturstoffe wie Sulforaphan (Zhang, Munday et al., 2006) gezeigt werden.

1.3 Flavonoide und Signaltransduktion

1.3.1 Wirkung von Flavonoiden auf Kinasen

Bei der Aktivierung von zellulären Schutzmechanismen bedient sich die Zelle verschiedener Signalwege, die über Proliferation, Migration, Differenzierung und Zelltod bestimmen. Naturstoffe, wie Flavonoide, können nicht nur indirekt durch ihr antioxidatives Potential wirken, indem sie den intrazellulären Redox-Status modifizieren, sondern selbst auch mit Proteinen dieser Signalkaskaden interagieren und so direkt die zelluläre Antwort auf äußere Einflüsse modulieren (Kampa, Nifli et al., 2007). Im Folgenden werden die bekanntesten Signalwege, welche von Flavonoiden beeinflusst werden, dargestellt. Zu ihnen zählen die Modulation der MAPKinase-Kaskaden wie auch die Regulation von redoxsensitiven Transkriptionsfaktoren. Im Besonderen wird auf die Aktivierung des in dieser Arbeit untersuchten Nrf2-ARE-Signalwegs eingegangen (Abschnitt 1.4).

1.3.2 Kinase Kaskaden

Mitogen-aktivierte Kinasen (MAPK) gehören zu der Familie der Serin/Threonin spezifischen Kinasen. Sie selbst werden nur aktiv, wenn sie an einem Tyrosin-Rest und an einem Threonin-Rest phosphoryliert werden. Diese Phosphorylierung wird von einer übergeordneten Kinase, der MAPK Kinase, welche für beide Reste eine Doppelspezifität besitzt, bewerkstelligt. Die MAPK Kinase wird ihrerseits wieder durch eine übergeordnete Kinase phosphoryliert und aktiviert. Die MAPKK Kinase erfährt eine Aktivierung über Rezeptor-Tyrosin-Kinasen, welche durch vielfältige exogene Stimuli aktiviert werden (Strnisková, Barancík et al., 2002). Nicht nur die namensgebenden Wachstumsfaktoren (Mitogene), auch stressauslösende Faktoren, wie UV-Strahlung, oxidativer Stress oder Chemotherapeutika, können diese Signalwege aktivieren (McCubrey, Lahair et al., 2006). Die MAPKinase-Familie lässt sich in drei Gruppen unterteilen, die extrazellulär regulierten Kinasen (ERK), die p38 Kinasen und die c-Jun-N-terminalen Kinasen (JNK). Alle MAPKinase Kaskaden können durch Flavonoide modifiziert werden.

Die ERK Kaskade stellt eine wichtige Regulation der Proliferation dar. ERK kann proapoptotische Proteine durch Phosphorylierung inhibieren und so die Proliferation regulieren. Auf Grund der meist proliferativen Wirkung wird die ERK oft als Indikator für eine antiapoptotische oder protektive Signaltransduktion verantwortlich gemacht. Allerdings sind für die ERK auch proapoptotische Wirkungen beschrieben worden (Lee, Kim et al., 2006). Die übergeordnete MAPKinase von ERK wird nicht nur über die für diesen Signalweg beschriebene MAPKKKinase Raf reguliert, sie kann auch durch MAPKKKinasen anderer Signalwege beeinflusst werden (Strnisková, Barancík et al., 2002). Flavonoide können die meist protektiven Eigenschaften durch die gewebespezifische Aktivierung (Wruck, Claussen et al., 2007) oder Inaktivierung der ERK (Shih, Wu et al., 2009) vermitteln. In respiratorischen Epithelzellen inhibierten die Flavone Apigenin und Luteolin den ERK-, JNK- und den p38-Signalweg und konnten so eine Expression von inflammatorischen Proteinen verhindern (Chen, Chow et al., 2004). Durch eine Aktivierung der ERK kann jedoch auch ein apoptotischer Stimulus weitergegeben werden. Die Arbeitsgruppe von (Hung, 2007) zeigte, dass eine Aktivierung der ERK mit einer Inhibition des Zellwachstums in A549 Lungenkarzinomzellen einhergeht. Das Flavonol Kaempferol kann den ERK-Signalweg inhibieren und löst in humanen Glioma Zellen eine erhöhte Apoptoserate aus (Jeong, Kim et al., 2009). Die angeführten Daten zeigen deutlich die sehr divergierende Wirkung der einzelnen Flavonoide auf die Signaltransduktion. Auch die p38 Kinase wird

durch unterschiedlichste Stimuli aktiviert. Neben Wachstumsfaktoren wird sie durch zellulären Stress, wie UV-Strahlung, Lipopolysaccharide, proinflammatorische Zytokine oder Hitzestress, aktiviert. Die p38 Kinase wird im allgemeinen mit proapoptotischen und proinflammatorischen Prozessen in Verbindung gebracht (Katz, Amit et al., 2007). Die Wirkung von Polyphenolen auf den p38 Signalweg ist sehr unterschiedlich und abhängig von den Strukturcharakteristika der Verbindung, wie auch von der Art des Zielgewebes. Meist vermitteln Flavonoide antiinflammatorische Effekte, so dass eine Inhibition der p38 für Verbindungen wie Luteolin (Chen, Chow et al., 2004; Cheng, Hsieh et al., 2009; Wu, Wu et al., 2009), Quercetin und Kaempferol (Gutierrez-Venegas, Jimenez-Estrada et al., 2007; Kwon, Nam et al., 2009) beschrieben wurde. Auch die JNK ist in unterschiedliche physiologische Prozesse involviert. Nicht nur übergeordnete MAPKKinasen können JNK aktivieren, auch ERK ist als MAPKinase auch in der Lage mit JNK zu interagieren. Beide Kinasen können miteinander wechselwirken und sich gegenseitig phosphorylieren. Die Aktivierung ist also auch in diesem Signalweg von der Art des Stimulus abhängig (Zhang und Liu, 2002). Wie auch die Kinase p38 wird die JNK durch Flavonoide in vielen Fällen inhibiert (Kimata, Shichijo et al., 2000). Quercetin wie auch das Flavanol Epigallocatechin-Gallat vermitteln einen Schutz vor ROS in humanen epithelialen Zellen durch die Inhibition der Phosphorylierung der JNK (Choi, Jeong et al., 2005) und Fisetin konnte durch die Inhibition der JNK, UV-induzierten oxidativen Stress in humanen epithelialen Zellen des Auges verringern (Yao, Zhang et al., 2008).

Parallel zu den MAPKinase-Signalwegen verlaufen in der Zelle weitere Kinase-Kaskaden, die für die Regulation wichtiger Zellfunktionen verantwortlich sind, so wie der PI3K (Phosphoinositid-3-Kinase)/Akt-Signalweg oder der PKC (Protein kinase C)-Signalweg. Beide Signalwege können die Proliferation regulieren. Die PI3K gehört zu den Lipidkinasen und wird durch Signale wie Insulin oder moderate Mengen ROS aktiviert (Gopalakrishna und Jaken, 2000). Durch die sukzessive Übertragung des Signals auf mehrere Proteine wird in diesem Signalweg die Akt-Kinase aktiviert oder inaktiviert. Die Akt-Kinase reguliert unterschiedliche Prozesse, Moleküle und Transkriptionsfaktoren.

Die PKC reguliert wiederum die Proliferation und ist in verschiedene weitere Signalkaskaden involviert. Jeder der beschriebenen Signalwege kann durch Flavonoide beeinflusst werden. Für die zelluläre Antwort auf verschiedene Stresszustände, wie oxidativen oder chemisch-induzierten Stress, wird hauptsächlich die Aktivierung des ARE (*antioxidant responsive element*) für die Induktion von Phase-II Enzymen und die

durch diese Induktion vermittelten protektiven Effekte verantwortlich gemacht (Andreadi, Howells et al., 2006). Im folgenden wird dieser Signalweg näher beschrieben. Der Nrf2/ARE Signalweg kann durch unterschiedliche Stimuli wie oxidativen oder chemisch induzierten Stress (Itoh, Tong et al., 2004; Xu, Hellerbrand et al., 2008) und auch durch verschiedene andere Signalkaskaden aktiviert werden (Keum, 2006). Ziel der Aktivierung dieses Weges ist die Wiederherstellung eines physiologischen Gleichgewichtes nach der Anhäufung von reaktiven Verbindungen durch die vermehrte Expression von antioxidativen und fremdstoffmetabolisierenden Enzymen der Phase II (Osburn und Kensler, 2008).

1.4 Flavonoide und *Nuclear factor erythroid related factor 2 (Nrf2)*

1.4.1 Allgemeiner Verlauf der Nrf2 Aktivierung

Der redox-sensitive Transkriptionsfaktor Nrf2 gehört zu der Gruppe der *cap'n'collar basic-leucine zipper* Transkriptionsfaktoren und wurde zuerst bei der Untersuchung des Betaglobin-Gens entdeckt (Moi, Chan et al., 1994). Später wurden neben Nrf2 auch noch die Isoformen Nrf1 und Nrf3 entdeckt. Nrf1 und Nrf2 entstanden vermutlich aus demselben Gen, weisen jedoch erhebliche Unterschiede auf (Chan, Cheung et al., 1995). Nrf3 hat im Gegensatz zu Nrf2 eine reprimierende Wirkung auf die Expression von Phase-II- und antioxidativen Enzymen (Sankaranarayanan und Jaiswal, 2004).

1.4.2 *ECH-kelch-like-activator-protein1 (Keap I)*

Nrf2 ist ein redoxsensitiver Transkriptionsfaktor, der unter basalen Bedingungen an einen Inhibitor (Keap I) gebunden im Zytosol vorliegt.

Der Inhibitor Keap I ist nicht nur für die Sequestrierung von Nrf2 im Zytosol verantwortlich, ihm wird auch ein Einfluss bei der Degradation von Nrf2 zugesprochen (Buckley, Marshall et al., 2003; Giudice und Montella, 2006; Kobayashi, Kang et al., 2006). Keap I bindet über seine *broad complex-TramTrack-Bric a Brac* (BTB) Domäne einen zur Ubiquitinierung nötigen Cullin (Cul3) Ligasekomplex. Im Normzustand der Zelle bindet Keap I Nrf2 und ist in der Lage den Transkriptionsfaktor zu ubiquitinieren. Abbildungen 1.4 und 1.5 zeigen die Bindung des Inhibitors Keap I an Nrf2 im Zytosol. In einigen Studien wird postuliert, dass Keap I als Dimer über eine BTB Domäne im Zytosol an das Aktin-Zytoskelett gebunden vorliegt (McMahon, Thomas et al., 2006).

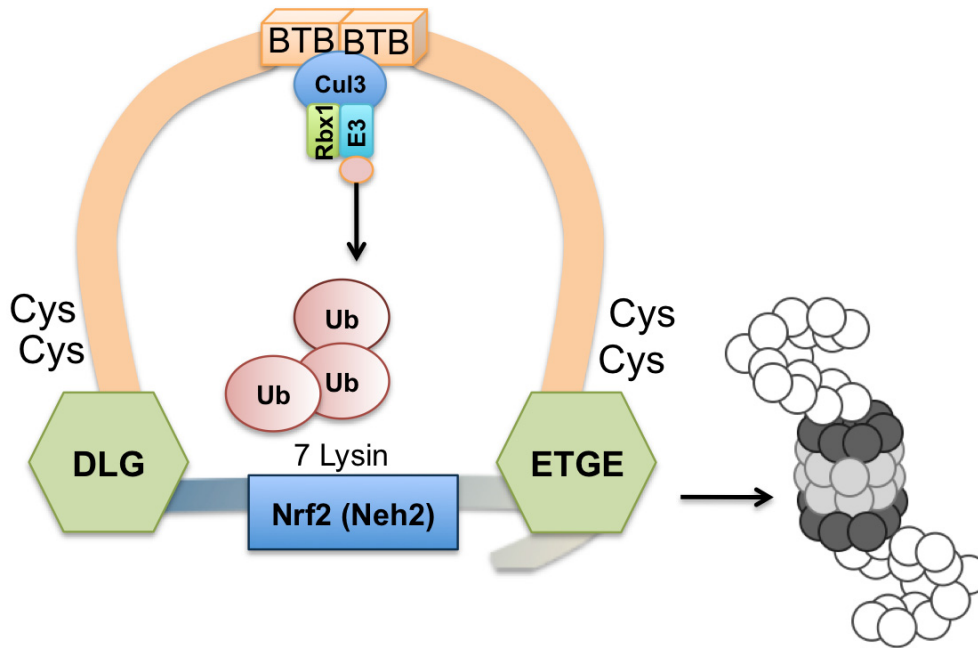


Abb.1.4: Schematische Darstellung des Nrf2/Keap I Komplexes
(modifiziert nach Tong et al., 2006)

Der Repressor Keap I ist ein Homodimer aus zwei cysteinreichen Bereichen, welche an der N-terminalen Seite durch zwei BTB Bindedomänen verbunden sind. An die BTB-Domänen ist der Cul3-E3-Ligase Komplex bestehend aus E3-Ligase, Rbx1 und Cul3 gelagert. Dieser Komplex ist für die korrekte Ubiquitinierung von Nrf2 verantwortlich. Keap I bindet über seine DGR-Bindestellen (*double glycine-repeats*) das Bindemotiv Neh2 des Transkriptionsfaktors Nrf2 an zwei Positionen. Über das DLG-Motiv und das ETGE-Motiv wird Nrf2 in die richtige Position zur Ubiquitinierung gebracht. An den zwischen beiden Bindemotiven gelagerten Lysinresten kann Nrf2 ubiquitiniert werden und wird anschließend durch das Proteasom abgebaut. Wird die Verbindung von Nrf2 und Keap I durch Modifikation an den Keap I-Cysteinresten oder durch Phosphorylierung von Nrf2 in der Nähe der DLG Bindestelle gestört, löst sich Nrf2 am DLG Motiv und besitzt nicht mehr die richtige Position zur Ubiquitinierung. Nrf2 wird stabilisiert.

Ein Nrf2-Monomer ist dabei über zwei distinkte Keap I-Bindstellen in seiner *Nrf2-ECH-homology2* (Neh2) Domäne, das Asparaginsäure/Leucin/Glycin (DLG) Motiv und das Glutaminsäure/Threonin/Glycin/Glutaminsäure (ETGE) Motiv, mit Keap I verbunden.

Die beiden Motive binden an zwei doppelte Glycin Reste (DGR) des Keap I Proteins (McMahon, Thomas et al., 2006). Das ETGE Motiv bindet dabei Keap I mit hoher Affinität, wohingegen die Bindung zwischen DLG und Keap I niedrige Affinität besitzt. Die Bindung zwischen DLG Motiv und DGR ist allerdings dafür verantwortlich, dass bestimmte Lysinreste in der Nrf2 Neh2-Domäne, welche das Ziel für eine Ubiquitinierung durch Keap I sind, in der richtigen Position gehalten werden. Eine Polyubiquitinierung ist die Voraussetzung für eine nachfolgende proteasomale Degradation.

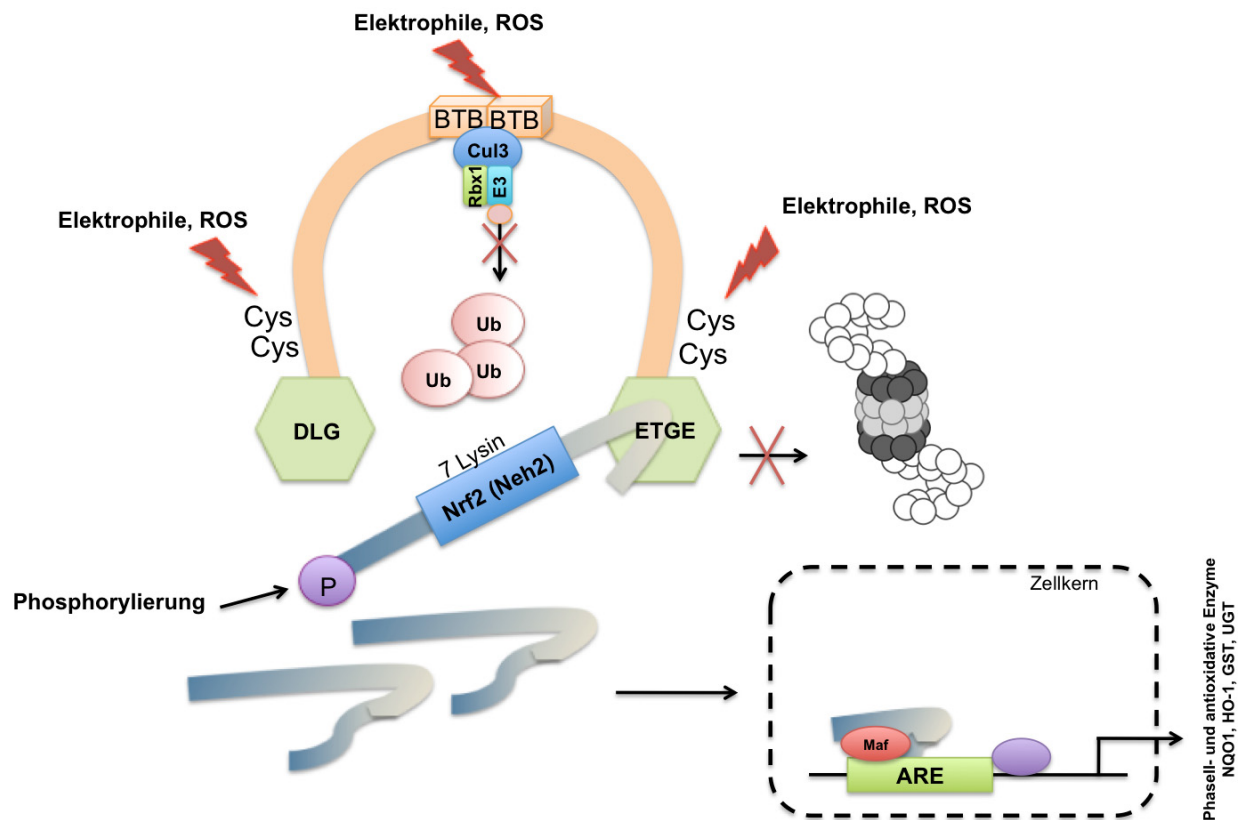


Abb.1.5: Schematische Darstellung der Nrf2/Keap I Dissoziation (modifiziert nach Tong et al., 2006)

Dargestellt ist der Repressor Keap I, der aus zwei cysteinreichen Untereinheiten besteht, welche durch eine BTB Domäne verbunden sind. Unterhalb der BTB-Domäne liegt der Ubiquitinierungskomplex. Dieser kann Nrf2 nur ubiquitinieren wenn Nrf2 über zwei Bindetellen (DLG & ETGE) an Keap I gebunden ist. Wird die Verbindung von Nrf2 und Keap I durch Modifikation an den Keap I-Cysteinresten oder durch Phosphorylierung von Nrf2 in der Nähe der DLG Bindestelle gestört, löst sich Nrf2 von diesem DLG Motiv und besitzt nicht mehr die richtige Position zur Ubiquitinierung. Nrf2 wird stabilisiert, gelangt in den Kern und kann die Transkription seiner Zielgene induzieren.

Abbildung 1.5 zeigt den möglichen Mechanismus der Dissoziation von Nrf2 und Keap I. Die wenig affine Verbindung der DLG Domäne von Nrf2 mit Keap I kann durch oxidativen Stress, Elektrophile oder Phosphorylierung gestört (Zhang und Hannink, 2003) werden, wobei Keap I durch das immer noch gebundene Nrf2 gesättigt ist und keine neuen Nrf2 Monomere binden und ubiquitinieren kann.

Neusynthetisiertes Nrf2 kann im Kern akkumulieren und die Expression fremdstoffmetabolisierender Enzyme induzieren (Tong, Katoh et al., 2006). Es wird angenommen, dass eine Phosphorylierung von Nrf2 essentiell für die Stabilisierung und Aktivierung dieses Transkriptionsfaktors ist.

Abbildung 1.6 zeigt unterschiedliche Möglichkeiten der Aktivierung von Nrf2. So kann der Nrf2-Keap I-Komplex zum Einen direkt durch Elektrophile aufgelöst werden, indem Keap I an spezifischen Cystein-Resten reduziert werden. Diese Elektrophile können durch den Metabolismus entstehen oder als elektrophile Verbindungen ohne metabolische Aktivierung direkt auf den Komplex einwirken.

Es konnte gezeigt werden, dass bestimmte Cystein-Reste das Ziel elektrophiler Substanzen sind (Dinkova-Kostova, Holtzclaw et al., 2002). Im Einzelnen konnte den Cystein-Resten Cys -151, -273 und -288 eine wichtige Rolle bei der Detektion von Veränderungen des Redoxstatus durch Keap I zugesprochen werden. Cys-151 scheint für die Aktivierung und Stabilisierung von Nrf2 durch eine reduzierte Degradation eine bedeutende Rolle zu spielen, Cys-273/-288 ist verantwortlich für die reprimierende Wirkung von Keap I (Zhang und Hannink, 2003; Zhang, Lo et al., 2004). Diese Hypothese wurde durch Versuche mit Induktoren des Phase II Metabolismus und mit unterschiedlichen Naturstoffen gestützt. Xanthohumol war wie verschiedene andere Induktoren (tBHQ, Arsenit) in der Lage, Cystein-Reste an Keap I zu modifizieren (Dietz, Kang et al., 2005; He und Ma, 2010).

Als ein anderer Mechanismus der Aktivierung konnte eine Phosphorylierung von Nrf2 und damit eine Dissoziation und Aktivierung durch MAPKinasen nachgewiesen werden. MAPKinasen werden durch ROS oder elektrophile Verbindungen aktiviert und phosphorylieren Nrf2. Eine direkte Phosphorylierung ist durch die Protein Kinase C (Bloom und Jaiswal, 2003), die extrazellulär regulierte Kinase 1 (ERK1) (Papaiahgari, Zhang et al., 2006) und die Protein Kinase R-ähnliche Endoplasmatisches Retikulum Kinase (PERK) (Cullinan, Zhang et al., 2003) gezeigt worden. Die Phosphorylierung hat die direkte Dissoziation von Nrf2 und Keap I zur Folge. Allerdings sind die Befunde zum Einfluss bestimmter MAPKinase-Signalwege kontrovers und scheinen in einem starken Maße vom Zelltypus oder Gewebe und von der Art des Induktors abzuhängen (Andreadi, Howells et al., 2006). In neueren Modellen wird versucht beide Aktivierungsmöglichkeiten miteinander zu verbinden (Kaspar, Niture et al., 2009; Niture, Jain et al., 2009).

In Abbildung 1.6 ist weiter dargestellt, dass Nrf2 an ein responsives DNA-Element bindet. Nrf2 bildet dabei einen Komplex mit weiteren bZIP-Proteinen wie Maf-, c-Jun, JunD oder c-Fos Proteinen. Nrf2 ist auch in der Lage, mit weiteren Nrf-Proteinen ein Dimer zu bilden. Dieser Komplex hat jedoch meist inhibierende Wirkung (Sankaranarayanan und Jaiswal, 2004). Für die durch Nrf2 induzierbaren Enzyme ist die Beteiligung unterschiedlicher Kofaktoren bei der Bindung des responsiven Elements beschrieben worden.

Das responsive Element wird auf Grund seiner Aktivierung durch elektrophile Verbindungen, die nicht zwingend radikalischen Charakter haben müssen und meist zu den Antioxidantien gehören, *antioxidant responsive element* (ARE) genannt.

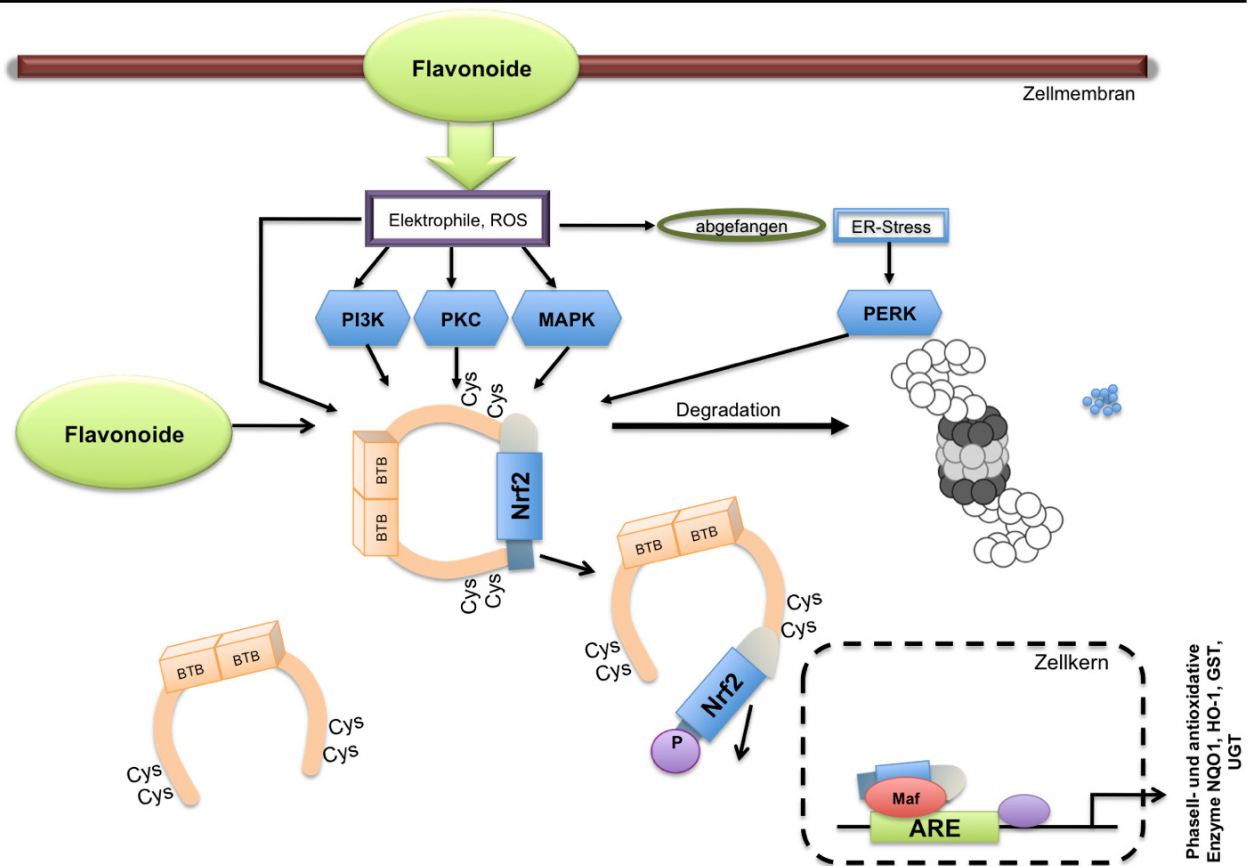


Abb.1.6: Schematische Darstellung des Nrf2- Signalwegs
(modifiziert nach Xu et al., 2005)

Dargestellt sind die möglichen Signalkaskaden, die zur Aktivierung von Nrf2 führen. Neben der direkten Interaktion von Elektrophilen mit dem Nrf2/Keap I Komplex können Elektrophile und Prooxidantien über die Aktivierung von Kinase-Kaskaden den Komplex durch Phosphorylierung von Nrf2 stören. Durch die Aktivierung von Nrf2 und dessen Translokation in den Kern kann die Expression von Phase-II-Enzymen und antioxidativen Enzymen induziert werden. Bleibt Nrf2 an Keap I gebunden, wird Nrf2 schnell durch das Proteasom degradiert. Die Degradation erfolgt langsamer wenn Nrf2 einmal aktiviert worden und in den Kern gelangt ist.

1.4.3 ARE

Das ARE ist eine Konsensus Sequenz in der 5' *untranslated region* (UTR) vieler fremdstoffmetabolisierender und antioxidativer Enzyme. Zu ihnen zählen die Familie der GSTs, UGTs, die HO-1, NQO 1 und die γ -Glutamylcysteiniligasen (GCL). Es konnte gezeigt werden, dass die GSTYa der Ratte transkriptionell durch die Bindung von Nrf2 an das ARE reguliert wird und durch planare, phenolische Antioxidantien, wie β -Naphthoflavon oder tBHQ, induziert werden kann. Dabei unterschied sich die Sequenz des AREs erheblich von der Sequenz der responsiven Elemente, die für die Induktion von CYP450 Oxygenasen verantwortlich sind (Rushmore und Pickett, 1990). Später konnte auch eine Induktion der humanen GST wie auch der NQO 1 durch H_2O_2 und elektrophile prooxidative Verbindungen nachgewiesen werden (Rushmore und Pickett, 1991). Somit stellt das ARE ein wichtiges Regulationselement dar, welches die zelluläre Antwort auf Veränderungen des Redox-Status steuert.

Das ARE ist in mehreren Repeats der Form 5'-GTGACNNNGC-3' in der Promotorregion dieser Gene vorhanden. Durch die Bindung eines Dimers aus dem Transkriptionsfaktor Nrf2 und anderer regulatorischer Proteine, wie Maf-Proteine oder AP-1, entsteht ein Transkriptom, welches die Expression dieser Enzyme induziert oder reprimiert (Favreau und Pickett, 1993).

Neben dem ARE gibt es in der Promotorregion dieser Enzyme meist noch andere responsive Elemente, die nicht durch Nrf2 reguliert werden. So sind in der 5'UTR der UGT1A-Familie neben AREs auch XREs (*xenobiotic responsive elements*) gefunden worden. XREs werden rezeptorvermittelt über den Arylhydrokarbon Rezeptor (AhR) reguliert. Enzyme wie die CYP450-Monooxygenasen, welche durch den AhR reguliert werden, sind in der Lage, neben Entgiftungsreaktionen, durch Ein-Elektronen-Übertragungen, auch reaktive Verbindungen zu erzeugen. Durch die Synthese von elektrophilen Verbindungen kann wiederum der Nrf2-ARE Signalweg aktiviert werden, um die Zelle vor potentiell reaktiven Verbindungen zu schützen.

1.4.4 Proteasomale Degradation

Zum Schutz vor den Folgen stressinduzierter Schäden bedient sich die Zelle unterschiedlicher Mechanismen. Sind durch diese Schäden veränderte oder nicht mehr funktionale Proteine entstanden, werden diese Proteine abgebaut. Über die UPR (*unfolded protein response*) werden fehlerhafte Proteine degradiert (Lord, Davey et al., 2000). Allerdings sind Kinasen der UPR (PERK) auch in der Lage, den Nrf2-Signalweg zu modifizieren (Cullinan, Zhang et al., 2003). Die Degradation erfolgt über das Ubiquitin-Proteasom-System. Dabei werden an die nicht funktionalen Proteine Ubiquitin-Reste kovalent in einer ATP-abhängigen Reaktion gebunden. Für die Anlagerung von Ubiquitin ist ein mehrstufiger enzymatischer Mechanismus verantwortlich. Zuerst wird Ubiquitin mit Hilfe des E1-Enzyms am carboxyterminalen Ende unter ATP-Verbrauch aktiviert. Es folgt der Transfer und die Konjugation mit den Zielproteinen durch das E2 Enzym (Ubiquitin konjugierendes Enzym) und der E3-Ligase. Sind die Zielproteine ubiquitiniert worden, können sie durch das 26S Proteasom erkannt und abgebaut werden (Mehlhase und Grune, 2002). Das Proteasom ist eine multikatalytische Protease, die an der Carbonylseite basischer, hydrophober und saurer Aminosäuren (Trypsin-ähnliche, Chymotrypsin-ähnliche und Peptidylglutamyl-Peptid Hydrolase Aktivitäten) schneidet und aus zwei Komplexen besteht. Der trommelförmige Kern-Komplex (20S) ist aus 28 α und β Untereinheiten aufgebaut und 700 kDa groß (Tanaka, 1998). Der Kern-Komplex wird durch verschiedene Proteine reguliert, da die

20S Untereinheit auch nicht-ubiquitinierte Proteine erkennt. Die bekanntesten sind der 19S regulatorische Komplex und der 11S Komplex. Die Bindung von zwei 19S Komplexen an jedem Ende des 20S Komplexes resultiert in der Formation des 26S Proteasoms, welches für die Degradation der Proteine verantwortlich ist. Die 19S Untereinheiten bestehen aus ATP-Hydrolasen, Ubiquitin bindenden Enzymen und Enzymen zur Entfernung von Ubiquitin Resten, die für die Proteinfaltung essentiell sind (Mehlase und Grune, 2002). Nur entfaltete Proteine werden innerhalb des proteasomalen Komplexes abgebaut. Das Proteasom wird durch die Bindung der regulatorischen Untereinheiten aktiviert.

Die Aktivierung des Nrf2/ARE-Signalwegs erfolgt also durch die Störung des Nrf2/Keap 1 Komplexes, sowie der Stabilisierung von Nrf2 durch verminderte proteasomale Degradation, ausgelöst durch Prooxidantien oder elektrophile Substanzen. Neben der Stabilisierung von Nrf2 durch verminderte proteasomale Degradation kann Nrf2 auch über Endoplasmatisches Retikulum (ER-)Stress aktiviert werden. Dabei wird Nrf2 durch die Proteinkinase R ähnliche ER Kinase (PERK) phosphoryliert und aktiviert, sobald die Zelle in einen Stresszustand gerät (Cullinan, Zhang et al., 2003). Neben der Aktivierung von Nrf2 ist PERK noch an der Vermittlung der UPR beteiligt (Cullinan und Diehl, 2006). Auch andere Kinasen können Nrf2 durch Phosphorylierung aktivieren. Für Pyrrolidin Dithiocarbamat konnte in HepG2 Zellen eine Aktivierung des ARE gezeigt werden, die vermutlich durch die Aktivierung der p38 Kinase ausgelöst wurde (Zipper und Mulcahy, 2000). In humanen retinalen Pigment Zellen konnten Nrf2 und die HO-1 durch die Inkubation mit Quercetin, Luteolin, Fisetin, Galangin, Epigallocatechin-Gallat, Baicalein, Eridictyol und zwei weiteren synthetischen Flavonoiden aktiviert werden (Hanneken, Lin et al., 2006). Auch in Ratten-Hepatozyten konnten bestimmte Quercetin-Glykoside den Nrf2/ARE Signalweg aktivieren (Kim, Lee et al., 2006). Bestimmte Flavonoide zeigten einen immunmodulatorischen Effekt durch die Induktion der Glutathion Synthese über Nrf2 in epithelialen Lungenzellen wie in Makrophagen (Rahman, Biswas et al., 2006). Epigallocatechin-Gallat steigert die UGT1A1 Expression über den Nrf2/ARE-Signalweg in humanen Kolon-Karzinom-Zellen (Zhang, Yang et al., 2009). Allerdings ist bei der Expression der UGT zu beachten, dass dieses Enzym neben der ARE Konsensus-Sequenz auch XRE-Sequenzen in der Promotorregion besitzt, welche durch den aktivierten AhR gebunden werden (Munzel, Schmohl et al., 2003).

1.5 Flavonoide als Nahrungsergänzungsmittel

Nahrungsergänzungsmittel sind *per definitionem* keine Arzneimittel, sondern gehören zu den Lebensmitteln. Sie ergänzen die Nahrung mit Nährstoffen (Vitaminen, Spurenelementen) in höherer Konzentration und unterliegen keiner Registrierungs- oder Zulassungspflicht. Sie werden in dosierter Form, insbesondere in Form von Kapseln, Tabletten und anderen ähnlichen Darreichungsformen, zur Aufnahme in abgemessenen kleinen Mengen, in den Verkehr gebracht. Sie unterliegen nur einer Anzeigepflicht beim Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, wobei die Kennzeichnung der Art erfolgen muss, dass dem Verbraucher ersichtlich wird, dass kein Arzneimittel vorliegt (Nahrungsergänzungsmittelverordnung - NemV). Viele Polyphenole werden in Darreichungsformen wie Rotweintabletten, Grapefruitextrakte oder aber auch als Reinsubstanz in Apotheken oder im Internet, angeboten. Dabei kann die Zusammensetzung der Nahrungsergänzungsmittel recht unterschiedlich sein, da die Extraktionsverfahren nicht deklariert werden müssen und nicht klar ist, ob die angegebene Polyphenolkonzentration enthalten ist.

Auf Grund der protektiven Eigenschaften von Flavonoiden werden sie in zunehmendem Maße als Nahrungsergänzungsmittel angeboten. Dabei wird häufig außer Acht gelassen, dass die Aufnahme einer höheren Konzentration durch wiederholte Aufnahme kleinerer Dosen durchaus adverse Effekte haben kann (Niering, Michels et al., 2005; Steffan, Watjen et al., 2005). Durch ihre antioxidativen Eigenschaften sind Flavonoide durchaus auch in der Lage zu prooxidativen Verbindungen zu reagieren (Sugihara, Arakawa et al., 1999). Des Weiteren werden intrazelluläre Signalwege modifiziert, wobei noch nicht belegt ist, welche Folgen eine derartige Modifikation dieser Signalwege *in vivo* auslöst. Obwohl potentiell protektive Eigenschaften von Flavonoiden auf Signalwege *in vitro* beschrieben wurden (Ahn, Lee et al., 2008; Yao, Nussler et al., 2007), können Polyphenole ihre protektiven Eigenschaften auch in Karzinomzellen vermitteln, was zu adversen Effekten im Gesamtorganismus führen kann (Lee-Hilz, Boerboom et al., 2006; Wang, Sun et al., 2008).

Neben den bereits erwähnten Eigenschaften von Flavonoiden kann ihre Aufnahme und Metabolisierung zu Wechselwirkungen mit Arzneimitteln führen. Allein durch die Aufnahme von Grapefruitsaft können Wechselwirkungen mit zusätzlich eingenommenen Arzneimitteln auftreten. Die in Grapefruitsaft enthaltenen Flavonoide (Naringin, Naringenin) haben einen inhibitorischen Einfluss auf Enzyme der CYP-Familie (CYP3A4), wodurch die Metabolisierung von Arzneimitteln, wie Digoxin herabgesetzt, wird und die Plasmakonzentration dieser Medikamente steigt (Bailey

1998). Die Wirkungen von Flavonoiden sind also keineswegs zu unterschätzen und eine weitere Untersuchung der Aufnahme sowie der Wirkung *in vivo* notwendig.

1.6 Zielsetzung

Für bestimmte sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe ist bekannt, dass sie für die positiven Wirkungen einer gemüse- und obstreichen Nahrung verantwortlich sind. Aus diesem Grund werden diese polyphenolischen Verbindungen immer häufiger hochkonzentriert in Form von Nahrungsergänzungsmitteln vermarktet. Dabei wird außer Acht gelassen, dass eine hohe Konzentration an Flavonoiden adverse Effekte vermitteln kann. Flavonoide sind in der Lage, zelluläre Signalwege zu modifizieren. Der Nrf2 Signalweg ist ein Weg, der als Antwort auf zelluläre Stresszustände, wie oxidativen oder chemisch-induzierten Stress, aktiviert wird. Die Aktivierung resultiert in der Induktion fremdstoffmetabolisierender und antioxidativer Enzyme und stellt somit einen Schutz gegen diese Stresszustände dar. Dabei erfolgt die Nrf2-vermittelte Induktion antioxidativer Enzyme über die Bindung des Transkriptionsfaktors an eine Konsensus-Sequenz in der Promotorregion der Zielgene. Auf Grund der Induzierbarkeit dieses Signalwegs durch Antioxidantien wurde diese Sequenz ARE genannt (Rushmore und Pickett, 1991). Allerdings konnte später auch die Aktivierung über prooxidative Substanzen gezeigt werden (Rushmore, Morton et al., 1991). Die Aktivierung von Nrf2 konnte bereits in metabolisch stark aktiven Hepatomzellen nachgewiesen werden (Ikeda, Nishi et al., 2004). Allerdings ist eine Induktion in Zellen des Darms bis zum heutigen Zeitpunkt wenig untersucht. Darmzellen stellen die erste Zellpopulation dar, welche mit der Reinsubstanz in Verbindung kommt. Aus diesem Grund sollte die Induktion des Nrf2-Signalwegs in humanen Kolon-Karzinomzellen nachgewiesen werden. In der vorliegenden Arbeit sollte die Wirkung strukturverwandter Flavonoide auf diesen redoxsensitiven Signalweg untersucht werden. Die untersuchten Flavonoide gehören zu der Gruppe der Flavone (Apigenin, Luteolin, Chrysin) und Flavonole (Quercetin, Kaempferol, Galangin, Morin, Fisetin, Myricetin). Flavonole sind die am weitesten verbreiteten Flavonoide und kommen in hohen Konzentrationen in Zwiebeln oder Grünkohl vor (Crozier, Jaganath et al., 2009). Flavone sind im Allgemeinen nicht so stark verbreitet, Apigenin und Luteolin sind Flavone, die noch in nennenswerten Mengen in Sellerie oder Petersilie vorkommen. Beiden Gruppen sind bestimmte Merkmale ihrer Struktur gemeinsam. Sie ist durch das Flavan-Gerüst gekennzeichnet. Die Unterschiede zwischen den untersuchten Flavonoiden kommen durch die unterschiedliche Anzahl an Hydroxylgruppen in diesem Ringsystem zustande. Mit der

Anzahl und der Verteilung dieser Substituenten variiert auch die Reaktivität der Flavonoide.

Zunächst sollten die strukturbedingten antioxidativen Wirkungen der Flavonoide sowohl zellfrei (TEAC-Assay) als auch im Zellkultursystem (DCF-Assay) untersucht werden. Aus den ermittelten Charakteristika der Substanzen sollte im weiteren Verlauf ein Zusammenhang zu der Aktivierung des Nrf2-Signalwegs hergestellt werden. Die Modulation der Nrf2-vermittelten Signaltransduktion wurde nur in wenigen Fällen in humanen Kolon-Karzinom Zellen untersucht. Durch den Einsatz von tBHQ als klassischem Aktivator dieser Kaskade wurde in Hct 116 Zellen eine geeignete Positivkontrolle etabliert. Es sollte der Einfluss von tBHQ und den Flavonoiden auf die Aktivierung und Translokation von Nrf2 untersucht werden. Als Folge der Translokation kommt es zu einer Aktivierung eines Nrf2-responsiven Elements, dem ARE. Es sollte die Aktivierung des ARE durch tBHQ und durch die Flavonoide dargestellt werden. Dazu wurde ein ARE-Luziferase-Reporter-Gen-Assay durchgeführt. Da der Nrf2-Signalweg die Expression von antioxidativen und fremdstoffmetabolisierenden Enzymen reguliert, wurde die Expression des antioxidativen Enzyms HO-1 mittels RT-PCR untersucht. Eine Aktivierung des Nrf2 Signalwegs durch Flavonoide sollte die diversen Wirkmechanismen dieser Pflanzeninhaltsstoffe aufzeigen, um die protektiven oder potentiell adversen Einflüsse der Flavonoide in hochdosierten Nahrungsergänzungsmitteln beurteilen zu können.

2. Material & Methoden:**2.1 Abkürzungen**

Abb	Abbildung	H ₂ -DCF-DA	H ₂ -DCF-Diacetat
AhR	<i>arylhydrocarbon receptor</i>	HO-1	Hämoxygenase 1
Ak	Antikörper	HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
Amp	Ampicillin	IgG	Immunglobulin G
ANOVA	<i>analysis of variance</i>	IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid
AP-1	<i>activator-protein-1</i>	JNK	<i>Jun-terminal kinase</i>
APS	Ammoniumperoxodisulfat	Kana	Kanamycin
ARE	<i>antioxidant responsive element</i>	kb	Kilobasen
ARNT	<i>arylhydrocarbon receptor nuclear translocator</i>	kDa	Kilodalton
Bach 1	<i>BTB and CNC homology 1</i>	Keap 1	<i>ECH-kelch-like-activator-protein1</i>
BHA	Butylhydroanisol	l	Liter
bHLH	<i>basic helix loop helix</i>	LB-Medium	Luria-Broth-Medium
bp	Basenpaar	Lsg	Lösung
BSA	Rinderserumalbumin	mA	Milliampere
BTB	<i>broad complex-TramTrack-Bric a Brac</i>	M	Marker
bzip	<i>basic-leucine zipper</i>	MAPK	<i>mitogen-activated protein-kinase</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>	MCS	<i>multiple cloning site</i>
CNC	<i>cap'n'collar</i>	MEK	Map-Erk-Kinase
CYP	Cytochrom-P450-Monooxygenase	Min	Minute
DCF	2',7'-Dichlorofluorescein	MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
DEPC	Diethylpyrocarbonat	μm	Mikrometer
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>	n	Anzahl der Versuche
DMSO	Dimethylsulfoxid	NAD(P)H	Nicotinamid-Adeninnukleotid-Phosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure	NFκB	<i>nuclear factor κB</i>
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat	NP-40	Nonidet P 40
DGR	<i>double-glycin-repeats</i>	NQO 1	NAD(P)H-Chinon-Oxidoreduktase1
DTT	Dithiothreitol	Nrf2	<i>Nuclear factor erythroid related factor 2</i>
EC ₅₀	<i>effective concentration (50 %)</i>	nts	Nukleotide
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	OD	Optische Dichte
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>	ORF	<i>open reading frame</i>
ERK	<i>extracellular-regulated kinase</i>	PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
EtBr	Ethidiumbromid	PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
EtOH	Ethanol	PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
FADH	Flavin-Adenin-Dinukleotid	PERK	Protein Kinase R-ähnliche Endoplasmatisches Retikulum Kinase
FCS	<i>fetal calf serum</i>	PI3K	<i>phosphatidyl inositol 3-kinase</i>
g	Gramm, Erdbeschleunigung	PKC	Proteinkinase C
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase	PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
GFP	<i>green fluorescent protein</i>	PVDF	<i>polyvinylidene difluoride</i>
GST	Glutathion-S-Transferase	Raf	<i>rapidly growing fibrosarcoma or rat fibrosarcoma</i>
h	Stunde	Ras	<i>rat sarcoma</i>
H ₂ -DCF	2',7'-Dichlorodihydrofluorescein		

RFU	<i>relative fluorescent units</i>
RLB	<i>reporter lysis buffer</i>
RNA	Ribonukleinsäure
mRNA	<i>messenger RNA</i>
RNase	Ribonuklease
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
rpm	<i>rotations per minute</i>
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	<i>reverse transcriptase polymerase chain reaction</i>
STABW	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sek	Sekunden
SEM	<i>standard error of the mean</i>
SULT	Sulfotransferasen
Tab	Tabelle
TAK1	TGF-beta activated-kinase 1
TBE	Tris-Borat-EDTA
tBHQ	tert-Butylhydrochinon
tBQ	tert-Butylchinon
TE	Tris-EDTA
TEMED	N, N, N', N', - Tetramethylethyldiamin
Tm	<i>melting temperature</i>
U	<i>Units</i>
UGT	UDP-Glucuronyltransferase
UTR	<i>untranslated region</i>
V	Volt
W	Watt
x	Arithmetisches Mittel
XRE	<i>xenobiotic responsive element</i>

2.2 Material

2.2.1 Bakterienstämme und Zelllinien

Bakterien:

DH5 α : (Hanahan 1983) [F⁻, endA1, hsdR17 (r_k⁻, m_k⁺), supE44, th-1, λ ⁻, recA1, gyrA96, relA1, Δ (argF-lacZya)U196, Φ 80dlacZ Δ M15]

Zelllinien:

Hct-116	humane Kolon-Karzinom Zellen (Long, Willson et al., 1984)
Caco-2	humane Kolon-Karzinom-Zellen (Fogh, Fogh et al., 1977)
HepG2	humane Hepatom Zellen (Knowles, Howe et al., 1980)
H4IIE	Ratten-Hepatom Zellen (Reuber, 1961)

2.2.2 Plasmide

pTi-Luc	Amp ^R ; Luciferase-Reporter mit Ti-promotor (Wasserman und Fahl, 1997)
pTI-ARE-GSTYa-LucAmp ^R	Luciferase-Reporter mit Ti-promotor und GSTYa – Sequenz (41 bp)
pEGFP-Nrf2	Kana ^R ; Expressionsvektor für Nrf2-Fusionsprotein
pEGFP-C1	Kana ^R ; Expressionsvektor für Fusionsproteine
pGem-T Easy	Amp ^R ; Klonierungsvektor

2.2.3 Medien & AntibiotikaBakterien:

LB-Medium	1 % Bacto-Trypton, 0,5 % Hefe-Extrakt, 85 mM NaCl, pH 7,4 einstellen mit NaOH [1 N]
LB-Agar (Platten)	1 % Bacto-Trypton, 0,5 % Hefe-Extrakt, 85 mM NaCl, 1,5 % Bacto-Agar, NaOH [1 N] (abkühlen auf 60 °C, Zugabe des Antibiotikums)
LB-Medienzusätze	IPTG: 0,5 mM in dH ₂ O; x-Gal: 0,01 % in DMSO
Antibiotika	Ampicillin 50 µg/ml; Kanamycin 30 µg/ml

2.2.4 Lösungen & Puffer

Acrylamid-Lösung	30 % Acrylamid, 0,8 % Bisacrylamid
Anodenpuffer	200 mM Tris, 20 % MeOH, pH 10,4
APS 10 % [w/v]	1 g APS ad 10 ml dH ₂ O, aliquotiert bei -20°C
Antikörper-Inkubationslösung	5 % Trockenmilch in TBST
Antikörper-Blockierlösung	5 % Trockenmilch in TBST
Coomassie-Entfärbelösung (Membran)	50 % [v/v] Methanol, 1 % [v/v] Essigsäure
Coomassie-Entfärbelösung (Gele)	5 % [v/v] Methanol, 10 % [v/v] Essigsäure
Coomassie-Färbelösung (Membran)	40 ml Ethanol, 2 ml Essigsäure, 0,2 g Coomassie Brilliantblau auffüllen auf 100 ml mit dH ₂ O
Coomassie-Färbelösung (Gele)	45 % [v/v] Methanol, 10 % Eisessig [v/v], 0,2 % [w/v] Coomassie Brilliantblau
DNA - Auftragspuffer	0,1 % [w/v] Bromphenolblau, 0,1 % [w/v] Xylenyanol, 50 % [v/v] Glycerol, in 1x TBE
dH ₂ O-DEPC	0,1 % Diethylpyrocarbonat in dH ₂ O 12 h rühren, 10 min unter UV Licht, 2x autoklavieren
EDTA-Lösung	0,5 M EDTA, pH 8,0

Einfriermedium (Zellen)	6,2 ml Zellkulturmedium + 1 ml DMSO, auf Eis
Entwickler (Western Blot) (Kodak GBX developer and replenisher)	250 ml Entwickler Lösung + 750 ml dH ₂ O
EtOH 75 % (RNA Isolation)	75 % Ethanol in dH ₂ O-DEPC
Extraktionslösung (MTT - Test)	5 % Ameisensäure, 95 % Isopropanol
FCS	105 min 56°C hitzeinaktiviert, Lagerung bei -20°C
Fixierer (Western Blot)	600 g Natriumthiosulfat, 60 g Kaliumdisulfit ad 2 l dH ₂ O
Fixierlösung (NR-Test)	1 % [v/v] Formaldehyd, 1 % [w/v] CaCl ₂
GTE-Lösung	50 mM Glucose, 25 mM Tris/HCl pH 8,0, 10 mM EDTA
Glycerinstocks (Bakterien)	Autoklavierte sterile Glycerin/Wasser - Lösung, 4:1 [v/v]
H ₂ -DCF-DA Stocklösung	50 mM H ₂ -DCF-DA in DMSO
Kathodenpuffer	25 mM Tris, 20 % Methanol, ε-Aminocaprionsäure, pH 9,4
Laufpuffer (10 x)	250 mM Tris, 1,92 M Glycin
5 x MTT Stammlösung	3,5 mg/ml MTT in dH ₂ O filtrieren, lichtgeschützt 4°C
NaCl-Lösung (Transfektion)	150 mM NaCl in dH ₂ O
NaOH – SDS	0,2 M NaOH, 1 % [w/v] SDS
NP-40 10 %	10 % [v/v] in dH ₂ O
10 x PBS	1,36 mM NaCl, 26 mM KCl, 81 mM Na ₂ HPO ₄ , 15 mM KH ₂ PO ₄
Phenol/Chloroform/ Isoamylalkohol	(19:1:1) 19 ml Phenol, 1 ml Chloroform, 1 ml Isoamylalkohol
Ponceau-S Färbelsg.	2 g Ponceau Rot S, 30 g Sulfosalicylsäure, 60 ml 50 % Trichloressigsäure, ad 100 ml dH ₂ O
Propidiumiodid	1,5 mM (1mg/ml) in dH ₂ O, filtrieren (0,2 µm), Lagerung in Aliquots bei -20°C
Puffer A (Zytosolfraktion)	10 mM HEPES, 10 mM KCl, 100 µM EDTA, 100 µM EGTA, 1 mM PMSF, 1 x Proteinase-Inhibitor Cocktail, 1 mM DTT, 10 mM NaF
Puffer B (Kernfraktion)	20 mM HEPES, 400 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 2 mM PMSF, 1 x Protease-Inhibitor Cocktail, 1 mM DTT, 10 mM NaF
RIPA – Puffer	50 mM Tris HCl pH 8,0, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1 % [w/v] NP40, 0,1 % [w/v] SDS, 0,5 % [w/v] Deoxycholat

RIPA-Gebrauchspuffer	RIPA-PUFFER + 1 mM PMSF (aliquotiert, -20°C), 1 x Protease-Inhibitor Cocktail (aliquotiert, -20°C)
RNase A	10 mg RNase A in 1 ml Wasser, sterilfiltrieren, 15 min bei 90°C denaturiert, Lagerung in Aliquots bei -20°C
Sammelgelpuffer (2x) SDS 10 % oder 20 % [w/v]	250 mM Tris, 0,2 % [w/v] SDS, pH 6,8 100 g oder 200 g SDS ad 1 L H ₂ O unter langsamem Rühren lösen
SDS – Laufpuffer (1x)	25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1 % [w/v] SDS
SDS – Probenpuffer (4x)	40 % [w/v] Glycerin, 20 % [v/v] β-Mercaptoethanol, 12 % [w/v] SDS, 0,4 % Bromphenolblau
TBE (5x)	0,45 M Tris, 0,45 M Borsäure, 10 mM EDTA, pH 8,0
TBS (10x)	100 mM Tris, 1,5 M NaCl, pH 7,4
TBST	1x TBS + 0,1 % [v/v] Tween 20
TE - Puffer	10 mM Tris HCl pH 8,0, 1 mM EDTA pH 8,0
Trenngelpuffer (4x)	1,5 M Tris, 0,4 % [w/v] SDS, pH 8,8
TrisHCl pH 8,0	0,1 M Trizma®-Base (Sigma, Steinheim, Deutschland)

2.2.5 Molekulargewichtsstandards

DNA-Marker: Gene Ruler® 1 kb DNA ladder:
10000 / 8000 / 6000 / 5000 / 4000 / 3500 / 3000 / 2500 / 2000 / 1500 / 1000 / 750 / 500 / 250 bp (MBI Fermentas)

Gene Ruler® 100 bp DNA ladder:
1031 / 900 / 800 / 700 / 600 / 500 / 400 / 300 / 200 / 100 / 80 bp (MBI Fermentas)

Proteinmarker: Page Ruler® Protein ladder:
200 / 150 / 120 / 100 / 85 / 70 / 60 / 50 / 40 / 30 / 25 / 20 / 15 / 10 kDa, unstained (MBI Fermentas)

Page Ruler® Prestained Protein ladder:
170 / 130 / 100 / 72 / 55 / 40 / 33 / 24 / 17 / 11 kDa (MBI Fermentas)

2.2.6 Synthetische Primer

Gen	Primersequenz	TM (°C)	Größe (Bp)
5'-GAPDH	5' – ACCACAGTCCATGCCATCAC – 3'		
3'-GAPDH	5' – TCCACCACCCTGTTGCTGTA – 3'	60	450
5'HO-1	5' – AACAAGGAGAGCCCAGTCTT – 3'		
3'HO-1	5' – ATGGCATAAAGCCCTACAGC – 3'	60	662
5'GST	5' – CCACTACTCCAATATACGGG – 3'		
3'GST	5' – GTTCCACCAGGTGAATGTCA – 3'	60	467

5'Nrf2	5' –CTGCTTTTCATAGCTGAGCCC- 3'		
3'Nrf2	5' –CCTGAGATGGTGACAAGGGT- 3'	62	672

Klonierungspr

imer:

5'Nrf2	5' –CTCGAGTAATGATGGACTTGGAGCTGCCG- 3'		
3'Nrf2	5' –CTAGTTTTTCTTAACATCTGGGGATCC - 3'	(62)	1818

2.2.7 Antikörper

Zielprotein	Hersteller/Firma	Verdünnung	Größe (kDa)
NRF 2-sc-13032	Santa Cruz Biotech, Californien, USA	1:1000	100
KEAP I-sc-33569	Santa Cruz Biotech, Californien, USA	1:1000	75
HO-1-sc-7695	Santa Cruz Biotech, Californien, USA	1:500	32
NQO-1-sc-16464	Santa Cruz Biotech, Californien, USA	1:500	31
GST-M1-sc-28502	Santa Cruz Biotech, Californien, USA	1:500	26
<u>Sekundär-</u>			
<u>Antikörper</u>			
Goat-anti-Rabbit	Southern Biotech , Birmingham, USA	1:3000	
Donkey-anti-Goat-sc-2033	Santa Cruz Biotech, Heidelberg, Deutschland	1:1000	

2.2.8 Enzyme & Substrate

Restriktionsendonukleasen:	BglII, EcoRI, HindIII, KpnI, MluI, PstI, XbaI, XhoI, NdeI,	(MBI Fermentas)
Alkalische Phosphatase (CIAP)	1 U/μl	(MBI Fermentas)
Taq-Polymerase	5 U/μl	(Promega)
Go-Taq Polymerase	5 U/μl	(Promega)
Pfu-Taq Polymerase	1 U/μl	(Promega)
Ribonuclease Inhibitor	40 U/μl	(MBI Fermentas)
M-MLV Reverse Transkriptase	200 U/μl	(Promega)
T4 – Ligase	400 U/μl	(Biolabs, Fermentas, Promega)
RNase	70 U/mg	(Serva)
DNase	4710 U/mg	(Fluka)

2.2.9 Transfektionsreagenzien

JetPEI™ DNA Transfection Reagent (Polyplus Transfection, NewYork, USA)

2.2.10 Chemikalien

Acrylamid-Lösung (37,5:1)	Merck	Darmstadt, Deutschland
Agarose Neeo Ultra	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Ameisensäure	Roth	
Ammoniumperoxodisulfat	Merck	
Ampicillin	ICN	
APO-ONE® Homogenous Caspase-3/-7 Assay	Promega	Madison, WI, USA
Bacto-Agar	Becton Dickinson	NJ, USA
Bacto-Hefe Extrakt	Becton Dickinson	
Bacto-Trypton	Becton Dickinson	
Bio-Rad DC Protein Assay	Bio-Rad	München, Deutschland
Borsäure	Merck	
BSA Proteinstandard	Bio-Rad	
Bradford Reagenz	Bio-Rad	München, Deutschland
Bromphenolblau	Merck	
Calciumchlorid	Merck	
CHAPS	Fluka	Steinheim, Deutschland
Chloroform	Merck	
Coomassie Brilliantblau R250 (Serva Blau®)	Serva	Heidelberg, Deutschland
dATP, dCTP, dGTP, dTTP	MBI Fermentas	St- Leon-Rot, Deutschland
DEPC	Sigma	Steinheim, Deutschland
Deoxycholat	Sigma	
Diethanolamin	Fluka	
Dimethylformamid	Merck	
Dithiotreitol	Sigma	
DMEM (farblos)	GIBCO	Karlsruhe, Deutschland
DMEM (high glucose, LGlutamin, DMSO)	GIBCO	
BM Chemiluminescence Western Blotting Kit	Roche Applied Sciences	Mannheim, Deutschland
EDTA	PIERCE ICN	Rockford, IL, USA
EGTA	Serva	Heidelberg, Deutschland

Eisessig	Merck	
Entwickler	Kodak	Stuttgart, Deutschland
Ethanol	Merck	
Ethidiumbromid (10 mg/ml)	Roth	
FCS gold	PAA Laboratories	Pasching, Österreich
Formamid	Merck	
Formaldehyd 37 % [v/v]	Roth	
Gel Extraktion Kit		
Wizard® SV Gel and PCR Cleanup System	Qiagen Promega	Hilden, Deutschland Madison, WI, USA
pGem-T® Easy Vector System I	Promega	
Glucose D(+)	Merck	
Great Escape Chemilumi-nescent Detection Kit	Clontech	Californien, USA
Glycerol (≥99,5 %)	Roth	
Glycin	Roth	
H ₂ DCF-DA	Sigma	
H ₂ O ₂ 30 %	Roth	
Hemin	Fluka	
Hepes	Sigma	
Hoechst 33342	Sigma	
Isoamylalkohol	Merck	
Isopropanol	Merck	
Kaliumchlorid	Merck	
Kaliumdisulfit	Merck	
Kanamycin	Sigma	
KH ₂ PO ₄	Merck	
6x Loading dye (green)	MBI Fermentas	
Luciferase Assay Kit	BioThema	Handen, Schweden
Methanol	Roth	
MTT	Sigma	
NaCl	Merck	
Natriumacetat	Merck	
NaOH	Merck	
Di-Natriumhydrogenphosphat	Merck	
Natriumthiosulfat	Merck	
nicht-essentielle Aminosäuren	GIBCO	
Nonidet-P40	Fluka	
PCR Purification Kit	Qiagen	
Penicillin/Streptomycin	GIBCO	
Phenol (Rotiphenol®)	Roth	
PMSF	Sigma	
Plasmid Kit	Qiagen	

Ponceau-S	Sigma	
Proteinase Inhibitorcocktail	Calbiochem	Darmstadt,
Propidiumiodid	Sigma	
RNAse A	Serva	
Rotiphorese Gel 30	Roth	
RPMI (L-Glutamin, Phenolrot)	PAA Laboratories	
Salzsäure 37 % [v/v]	Merck	
SDS	Serva	
Spermintetrahydrochlorid	Sigma	
Stripping Buffer	PIERCE	Rockford, IL, USA
TEMED	Serva	
Tris-Base	Sigma	
Trichloressigsäure	Merck	
TrisHCl	ICN	
Triton X-100	Sigma	
Trizol (Tri [®] Reagent)	Invitrogen	Karlsruhe, Deutschland
Trockenmilch (Nonfat-Dried Milk - Bovine)	Sigma	
Trypsin (0,5 % Trypsin, 5,3 mM EDTA – HNa)	GIBCO	
Tween 20	MP Biochemicals	Solon, OH, USA
X-Gal	MBI Fermentas	
Xylenxyanol	Merck	
β-Mercaptoethanol	Merck	
ε-Aminocaprionsäure	Sigma	

2.2.11 Geräte

Geldokumentationsanlage 2000	Bio-Rad	
Thermoprinter	Mitsubishi P91	
Blotting Apparaturen	Biometra, Pharmacia LKB Multiphor II OWL HEP-1, Thermo Scientific Peqlab	Göttingen, Freiburg, Erlangen, Deutschland
inverses Lichtmikroskop	Axiovert 100, Zeiss	Oberkochen, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop	Axiolab, Zeiss	
Zentrifugen	Hettich R 24 – 48	Tuttlingen, Deutschland
	Hettich universal 30F	
	Eppendorf 5415R	Hamburg, Deutschland
	Jouan MR 18 12	

	Beckman Microfuge R	Krefeld, Deutschland
	Beckman Coulter Avant J – 25	
	Minifuge2, Heraeus Christ	Hanau, Deutschland
Kamera	CoolSNAP-Pro (INAS)	
Fluoreszenzmikroskop		
Photometer	Lambda 25 UV/VIS spectrometer, Perkin Elmer	Waltham, USA
	Lambda 12 UV/VIS spectrometer, Perkin Elmer	
PCR Cycler	Biometra T Personal	Göttingen, Deutschland
	Perkin Elmer Gene Amp PCR System 2400	Waltham, USA
Heizblock	Ori-Block® DB-3, Techne	Ahrensburg, Deutschland
pH - Meter	Dry Bath System, Starlab	
	Radiometer Copenhagen PHM 93	
Plattenlesegerät	Wallac Victor 1420 Multilable Counter, Perkin Elmer	
Power Supply	E143, Consort	Karlsruhe, Deutschland
	EV231, Consort	
	E835, Consort	
	PS3002, GIBCO BRL Life Technologies	
Inkubator	Jouan IG 150	Tuttlingen, Deutschland
	Binder Serie BC	
Sterilbänke	Jouan IC2.12	Berthold, Deutschland
	Gelaire BSB4	
Schüttler	Swip, Edmund Bühler (EB)	München, Karlsruhe
	Roto-Shake Genie, Scientific Industries	(Roth), Deutschland
Rührer	Heidolph MR2002	Schwabach, Deutschland
Bakterienschüttler	INFORS AG CH-4103	Bottmingen, Schweiz
Eismaschine	Icematic F90, Compact Electronics	
Waage	Sartorius 3716MP	Göttingen, Deutschland
	Sartorius Analysenwaage MC1	
Wasserbad	W22, Mendingen	Leipzig, Deutschland
	Thermomix_1420, B. Braun	
	Certomat WR, B. Braun	
	Köttermann	
Wasser-Deionisierungsanlage	Millipore	Schwalbach, Deutschland

2.2.12 Sonstige Materialien

Proteinmembranen	PVDF Western Blotting Membranes, Roche
Filme	Kodak X-OMAT AR Film XAR-5 CL-X Posure™ Film, Thermo Scientific
Membranfilter	Porengröße 0,22 und 0,4 µm, Santorius
Zählkammer	Neubauer
Chromatographie Papier	3MMCHR, Whatman

2.2.13 Computersoftware

Quantity One 4.1.0	Bio Rad
Serial Cloner 1.3r11	Serial Basics
Word, Excel, Powerpoint	Microsoft Corporation (Version 2003)
GraphPad Prism	
iWork`09	Apple Inc.
Wallac 1420 Workstation	Perkin Elmer
Tina 2.09	Raytest Isotopenmessgeräte GmbH
Papers 1.9.1	Mekentosj.com
Image Pro Plus, Version 4.5.1.22	Media cybernetics
UV-Winlab	Perkin Elmer
CLC Sequence Viewer 4.6.2	clcBio

2.3 Methoden**2.3.1 Zellkultur**

a) Hct-116 Zellen (Passage 10 – 30) wurden mit einer Dichte von 1×10^4 Zellen/cm² kultiviert. Als Gefäße wurden T75 Kulturflaschen, 24-, 12-, 6- und 96-Wellplatten sowie 35 mm Schalen verwendet. Die Hct-116 Zellen wurden in DMEM Komplettmedium kultiviert (DMEM High Glucose, 10 % hitzeinaktiviertes FCS, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin). Die Kulturgefäße wurden in einem wasserdampfgesättigten Inkubator bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Da bei Erreichen einer Konfluenz der Zellen eine Kontaktinhibition auftritt, erfolgte die Subkultivierung 2-mal in der Woche. Die konfluenten Zellen wurden zuvor lichtmikroskopisch auf Kontaminationen untersucht. Das Ablösen der Zellen erfolgte mit Hilfe einer 0,5 % -igen Trypsin/EDTA Lösung. Nach Entfernen des Mediums wurde 1 ml Trypsin/EDTA pro T75 Kulturflasche zugegeben. Danach wurden die Zellen für 20 Sekunden im Brutschrank inkubiert. Die Zellen wurden in 10 ml Medium aufgenommen und 5 Minuten bei 560 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde nach lichtmikroskopischer Bestimmung der Zellzahl mittels einer Neubauer-

Zählkammer in einem definierten Volumen DMEM aufgenommen und erneut ausplattiert.

- b) Caco-2 Zellen (Passage 7 – 30) wurden mit einer Dichte von 2×10^4 Zellen/cm² kultiviert. Als Gefäße wurden T75 Kulturflaschen und 96-Wellplatten verwendet. Die Caco-2 Zellen wurden in Earle's Medium kultiviert (20 % FCS, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 1 x Non-essential-amino-acids (NEAA)). Die Kulturgefäße wurden in einem wasserdampfgesättigten Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Ein Erreichen einer Konfluenz ist bei Caco 2 Zellen erst nach ca. 21 Tagen zu erwarten. Caco 2 Zellen beginnen nach 21 Tagen mit einer erneuten Differenzierung und können einen Polylayer ausbilden. Sie unterliegen nicht der Kontaktinhibition und können bei Einhaltung der Mediumwechselzeiten (alle 2-3 Tage) gewebeartige Formen bilden. Für die in dieser Arbeit durchgeführten Tests genügten 24h Anhaftungszeit.
- c) HepG2 (Passage 17-35) wurden mit einer Dichte von 1×10^4 Zellen/cm² kultiviert. Als Gefäße wurden T75 Kulturflaschen 6- und 96-Wellplatten verwendet. Die HepG2 Zellen wurden in RPMI Komplettmedium kultiviert (RPMI, 10 % hitzeinaktiviertes FCS, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin). Die Kulturgefäße wurden in einem wasserdampfgesättigten Inkubator bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Da bei Erreichen einer Konfluenz der Zellen eine Kontaktinhibition auftritt, erfolgte die Subkultivierung alle 7 Tage. Die konfluenten Zellen wurden zuvor lichtmikroskopisch auf Kontaminationen untersucht. Das Ablösen der Zellen erfolgte mit Hilfe einer 0,5 % -igen Trypsin/EDTA Lösung. Nach Entfernen des Mediums wurde 1 ml Trypsin/EDTA pro T75 Kulturflasche zugegeben. Danach wurden die Zellen für 1 Minute im Brutschrank inkubiert. Die Zellen wurden in 10 ml Medium aufgenommen und 5 Minuten bei 560 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde nach lichtmikroskopischer Bestimmung der Zellzahl mittels einer Neubauer-Zählkammer in einem definierten Volumen DMEM aufgenommen und erneut ausplattiert.
- d) H4IIE (Passage 30-35) wurden mit einer Dichte von 1×10^4 Zellen/cm² kultiviert. Als Gefäße wurden T75 Kulturflaschen 6- und 96-Wellplatten verwendet. Die H4IIE Zellen wurden in DMEM Komplettmedium kultiviert (DMEM High Glucose, 10 % hitzeinaktiviertes FCS, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin). Die Kulturgefäße wurden in einem wasserdampfgesättigten Inkubator bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Da bei Erreichen einer Konfluenz der Zellen eine Kontaktinhibition auftritt, erfolgte die Subkultivierung alle 7 Tage. Die konfluenten Zellen wurden zuvor lichtmikroskopisch auf Kontaminationen untersucht. Das Ablösen der Zellen erfolgte mit Hilfe einer 0,5 % -igen Trypsin/EDTA Lösung. Nach Entfernen des Mediums wurde 1 ml Trypsin/EDTA pro T75 Kulturflasche zugegeben. Danach wurden die Zellen für 3-5 Minuten im Brutschrank inkubiert. Die Zellen wurden in 10 ml Medium aufgenommen und 5 Minuten bei 560 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde nach lichtmikroskopischer

Bestimmung der Zellzahl mittels einer Neubauer-Zählkammer in einem definierten Volumen DMEM aufgenommen und erneut ausplattiert.

2.3.2 Inkubation/Schädigung der Zellen

Die verschiedenen Zelllinien wurden mit Zellzahlen von 1×10^4 – 5×10^4 /well auf 96-Wellplatten oder $0,5 \times 10^6$ – 1×10^6 /well auf 6-Wellplatten ausplattiert. 24 h nach Ausplattieren der Zellen wurden verschiedene Konzentrationen an Noxen oder frisches Medium zu den Zellen gegeben und für weitere 4 bis 24 h inkubiert. Wurden die Hct 116 Zellen zuvor transfiziert, wurde die Anhaftungszeit um 24h verlängert.

2.3.3 Einfrieren & Auftauen von Zellen

Zum Einfrieren wurden die Zellen einer zu 70 % konfluent bewachsenen T75 Kulturflasche abtrypsinisiert, in 10 ml Medium aufgenommen, bei 560 rpm für 5 Minuten zentrifugiert und das Zellpellet in 900 μ l FCS aufgenommen. Die FCS-Zellsuspension wurde mit 0,1 ml DMSO, in einem Kryoröhrchen vorgelegt, versetzt, gemischt und bei -80°C eingefroren und gelagert.

Zum Auftauen wurden die Kryoröhrchen auf Raumtemperatur erwärmt, bis die Suspension fast aufgetaut war. Die Zellsuspension wurde in 20 ml frischem Medium in einer T75 Kulturflasche aufgenommen. Nach 24 h wurde das Medium gewechselt.

2.3.4 Mikroskopie von Zellen

2.3.4.1 Lichtmikroskopie

Die lichtmikroskopische Analyse erfolgte am Zeiss Axiovert 100. 1×10^6 Zellen wurden auf 6-Well oder 35 mm Schalen ausplattiert und 24 h später mit den jeweiligen Substanzen inkubiert. Nach Ende der Inkubation wurden die Zellen im Lichtmikroskop betrachtet und bei 32x Objektiv-Vergrößerung mittels einer Digitalkamera der Habitus der Zellen aufgenommen.

2.3.4.2 Fluoreszenzmikroskopie

Die fluoreszenzmikroskopische Analyse wurde am Zeiss Axiolab Fluoreszenzmikroskop durchgeführt. Es wurden $0,5 \times 10^5$ Zellen ausplattiert, inkubiert und bei 10x, 20x und 40x Objektiv-Vergrößerung betrachtet. Die Belichtungszeit wurde auf 5 msec eingestellt. Die Aufnahme der Bilder erfolgte mit einer schwarz-weiß Kamera und die Auswertung über ImagePro plus oder ImageJ.

2.3.5 Antioxidative Kapazität

2.3.5.1 TEAC-Assay (Re, Pellegrini et al., 1999)

Der *trolox equivalent antioxidative capacity* (TEAC) Assay ist ein *in vitro* Assay, welcher zur Bestimmung antioxidativer Eigenschaften von Substanzen verwendet wird (Miller et al., 1993). Hierbei wird die Reduktion eines stabilen grünen ABTS•-Radikals (*2,2'-azino-bis(3ethylbenz-thiazoline-6-sulfonic acid): radical*) durch

antioxidative Stoffe zum farblosen ABTS photometrisch gemessen. Als Referenzsubstanz für die antioxidative Kapazität wird das synthetische Vitamin E-Derivat Trolox verwendet.

Zur Generierung des ABTS•-Radikals wurde eine 14 mM ABTS-Lösung mit einer 4,9 mM Ammoniumpersulfat-Lösung 1:1 gemischt. Zur Messung wurde die ABTS•-Lösung mit Ethanol so verdünnt, dass bei 734 nm eine Absorption von 0,7 erhalten wurde. 500 µl Troloxlösung (100 mM, Ethanol) wurde zu Endkonzentrationen von 0 bis 25 µM mit 500 µl verdünnter ABTS•-Lösung gemischt. Ebenso wurde mit zu testenden Substanz verfahren. Die Abnahme der Absorption durch Zugabe der zu testenden Substanz wurde im Photometer bei 734 nm über 2,5 Minuten aufgezeichnet. Die Absorptions-abnahme über die Zeit wurde als Maß für die antioxidativen Eigenschaften bzw. für die Radikalfänger-Eigenschaften der untersuchten Stoffe verwendet.

2.3.5.2 DPPH-Assay (Brand-Williams, Cuvelier et al., 1995)

Der DPPH Assay ist wie der TEAC-Assay ein zellfreier Test, der zur Bestimmung des antioxidativen Potentials genutzt werden kann. Dabei wurde auch hier die Reduktion eines stabilen dunkelroten DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) - Radikals zum farblosen DPPH als Abnahme der Absorption bei 517 nm detektiert. Zur Messung wurde eine 14mM DPPH Lösung in 80 % igem Ethanol hergestellt und so verdünnt, dass bei 517 nm eine Absorption von 0,7 erhalten wurde. Ein vorheriges Mischen mit einer Ammoniumpersulfatlösung ist nicht notwendig. 500 µl Troloxlösung (100 mM, Ethanol) wurde zu Endkonzentrationen von 0 bis 25 µM mit 500 µl verdünnter DPPH•- Lösung gemischt. Ebenso wurde mit zu testenden Substanz verfahren. Die Abnahme der Absorption durch Zugabe der zu testenden Substanz wurde im Photometer bei 517 nm über 2,5 Minuten aufgezeichnet. Die Absorptionsabnahme über die Zeit wurde als Maß für die antioxidativen Eigenschaften bzw. für die Radikalfänger-Eigenschaften der untersuchten Stoffe verwendet.

2.3.6 Zytotoxizität

2.3.6.1 MTT-Test (Mosmann, 1983)

Das Prinzip des MTT Assays beruht darauf, dass das lösliche gelbe Tetrazoliumsalz MTT (3,(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyl-Tetrazoliumbromid) durch die Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenasen mittels Reduktion in das lösliche blaue Formazan umgewandelt wird. Über das Absorptionsmaximum des Formazans bei 562 nm lässt sich die Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenasen als Maß für die Viabilität der Zellen bestimmen. Die Viabilität der Zellen wurde nach Behandlung mit verschiedenen Noxen bestimmt. Die Zellen wurden 1 h mit 1x MTT-Gebrauchslösung bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach vorsichtigem Entfernen der MTT-Lösung wurden die Zellen mit 1x PBS gewaschen und das gebildete Formazan mit der MTT-Extraktionslösung aus den Zellen herausgelöst. Die Quantifizierung des Formazans erfolgte über die Messung der Farbintensität bei 560 nm im Plattenlesegerät. Für die Viabilitätsmessung auf 24-

oder 12-Wellplatten wurden jeweils 100 μl der extrahierten Lösung (3-fach Bestimmung) in 96-Wellplatten umpipettiert (Mosman et al., 1983).

2.3.7 Transiente Transfektion

Bei einer transienten Transfektion wird die DNA nur vorübergehend in die Empfängerzellen eingebracht. Die transfizierte DNA bleibt dabei extrachromosomal und wird daher nicht regelmäßig an die nächste Zellgeneration weitergegeben. Die Transfektion erfolgte mit Hilfe von kationischen Reagenzien nach einem Batch Protokoll, das für alle Zellen in Suspension etabliert wurde. Verwendet wurden das Transfektionsreagenz JetPEI mit einer DNA/Reagenz Ratio von 5.

Tabelle 2.1: Transfektionsbedingungen

Platten-format	Wellgröße [cm ²]	DNA [μg]	JetPei [μl]	NaCl Volumen [$\mu\text{l}/\text{Well}$]	Zellzahl	Medium/Well [μl]
6-Well	9,4	3	6	100	5×10^5	3000
12-Well	3,8	2	4	100	$2,5 \times 10^5$	1500

Tabelle1 zeigt eine Übersicht über die verwendeten Zellkulturformate und Bedingungen für das Transfektionsreagenz JetPEI™. Für die JetPEI™ Batch Transfektion wurde für DNA und Reagenz jeweils die erforderliche Menge an 150 mM NaCl in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß vorgelegt. Nach Zugabe von DNA und JetPEI™ in das jeweilige Gefäß wurde kurz durch Vortexen gemischt, dann die JetPEI™ Lösung zu der DNA Lösung pipettiert und erneut durch Vortexen gemischt. Die Komplexbildung erfolgte für 30 min bei RT. Währenddessen wurde die benötigte Menge an Zellen in einem Falcon auf ein ausreichendes Endvolumen mit Medium eingestellt. Nach der 30 min Inkubationszeit wurde die DNA/JetPEI™-NaCl Mischung zu der Zellsuspension gegeben und eine homogene Mischung hergestellt. Die jeweilige Medium Menge wurde dann pro Well oder Kulturschale ausplattiert.

Die Inkubation mit den jeweiligen Noxen erfolgte 24 - 48 h nach der Transfektion.

2.3.8 Reporter Assays

In der vorliegenden Arbeit wurde die Luciferase sowie das GFP als Reporter verwendet.

2.3.8.1 Luciferase Assay (Promega/Biothema)

Im Luciferase (Luc)-Assay wird das rekombinante Gen des Enzyms Luciferase aus dem Leuchtkäfer (*Lampyridae*) als Reportergen unter Expressionskontrolle eines spezifischen Promotors verwendet. Die Bestimmung der Luciferase-Aktivität erfolgt durch eine Biolumineszenzreaktion, die mithilfe eines Luminometers gemessen werden kann. Die Zellen wurden nach Transfektion mit einem

Luciferase Reporter Plasmid und jeweiliger Inkubation, 2x mit 1x PBS gewaschen und mit 1x Reporter Lysis Buffer (Promega) in den Wells für 15 min lysiert. Die noch nicht lysierten Zellen wurden durch mehrmaliges auf- und abpipettieren und Abspülen des Wells lysiert. Das Lysat wurde komplett abgenommen und für 1 min bei Höchstgeschwindigkeit zentrifugiert. 20 µl Probe wurde mit 100 µl Luciferase Substrat und 100 µl ATP-Lösung (BioThema) versetzt und die Lumineszenz in einem Plattenlesegerät gemessen. Die Normalisierung der Messwerte erfolgte über die Proteinmenge in den Proben, die über eine Proteinbestimmung gemessen wurde.

2.3.8.1.2 GFP-Reporter Assay (Nrf2-EGFP-Konstrukt)

Hct 116 Zellen wurden wie unter 2.3.7 beschrieben einer Batch-Transfektion unterzogen. Dabei wurde ein Plasmid, welches das komplette Nrf2-ORF sowie die kodierende Sequenz des GFP beinhaltet, in die Zellen eingebracht. $0,5 \times 10^6$ Zellen wurden in 35mm-Schälchen ausplattiert. Nach einer Regenerationsphase von 44h wurden die Zellen mit den zu untersuchenden Noxen 4h behandelt. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen zweimal mit 1 x PBS gewaschen, da Flavonoide eine Eigenfluoreszenz besitzen und Flavonidreste, welche an der Zelle haften, entfernt werden müssen. Die behandelten Zellen wurden dann unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet und dokumentiert.

2.3.9 Proteasom-Inhibitor-Assay (Cali, Niles et al., 2008)

Der Proteasom Inhibitor Assay (Promega) ist ein auf Lumineszenz beruhender Assay. Ein mit Aminoluciferin gekoppeltes Substrat wird nach der Inkubation der Zellen mit der zu untersuchenden Substanz zugesetzt und die Fluoreszenz als Maß für die Chymotrypsin-Aktivität des Proteasoms detektiert. Hct 116 Zellen wurden in einer Dichte von 1×10^4 Zellen/well in einer 96-well Platte ausgesät und 24h bei 37°C, 5 % CO₂ in wasserdampfgesättigter Atmosphäre inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit der Testsubstanz 4h inkubiert. Nach der 4h Inkubation wurde das Medium abgenommen und durch 50 µl unkonditioniertes frisches DMEM-Medium (10 % FCS, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin %) ersetzt. Zu den Zellen wurden 50 µl des zuvor nach Herstellerangaben angesetzten Proteasome-Glo-Reagenz zugesetzt und 2 min bei 700 rpm für 2 min geschüttelt und die Lumineszenz anschließend 20 min im Plattenlesegerät (VICTOR) gemessen.

2.3.10 Nachweis von ROS (H₂DCF-DA) (Burow und Valet, 1987)

Der Nachweis der Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies in den Zellen erfolgte fluorimetrisch über die Sonde 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein-diacetat (H₂DCF-DA). Hierbei handelt es sich um ein nicht fluoreszierendes Molekül, das lipophil ist und über die Zellmembran diffundieren kann. In den Zellen erfolgt durch Esterasen eine Abspaltung des Diacetats, sodass die Sonde in ihrer reduzierten, nichtfluoreszenten Form vorliegt und nur noch schwer membrangängig ist. Durch

in den Zellen vorhandene ROS kann das H₂DCF zu 2',7'-Dichlorofluorescein (DCF) oxidiert und über eine Fluoreszenzmessung nachgewiesen werden.

Zur Messung der ROS Menge während der Flavonoid Inkubation wurden 1x10⁴ Zellen auf 96-Wells geteilt. Nach 24 h wurden die Zellen mit den Flavonoiden in den angegebenen Konzentrationen für 1 Stunde inkubiert. Das Inkubationsmedium wurde dann durch farbloses DMEM ersetzt und die Zellen mit 10 µM H₂DCF-DA für 30 min inkubiert. Nachdem das Medium mit der Sonde entfernt worden war, wurden die Zellen erneut mit 100µl farblosem DMEM und 250 µM H₂O₂ versetzt. Die Fluoreszenz wurde im Plattenlesegerät über 1 Stunde gemessen (Ex: 485 nm, Em: 525 nm).

2.3.11 Nukleinsäuren

2.3.11.1 RNA Isolation mit Trizol (nach Chomczynski und Sacchi, 1987)

Auf den zuvor mit PBS gewaschenen Zellrasen wurde 0,8 ml Trizol[®] gegeben. Die Zellyse wurde durch wiederholtes Pipettieren per Kanüle beschleunigt. Durch Zugabe von 300 µl Chloroform und anschließender Zentrifugation konnte die RNA in der wässrigen Phase isoliert werden. Die Fällung der RNA erfolgte durch 0,6 ml Isopropanol. Nach 10 Minuten Inkubation bei RT wurde die RNA für 10 Minuten bei 4°C und 10000 rpm gefällt. Nach Waschen mit 0,5 ml 75 % EtOH und Trocknen wurde das Pellet in 20-35 µl DEPC-H₂O aufgenommen. Um die Sekundärstrukturen zu zerstören, erfolgte bei 55-60°C für 10 Minuten eine Denaturierung. Es folgte die photometrische Quantifizierung (2.3.10.2). (Chomczynski und Sacchi, 1987)

2.3.11.2 Konzentrationsbestimmung von DNA & RNA

Die Quantifizierung der DNA und RNA erfolgte am Photometer. Die Proben wurden zuvor jeweils 1:100 verdünnt und mittels einer Quarzküvette bei 260 nm (Absorptionsmaximum der Basen) und 280 nm (Absorptionsmaximum der Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin) gemessen.

Die Konzentrationsberechnung erfolgte nach folgenden Angaben für $\lambda = 260$ nm:

- DNA: 1 OD = 50 µg/ml DNA
- RNA: 1 OD = 40 µg/ml RNA
- Oligonukleotid: 1 OD = 20 µg/ml Oligonukleotid

Durch Berechnung des Verhältnisses 260/280 nm konnte die Reinheit der Nukleinsäuren bestimmt werden. Für reine DNA und RNA liegt dieses Verhältnis zwischen 1,8 und 2,0.

2.3.11.3 „Reverse Transcription PCR“ (RT-PCR)

Bei der RT-PCR dient eine RNA als Ausgangsmatrize für die PCR. Daher wird zuerst die RNA mittels der Reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Als Primer wurde hier ein Oligo-dT Primer verwendet, der an das 3'- polyadenylierte Ende der mRNA bindet. Die Ansätze wurden für 1 h bei 42°C inkubiert, abschließend die Reverse Transkriptase für 5 Minuten bei 95°C hitzeinaktiviert. Folgender Reaktionsansatz wurde verwendet (Puffer & Enzyme von Promega):

	Stammlösungen	Endkonzentration
5x Puffer		1 x
dNTPs	10 mM	0,5 mM
Oligo dT	50 µM	2 µM
Ribonuclease Inhibitor	40 U/µl	1,6 U/µl
Reverse Transkriptase	200 U/µl	8 U/µl
dH ₂ O DEPC		ad 25 µl
RNA		2 µg
Summe		25 µl

2.3.11.4 „Polymerase Chain Reaction“ (PCR)

Die PCR ist eine zyklische Reaktion, bei der sich von zu untersuchenden DNA-Abschnitten multiple Kopien (Amplifikationen) erstellen lassen (Mullis und Faloona, 1987). Für die PCR wird das Enzym Taq-Polymerase verwendet, das aus *Thermophilus Aquaticus* gewonnen wird. Die Taq-Polymerase hat den Vorteil, dass sie fast ohne Funktionsverlust Denaturierungsphasen bei 90-95°C übersteht. Für die PCR wurde die GoTaq® Polymerase von Promega verwendet.

Eine PCR setzt sich aus drei Schritten zusammen: Im ersten Schritt wird die DNA Matrize bei 95°C denaturiert, sodass beide komplementären Stränge als *Template* vorliegen. Im zweiten Schritt, dem *Annealing*, erfolgt die Hybridisierung der 2 spezifischen Primer an ihrer komplementären Sequenz der DNA. Im dritten Schritt, der Elongation, werden die Transkripte in 5' - 3' Richtung ausgehend von den hybridisierten Primern durch die Taq-Polymerase verlängert. Die Elongation erfolgt bei 72°C, hier besitzt die Taq-Polymerase ihr Temperaturoptimum. Das Prinzip der PCR ist die nun folgende zyklische Wiederholung der Schritte Denaturierung, *Annealing* und Elongation. Ab der zweiten Wiederholung entstehen DNA-Stränge definierter Größe, deren Anzahl sich bei jedem weiteren Reaktionsdurchlauf verdoppelt. Es kommt zu einem exponentiellen Wachstum der Anzahl dieser DNASTränge. Abschließend erfolgte ein finaler Elongationsschritt bei 72°C, um sicher zu stellen, dass die Polymerase alle noch offenen Transkripte beenden konnte.

Die *Annealing*-Temperatur der Primer wurde für alle Primer Paare zwischen 50°C und 65°C gewählt. Sie ist abhängig von der Länge der Primer (20 Basenpaare) und dem GC-Gehalt (50 % GC-Gehalt). Zur Abschätzung der T_m der Primer wurde folgende Näherung genutzt:

$$T_m [^{\circ}\text{C}] = 4 \times (\text{G+C}) + 2 \times (\text{A+T})$$

Anhand des Schätzwertes wurde die *Annealing*-Temperatur so gewählt, dass bei der Reaktion das spezifische Amplifikat erwarteter Größe entstand. Folgender Reaktionsansatz wurde verwendet: (Puffer & Enzyme von Promega)

	Stammlösungen	Endkonzentration
5x Puffer	5x	1x
MgCl₂	25 mM	2 mM
dNTPs	10 µM	0,2 µM
Primer 1	10 µM	0,2 µM
Primer 2	10 µM	0,2 µM
Template		y
Taq	5 U/µl	1 U/25 µl
H₂O		ad 25 µl
Summe		25 µl

Neben der Amplifikation von Fragmenten spezifischer Größe kann die PCR auch zur Amplifikation der kompletten Kodiersequenz von Genen genutzt werden. Dazu werden Primer anhand der Sequenz der mRNA des zu amplifizierenden Gens erstellt. Auch hier wird die *Annealing*-Temperatur anhand der Gleichung abgeschätzt. Allerdings wird für die Amplifikation eines Gens eine *proof-reading* Taq eingesetzt. Das entstandene Amplifikat wurde elektrophoretisch aufgetrennt und die in der Größe entsprechende Bande aus dem Agarosegel ausgeschnitten und eluiert.

Für die Amplifikation des *Nrf2-open-reading-frame* wurde folgender Reaktionsansatz verwendet:

	Stammlösungen	Endkonzentration
10x Puffer	10x	1x
MgCl ₂	25 mM	2 mM
dNTPs	10 µM	0,2 µM
Primer 1	10 µM	0,2 µM
Primer 2	10 µM	0,2 µM
Template		µg
proof-reading Pfu-Taq	1 U/µl	0,63 U/25 µl
H ₂ O		ad 25 µl
Summe		25 µl

2.3.11.5 Elektrophoretische Auftrennung von DNA & RNA

Bei der Gelelektrophorese werden Nukleinsäuren mithilfe einer Agarose Matrix nach ihrer Größe aufgetrennt. Für doppelsträngige und nach Denaturierung als *random coil* vorliegende einzelsträngige Nukleinsäuren bestimmter Länge ergibt sich so ein linearer Zusammenhang zwischen dem Logarithmus ihres Molekulargewichts und ihrer Laufweite im Gel. Zu große oder kleine Fragmente sind hierbei ausgenommen, da sie entweder zu sehr gestaucht werden oder zu klein für den Siebeffekt des Geles sind (Southern, 1979).

2.3.11.5.1 Agarosegele

Für alle DNA Elektrophoresen wurden Agarosegele verwendet. Agarose besteht aus einem Heteroglucan aus β -D-Galaktose und 3,6-Anhydro-L-Galaktose in alternierender α -1,3/ β -1,4-Verknüpfung. Agarosegele eignen sich zur Trennung von ca. 0,1 - 60 kb. Als Puffer wurde 1x TBE Puffer verwendet. 100 ml Puffer wurden mit 0,75 - 2 g Agarose versetzt und 2 x aufgekocht. Das TBE/Agarose Gemisch wurde unter Rühren bis auf Handwärme abgekühlt, mit dem Fluoreszenzfarbstoff EtBr (interkaliert zwischen den Basen) versetzt und in eine Kammer gegossen. Nach Erkalten des Geles wurde mit 1x TBE überschichtet und die Proben, die zuvor mit DNA-Auftragspuffer oder 10x GoTaq-Polymerase Puffer versetzt wurden, in den Taschen aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei 50 - 150 mA durchgeführt, bis die untere Blaumarkerfront $\frac{3}{4}$ der Trennstrecke durchlaufen hatte. Die Auswertung der Gele erfolgte unter UV an einer Geldokumentationsanlage.

2.3.11.6 Isolation von DNA aus Agarosegelen über Gelelution

Die Aufreinigung der DNA aus Agarosegelen erfolgte nach dem „Qiaquick Gel Extraction Kit“ (Qiagen) oder „Wizard® SV Gel and PCR cleanup System“ (Promega), Zymoclean nach den Angaben der Hersteller. Nach der Säulenelution wurde die DNA im Agarosegel quantifiziert. Dazu wurde 1/10 Volumen des Eluats aufgetragen und die DNA Menge mithilfe eines Größenstandards bestimmt.

2.3.11.7 Enzymatische Reaktionen an DNA

1) Restriktion von DNA mit Restriktionsendonukleasen vom Typ II

Für Restriktionsenzyme gilt, dass in der Regel 1 Unit Enzym bei optimalen Bedingungen von 37°C 1 μ g DNA in 1 h restringiert. Die Durchführung der Restriktionsanalysen erfolgte nach Angaben des Herstellers (Fermentas) und das Ergebnis wurde in einem Agarosegel überprüft.

2) Dephosphorylierung von 5'-Enden

Für Klonierungsreaktionen ist es notwendig, die 5'-terminalen Enden restringierter Plasmide durch eine alkalische Phosphatase zu dephosphorylieren, um eine Re-Ligation dieser DNA zu verhindern. Dazu wurde nach Ende der Restriktionsreaktion 1 μ l alkalische Phosphatase zu den Restriktionsansätzen gegeben und weitere 30 min bei 37°C inkubiert. Eine Inaktivierung der alkalischen Phosphatase wurde durch Inkubation bei 65°C, 10 min erzielt.

3) *Poly-A-tailing*

Bei der Ligation von *blunt-end* PCR-Produkten kann durch eine enzymatische Reaktion ein Poly-A-Schwanz angefügt werden, um zu gewährleisten, dass nur ein Insert einligiert wird. Ohne eine Polyadenylierung besteht die Gefahr, das

Insert mehrfach hintereinander einzufügen. Die Polyadenylierung wurde nach folgendem Schema durchgeführt:

	Stammlösungen	Endkonzentration
10x Puffer	10x	1x
dATP	10 µM	0,2 mM
Template		µg
Taq	5 U/µl	5 U/10 µl
H ₂ O		ad 10 µl
Summe		10 µl

2.3.12 Bakterien

2.3.12.1 Ligation von DNA

Bei einer Ligation werden 2 lineare DNA Fragmente über eine Phosphodiesterbindung, die von dem Enzym T4-Ligase katalysiert wird, miteinander verbunden. In der Regel wird die Ligation verwendet, um ein definiertes DNA Fragment in einen Vektor zu ligieren. Man unterscheidet die Ligation von *sticky end* oder *blunt end* Fragmenten. Die *sticky end* Ligation ist einfacher, da 2 Moleküle mit komplementären Enden ligiert werden. Bei einer *blunt end* Ligation müssen die glatten Enden ligiert werden. Die Ligation wurde nach Angaben des Herstellers über Nacht bei RT oder 4°C in der Regel im Verhältnis Vektor zu Insert von 1:3 oder 1:5 durchgeführt.

2.3.12.2 Transformation

Für die Transformation wurden 50 - 100 µl kompetente Zellen (DH5α) auf Eis aufgetaut. Nach Zugabe der DNA wurden die Zellen für weitere 10 – 30 Minuten auf Eis inkubiert. Der anschließende Hitzeschock erfolgte für 45 sek bei 42°C. Nach Zugabe von 900 µl LB-Medium wurden die Zellen für 1 h bei 37°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Nach einer Volumenreduktion (5 min. 2000xg) wurden die Zellen auf LB-Ampicilin oder LB-Kanamycin Platten ausplattiert. Nach ca. 16h werden die transformierten Zellen als Plaques auf den Platten sichtbar. Je ein Plaque kann in 3 ml LB-Medium mit Antibiotika-Zusatz aufgenommen werden.

2.3.12.3 Isolation von Plasmid DNA

2.3.12.3.1 Mini-Präparation (Chowdhury, 1991)

3 ml über Nacht Kultur wurden 1 min bei 13000 rpm abzentrifugiert. 0,5 ml Überstand wurde auf dem Zellpellet belassen und 0,5 ml Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol zur Zellextraktion zugegeben. Nach 5 min Zentrifugation bei 10000 rpm wurde die durch Zugabe von Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol freigesetzte DNA mittels Isopropanol aus der wässrigen Phase bei 4°C (5 min, 10000 rpm) gefällt. Nach Waschen des Pellet mit EtOH und Trocknen wurde dieses in 50 µl dH₂O aufgenommen und für 30 min bei RT mit 1 µl RNase A inkubiert.

2.3.12.3.2 Alkalische Lyse (nach Birnboim und Doly, 1979)

Bei der alkalischen Lyse wird eine schnelle Abfolge von De- und Renaturierung genutzt, um die kleinere Plasmid DNA von der bakteriellen DNA zu trennen. Nach der Denaturierung fällt die bakterielle DNA als Netzwerk aus. Die Plasmid DNA dagegen kann aufgrund der geringeren Größe renaturieren und verbleibt im Überstand. 3 ml Kultur wurden abzentrifugiert, das erhaltene Pellet wurde in 100 µl GTE-Lösung (osmotischer Schock) resuspendiert und für 5 min inkubiert. Nach Zugabe von 1 µl RNase für 20 - 25 Minuten bei Raumtemperatur wurden 200 µl NaOH/SDS – Lösung zur Neutralisierung zugegeben. Nach 5 min wurden 150 µl Kalium-Acetat-Lösung hinzugefügt und nach kurzem Mischen für weitere 5 min auf Eis inkubiert, um die Denaturierung zu stoppen. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand vom entstandenen Pellet abgenommen und die darin enthaltene Plasmid-DNA mit kaltem 95 % -igem EtOH gefällt. Das gewaschene und getrocknete Pellet wurde in 30 µl dH₂O oder in TE-Puffer aufgenommen.

2.3.12.3.3 Plasmid Präparation (Mini, Midi & Maxi Kits, Qiagen)

Die durchgeführten Mini-, Midi- und Maxi-Plasmid Präparationen erfolgten nach Angaben des Herstellers (Qiagen, Hilden). Die DNA-Isolation erfolgt auch hier nach den Prinzipien der alkalischen Lyse.

2.3.12.4 Glycerin Stocks

Zur längeren Konservierung von Bakterienklonen wurden Glycerin Stocks hergestellt. Dazu wurden 1,5 ml Bakterienkultur zu 1 ml Glycerinlösung gegeben, sofort auf Eis gestellt und in Kryoröhrchen bei -80°C eingefroren. Mithilfe einer Impföse konnte aus dem eingefrorenen Glycerin Stock eine frische Kultur angeimpft werden.

2.3.13 Proteine

2.3.13.1 Isolation von Proteinen

2.3.13.1.1 Gesamtprotein Lysate

Für die Proteinisolation wurde als Lysepuffer RIPA-Puffer verwendet. Der Puffer wurde zusätzlich mit den Proteaseinhibitoren Aprotinin & Leupeptin (oder einem Protease-Inhibitor Cocktail) und PMSF versetzt. Der Zellrasen wurde mit 1x PBS gewaschen. Nach Zugabe von Trypsin konnten die Zellen ebenfalls mit 1x PBS oder mit dem Mediumüberstand abgelöst werden. Es wurde 2x für 2 min bei 5000xg zentrifugiert, wobei im zweiten Schritt noch einmal mit PBS gewaschen wurde. Danach wurden die Pellets in RIPA-Puffer (+Protease Inhibitoren) aufgenommen, gemischt und bei -80°C eingefroren. Nach Auftauen und erneutem Einfrieren wurde für 10 Minuten bei 10000xg zentrifugiert. Für die im Überstand enthaltenen Proteine wurde nach einer 1:5 Verdünnung eine Proteinbestimmung durchgeführt.

2.3.12.1.2 Zytosolische & Nukleäre Fraktionen

Für die zelluläre Fraktionierung in Zytosolfraktion und Kernfraktion wurden sowohl die adhärennten als auch die bereits abgelösten Zellen vereint. Dazu wurden die Zellen entweder nach vorheriger Trypsinisierung oder direkt mit dem Mediumüberstand von den Zellkulturplatten ab gespült und 2x mit 1x PBS gewaschen (10 min, 2000 x g). Die erhaltenen Pellets wurden in 50 µl Puffer A resuspendiert und für 15 min auf Eis inkubiert. Zur vollständigen Lyse der Zellen wurde die Zellsuspension 4x durch eine 25 Gauge Kanüle gezogen. Anschließend wurde die Zellsuspension mit 25 µl 10 % [v/v] NP-40/H₂O versetzt und kurz kräftig gevortext. Nach Zentrifugation (1 min, 13000 rpm, 4°C) konnte die Zytosolfraktion abgenommen und bei -80°C gelagert werden. Das Pellet wurde mit 75 µl Puffer B versetzt und 25 min bei 4°C mit einem Metallrührer lysiert. Die nach Zentrifugation (5 min, 13000 rpm, 4°C) erhaltene Kernfraktion wurde ebenfalls bei -80°C gelagert. Nach einer 1:5 oder 1:10 Verdünnung wurde eine Proteinbestimmung durchgeführt.

2.3.13.2 Proteinbestimmung

2.3.13.2.1 Lowry

Die Proteinbestimmung erfolgte mit dem „Bio-Rad DC Protein Assay“ von Bio-Rad Laboratories nach Angaben des Herstellers in 96-Wellplatten. Als Proteinstandard wurde BSA (1mg/ml) verwendet.

2.3.13.2.2 Bradford

Die Proteinbestimmung erfolgte mit einem modifizierten Assay nach Bradford (1976). Dazu wurden 10 µl Probe mit 90 µl Bradfordreagenz versetzt (1:5 in dH₂O verdünnt und filtriert), 15 min bei RT inkubiert und anschließend bei 595 nm im Plattenlesegerät gemessen. Als Standard wurde eine BSA-Verdünnungsreihe verwendet (Stock: 1 mg/ml; 0,05-0,5 mg/ml)

2.3.13.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli

Die Gelelektrophorese der Proteine erfolgte in Polyacrylamidgelen mit Sammel- und Trenngel. Hierzu wurde eine Lösung aus Acrylamid und Bisacrylamid durch APS und TEMED zur radikalischen Polymerisation angeregt, wobei das Acrylamid zu langen Ketten reagiert, die durch das bifunktionelle Bisacrylamid vernetzt werden. Je nach Prozentigkeit des Trenngels (10 % (größere Fragmente) -15 % (kleinere Fragmente)) konnten unterschiedliche Größenbereiche schärfer aufgetrennt werden.

Zusammensetzung der Gele: (Ansatz für Mini-Gele, doppelter Ansatz für großes Gel)

	Trenngel [10 %]	Trenngel [12 %]	Trenngel [15 %]	Sammelgel [4,5 %]
Acrylamid- Bisacrylamidlösung 30 %	2 ml	2,4 ml	3 ml	0,608 ml
Trenn-/ Sammelgelpuffer	1,5 ml	1,5 ml	1,5 ml	2 ml
dH ₂ O	2,5 ml	2,1 ml	1,5 ml	1,380 ml
APS 10 % [w/v]	30 µl	30 µl	30 µl	24 µl
TEMED	5 µl	5 µl	5 µl	4 µl

Die Polymerisation des Trenngels erfolgte zwischen 2 Glasplatten für 1 h, wobei das Gel mit Butanol überschichtet wurde. Nach Abgießen des Butanols wurde das Sammelgel (4,5 %) gegossen und der Kamm luftblasenfrei eingeführt, die Polymerisation dauerte 30 min.

Die Ladung von Proteinen ist aufgrund der unterschiedlichen Aminosäure-Zusammensetzung stark variierend. Eine Auftrennung nach Größe kann daher nur in denaturierter Form erfolgen. Die Proteinproben wurden auf 25 µg und 50 µg Protein pro Proben tasche eingestellt und mit ¼ Volumen SDS Auftragspuffer versetzt. Nach 10-minütiger Inkubation bei 95°C wurden die Proben sofort auf Eis überführt. Das im Auftragspuffer enthaltene β-Mercaptoethanol sorgt für eine Auflösung der Disulfidbrücken. Das SDS verursacht zusätzlich durch Anlagerung an die durch die Denaturierung exponierten hydrophoben Abschnitte der Proteine ein Auflösen ihrer Struktur. Die resultierenden Komplexe erhalten durch die Sulfatgruppen des SDS eine gleichmäßig verteilte negative Ladung, sodass die Laufgeschwindigkeit der Proteine im Gel nur noch von der relativen Molekülmasse abhängig ist. Die Elektrophorese erfolgte zunächst mit 1x SDS-Laufpuffer für 30 Minuten bei 15 - 30 mA, bis das Trenngel erreicht war und für weitere 90 - 120 Minuten bei 150 V bis zur vollständigen Auftrennung der Proteinproben.

2.3.13.4 Transfer von Proteinen auf PVDF-Membranen (Immunoblot)

Der Proteintransfer erfolgte als *semi-dry* Blot in einer Blottingapparatur. Der Transfer der Proteine aus dem Gel auf die PVDF-Membran erfolgt von Kathode zu Anode in einem Sandwich aus Whatmannpapieren. Für den Aufbau des Blots wurden jeweils 4 Whatmannpapiere in Anoden- und Kathodenpuffer getränkt und das Trenngel und die PVDF-Membran auf die gewünschte Größe zugeschnitten. Die Membran wurde für einige Sekunden in Methanol geschwenkt und, um ein Austrocknen zu verhindern, in Wasser gehalten. Je nach Ausrichtung der Blotting Apparatur wurden zuerst 4 in Anoden- oder Kathodenpuffer getränkte Whatmannpapiere luftblasenfrei aufgelegt. Die Reihenfolge von PVDF-Membran und Gel erfolgte so, dass die Membran immer Kontakt zu den in Anodenpuffer

getränkten Papieren hatte. Als Letztes wurden die restlichen 4 Whatmannpapiere aufgelegt. Der Blot wurde bei 200 mA und 30 W für 30 min durchgeführt.

2.3.13.5 Färbung filtergebundener Proteine

2.3.13.5.1 Coomassie

Coomassie Brilliant Blau ist ein Triphenylmethan-Farbstoff, der in saurem Medium durch elektrostatische Wechselwirkungen an freie geladene Amino- und Iminogruppen binden kann. Proteine auf Membranen lassen sich so durch Coomassie Brilliant Blau sichtbar machen. Dazu wurde die Membran kurz in Coomassie Färbelösung geschwenkt, bis sich eine einheitlich blaue Färbung zeigte. Durch darauffolgendes Schwenken in Coomassie-Entfärbelösung konnten die Proteinbanden gegenüber dem Hintergrund sichtbar gemacht werden.

2.3.13.5.2 Ponceau-S

Die Ponceau-S Färbung, bei der das Ponceau an die positiv geladenen Aminogruppen der Proteine bindet, ist reversibel. Daher wurde sie in erster Linie dazu verwendet, direkt nach dem Blotten den Transfer der Proteine auf die PVDF-Membranen zu überprüfen. Dazu wurde die Membran direkt nach dem Blotten in dH₂O überführt, um ein Austrocknen zu verhindern und dann kurz in Ponceau-S Lösung geschwenkt. Die Entfärbung der Membran erfolgte in H₂O, bis sich die Proteine gut erkennen ließen.

2.3.13.6 Immunologischer Nachweis spezifischer Proteine

Die PVDF-Membran wurde zur Blockierung in 5 % Blockierlösung für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Primär-Antikörperinkubation erfolgte ebenfalls in 5 % Blockierlösung über Nacht bei 4°C. Nach Ende der Primär-Antikörperinkubation wurde die Membran 3x 15 min in TBST unter leichtem Schütteln gewaschen. Die Inkubation mit dem entsprechenden Peroxidasegekoppelten Sekundär-Antikörper erfolgte in 5 %-iger Blockierlösung für 1 h bei RT. Danach wurde erneut 3x 15 min in TBST unter leichtem Schütteln gewaschen.

2.3.13.7 Chemilumineszenz Detektion

Die Chemilumineszenz Detektion erfolgte mittels „Super Signaling Kit“ von PIERCE. Durch Verwendung der HRP-gekoppelten Sekundär-Antikörper konnte in Anwesenheit von H₂O₂ das Substrat Luminol zu einem Licht emittierenden Intermediat oxidiert werden. Die Detektion der Lichtsignale erfolgte durch Auflegen von Röntgenfilmen für unterschiedliche Zeiträume. Die exponierten Filme wurden für ca. 10 sek in Entwickler geschwenkt, kurz in Wasser gewaschen und für ca. 3 min in Fixierer inkubiert. Nach Ende des Fixierens wurden die Filme für wenige min gewässert und getrocknet.

2.3.13.8 Strippen von PVDF- Membranen

Um auf einer bereits mit Primär- und Sekundär-Antikörper umgesetzten Membran noch ein weiteres Protein immunologisch zu detektieren, wurden die PVDF-Membranen *gestrippt*. Dazu wurde die Membran entweder direkt nach der Chemilumineszenz Detektion für 10 min in TBST gewaschen oder bereits getrocknete Membranen wurden für 10 sek in Methanol geschwenkt und dann 10 min in TBST gewaschen. Dann erfolgte eine Inkubation für 30 min bei 37°C in Stripping Buffer (PIERCE) (zuvor auf 37°C erwärmt) unter leichtem Schütteln. Am Ende der Reaktion wurde die Membran für 10 min in TBST gewaschen und erneut mit den gewünschten Antikörpern umgesetzt (siehe Abschnitt 2.3.12.6).

2.3.14 Densitometrische Auswertung

Die densitometrische Auswertung von Immunoblot-Analysen oder RT-PCR Dokumentationen wurde mit Hilfe von TINA 2.0 oder ImageJ angefertigt. Dabei wurden die Intensitäten der detektierten Banden als optische Dichte pro mm² ermittelt und um den Hintergrund in direkter Nähe der detektierten Banden normiert. Anschließend wurde der Quotient aus den Bandenintensitäten der inkubierten Proben und den Bandenintensitäten der Lösemittelkontrolle gebildet und die Effekte als relative Werte der Kontrolle dargestellt. Die Signifikanz wurde mittels Oneway-ANOVA ermittelt.

2.3.15 Statistische Auswertung

Alle Daten sind als Mittelwerte \pm Stabw oder SEM von mindestens 3 unabhängigen Messungen angegeben. Für die Analyse der statistischen Signifikanz wurde eine einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) durchgeführt. Als post hoc-Test wurde ein Bonferroni Test durchgeführt (GraphPad Prism). Unterschiede wurden bei $p < 0,05$ als signifikant erachtet.

3. Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung ausgesuchter Flavonoide auf intrazelluläre Signalwege, im Speziellen auf den Nrf2-Signalweg, untersucht. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen sich in zwei Abschnitte gliedern.

Im ersten Abschnitt wurde die Wirkung von ausgewählten Flavonoiden auf den Redoxstatus wie auch ihre Zytotoxizität in den verschiedenen Zelllinien untersucht. Die Bestimmung der antioxidativen Kapazität und auftretende zytotoxische Effekte der Flavonoide sind bei der Charakterisierung der Wirkung auf die humanen Kolon-Karzinomzellen Hct 116 Zellen unerlässlich.

Der zweite Abschnitt beschäftigt sich mit dem Einfluss der zuvor charakterisierten Flavonoide auf den Nrf2-Signalweg. Dabei ist von Bedeutung, welche Effekte Flavonoide auf den Transkriptionsfaktor selbst, aber auch auf weitere Komponenten des Signalwegs haben. Neben der Wirkung auf das Nrf2-responsive DNA-Element ARE wurden zudem Veränderungen der proteasomalen Degradation wie auch die transkriptionelle Induktion von Nrf2-Zielgenen untersucht.

3.1 Strukturcharakteristika von Flavonoiden

3.1.1 Antioxidatives Potential (TEAC)

Da die protektiven Eigenschaften der untersuchten sekundären Pflanzeninhaltsstoffe gegenüber kardiovaskulären Erkrankungen und chronischen Entzündungen meist mit ihrer antioxidativen Kapazität korreliert werden (Knekt, Kumpulainen et al., 2002) und des Weiteren bekannt ist, dass Flavonoide durch ihre Radikalfänger-Eigenschaften verschiedene zelluläre Signalwege modulieren (Spencer, 2008), wurde die Fähigkeit ROS abzufangen zunächst mit einem zellfreien Assay, dem sogenannten (*trolox equivalent antioxidative capacity*) TEAC-Assay untersucht.

Dabei wurde photometrisch die Entfärbung des grünen ABTS-Radikals zu ABTS ermittelt. Als Referenzverbindung wird das Vitamin E-Derivat Trolox eingesetzt. Neben den Flavonen Luteolin und Apigenin wurden auch die Flavonole Quercetin, Kaempferol, Galangin, Myricetin und Fisetin getestet.

In Abbildung 3.1 und 3.2 sind die antioxidativen Eigenschaften unterschiedlicher Flavonoide im Vergleich zu der Referenzsubstanz Trolox dargestellt. Trolox wies bei einer Konzentration von 10 μM eine Reduktion der Absorption von etwa 57 % auf. Quercetin, Myricetin, Fisetin zeigten in Abhängigkeit von der Konzentration ein stark antioxidatives Potential (Abb. 3.1 & 3.2.). Quercetin reduzierte dabei die Absorption um

81 % bei einer Konzentration von 10 μM , gefolgt von Fisetin und Myricetin mit einer Reduktion um etwa 70 %. Diese Flavonoide zeigten im Vergleich zu Trolox eine stärkere antioxidative Kapazität. In einer Konzentration von 10 μM reduzierten Luteolin, Kaempferol und Morin die Absorption um 35 %, 33 % und 32 % und wirkten somit weniger antioxidativ als Trolox. Apigenin, Chrysin und Galangin waren dagegen nicht in der Lage, das ABTS-Radikal zu reduzieren (Abb. 3.1 & 3.2). Die Fähigkeit Radikale zu neutralisieren nimmt in folgender Reihenfolge ab:

Quercetin > Fisetin > Myricetin > Luteolin > Morin > Kaempferol > Apigenin > Chrysin > Galangin

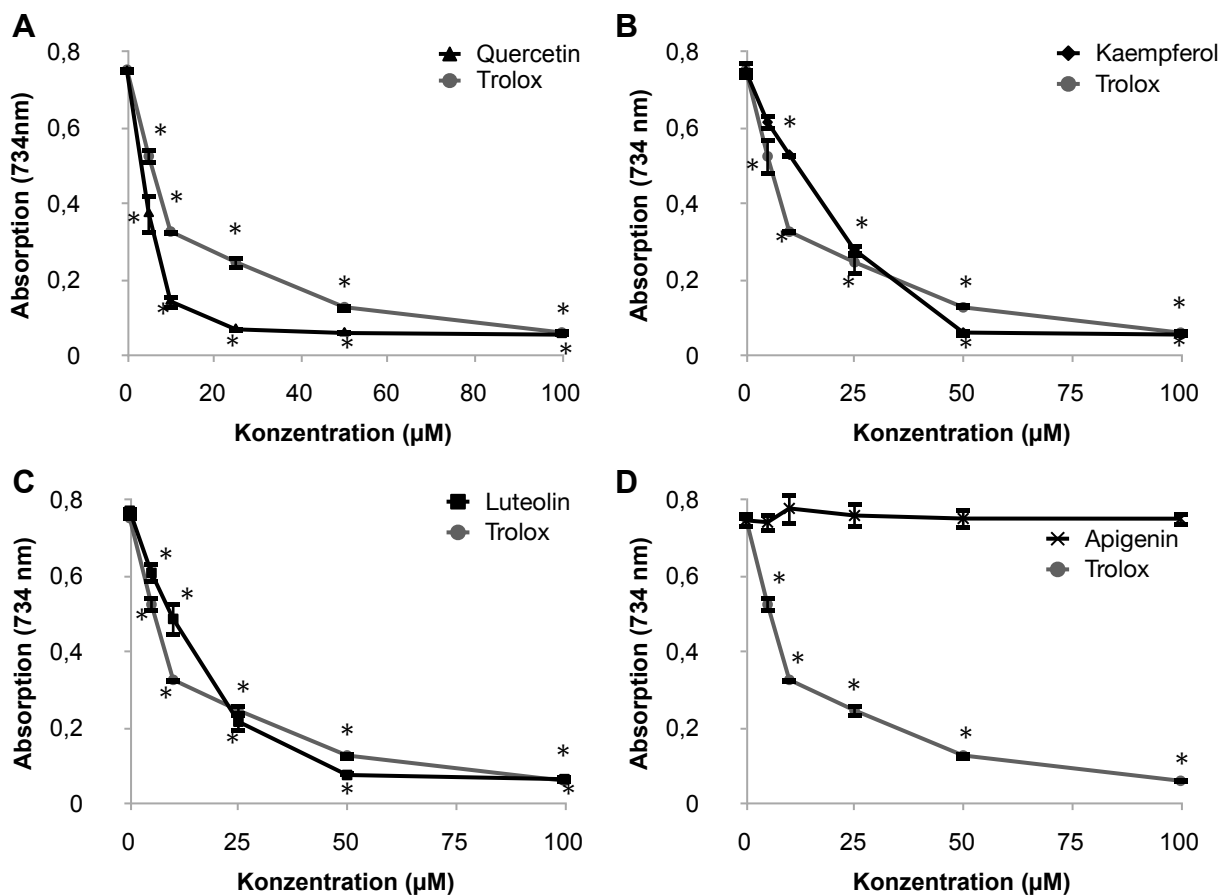


Abb.3.1.: Antioxidatives Potential von Flavonoiden

Dargestellt ist die Abnahme der Absorption (bei 734 nm) der grünen ABTS Lösung durch Zugabe von (A) Quercetin, (B) Kaempferol, (C) Luteolin und (D) Apigenin im Vergleich zu der Referenzsubstanz Trolox (synthetisches Vitamin E Derivat). Angegeben sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Messungen \pm SEM; * = $p < 0,05$ getestet mit einer Oneway ANOVA und Bonferroni post hoc Test gegen die Lösemittelkontrolle.

Tabelle 3.1 fasst die im TEAC Assay ermittelten Reduktionskapazitäten bei 10 μM eingesetzter Substanz im Vergleich zu Trolox zusammen. Steigt die Konzentration an eingesetztem Flavonoid, steigt auch die im TEAC Assay gemessene Kapazität. So entwickelte Kaempferol im Vergleich zu Morin ein stärkeres antioxidatives Potential bei einer Konzentration von 50 μM (Abb.3.1(B) & 3.2 (D)) Bis auf Apigenin, Chrysin und

Substanz	0 μM	10 μM	Abnahme (%)
Trolox	0,753	0,327	57
Quercetin	0,749	0,144	81
Fisetin	0,739	0,228	69
Myricetin	0,773	0,238	69
Luteolin	0,772	0,488	37
Morin	0,767	0,523	32
Kaempferol	0,749	0,530	29
Apigenin	0,747	0,778	≈ 0
Chrysin	0,767	0,758	≈ 0
Galangin	0,753	0,745	≈ 0

Tabelle 3.1: Antioxidatives Potential untersuchter Flavonoide
 Aufgeföhrt sind die im TEAC-Assay bestimmten Mittelwerte der untersuchten Flavonoide im Vergleich zu der Referenzsubstanz Trolox. Dabei werden die jeweiligen Kontrollen (0 μM) und die Inkubationswerte bei 10 μM sowie die prozentuale Abnahme der Absorption verglichen.

Fisetin besaßen alle untersuchten Verbindungen in ihrer aglykosidischen Form eine antioxidative Kapazität.

Um jedoch die antioxidative Wirkung der hier verwendeten Flavonoide in der lebenden Zelle zu bestimmen, mussten verschiedene zusätzliche Parameter berücksichtigt werden, welche mit dem TEAC Assay nicht erfasst werden konnten. Meist werden Flavonoide nicht als Aglyka mit der Nahrung aufgenommen. Sie liegen in Pflanzen meist als glykosidische Verbindungen vor, die bereits ein verändertes antioxidatives Potential im Vergleich zu ihren Aglyka besitzen. Zudem werden sie metabolisiert, bevor sie von den meisten Zellen aufgenommen werden. Lediglich die Zellen des Darms kommen mit den Glykosiden in Kontakt. Allerdings kommt es auch in Darmzellen zu einer Metabolisierung der Flavonoide. Durch die Metabolisierung entstehen sulfatierte oder glucuronidierte oder auch methylierte Derivate, welche ein von den Aglyka abweichendes Reaktionsverhalten zeigen können. Aus diesem Grund ist die Feststellung der antioxidativen Wirksamkeit von Flavonoiden in Zellen von Bedeutung. Da es sich bei dem hier verwendeten TEAC-Assay um einen zellfreien Test handelt, wurde mit Hilfe des DCF Assays die radikalfangende Eigenschaft der Flavonoide im Zellkultursystem untersucht.

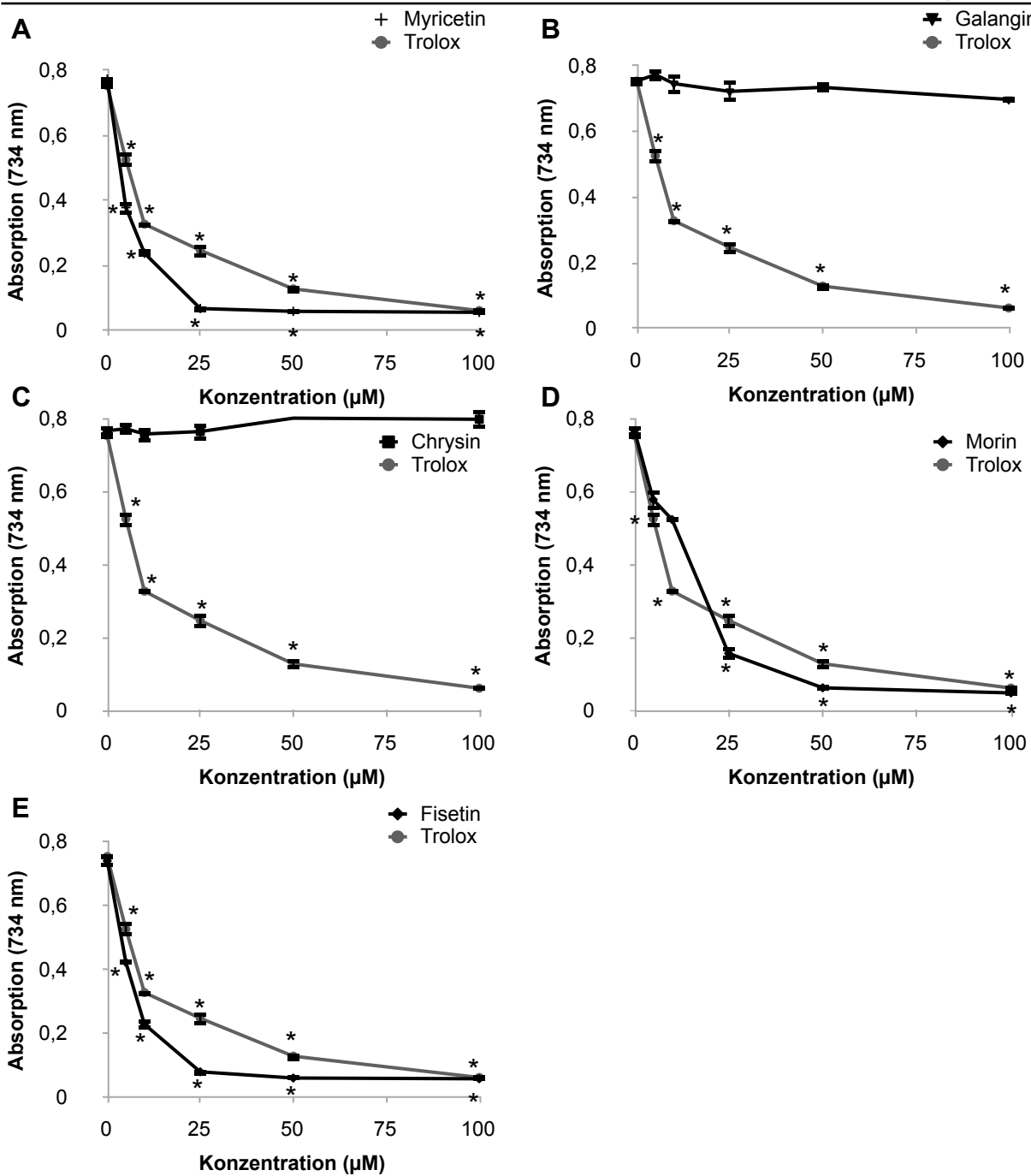


Abb.3.2: Antioxidatives Potential von Flavonoiden (TEAC Assay)

Dargestellt ist die Abnahme der Absorption (bei 734 nm) der grünen ABTS Lösung durch Zugabe von (A) Myricetin, (B) Galangin, (C) Chrysin, (D) Morin und (E) Fisetin im Vergleich zu der Referenzsubstanz Trolox (synthetisches Vitamin E Derivat). Angegeben sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Messungen \pm SEM; * = $p < 0,05$ getestet mit einer Oneway ANOVA und Bonferroni post hoc Test gegen die Lösemittelkontrolle.

3.1.2 Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (DCF)

Der Dichloro-dihydrofluorescein (DCF)-Assay verläuft über die Aufnahme eines nicht fluoreszenten Moleküls, welches zudem, mit zwei Acetatresten maskiert, die Zellmembran passieren kann. Im Zellinneren werden die Acetatreste durch Esterasen abgespalten und so das H₂DCF in der Zelle akkumuliert. Durch die Reaktion mit ROS

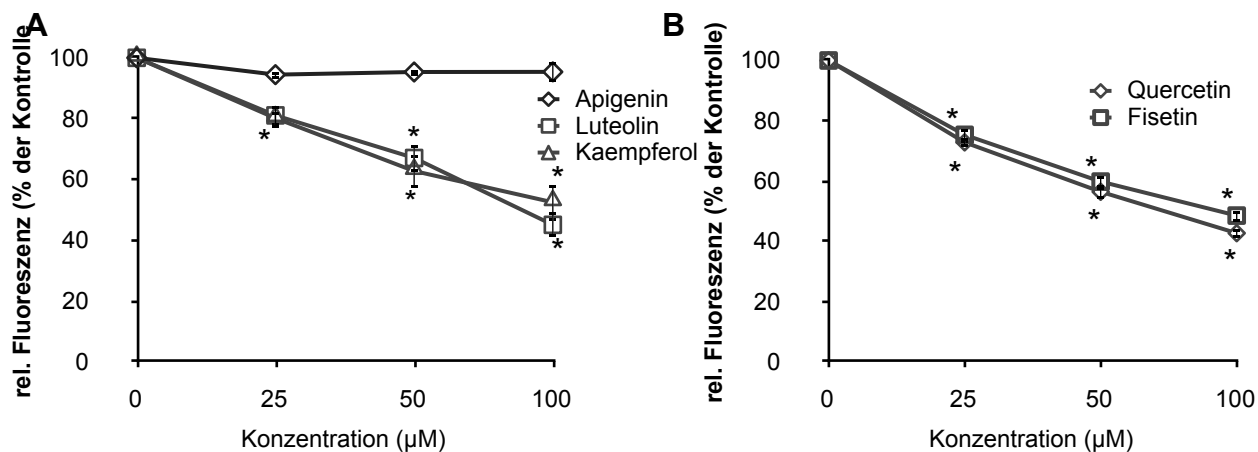


Abb.3.3: Wirkung von Flavonoiden auf die Bildung von ROS nach H₂O₂ Bolusgabe in Hct 116 Zellen

1 x 10⁴ Zellen/Well wurden auf eine 96-Well-Platte ausgesät und mit den angegebenen Konzentrationen (A) Apigenin, Luteolin und Kaempferol oder (B) Quercetin und Fisetin für 1h behandelt. Nach Zugabe der DCF-Sonde und 250 µM H₂O₂ wurde der ROS-bedingte Fluoreszenzanstieg über 1h gemessen und der Endpunkt gegen die Konzentration aufgetragen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Messungen bezogen auf die Lösemittelkontrolle ± SEM; * = p<0,05 getestet mit einer Oneway ANOVA und Bonferroni post hoc Test gegen die Lösemittelkontrolle.

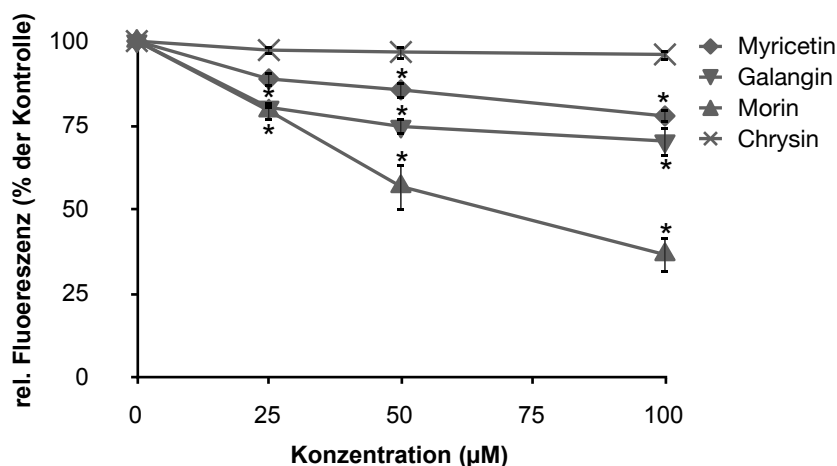


Abb.3.4: Wirkung von Flavonoiden auf die Bildung von ROS nach H₂O₂ Bolusgabe in Hct 116 Zellen

1 x 10⁴ Zellen/Well wurden auf eine 96-Well-Platte ausgesät und mit den angegebenen Konzentrationen Myricetin, Galangin, Morin und Chrysin für 1h behandelt. Nach Zugabe der DCF-Sonde und 250 µM H₂O₂ wurde der ROS-bedingte Fluoreszenzanstieg über 1h gemessen und der Endpunkt gegen die Konzentration aufgetragen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Messungen bezogen auf die Lösemittelkontrolle ± SEM; * = p<0,05 getestet mit einer Oneway ANOVA und Bonferroni post hoc Test gegen die Lösemittelkontrolle.

wird das H₂DCF oxidiert und fluoresziert. Der Anstieg der Fluoreszenz dient als Maß für intrazelluläre ROS-Menge.

Hct 116 Zellen wurden zunächst mit den untersuchten Flavonoiden und anschließend mit der Fluoreszenzsonde 2',7'-Dichloro-dihydrofluorescein-diacetat inkubiert. Nach der Aufnahme des Dichloro-dihydrofluorescein-diacetat und der Reaktion mit ROS wird es zum Dichloro-dihydrofluorescein oxidiert. Wird den Zellen eine Substanz zugesetzt, welche Radikale abfangen kann, wird eine Abnahme der Fluoreszenz detektiert.

Abbildung 3.3 und 3.4 zeigen die Abnahme der Fluoreszenz in Abhängigkeit von der Konzentration der Flavonoidbehandlung. Da unter Zellkulturbedingungen jedoch nur eine geringe Menge an ROS gebildet wurde, war eine Abnahme der ROS Menge durch die Zugabe einer antioxidativen Substanz nur schwer zu detektieren. Die Menge an endogenen ROS wurde in einem späteren Versuch (Abb. 3.5 & 3.6) gemessen. Die Zugabe von H₂O₂ ermöglicht zudem die Darstellung der Wirkung von Flavonoiden auf bereits akkumulierte ROS, während die DCF-Messung ohne Bolusgabe von H₂O₂, die Wirkung auf die intrazelluläre ROS Menge ermöglicht.

Substanz	25 μ M	50 μ M	100 μ M
Morin	79,3	56,7	36,5
Quercetin	72,8	56,4	42,7
Luteolin	81,1	67,1	45,1
Fisetin	75,3	59,8	48,5
Kaempferol	80,1	62,8	52,5
Galangin	80,3	74,6	70,3
Myricetin	88,8	85,5	77,7
Apigenin	94,5	95,3	95,4
Chrysin	97,3	96,8	96,0

Tabelle 3.2: Abnahme der DCF Fluoreszenz nach H₂O₂ Bolusgabe
Aufgeführt sind die beim DCF-Assay bestimmten prozentualen Mittelwerte der Fluoreszenzintensitäten durch die Inkubation mit den Flavonoiden in den angegebenen Konzentrationen im Vergleich zur Lösemittelkontrolle.

Abbildung 3.3 (A) und (B) zeigen eine starke Abnahme der ROS vermittelten Fluoreszenz für Quercetin, Fisetin, Kaempferol und Luteolin. In Abbildung 3.3 (A) ist die Abnahme der Fluoreszenz für Luteolin und Kaempferol zu sehen. Bei Behandlung der Hct 116 Zellen mit Kaempferol konnte eine Reduktion der Fluoreszenz auf 52 % des Ausgangswertes detektiert werden. Bei Luteolin wurde eine Abnahme auf 35 % gemessen. Apigenin hatte auf die H₂O₂ vermittelte ROS-Akkumulation keinen Effekt (Abb.3.3 (A)).

In Abbildung 3.3 (B) zeigt sich sowohl für Fisetin als auch für Quercetin eine starke Abnahme der Fluoreszenz. Fisetin reduziert die ROS-vermittelte DCF-Fluoreszenz auf 45 % und Quercetin auf 43 %. In Abbildung 3.4 sind die DCF Ergebnisse der restlichen untersuchten Flavonoide zu sehen. Myricetin und Galangin erreichten eine moderate Fluoreszenzverminderung auf 70 % und 72 % des Ausgangswertes, wohingegen Morin die Fluoreszenz nur auf 36 % senkte.

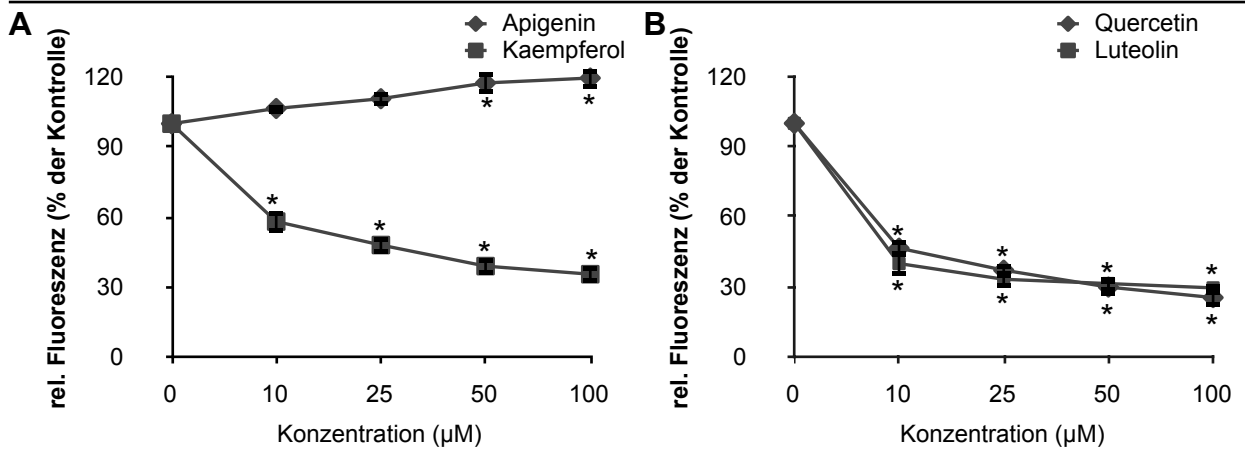


Abb.3.5: Wirkung von Flavonoiden auf die endogene ROS Menge in Hct 116 Zellen
 1×10^4 Zellen/Well wurden auf eine 96-Well-Platte ausgesät und mit den angegebenen Konzentrationen (A) Apigenin und Kaempferol oder (B) Quercetin und Luteolin für 1h behandelt. Nach Zugabe der DCF-Sonde wurde der ROS-bedingte Fluoreszenzanstieg über 1h gemessen und der Endpunkt gegen die Konzentration aufgetragen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Messungen bezogen auf die Lösemittelkontrolle \pm SEM; $p < 0,05$, getestet mit einer Oneway ANOVA und Bonferroni post hoc Test gegen die Lösemittelkontrolle.

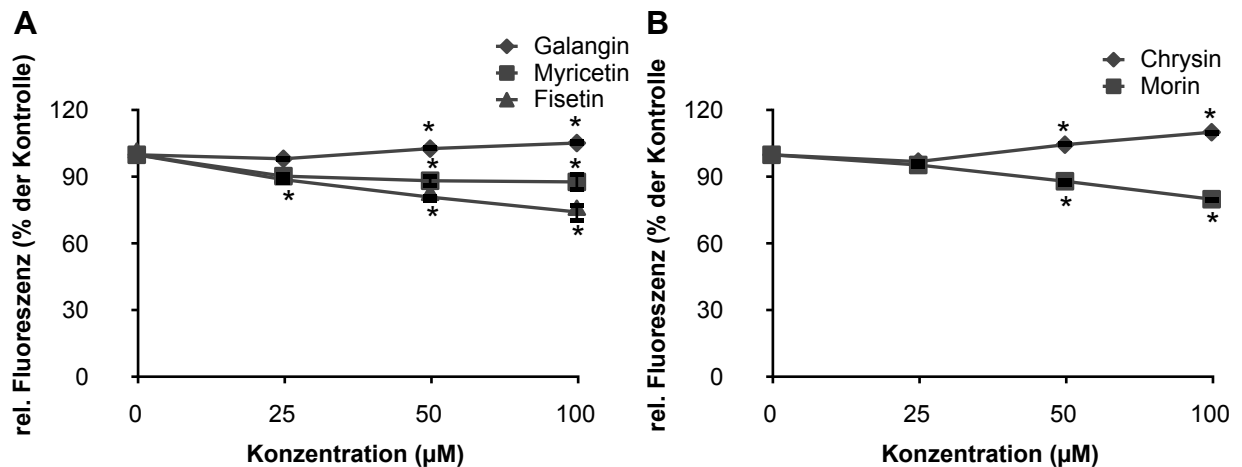


Abb.3.6: Wirkung von Flavonoiden auf die endogene ROS Menge in Hct 116 Zellen
 1×10^4 Zellen/Well wurden auf eine 96-Well-Platte ausgesät und mit den angegebenen Konzentrationen (A) Galangin, Myricetin und Fisetin oder (B) Chrysin und Morin für 1h behandelt. Nach Zugabe der DCF-Sonde wurde der ROS-bedingte Fluoreszenzanstieg über 1h gemessen und der Endpunkt gegen die Konzentration aufgetragen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Messungen bezogen auf die Lösemittelkontrolle \pm SEM; * = $p < 0,05$ getestet mit einer Oneway ANOVA und Bonferroni post hoc Test gegen die Lösemittelkontrolle.

Vergleichbar zu Apigenin zeigte auch Chrysin keinen Effekt auf die akkumulierte ROS-Menge.

Die Abbildungen 3.5 und 3.6 zeigen die Wirkung der untersuchten Flavonoide auf die endogene ROS Menge. Apigenin (Abb.3.5 (A)) zeigte nicht nur im TEAC Assay eine sehr schwache antioxidative Kapazität, auch im DCF-Assay war keine Verringerung der Fluoreszenz zu messen. Im Gegensatz zu den anderen Flavonoiden bewirkt Apigenin in Hct 116 Zellen eine signifikante Zunahme der Fluoreszenz. Kaempferol (Abb. 3.5 (A)) Luteolin und Quercetin (Abb. 3.5 (B)) senkten die intrazelluläre ROS Menge stark.

Quercetin, Kaempferol und Luteolin erniedrigten die endogene ROS-Menge auf 21 %, 33 % und 29 % bei einer Konzentration von 100 μ M. Fisetin, Myricetin und Morin (Abb. 3.6 (A) & (B)) reduzierten die Fluoreszenz im Vergleich zu Quercetin, Luteolin und Kaempferol nur leicht. Fisetin erreichte eine Abnahme auf 74 % des Ausgangswertes. Bei den restlichen untersuchten Flavonoiden zeigte Morin eine Reduktion der Fluoreszenz auf 80 %.

Nach der Behandlung der Zellen mit Apigenin und Chrysin konnte keine Verminderung der ROS-Menge gemessen werden. Auch in dem erneut durchgeführten Assay, welcher die Wirkung auf die endogene ROS Menge detektiert, steigerte Apigenin die Fluoreszenz leicht. Im Gegensatz zu dem zuvor durchgeführten DCF-Assay mit H₂O₂ Bolusgabe steigerte auch Chrysin die Fluoreszenzintensität.

Tabelle 3.2 zeigt die Abnahme der Fluoreszenz durch die Inkubation mit den aufgeführten Flavonoiden.

Substanz	25 μ M	50 μ M	100 μ M
Quercetin	37,10	29,85	25,35
Luteolin	33,20	31,36	29,51
Kaempfero	48,01	38,98	35,51
Fisetin	88,84	80,96	74,27
Morin	95,418	88,098	80,015
Myricetin	90,40	88,32	87,80
Galangin	98,20	102,78	105,29
Chrysin	96,937	104,544	110,155
Apigenin	110,70	117,45	119,56

Tabelle 3.3: Abnahme der DCF Fluoreszenz ohne H₂O₂ Bolusgabe
Aufgeführt sind die beim DCF-Assay bestimmten prozentualen Mittelwerte der Fluoreszenzintensitäten durch die Inkubation mit den Flavonoiden in den angegebenen Konzentrationen im Vergleich zur Lösemittelkontrolle.

Die Verbindungen Morin, Quercetin, Luteolin und Fisetin senkten die DCF bedingte Fluoreszenz stärker als die verbleibenden Flavonoide Galangin, Myricetin, Apigenin und Chrysin.

Bei einer Konzentration von 10 μ M zeigten sich bereits starke Effekte auf die endogene ROS-Menge. Dabei nimmt die Kapazität, ROS abzufangen in der Reihenfolge Kaempferol > Quercetin > Luteolin zu.

Die Abnahme ist in Tabelle 3.3 zusammengefasst. Bei der Messung der endogenen ROS Menge reduzierten Quercetin, Luteolin und Kaempferol erneut die DCF-Fluoreszenz stärker als die weiteren verwendeten Flavonoide. Morin zeigte hier im Vergleich zu der ROS-Messung nach H₂O₂ Bolusgabe eine schwächere antioxidative Kapazität, ebenso wie Myricetin und Galangin. Apigenin und Chrysin waren die

schwächsten Radikalfänger im DCF-Assay. Aus der Tabelle 3.3 geht hervor, dass Apigenin und Chrysin in diesem Testsystem die Fluoreszenzintensität steigerten.

Neben der antioxidativen Kapazität von Flavonoiden wurde die Toxizität der in dieser Arbeit verwendeten Verbindungen in verschiedenen Zellkultursystemen untersucht.

Zunächst wurde mit Hilfe von Zytotoxizitäts-Assays die Sensitivität der unterschiedlichen Zelllinien gegenüber Flavonoiden und weiteren elektrophilen Substanzen untersucht. tBHQ und Natrium-Arsenit (Na-Arsenit) dienten in dieser Arbeit als Induktoren des redoxsensitiven Nrf2 Signalwegs.

Durch die Inkubation von Leberzellen mit Na-Arsenit wurden diese Zellen in einen Stresszustand versetzt, welcher diesen Signalweg aktiviert (Kietzmann, Samoylenko et al., 2003). tBHQ ist genauso wie Na-Arsenit ein Aktivator. Es entsteht bei der Metabolisierung von Butylhydroxyanisol (BHA), einem Antioxidans (Yuan, Xu et al., 2006), welches auch heute noch Lebensmitteln zur Konservierung zugesetzt wird. Beide Aktivatoren des Nrf2-Signalwegs wurden hier zur Charakterisierung des Signalwegs in humanen Kolon-Karzinomzellen (Hct 116) eingesetzt. Für beide Substanzgruppen, Induktoren und Flavonoide, ist die Darstellung einer Dosis-Wirkungsbeziehung unerlässlich für eine Darstellung der Wirkung auf Kolon-Karzinomzellen.

3.1.3 Einfluss von Flavonoiden und Induktoren auf die Viabilität

3.1.3.1 Einfluss von Induktoren (tBHQ, Arsenit) auf die Viabilität

Zur genauen Untersuchung der Wirkung von Flavonoiden auf den Nrf2-ARE Signalweg wurden Hct 116 Kolon-Karzinom Zellen mit bekannten Aktivatoren dieses Signalweges

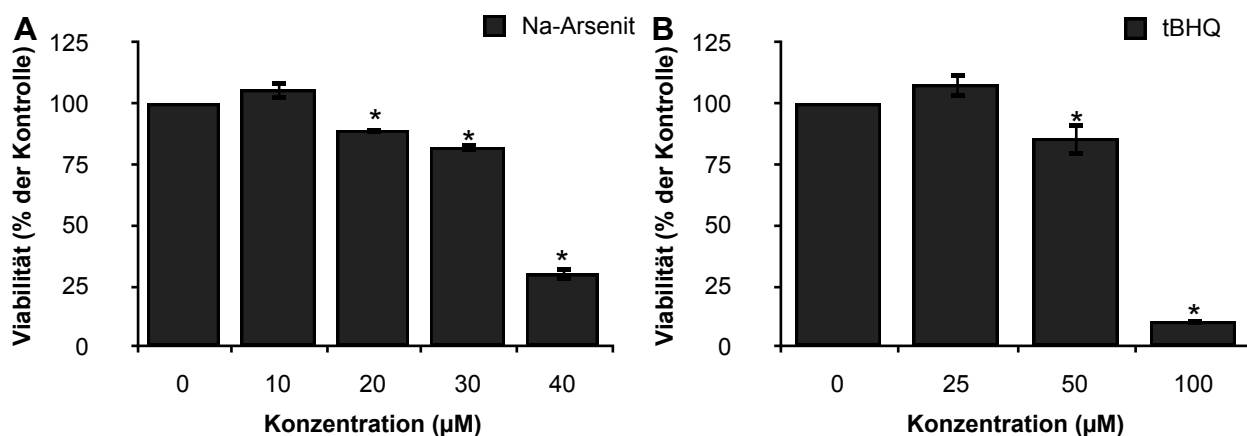


Abb.3.7: Wirkung von ARE-Induktoren auf die Viabilität in Hct 116 Zellen

2×10^4 Zellen/Well wurden auf eine 96-Well-Platte ausplattiert und für 24h bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach weiteren 24h Inkubation mit (A) Na-Arsenit oder (B) tBHQ wurde ein MTT-Assay durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte der gemessenen Absorptionen bei 560 nm bezogen auf die Viabilität der Kontrollzellen. Die Werte stammen aus drei unabhängigen Messungen \pm SEM; *= $p < 0,05$, getestet mit Oneway ANOVA und Bonferroni post hoc Test gegen die Lösemittelkontrolle.

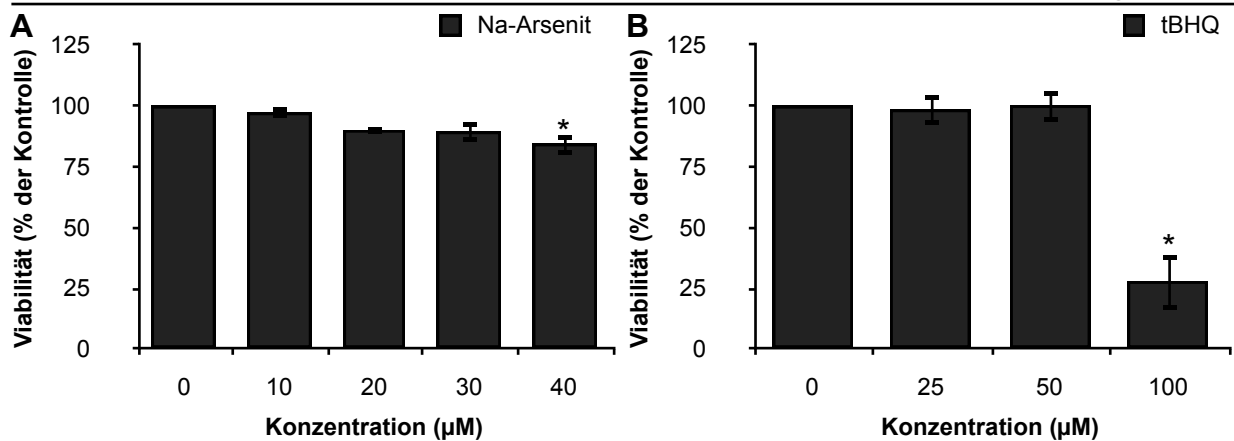


Abb.3.8: Wirkung von ARE-Induktoren auf die Viabilität in Caco 2 Zellen

2×10^4 Zellen/Well wurden auf eine 96-Well-Platte ausplattiert und für 24h bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach weiteren 24h Behandlung mit (A) Na-Arsenit oder (B) tBHQ in den angegebenen Konzentrationen wurde ein MTT-Assay durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte der gemessenen Absorptionen bei 560 nm bezogen auf die Viabilität der Kontrollzellen. Die Werte stammen aus drei unabhängigen Messungen \pm SEM; * = $p < 0,05$, getestet mit Oneway ANOVA und Bonferroni post hoc Test gegen die Lösemittelkontrolle.

behandelt, um die Sensitivität dieser Zelllinie gegenüber Substanzen zu bestimmen, welche im weiteren experimentellen Vorgehen als Positivkontrolle dienen sollten.

Zunächst musste die Viabilität der Zellen nach Behandlung mit diesen Induktoren untersucht werden. Dazu wurde hier der MTT-Assay genutzt. Dabei wird das gelbe in wässriger Lösung befindliche Tetrazoliumsalz zu den inkubierten Zellen gegeben. Es wird von den Zellen aufgenommen und durch zelluläre Dehydrogenasen zu dem unlöslichen blauen Formazansalz reduziert. Anschließend wird die Absorption des gebildeten blauen Formazansalzes gemessen. Geschädigte Zellen können das Tetrazoliumsalz nicht mehr umsetzen.

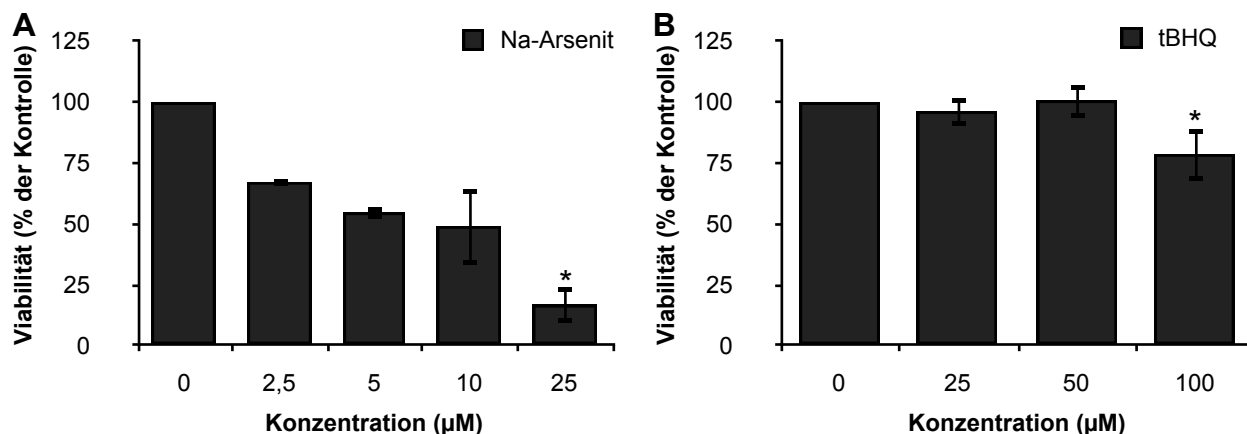


Abb.3.9: Wirkung von ARE-Induktoren auf die Viabilität Ratten Hepatomzellen (H4IIE)

1×10^4 Zellen/Well wurden auf eine 96-Well-Platte geteilt und für 24h bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach weiteren 24h Behandlung mit (A) Na-Arsenit oder (B) tBHQ in den angegebenen Konzentrationen wurde die Viabilität mittels MTT-Assay bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte der gemessenen Absorptionen bei 560 nm bezogen auf die Viabilität der Zellen der Lösemittelkontrolle. Die Werte stammen aus drei unabhängigen Messungen \pm SEM; * = $p < 0,05$, getestet mit Oneway ANOVA gegen die Lösemittelkontrolle mit anschließendem Bonferroni post hoc Test.

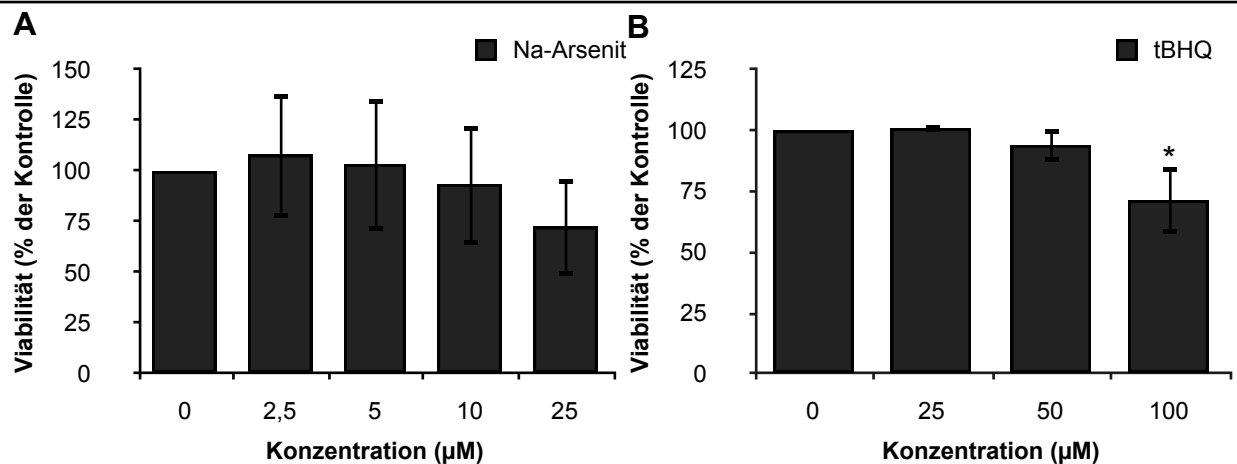


Abb.3.10: Wirkung von ARE-Induktoren auf die Viabilität in humanen Hepatomzellen (HepG2)

1×10^4 Zellen/Well wurden auf eine 96-Well-Platte geteilt und für 24h bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach weiteren 24h Behandlung mit (A) Na-Arsenit oder (B) tBHQ in den angegebenen Konzentrationen wurde mittels MTT-Assay die Viabilität bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte der gemessenen Absorptionen bei 560 nm bezogen auf die Viabilität der Zellen der Lösemittelkontrolle. Die Werte stammen aus drei unabhängigen Messungen \pm SEM; * = $p < 0,05$, getestet mit Oneway ANOVA gegen die Lösemittelkontrolle mit anschließendem Bonferroni post hoc Test.

Die aus der mangelnden Umsetzung resultierende verringerte Färbung ist ein Maß für die Schädigung der Zelle. Die Abbildungen 3.7 bis 3.10 zeigen die Abnahme der Viabilität in Abhängigkeit von der Konzentration in verschiedenen Zelllinien.

Abbildung 3.7 zeigt Hct 116 Zellen, die 24h mit den Induktoren tBHQ und Na-Arsenit behandelt wurden. tBHQ besaß einen EC₅₀ von 75 µM, während Arsenit diesen Wert schon bei 37 µM erreichte.

Die Wirkung dieser Induktoren wurde zusätzlich in Caco 2 (humane Kolon-Karzinom-Zellen) in Abbildung 3.8, in den Hepatom Zelllinien H4IIE (Abb. 3.9) und HepG2 (Abb. 3.10) untersucht. Aus der Abbildung 3.8 lässt sich für Caco 2 Zellen ein EC₅₀ Wert von 78 µM für tBHQ, jedoch kein EC₅₀ Wert für Arsenit feststellen. H4IIE Zellen sind bei 9µM Na-Arsenit (Abb. 3.9 (A)) und 152 µM tBHQ (Abb. 3.9 (B)) zu 50 % viabel. Für HepG2 Zellen lag der EC₅₀ Wert bei 32 µM für Na-Arsenit (Abb. 3.10 (A)) und bei 178 µM für tBHQ (Abb. 3.10 (B)). Die ermittelten EC₅₀ Werte für HepG2 Zellen decken sich mit den in der Literatur verwendeten Konzentrationen. HepG2 Zellen wurden mit 75 µM (Galloway, Blake et al., 1997) oder mit bis zu 100 µM (Huang, Nguyen et al., 2000) oder 200 µM (Kauffmann, Pfannschmidt et al., 2002) tBHQ behandelt. Für murine Zellen wurden ebenfalls ähnliche Konzentrationen an tBHQ genutzt (Ma, Kinneer et al., 2004). Nicht nur für die Induktoren, sondern auch für die Flavonoide wurden die Dosis-Wirkungsbeziehungen ermittelt. Um einen Konzentrationsbereich zu untersuchen, in welchem diese Substanzen noch keine Reduktion der Zellviabilität zur Folge haben und

somit mit den später durchgeführten Analysen interferieren könnten, wurden 9 Flavonoide auf ihre Toxizität mit Hilfe des MTT-Assays untersucht.

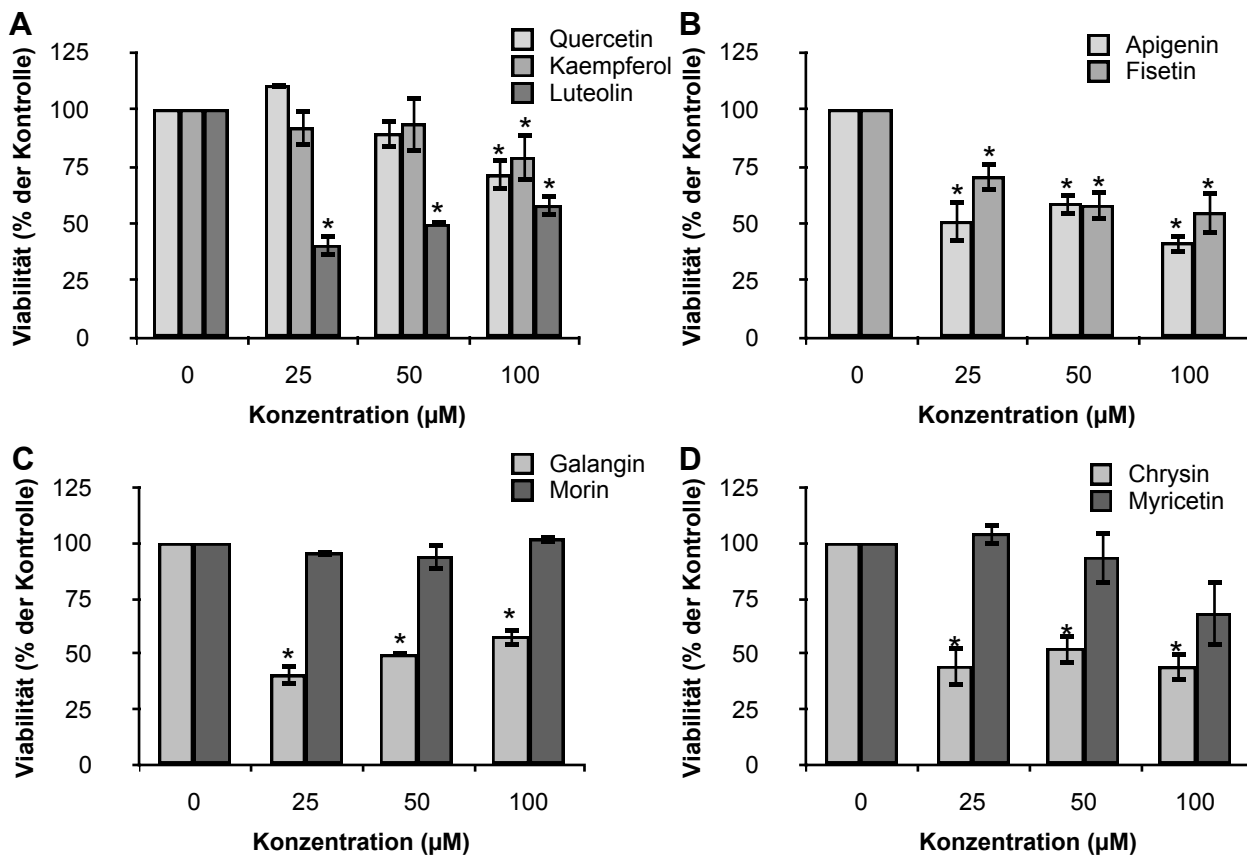


Abb.3.11: Wirkung von Flavonoiden auf die Viabilität von Hct 116 Zellen nach 24h Inkubation

2×10^4 Zellen/Well wurden auf eine 96-Well-Platte ausplattiert und für 24h bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach weiteren 24h wurden die Zellen mit (A) Quercetin, Kaempferol und Luteolin, (B) mit Apigenin und Fisetin, (C) mit Galangin und Morin oder (D) mit Chrysin und Myricetin in den angegebenen Konzentrationen behandelt. Mittels MTT-Assay wurde die Viabilität bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte der gemessenen Absorptionen bei 560 nm bezogen auf die Viabilität der Kontrollzellen. Die Werte stammen aus drei unabhängigen Messungen \pm SEM; * = $p < 0,05$, getestet mit Oneway ANOVA und Bonferroni post hoc Test gegen die Lösemittelkontrolle.

3.1.3.2 Einfluss von von Flavonoiden auf die Viabilität

In Abbildung 3.11 ist die Wirkung der untersuchten polyphenolischen Verbindungen auf die Viabilität von Hct 116 Zellen gezeigt. Aus der Abbildung ergibt sich für Apigenin (Abb. 3.11 (B)) ein EC₅₀ Wert von 25 µM und für Chrysin (Abb. 3.11 (D)) von 23 µM, für Quercetin und Kaempferol (Abb. 3.11 (A)) konnte kein EC₅₀-Wert detektiert werden, nach einer Inkubation mit 100 µM Quercetin waren noch 71 % der Zellen viabel und bei den mit Kaempferol behandelten Zellen konnte eine Viabilität von 79 % detektiert werden. Die Hct 116 Zellen reduzierten nach einer 24h Inkubation mit 100 µM Luteolin die Viabilität um 42 % (Abb. 3.11 (A)). Fisetin wirkte im Vergleich zu Luteolin stärker toxisch, so dass bei einer 100 µM Inkubation eine Reduktion der Viabilität auf 55 % gemessen werden konnte (Abb. 3.11 (B)). Der Abbildung 3.11 (C) ist zu entnehmen,

dass bei einer Inkubation mit Galangin der EC_{50} Wert bei $88\mu\text{M}$ detektiert wurde, bei $100\mu\text{M}$ betrug die Viabilität nur noch 40 %.

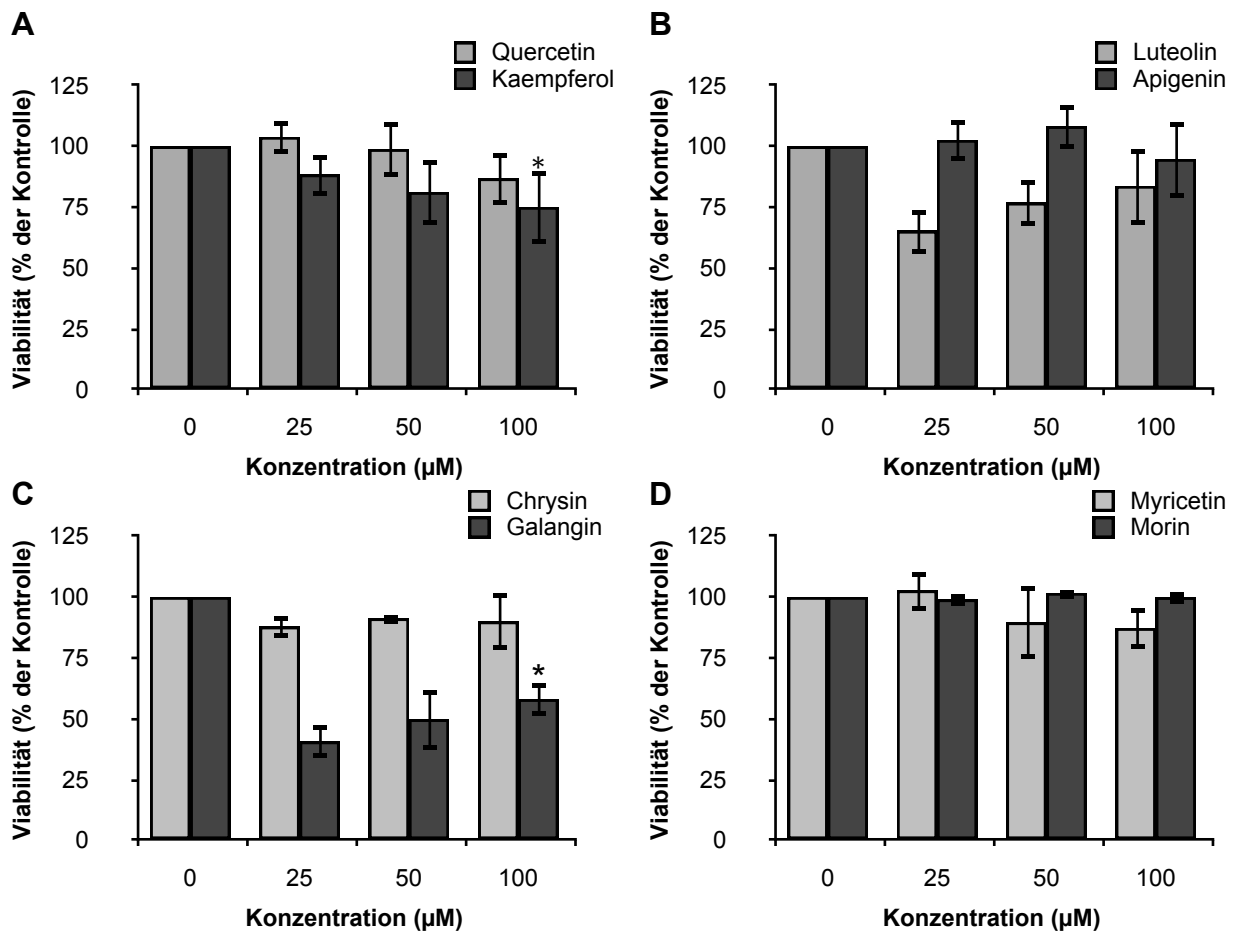


Abb.3.12: Wirkung von Flavonoiden auf die Viabilität in Caco 2 Zellen nach 24h Inkubation

2×10^4 Zellen/Well wurden auf eine 96-Well-Platte ausplattiert und für 24h bei 37°C und 5 % CO_2 inkubiert. Nach weiteren 24h wurden die Zellen mit (A) Quercetin und Kaempferol, (B) Luteolin und Apigenin, (C) Chrysin und Galangin sowie (D) mit Myricetin und Morin in den angegebenen Konzentrationen für 24h inkubiert. Mittels MTT-Assay wurde die Viabilität bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte der gemessenen Absorptionen bei 560 nm bezogen auf die Viabilität der Kontrollzellen. Die Werte stammen aus drei unabhängigen Messungen \pm SEM; * = $p < 0,05$, getestet mit Oneway ANOVA und Bonferroni post hoc Test gegen die Lösemittelkontrolle.

Ein EC_{50} Wert war für Myricetin und Morin nicht messbar, jedoch verminderte sich die Viabilität bei Myricetin in einer Konzentration von $100\mu\text{M}$ auf 80 % (Abb. 3.11 (C) & (D)). Durch die Inkubation mit $100\mu\text{M}$ Morin änderte sich die Viabilität der Zellen nicht. Die zytotoxische Wirkung der untersuchten Flavonoide nimmt in der Reihenfolge Morin < Myricetin < Kaempferol < Quercetin < Luteolin < Fisetin < Galangin < Apigenin < Chrysin zu.

Auch in Caco 2 Zellen wurden die Flavonoide auf ihre Toxizität untersucht. Abbildung 3.12 zeigt die ermittelten Viabilitätskurven.

Der Abbildung 3.12 (C) ist zu entnehmen, dass für Galangin ein EC_{50} Wert erst bei $100\mu\text{M}$ zu detektieren war. Für keines der anderen untersuchten Flavonoide ließ sich ein

EC₅₀ Wert messen (Abb. 3.12 (A)-(D)). Nach einer Inkubation mit 100 µM Kaempferol reduzierte sich die Viabilität auf 75 % (Abb. 3.12 (A)). Myricetin und Morin hatten keinen signifikanten Einfluss auf die Viabilität (Abb. 3.12 (D)). Kaempferol verringerte die Viabilität zwar signifikant, jedoch wurde auch hier ein EC₅₀ Wert nicht erreicht (Abb. 3.12 (A)). Nach der Behandlung mit Chrysin, Quercetin und Luteolin verringerte sich die Absorption nur marginal auf 90 %, 86 % und 84 % des Ausgangswertes (Abb. 3.12 (A), (B) & (C)). Apigenin und Morin zeigten keine Veränderung der Absorption.

Im Gegensatz zu der Wirkung auf Hct 116 Zellen wiesen Chrysin und Apigenin die schwächsten Effekte unter den untersuchten Flavonoiden auf Caco 2 Zellen auf. Bei den Viabilitäts-Tests der Caco 2 Zellen fiel auf, dass es nur im Fall einer Inkubation mit Galangin zu einer signifikanten Änderung der Viabilität kam. Bei den restlichen durchgeführten Messungen konnte zwar eine Tendenz zur Abnahme der Viabilität festgestellt werden, jedoch kann nicht von einer Toxizität gesprochen werden. Auf Grund ihrer Insensitivität gegenüber Flavonoiden wurden Caco 2 Zellen nicht für das weitere experimentelle Vorgehen genutzt.

Neben der Charakterisierung der direkt vermittelten Wirkungen von Flavonoiden wurde der Einfluss dieser Substanzen auf zelluläre Signalwege untersucht.

Der redox-sensitive Transkriptionsfaktor Nrf2 spielt bei der zellulären Antwort auf oxidativen und chemisch-induzierten Stress eine maßgebliche Rolle. Durch die Aktivierung dieses Signalwegs werden enzymatische Schutzmechanismen reguliert. Um zu untersuchen, ob die hier verwendeten polyphenolischen Verbindungen in der Lage sind, den Nrf2 Signalweg zu aktivieren und somit das zelluläre Schutzsystem zu regulieren, wurde der Einfluss von Flavonoiden auf die Aktivierung des Transkriptionsfaktors Nrf2 mittels Immunoblot Analysen detektiert.

3.2 Nrf2 Translokation

Eine Aktivierung des unter basalen Bedingungen im Zytosol vorliegenden Nrf2 verläuft über die Störung des Komplexes des Transkriptionsfaktors zu seinem Inhibitor (Keap I). Keap I ist für die Ubiquitinierung von Nrf2 verantwortlich und trägt somit zu seiner Degradation bei. Nachdem der Komplex zerstört worden ist, transloziert Nrf2 in den Kern, wo er die Expression seiner Zielproteine durch die Bindung an das ARE fördert. Als bekannte Aktivatoren von Nrf2 sind tBHQ und Na-Arsenit in der Literatur häufig beschrieben (Tasset, Perez-De La Cruz et al., 2009; Wang, Sun et al., 2008; Xu, Li et al., 2005).

tBHQ wurde in dieser Arbeit genutzt, um einen geeigneten Induktor für Hct 116 Zellen zu etablieren. Nachdem für die Induktoren wie auch für die Flavonoide ein geeigneter Konzentrationsbereich ermittelt wurde, wurden Hct 116 Kolon-Karzinomzellen mit dem Induktor tBHQ behandelt und sowohl die nukleäre als auch die zytosolische Proteinfraction isoliert. Da Nrf2 unter physiologischen Bedingungen im Zytosol an sein Inhibitorprotein gebunden vorliegt und erst durch einen Stimulus aus diesem Komplex dissoziieren und in den Kern translozieren kann, sollte durch eine Trennung des Gesamtproteins in eine nukleäre und eine zytosolische Fraktion die Verschiebung des Nrf2-Proteins zwischen den Kompartimenten sichtbar werden.

3.2.1 Nukleäre Nrf2-Akkumulation durch tBHQ

Abbildung 3.13 zeigt die zeitabhängige nukleäre Akkumulation von Nrf2 im Zellkern durch tBHQ (50 μ M). Durch eine Inkubation mit tBHQ und anschließende Fraktionierung des Proteins aus Hct 116 Zellen konnte unter Kontrollbedingungen kaum Nrf2 detektiert werden. Eine Detektion von Nrf2 war erst nach einer Inkubation mit dem Induktor tBHQ möglich. Weiter konnte in der zytosolischen Fraktion der tBHQ behandelten Zellen kein oder kaum Nrf2 detektiert werden.

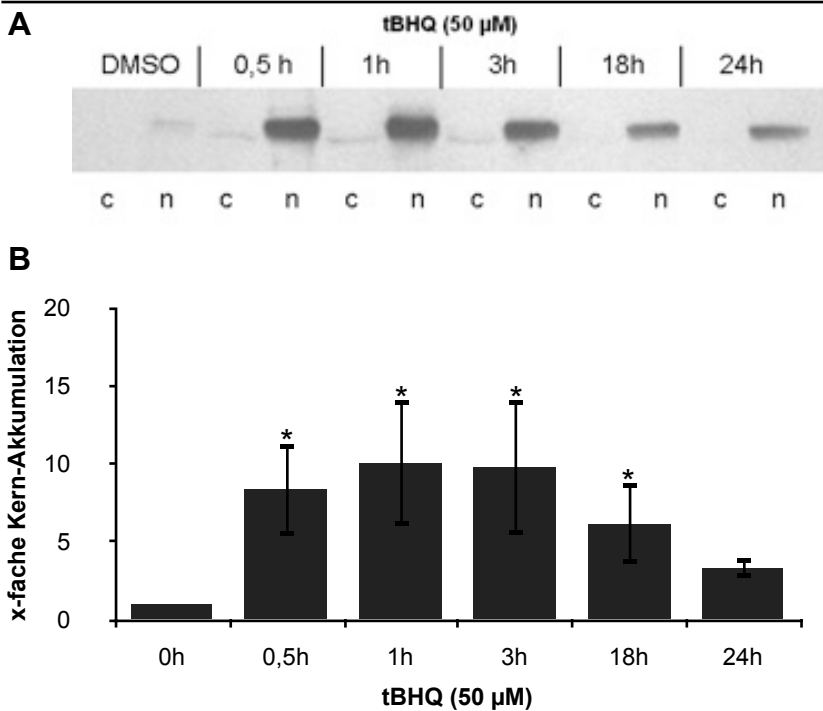


Abb. 3.13: Modulation der Nrf2 Lokalisation durch tBHQ

0,5 x 10⁶ Hct 116 Zellen/Well wurden für 24h bei 37°C und 5% CO₂ in 6-Well-Platten inkubiert und dann mit 50 μ M tBHQ für die angegebenen Zeiträume behandelt. Anschließend wurde eine Proteinfractionierung durchgeführt und je 50 μ g zytosolische (c) und 25 μ g nukleäre (n) Fraktion über eine 10 % ige SDS-PAGE aufgetrennt. Nach dem Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran wurde Nrf2 mit einem polyklonalem Antikörper (Nrf2;sc H-300) bei 100 kDa detektiert. Die Abbildung zeigt (A) einen repräsentativen Immunoblot sowie (B) die densitometrische Auswertung von drei unabhängig voneinander durchgeführten Immunoblots. Gezeigt ist die optische Dichte der Banden (OD-Bkg/mm²) bezogen auf die optische Dichte der Kontrollbande \pm SEM; * = p < 0,05, Statistische Signifikanz ermittelt mit Oneway ANOVA und Bonferroni post hoc Test. Die Werte sind auf die aufgetragene Proteinmenge normiert.

Die mit DMSO behandelte Kontrolle wies in der zytosolischen Fraktion keine und in der nukleären Fraktion nur eine schwache Nrf2 Bande auf. Nach der geringsten Inkubationszeit von 30 min konnte bereits eine starke Akkumulation von Nrf2 im Kern detektiert werden. Die maximale Kern-Akkumulation wurde nach 1h Inkubation mit dem Induktor tBHQ erreicht. Diese deutliche Induktion des nukleären Proteins nahm nach 3h und 18h wieder ab. Nach 24h konnte im Vergleich zu der Kontrolle noch eine hohe Nrf2- Proteinkonzentration gemessen werden. Nach der Etablierung von tBHQ als einem geeignetem Induktor der Nrf2 Akkumulation in Hct 116 Zellen wurden einige strukturverwandte Flavonoide sowohl zu verschiedenen Zeitpunkten als auch mit verschiedenen Konzentrationen untersucht (Abb. 3.13).

3.2.2 Nukleäre Nrf2-Akkumulation durch Flavonoide

Nachdem für den Induktor tBHQ eine zeitabhängige Zunahme von Nrf2 im Nukleus detektiert werden konnte, die bei 1h ihr Maximum erreichte, wurden zunächst die

Effekte der Flavonoide Quercetin, Apigenin, Luteolin und Kaempferol untersucht. Dazu wurden die Kolon-Karzinom-Zellen Hct 116 mit dem jeweiligen Flavonoid für 4h und für 24h inkubiert. Die Effekte sind in den Abbildungen 3.14 bis 3.18 dargestellt.

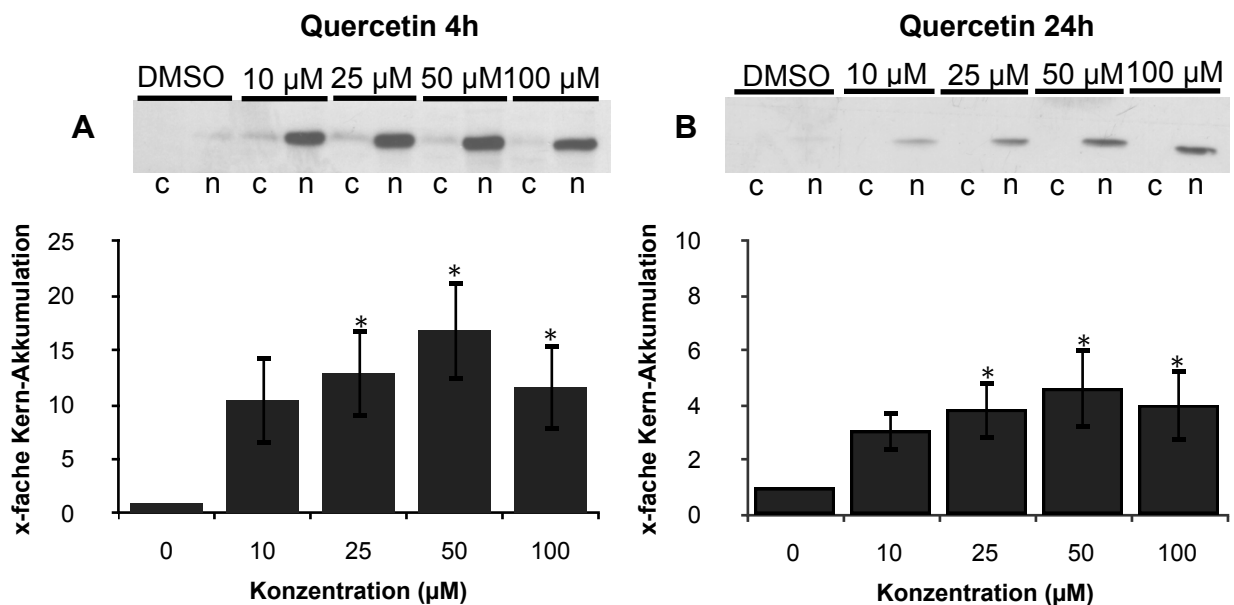


Abb. 3.14: Modulation der Nrf2 Lokalisation durch Quercetin

$0,5 \times 10^6$ Hct 116 Zellen/Well wurden für 24h auf 6-Well-Platten ausgesät und anschließend mit den angegebenen Konzentrationen Quercetin für 4h (A) und 24h (B) behandelt. Nach einer Proteinfractionierung, der Auftrennung der Proteine in einer 10%igen SDS-PAGE und dem Transfer der Proteine auf eine PVDF Membran wurden die Membranen mit einem polyklonalen Nrf2 Antikörper umgesetzt. Aufgetragen wurden 50 µg zytosolisches (c) und 25 µg nukleäres (n) Protein. Dargestellt ist jeweils ein repräsentativer Blot und die densitometrische Auswertung von drei unabhängigen Western Blots, angegeben ist Bandenintensität (OD-Bkg/mm²) bezogen auf die Intensität der Kontrollbande \pm SEM; * = $p < 0,05$, getestet mit einer Oneway ANOVA sowie einem Bonferroni post hoc Test gegen die Lösemittelkontrolle.

Werden die Zellen 4h mit Quercetin behandelt, ist die nukleäre Akkumulation deutlicher als bei einer 24h Inkubation (Abb. 3.14 (A) & (B)). Bei einer Inkubation mit 10 µM für 4h stieg die Nrf2 Konzentration auf das 10-fache des Kontrollwertes an. Das Maximum der Kern-Akkumulation ist bei 50 µM erreicht, bei dieser Konzentration nahm sie auf das 17-fache der Kontrolle zu. Die Akkumulation nahm bei einer Inkubation mit 100 µM Quercetin wieder ab.

Nach einer 24h Inkubation mit Quercetin kam es erneut zu einer deutlichen konzentrationsabhängigen Zunahme von Nrf2 im Kern (Abb. 3.14 (B)). So war die Konzentration von Nrf2 nach Behandlung mit 10 µM Quercetin im Vergleich zur Kontrolle 3-fach erhöht und erreichte ihr Maximum bei 50 µM. Bei dieser Konzentration war sie 5-fach erhöht. Nach einer 24h Inkubation mit 100 µM Quercetin sank die Nrf2 Konzentration im Kern auf den 4-fachen Wert der Kontrolle (Abb. 3.14 (B)). Vergleichbar zu der zeitlichen Nrf2-Kern-Akkumulation durch tBHQ war nach einer 4h Inkubation mit

Quercetin bereits eine starke Kern-Akkumulation von Nrf2 zu erkennen. Zudem war die Akkumulation durch Quercetin stark konzentrationsabhängig.

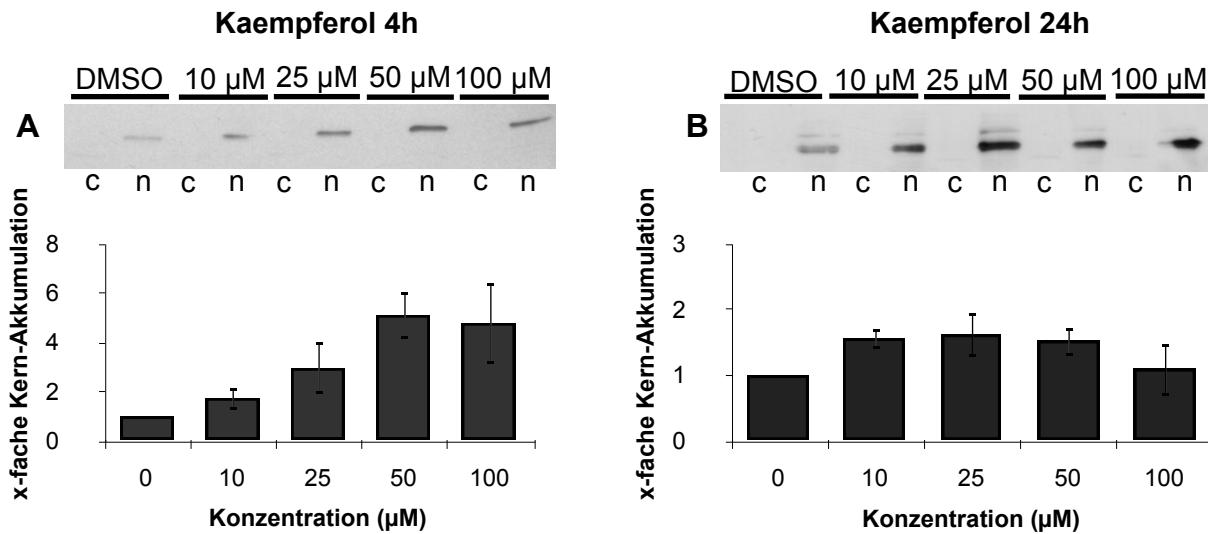


Abb. 3.15: Modulation der Nrf2 Lokalisation durch Kaempferol

0,5 x 10⁶ Hct 116 Zellen/Well wurden für 24h auf 6-Well-Platten ausgesät und anschließend mit den angegebenen Konzentrationen Kaempferol für 4h (A) und 24h (B) behandelt. Nach einer Proteinfractionierung, der Auftrennung der Proteine in einer 10%igen SDS-PAGE und dem Transfer der Proteine auf eine PVDF Membran wurden die Membranen mit einem polyklonalen Nrf2 Antikörper umgesetzt. Aufgetragen wurden 50 µg zytosolisches (c) und 25 µg nukleäres (n) Protein. Dargestellt ist jeweils ein repräsentativer Blot und die densitometrische Auswertung von drei unabhängigen Western Blots, angegeben ist Bandenintensität (OD-Bkg/mm²) bezogen auf die Intensität der Kontrollbande ± SEM; * = p<0,05, getestet mit einer Oneway ANOVA sowie einem Bonferroni post hoc Test gegen die Lösemittelkontrolle.

Auch für Kaempferol wurde die konzentrationsabhängige Kern-Akkumulation von Nrf2 untersucht.

In Abbildung 3.15 ist die Kern-Akkumulation von Nrf2 nach 4h (Abb. 3.15 (A)) und 24h (Abb. 3.15 (B)) Inkubation mit Kaempferol gezeigt. Kaempferol wirkt wie Quercetin Nrf2-aktivierend. Die densitometrischen Auswertungen der Immunoblot-Analysen zeigen jedoch, dass die Wirkung von Kaempferol während beider Inkubationszeiträume nicht so stark war wie die Wirkung von Quercetin oder tBHQ. Der Verlauf der nukleären Akkumulation bei der 4h Inkubation gleicht dem Akkumulationsverlauf bei der 4h Quercetin Inkubation, nur wurden bei der Quercetin Behandlung deutlich höhere Werte erreicht.

Für 10 µM Kaempferol fand sich eine noch geringe Steigerung auf das 1,7-fache der Kontrollkonzentration, das Maximum lag auch hier wieder bei 50 µM (Abb. 3.15 (A)). Dort war die Nrf2 Konzentration 5,1-fach höher als in der Kontrolle. Bei 100 µM Kaempferol fiel der Wert wieder leicht auf das 4,8-fache ab. Abbildung 3.15 (B) zeigt, dass bei der 24h Inkubation durch Kaempferol nur schwache Akkumulationen von 1,5-fach bei 10 µM und 25 µM festgestellt werden konnten. Bei allen Konzentrationen schwankt der Wert der Kern-Akkumulation um den Akkumulationswert der Kontrolle.

Kaempferol zeigt erneut deutlich, dass Nrf2 nach sehr kurzer Behandlungsdauer akkumuliert.

Die Wirkung auf Nrf2 Akkumulation im Kern wurde des Weiteren mit Luteolin untersucht.

Bei einer 4h Inkubation mit Luteolin zeigte sich erneut ein konzentrationsabhängiger Verlauf. In Abbildung 3.16 (A) kann schon bei den niedrigen Konzentrationen eine Zunahme der nukleären Nrf2-Konzentration um den Faktor 2,7 erfasst werden.

Die maximale Kern-Akkumulation von Nrf2 durch die Inkubation mit Luteolin lag bei 100 μM und einer 3,7-fachen Steigerung der Nrf2-Proteinmenge im Kern.

Luteolin bewirkte nach einer 24h Behandlung eine schwache Akkumulation von Nrf2 im Kern. Auch hier wurden nur Werte erreicht, die sich im Bereich des Kontrollwertes befanden. Nach einer Inkubation mit 50 μM Luteolin fällt der Wert bereits unter den Wert der Kontrolle. Luteolin bewirkte im Gegensatz zu den anderen untersuchten Flavonoiden eine Abnahme der Nrf2 Akkumulation im Kern. Nach einer 100 μM Inkubation mit Luteolin wurde Nrf2 nicht mehr detektiert.

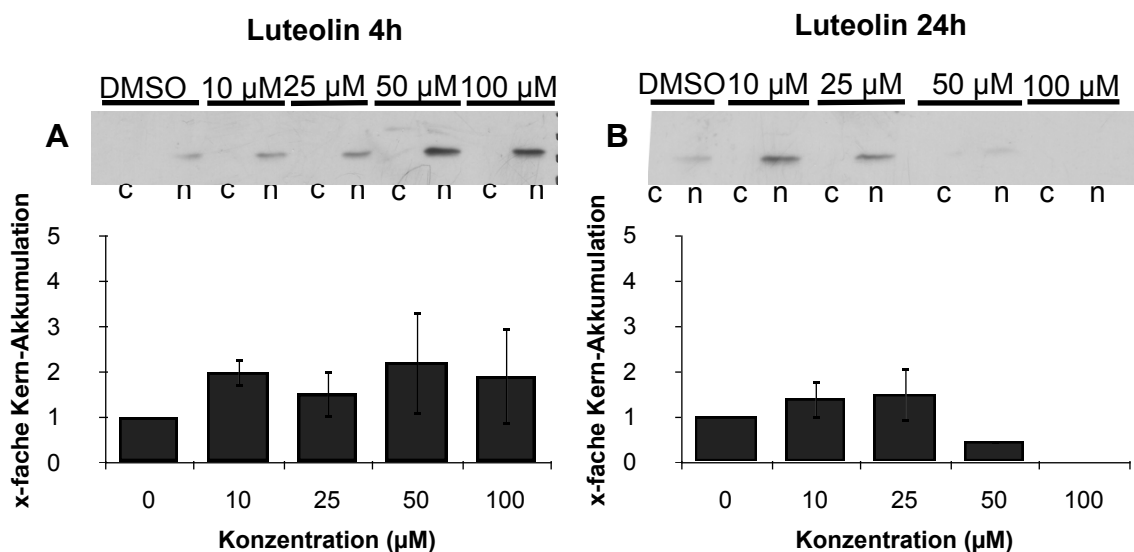


Abb. 3.16: Modulation der Nrf2 Lokalisation durch Luteolin

0,5 x 10⁶ Hct 116 Zellen/Well wurden für 24h auf 6-Well-Platten ausgesät und anschließend mit den angegebenen Konzentrationen Luteolin für 4h (A) und 24h (B) behandelt. Nach einer Proteinfraktionierung, der Auftrennung der Proteine in einer 10%igen SDS-PAGE und dem Transfer der Proteine auf eine PVDF Membran wurden die Membranen mit einem polyklonalen Nrf2 Antikörper (Nrf2; sc-H-300) umgesetzt. Aufgetragen wurden 50 μg zytosolisches (c) und 25 μg nukleäres (n) Protein. Dargestellt ist jeweils ein repräsentativer Blot und die densitometrische Auswertung von drei unabhängigen Western Blots, angegeben ist Bandenintensität (OD-Bkg/mm²) bezogen auf die Intensität der Kontrollbande \pm SEM; * = p<0,05, getestet mit einer Oneway ANOVA sowie einem Bonferroni post hoc Test gegen die Lösemittelkontrolle.

Ein weiteres Flavonoid, welches auf die Kern Akkumulation von Nrf2 überprüft wurde, ist Apigenin.

In Abbildung 3.17 (A) und (B) ist die nukleäre Akkumulation für Apigenin gezeigt.

Wurden die Zellen für 4h mit Apigenin behandelt (Abb. 3.16 (A)), zeigt sich eine leichte Zunahme der nukleären Nrf2 Menge. Bei 10 μM Apigenin fand sich eine Zunahme der Nrf2 Menge um den Faktor 2, bei 100 μM schließlich war eine Zunahme um den Faktor 3 im Kern zu erkennen.

Im Gegensatz dazu ist nach der 24h Inkubation eine Abnahme der Nrf2 Menge im Kern festzustellen. Bei 25 μM Apigenin zeigte sich bereits eine Reduktion der Nrf2 Menge im Kern im Vergleich zur Kontrolle, bei 50 μM war es eine Abnahme um das 0,6-Fache des Kontrollwertes und bei 100 μM eine fast vollständige Abnahme. Ähnlich wie bei einer 24h Inkubation mit Luteolin kam es auch durch die 24h Inkubation mit Apigenin zu einer Abnahme der Nrf2 Proteinmenge im Kern. Der Verlauf der densitometrischen Auswertung zeigte im Gegenteil zu Luteolin eine konzentrationsabhängige Abnahme von Nrf2 im Kern. Anders als bei Quercetin und Kaempferol kam es nach einer 24h Inkubation nicht zu einer verstärkten Nrf2 Akkumulation, sondern zu einer Reduktion der Nrf2 Menge im Kern.

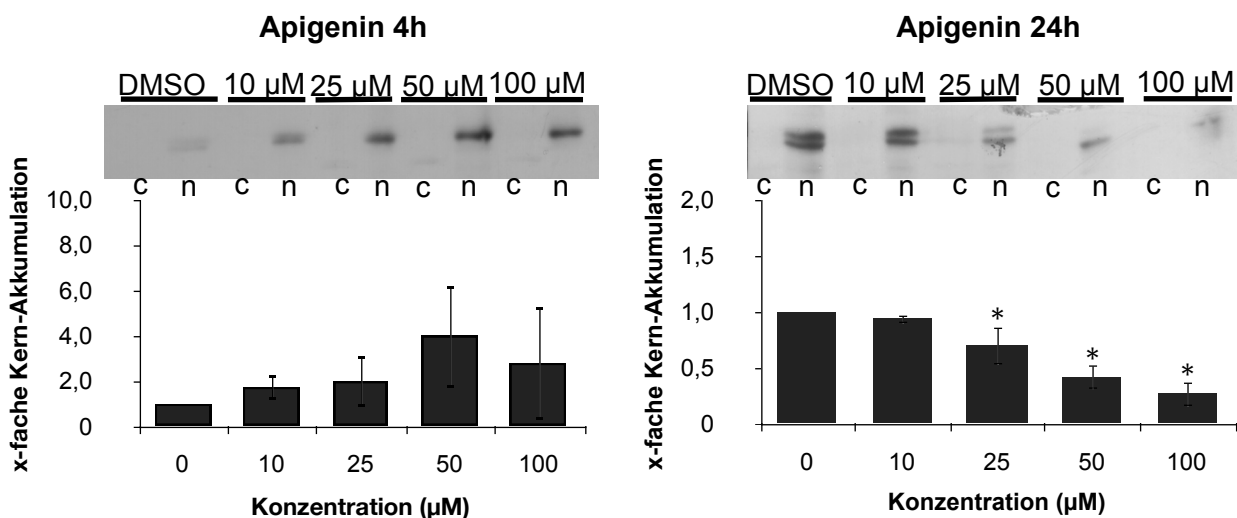


Abb. 3.17: Modulation der Nrf2 Lokalisation durch Apigenin

$0,5 \times 10^6$ Hct 116 Zellen/Well wurden für 24h auf 6-Well-Platten ausgesät und anschließend mit den angegebenen Konzentrationen Apigenin für 4h (A) und 24h (B) behandelt. Nach einer Proteinfractionierung, der Auftrennung der Proteine in einer 10%igen SDS-PAGE und dem Transfer der Proteine auf eine PVDF Membran wurden die Membranen mit einem polyklonalen Nrf2 Antikörper (Nrf2; sc-H-300) umgesetzt. Aufgetragen wurden 50 μg zytosolisches und 25 μg nukleäres Protein. Dargestellt ist jeweils ein repräsentativer Blot und die densitometrische Auswertung von drei unabhängigen Western Blots, angegeben ist Bandenintensität ($\text{OD-Bkg}/\text{mm}^2$) bezogen auf die Intensität der Kontrollbande \pm SEM; * = $p < 0,05$, getestet mit einer Oneway ANOVA sowie einem Bonferroni post hoc Test gegen die Lösemittelkontrolle.

Als letztes der Flavonoide zeigte Fisetin eine Wirkung auf Nrf2. Bei Fisetin zeigt sich eine Steigerung des Nrf2 Signals bei 50 μM nach 4h Inkubation ähnlich der Akkumulation durch die Behandlung mit Kaempferol bei gleicher Konzentration.

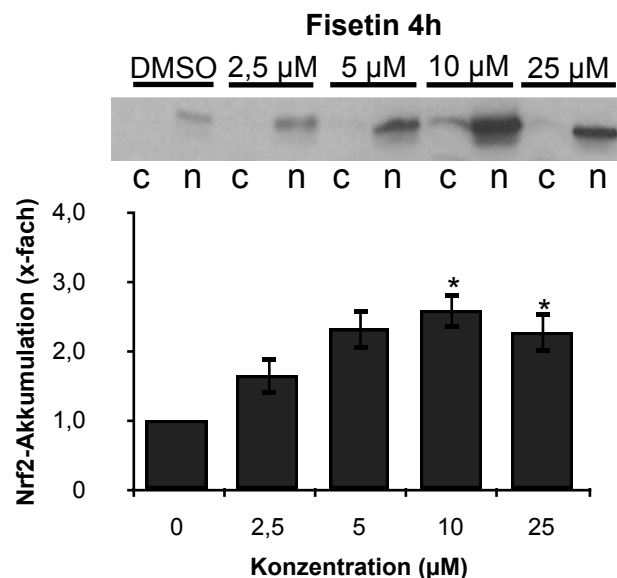


Abb. 3.18: Nrf2 Kernakkumulation nach einer 4h Inkubation mit Fisetin
 $0,5 \times 10^6$ Hct 116 Zellen/Well wurden für 24h auf 6-Well-Platten ausgesät und anschließend mit 50 μ M Fisetin für 4h behandelt. Nach einer Proteinfractionierung und anschließender Auftrennung in einer 10%igen SDS-PAGE wurden die Proteinproben auf eine PVDF-Membran transferiert und mit einem polyklonalen Nrf2 Antikörper (Nrf2;sc-H-300) umgesetzt. Gezeigt sind (A) ein repräsentativer Blot und (B) zeigt die densitometrische Auswertung von drei unabhängigen Immunoblots, angegeben ist die optische Dichte (OD-Background/ mm^2) bezogen auf die optische Dichte der Kontrollbande \pm SEM * = $p < 0,05$, getestet mit einer Oneway ANOVA und Bonferroni posthoc Test. Die Werte sind auf die aufgetragene Proteinmenge normiert.

Im Gegensatz zu den vorherigen Flavonoiden Quercetin, Kaempferol, Luteolin und Apigenin konnte für Fisetin eine Akkumulation von Nrf2 im Kern bereits bei sehr niedrigen Konzentrationen gezeigt werden. Der erste messbare Effekt konnte bereits mit einer Konzentration von 2,5 μ M nach 4h Inkubationszeit detektiert werden (Abb. 3.18). Eine verstärkte Kern Akkumulation von Nrf2 war auch bei höheren Konzentrationen Fisetin zu detektieren, allerdings zeigten sich in höheren Konzentrationen und bei längeren Inkubationszeiten erste morphologische Veränderungen, welche eine beginnende Schädigung der Zellen anzeigten.

Abbildung 3.19 zeigt lichtmikroskopische Aufnahmen von Hct 116 Zellen nach einer 4h Inkubation mit Fisetin. Durch die Behandlung mit Fisetin konnten nach 4h Inkubation keine morphologischen Veränderungen festgestellt werden.

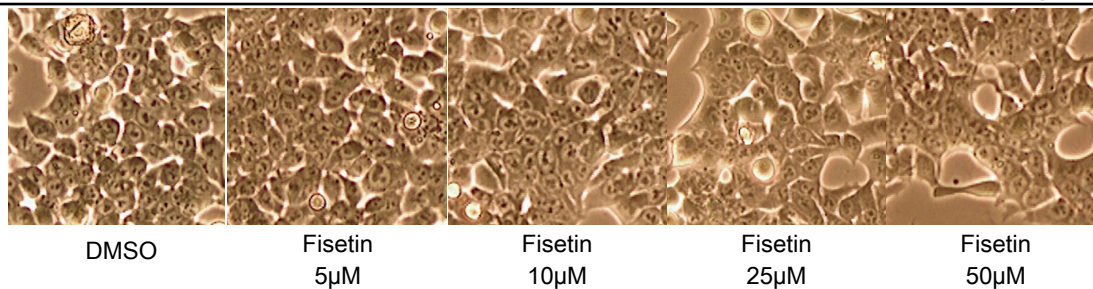


Abb. 3.19: Morphologie von Hct 116 Zellen nach Inkubation mit Fisetin (4h)
 $0,5 \times 10^6$ Hct 116 Zellen/Well wurden für 24h auf 6-well-Platten ausgesät und anschließend mit den angegebenen Konzentrationen Fisetin für 4h behandelt. Die Abbildung zeigt repräsentative lichtmikroskopische Aufnahmen in 200-facher Vergrößerung. Die Aufnahmen wurden mit einem inversen Mikroskop (Axiovert 100; Zeiss) angefertigt.

Die weiteren zuvor untersuchten Flavonoide Galangin, Chrysin, Morin und Myricetin wurden nicht auf Nrf2-Kern-Akkumulation getestet, da sie auch keine Aktivierung des ARE (Abschnitt 3.3) aufwiesen.

Allen Immunoblots gemeinsam ist die fehlende zytosolische Lokalisation von Nrf2. In der Literatur fanden sich zu der Detektion der zytosolischen Nrf2 Proteinfraction kontroverse Berichte. So konnten einige Arbeitsgruppen Nrf2 im Zytosol nachweisen. Rushworth et al., 2006 konnten durch die Inkubation mit Curcumin in humanen Monozyten die sukzessive Abnahme des Nrf2 Proteins im Zytosol mit der gleichzeitigen Zunahme der nukleären Nrf2 Proteinmenge detektieren. In dieser Arbeit konnte zytosolisches Nrf2 mittels Immunoblot-Analysen nicht detektiert werden. Um die zytosolische Lokalisation und Translokation von Nrf2 dennoch darstellen zu können, wurde ein GFP-Reporter-gen-Konstrukt generiert. Zur Erstellung dieses Konstrukts wurde aus Hct 116 Zellen mittels PCR das komplette ORF (*open reading frame*) des Nrf2 Transkriptionsfaktors amplifiziert und in den pEGFP C1-Vektor (Fa. Clontech) kloniert.

3.2.3 Klonierung des Nrf2-GFP-Reporter-gen-Konstrukts

Um ein funktionales GFP-Reporter-gen-Konstrukt zu generieren, wurde aus Hct 116 Zellen das komplette Nrf2 ORF amplifiziert. Den Primern für die Amplifikation wurden Schnittstellen für die Restriktionsenzyme BamHI und XhoI angehängt, um das 1818 bp große Nrf2 ORF gerichtet und in Leserichtung in den finalen pEGFP-Vektor zu klonieren. In Abbildung 3.20 ist die Klonierungsstrategie dargestellt.

Die Amplifikation des kompletten ORF wurde mit Primern durchgeführt, welchen je eine Schnittstelle für die Restriktionsenzyme BamHI und XhoI angefügt wurde. Das nach der Amplifikation erhaltene Fragment wurde *blunt end* in einen Zwischenvektor (pGem-T

Easy; Promega) kloniert. Durch eine anschließende Restriktion der Klone mit BamHI und XhoI wurde das ligierte Fragment mit BamHI und XhoI Schnittstellen gewonnen. Der pEGFP-C1 Vektor wurde ebenfalls mit BamHI und XhoI geschnitten und mit dem zuvor aus dem pGem-T Easy Vektor erhaltenen Fragment ligiert. So konnte die Ligationsrichtung für das Fragment festgelegt werden. Die Nrf2-GFP-Klone wurden einer Restriktion mit NdeI und PstI unterzogen, um die korrekte Ligation des Fragments zu überprüfen.

Konnte das Insert erfolgreich in die Vektoren kloniert werden, erzeugt die Restriktion je eine Bande bei einer Größe von 3649 bp und bei einer Größe von 2864 bp. In Abbildung 3.21 ist die elektrophoretische Auftrennung von 12 isolierten Nrf2-GFP-Klonen dargestellt. Anhand der in pEGFP-C1 enthaltenen Schnittstellen wurden für einen positiven Klon zwei Banden erwartet, die 3649 bp und 2864 bp groß sind und für einen Klon, welcher kein Insert trägt, wurden zwei Banden in den Größen 3600 bp und 1131 bp erwartet.

Der Abbildung ist zu entnehmen, dass die Klone 5.9 und 5.11 das Nrf2-Insert nicht tragen und je eine Bande bei einer Größe von 1131 bp und eine Bande bei einer Größe von 3600 bp zu detektieren war. Von den in Abbildung 3.18 dargestellten positiven Klonen wurden die Klone 5.4 und 5.8 einer Sequenzierung unterzogen, um auszuschließen, dass eine falsche Basenabfolge die Funktionalität des Konstrukts stört. Beide Klone beinhalten die korrekte Nrf2 ORF Sequenz und konnten beide für die folgenden Versuche genutzt werden. Die Ergebnisse der Sequenzierung befinden sich im Anhang.

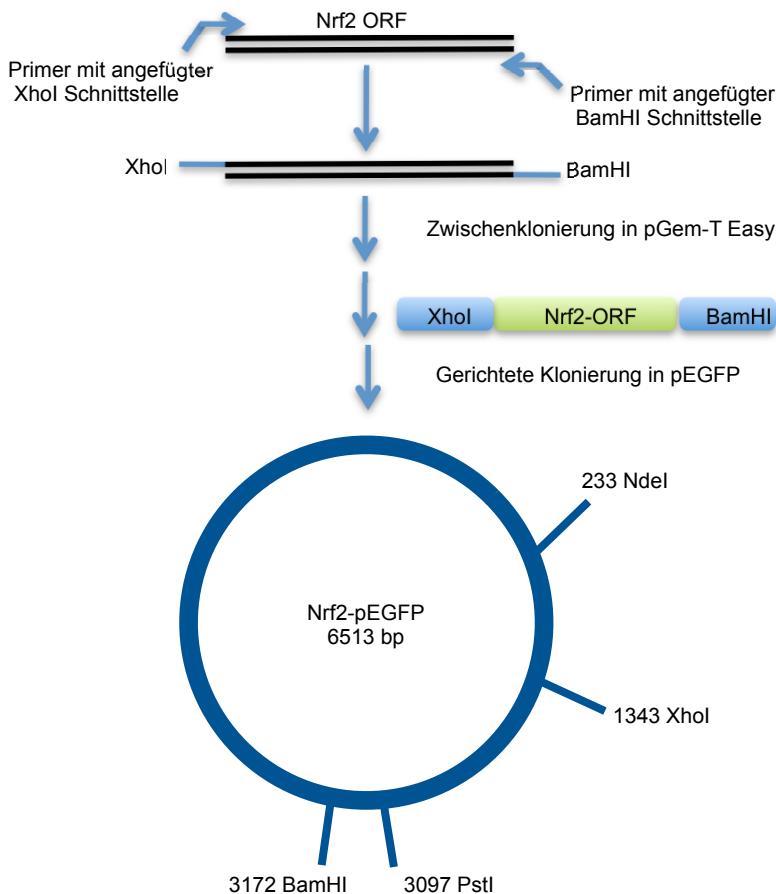


Abb. 3.20: Klonierungsstrategie

Dargestellt ist ein Schema der Amplifikation des Nrf2-ORF mittels PCR sowie dessen Ligation in pGem-T Easy und pEGFP-C1. Dem Fragment wurden mit Hilfe der Primer Schnittstellen für die Restriktionsenzyme BamHI und XhoI angehängen. Durch die Zwischenklonierung in pGem-T Easy. Extahieren des Fragments mit Hilfe von BamHI und XhoI sowie einer Restriktion von pEGFP mit BamHI und XhoI wird sichergestellt, dass das erhaltene Fragment in der richtigen Orientierung in pEGFP ligiert wird. Durch eine anschließende Restriktion des erhaltenen Nrf2-pEGFP Vektors mit NdeI und PstI kann anhand der Größe der herausgeschnittenen Fragmente bestimmt werden, ob der Vektor das Nrf2-ORF beinhaltet.

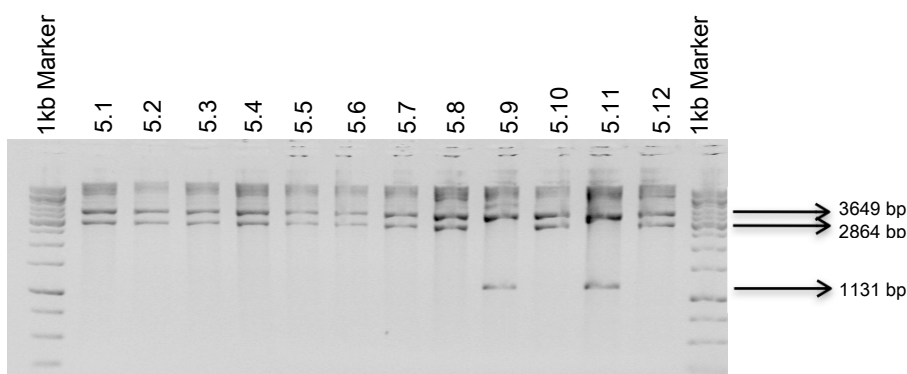


Abb. 3.21: Restriktion der Nrf2-GFP-Reporter-Gen-Konstrukte

Zur Identifizierung positiver Klone wurde eine Restriktion der generierten Klone mit den Restriktionsenzymen NdeI und PstI durchgeführt. Die dargestellten Klone 5.9 und 5.11 zeigen das Bandenmuster für Klone, welche das Nrf2-Insert nicht beinhalten. Es sind Banden der Größe 3649 bp und 2864 bp zusehen. Ist das Nrf2 ORF nicht erfolgreich in den Vektor ligiert worden sind Banden der Größe 3600 bp und 1131 bp zu sehen. Die Spuren 5.9 und 5.11 beinhalten also nicht das gewünschte Fragment. Von den verbliebenen Klone wurden die Klone 5.4 und 5.8 einer Sequenzierung unterzogen und für die weiteren Transfektionsversuche eingesetzt.

Das beschriebene Nrf2-GFP-Konstrukt wurde zunächst auf seine Funktionalität untersucht. Dazu wurden Hct 116 Zellen einer transienten Co-Transfektion mit dem Nrf2-GFP-Konstrukt und mit einem ARE-Luziferase-Konstrukt unterzogen. Das ARE-Luziferase-Reporter-Konstrukt enthält ein 41 bp großes Fragment aus der Promotorregion der murinen GSTYa. In diesem Fragment enthalten ist das DNA-Element, an welches Nrf2 bindet, das ARE. Da das ARE eine hochkonservierte Konsensus-Sequenz ist, wird sie auch durch das humane Nrf2 gebunden. Durch eine vermehrte Bindung von Nrf2 an das ARE wird Luziferin exprimiert. Durch die Überexpression von Nrf2 sollte das ARE vermehrt aktiviert werden. Abbildung 3.22 zeigt die Ergebnisse des Luziferase Assays. Im Vergleich zu der mit DMSO behandelten Kontrolle, wurde eine 7,5-fache Steigerung der Luziferase-Aktivität durch tBHQ und eine 6,6-fache Steigerung durch die Behandlung mit Quercetin erreicht. Die Co-Transfektion mit dem Nrf2-GFP-Konstrukt bewirkte eine 4,3-fache Steigerung der Luziferase-Aktivität ohne zusätzliche Behandlung mit einem Induktor. Die Aktivitätssteigerung zeigt die Funktionalität des Konstrukts.

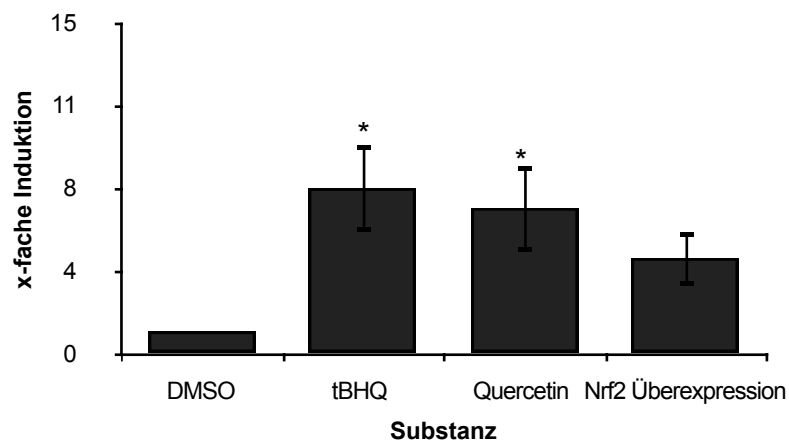


Abb.3.22: ARE-Aktivierung durch Nrf2 Überexpression

0,5 x 10⁶ Hct 116 Zellen/Well wurden für 24h mit dem Nrf2-GFP-Konstrukt und dem ARE-Luziferase-Vektor transfiziert und auf 6-Well-Platten ausgesät. Nach weiteren 4h Inkubation mit 50 µM tBHQ und 50 µM Quercetin wurden die Zellen lysiert und die Luziferase-Aktivität bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte der gemessenen relativen Lumineszenz bezogen auf die unbehandelten, transfizierten Zellen, normiert auf die Proteinkonzentration in den gemessenen Wells, ± SEM; * = p < 0,05, getestet mit Oneway ANOVA und Bonferroni post hoc Test gegen die Kontrolle.

Neben der Co-Transfektion mit einem ARE-Luziferase-Konstrukt wurden Hct 116 Zellen erneut mit dem Nrf2-GFP-Konstrukt transfiziert und das Gesamtprotein isoliert. Die Abbildung 3.23 zeigt den Immunoblot mit Proteinproben aus Zellen, die mit dem leeren GFP-Vektor und dem Nrf2-GFP-Konstrukt transfiziert wurden. Beide Proben wurden im

Vergleich zu nicht transfizierten Zellen mit einem Anti-GFP-Antikörper und einem Anti-Nrf2-Antikörper umgesetzt.

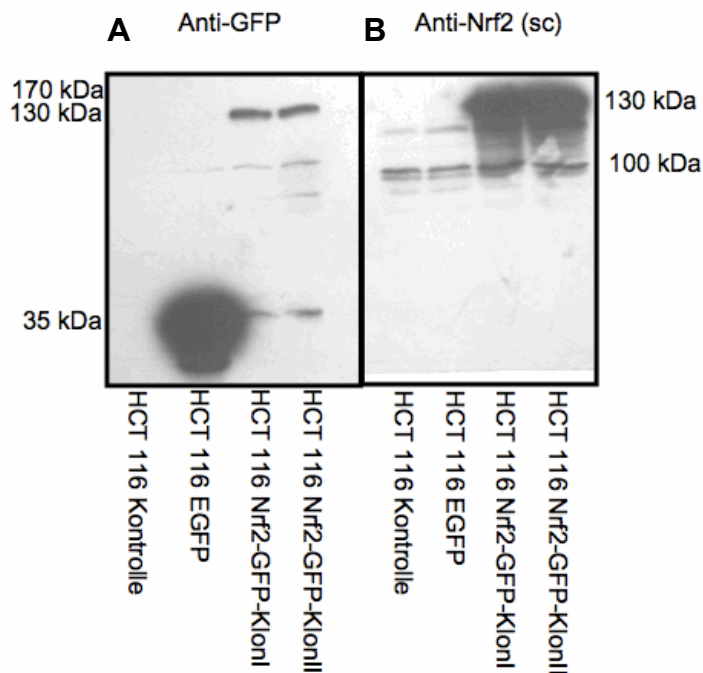


Abb.3.23: Nrf2 Überexpression in HCT-116 Zellen

0,5 x 10⁶ Hct 116 Zellen wurden für 24h mit dem Nrf2-GFP-Konstrukt und dem leeren pEGFP-C1 Vektor transfiziert und auf 6-Well-Platten ausgesät. Es wurde das Gesamtprotein isoliert und jeweils 25 µg Protein in einer 10 % SDS-PAGE aufgetrennt. Nach dem Transfer der Proteine auf eine PVDF Membran wurden die Proben mit Anti-GFP-Antikörper (A) und mit Anti-Nrf2-Antikörper(B) umgesetzt.

In Abbildung 3.23 (A) ist die Umsetzung mit dem Anti-GFP-Antikörper gezeigt. Die Zellen, welche mit dem leeren GFP-Vektor transfiziert wurden, zeigen erwartungsgemäß ein sehr starkes Signal bei ca. 30 kDa. GFP hat eine Größe von 27 kDa. Bei den Zellen, die mit dem Nrf2-GFP-Konstrukt transfiziert wurden, konnte neben der Bande bei 30 kDa noch eine weitere Bande bei 130 kDa detektiert werden, während bei der Kontrolle, welche nicht transfiziert wurde, keine Bande zu detektieren war. Da Nrf2 bei einer Größe von 100 kDa detektiert wird, entspricht das Signal bei 130 kDa einem Fusionsprotein aus Nrf2 und GFP. Die 30 kDa Bande in den mit Nrf2-GFP transfizierten Proben zeigt detektiertes, nicht mit Nrf2 gekoppeltes GFP an.

Wurden die Proteinproben mit dem Anti-Nrf2-Antikörper umgesetzt, konnte in den Proben der Zellen, die mit dem leeren GFP-Vektor transfiziert worden waren und den Kontrollproben eine prominente Bande bei ca. 100 kDa und bei den Zellen, die mit dem Nrf2-GFP-Konstrukt transfiziert waren, bei 130 kDa detektiert werden. Dieses Ergebnis zeigt, dass Nrf2 erfolgreich in einen GFP-Vektor kloniert wurde. Der Nrf2-GFP Vektor wurde im Folgenden dazu eingesetzt, Nrf2 im Zytosol zu detektieren und die Translokation von Nrf2 aus dem Zytosol in den Kern darzustellen.

3.2.3.1 Einfluss von Flavonoiden auf die Nrf2-Translokation

Wie den in Abbildungen 3.11 bis 3.15 gezeigt ist, konnte die direkte Translokation von Nrf2 durch eine konzentrationsabhängige Abnahme des Nrf2 Proteins im Zytosol mit gleichzeitiger konzentrationsabhängiger Zunahme von Nrf2 im Kern nicht detektiert werden, stattdessen konnte nur eine Akkumulation von Nrf2 im Kern dargestellt werden. Nrf2 war unter Kontrollbedingungen im Zytosol nicht zu detektieren. Um die Abnahme von Nrf2 im Zytosol auf andere Weise detektieren zu können, wurde das wie oben beschrieben klonierte Nrf2-GFP-Fusionsprotein eingesetzt. Dazu wurden Hct 116 Zellen mit dem Nrf2-GFP-Konstrukt transfiziert und nach 44h mit 50 μ M tBHQ als Positivkontrolle wie auch mit den Flavonoiden Quercetin (50 μ M), Kaempferol (50 μ M) und Fisetin (50 μ M) für 4h inkubiert. Zur Detektion der Translokation wurden die Zellen mit 1 x PBS gewaschen und anschließend im Fluoreszenzmikroskop betrachtet und dokumentiert.

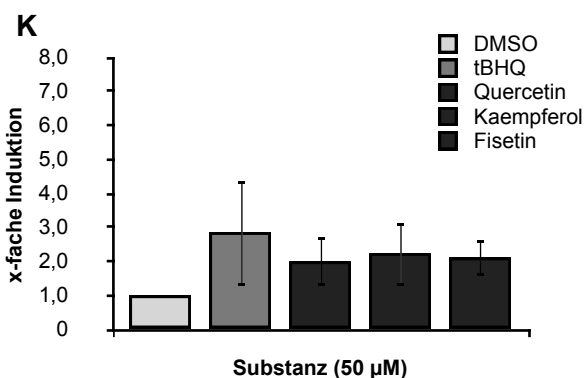
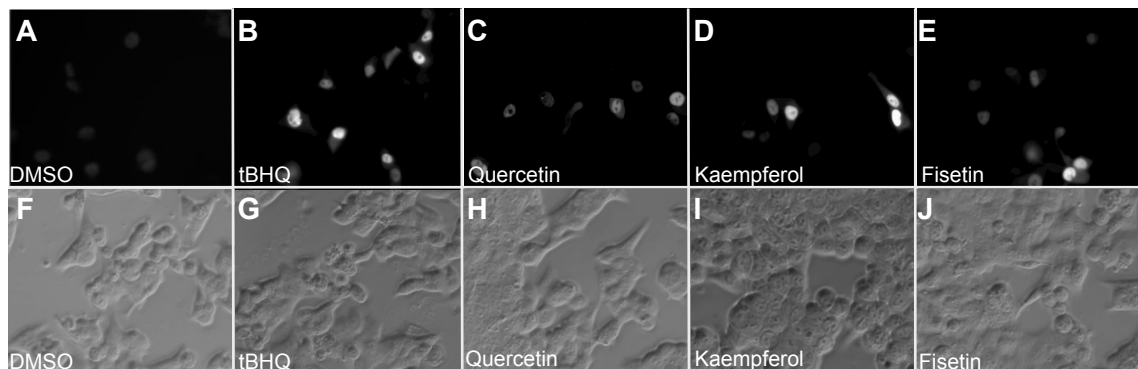


Abb. 3.24: Nrf2 Translokation

Hct 116 Zellen/Well wurden auf 30 mm Schälchen ausgesät und mit dem Nrf2-GFP Konstrukt für 44h transfiziert. Anschließend wurden die Zellen 4h mit DMSO (A) & (F), 50 μ M (B) + (G) tBHQ, (C) + (H) Quercetin, (D) + (I) Kaempferol und (E) + (J) Fisetin behandelt und die Fluoreszenz bei 400-facher Vergrößerung im Zeiss Axiolab Fluoreszenzmikroskop detektiert. (K) zeigt die Mittelwerte einer densitometrischen Auswertung von Zellkernen aus drei unabhängigen Experimenten \pm SEM. Ausgezählt wurden insgesamt 426 Zellkerne.

In Abbildung 3.24 ist die Fluoreszenz gezeigt, die durch die Transfektion mit dem Nrf2-GFP-Konstrukt und anschließende Behandlung mit dem Induktor tBHQ (50 μ M) und Quercetin, Kaempferol sowie Fisetin (50 μ M) für 4h im Zellkern zu detektieren war. Wie auch in den Immunoblot Analysen fand sich in den transfizierten Zellen, die mit DMSO behandelt wurden (Kontrolle), nur eine äußerst schwache Fluoreszenz im Nukleus und keine Fluoreszenz im Zytosol. Durch den Induktor tBHQ konnte die Fluoreszenz im

Zellkern erheblich gesteigert werden. Es wurde also mehr Nrf2 im Kern akkumuliert. Auch durch die Inkubation mit den Flavonoiden war im Vergleich zur Kontrolle mehr Nrf2-GFP im Kern zu detektieren. Für 50 μ M tBHQ ergab sich eine Signalverstärkung um den Faktor 3. Nach einer Inkubation mit 50 μ M Quercetin, Kaempferol und Fisetin wurde eine Signalverstärkung um den Faktor 2 detektiert.

Dieses Ergebnis bestätigt die Western Blot Analysen, lässt aber offen, wie die gesteigerte Nrf2-Proteinmenge im Kern entsteht. Da Nrf2 ein stress-sensitiver Transkriptionsfaktor ist, welcher auch seine eigene Expression steuert (REF), wurde zunächst untersucht, ob es sich bei der erhöhten Nrf2-Menge um eine *de novo* Synthese, also um eine transkriptionelle Regulation dieses Proteins handelt. Dazu wurden die mRNA Mengen von Nrf2 nach der Behandlung mit tBHQ mit Hilfe einer semiquantitativen RT-PCR untersucht.

3.2.4 Transkriptionelle Nrf2-Regulation durch tBHQ

Einige Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass Nrf2 durch unterschiedliche Induktoren auf transkriptioneller Ebene reguliert werden. Zum Einen wurde die gesteigerte Expression von Nrf2 über den Einsatz eines Nrf2-Promoter-Reportergen Assay gezeigt (Kwak, Itoh et al., 2002). Bei diesen Experimenten wurde Nrf2 als Induktor seiner eigenen Expression angesehen, da der Nrf2 Promoter ein ARE Motiv trägt. Andere Gruppen zeigten die gesteigerte Nrf2 Expression durch die quantitative Detektion der mRNA Menge *in vivo* (Yuan, Li et al., 2007). Die Abbildung 3.25 zeigt exemplarisch die elektrophoretische Auftrennung einer RT-PCR zur Expressionsanalyse (Abb. 3.25 (A)) von Nrf2 sowie die dazugehörige densitometrische Auswertung (Abb. 3.25 (B)). Aus der densitometrischen Auswertung geht hervor, dass die mRNA Menge von Nrf2 durch die Behandlung mit tBHQ in verschiedenen Konzentrationen und in unterschiedlichen Inkubationszeiträumen nicht verändert wurde. Vielmehr wurden Transkripte dieses Transkriptionsfaktors konstitutiv exprimiert.

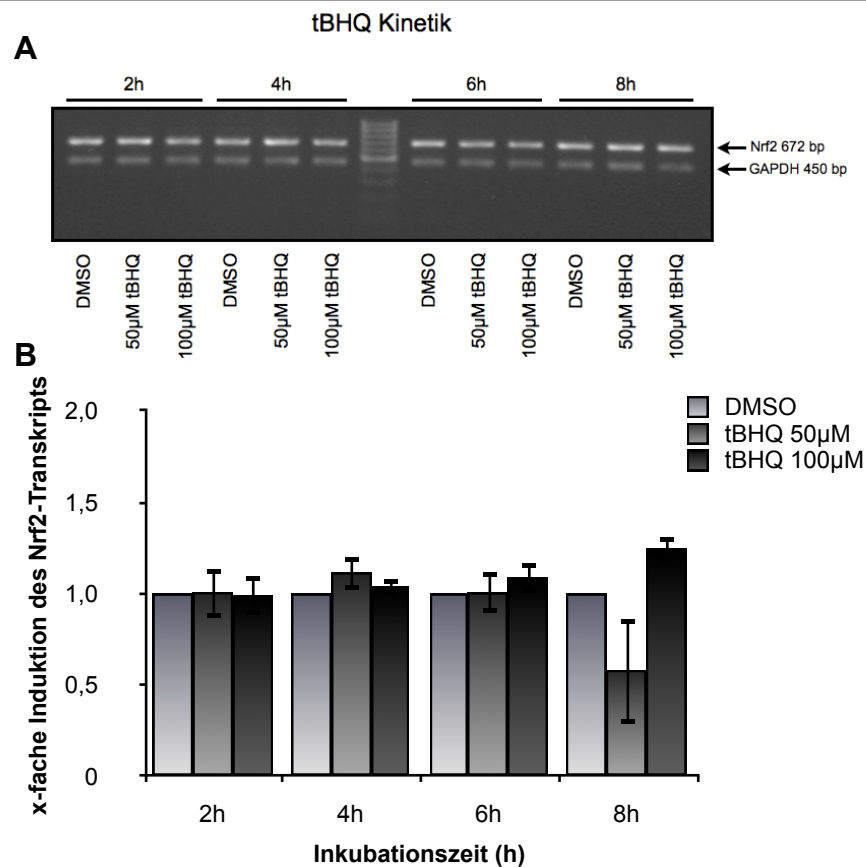


Abb.3.25: Transkriptionelle Regulation von Nrf2

0,5 x 10⁶ Hct 116 Zellen/Well wurden für 24h in 6-Well-Platten bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für die angegebenen Zeiträume mit 50 μM oder 100 μM tBHQ inkubiert. Nach der RNA-Isolierung mit Trizol wurden 2 μg RNA in eine RT-Reaktion eingesetzt. Aus der RT-Reaktion wurden 2 μg RNA über 32 Zyklen in einer PCR amplifiziert und je 5 μl der Nrf2 Amplifikation und 3 μl der GAPDH Amplifikation in einem 1,5% Agarosegel aufgetrennt. In (A) ist repräsentativ die elektrophoretische Auftrennung der Amplifikate dargestellt. (B) zeigt die densitometrische Auswertung der Mittelwerte der Bandenintensitäten (OD-Bkg/mm²) bezogen auf die Kontrolle und normiert auf den Standard (GAPDH). Die Mittelwerte stammen aus drei unabhängigen Versuchen ± SEM.

Da unter physiologischen Bedingungen das Nrf2 Protein, wie in den Immunoblot Analysen und den Lokalisationsversuchen gezeigt, nicht zu detektieren war und die Nrf2 Transkriptmenge durch die Inkubation mit tBHQ nicht verändert wurde, wurde untersucht ob die festgestellte starke Nrf2-Akkumulation im Kern in einer Stabilisierung des Proteins begründet liegt.

3.2.5 Posttranslationale Stabilisierung von Nrf2 (Proteasomen-Inhibition)

Neben der transkriptionellen Regulation von Nrf2 wäre auch eine Stabilisierung des Proteins durch die Inhibition des proteasomalen Abbaus eine Erklärung für die erhöhte Nrf2-Menge im Kern. Da Nrf2 unter basalen Bedingungen an Keap I, seinen Inhibitor, gebunden im Zytosol vorliegt und Keap I nicht nur für die Sequestrierung von Nrf2, sondern auch für dessen Ubiquitinierung verantwortlich ist (Yamamoto, Suzuki et al., 2008), ist eine schnelle Degradation wahrscheinlich. Es konnte bereits in verschiedenen

Zellen gezeigt werden, dass eine Inhibition des Proteasoms mit einer Stabilisierung von Nrf2 und einer erhöhten Induktion von Nrf2-Zielgenen korreliert ist (Dreger, Westphal et al., 2009; Sahni, Rydkina et al., 2008; Yamamoto, Sawada et al., 2007).

Bei der Untersuchung des proteasomalen Abbaus von Nrf2 wurden Hct 116 Zellen mit dem Proteasom Inhibitor MG132 und mit tBHQ für 4h inkubiert. Abbildung 3.26 zeigt die Umsetzung der nukleären als auch der zytosolischen Proteinfraction mit einem spezifischen Anti-Nrf2-Antikörper und lässt deutlich eine Akkumulation von Nrf2 im Kern erkennen.

Diese starke Ansammlung von Nrf2 im Kern war sowohl in der mit MG132 behandelten Probe als auch in der mit tBHQ behandelten Probe zu finden. MG132 zeigte auch eine Bande in der zytosolischen Fraktion. Dieses Signal war in der tBHQ Probe erheblich schwächer und in der Kontroll-Probe nicht zu detektieren. Die Inkubation mit dem Proteasominhibitor MG132 und mit dem Induktor tBHQ zeigten vergleichbare Signale, welche in der Kontrollprobe nicht zu finden sind.

Zur weiteren Untersuchung der Stabilisierung von Nrf2 durch die Inhibition des Proteasoms wurden Hct 116 Zellen mit dem Inhibitor MG132 inkubiert (1 μM) oder dem generierten Nrf2-GFP-Konstrukt transfiziert und mit MG132 inkubiert.

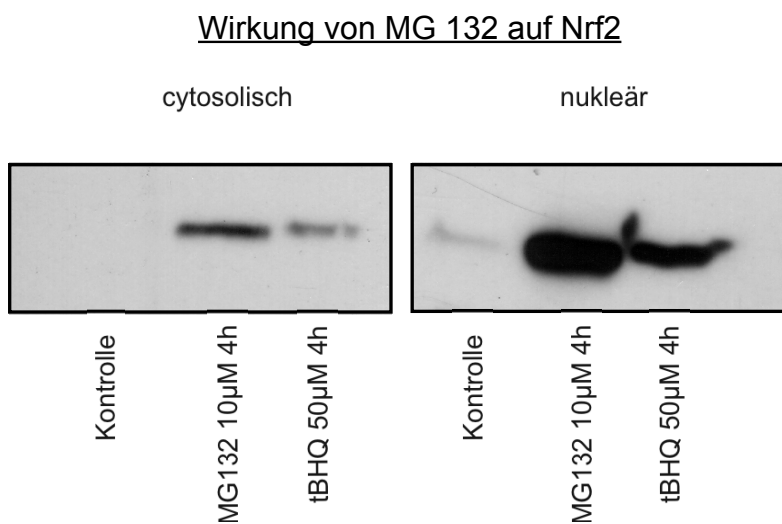


Abb.3.26: Proteasomale Inhibition
 0,5 x 10⁶ Hct 116 Zellen/Well wurden für 24h in 6-Well-Platten bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert und anschließend 4h mit 10 μM MG132 oder mit 50 μM tBHQ inkubiert. 25 μg des nukleären Proteins sowie 50 μg des zytosolischen Proteins in einer 10 %igen SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Proben wurden mit einem polyklonalen Antikörper gegen Nrf2 (Nrf2;sc-H-300) umgesetzt. Gezeigt sind die jeweils die zytosolische und die nukleäre Proteinfraction der MG132 und der tBHQ-behandelten Probe gegen die Kontrolle.

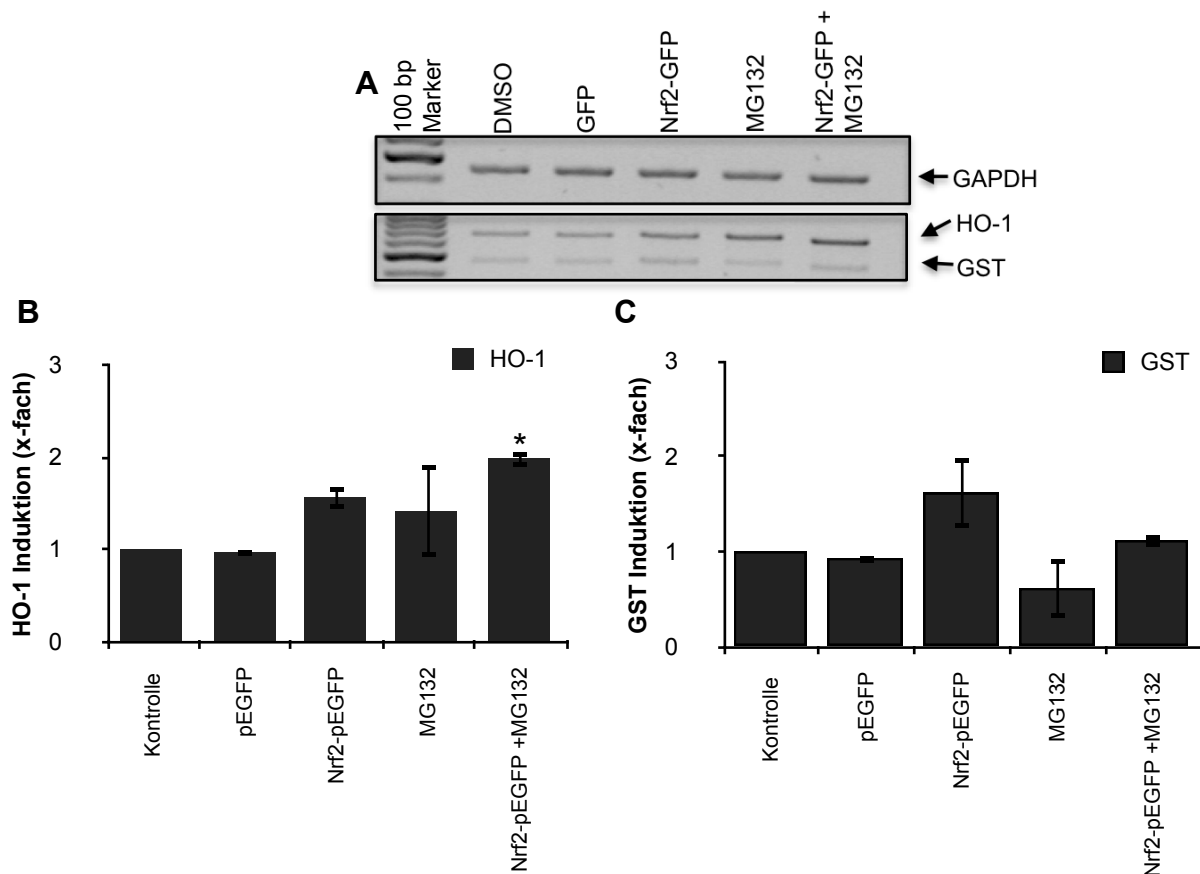


Abb.3.27: Induktion von HO-1 und GST nach Nrf2 Überexpression

0,5 x10⁶ Hct 116 Zellen/Well wurden transient transfiziert oder ohne Behandlung auf eine 6-Well Platte ausgesät und nach einer Anhaftungszeit von 24h für 4h mit DMSO (Kontrolle) oder MG132 (1 µM) inkubiert. Transfiziert wurden sowohl der leere Vektor pEGFP als auch das Nrf2-GFP-Fusionskonstrukt. Nach der RNA-Isolierung mit Trizol wurden 2 µg RNA in eine RT-Reaktion eingesetzt. Aus der RT-Reaktion wurden 2 µg RNA über 32 Zyklen in einer PCR amplifiziert und je 5 µl der HO-1(A) oder GST (B) Amplifikation und 3 µl der GAPDH Amplifikation in einem 1,5% Agarosegel aufgetrennt. (A) zeigt eine repräsentative elektrophoretische Auftrennung der Proben. Die Abbildungen (B) und (C) zeigen die densitometrische Auswertung der Mittelwerte der Bandenintensitäten (OD-Bkg/mm²) bezogen auf die Kontrolle und normiert auf den Standard (GAPDH). Die Mittelwerte stammen aus drei unabhängigen Versuchen ± SEM.

Nach 4h wurde die RNA isoliert und eine semiquantitative RT-PCR durchgeführt. Untersucht wurden dabei die Transkripte der beiden Zielproteine HO-1 (Hämoxygenase 1) und GST A2 (Glutathion-A-Transferase A2). Von beiden Enzymen ist bekannt, dass sie durch den Nrf2-Signalweg induziert werden (Itoh, Tong et al., 2004). Die Abbildung 3.27 (B) und (C) zeigt die densitometrische Auswertung dieses Versuchs. Durch die Transfektion mit dem Nrf2-GFP-Konstrukt wurde die HO-1 mRNA Expression leicht induziert, wohingegen sich die Transkriptmenge bei einer Inkubation mit 1 µM MG132 nicht änderte. Werden die Zellen mit dem Nrf2-GFP Konstrukt transfiziert und mit MG132 behandelt, kam es zu einer stärkeren Induktion der HO-1 als bei den Zellen, welche nur mit Nrf2-Konstrukt transfiziert wurden. Die GST mRNA Menge wurde ebenfalls durch die Transfektion induziert (Abb. 3.27 (B)), jedoch verstärkte sich die Induktion bei einer zusätzlichen Inkubation mit MG132 nicht. Durch die Inkubation mit MG132 allein ist allerdings eine Tendenz zur Reduktion der GST-Transkriptmenge zu

beobachten. Dieser Versuch zeigt im Fall der HO-1, dass es bei einer nicht toxischen Konzentration des Proteasom-Inhibitors MG132 zu einer verstärkten Nrf2 Aktivität kam. Die verstärkte Nrf2 Aktivität war bei der Untersuchung der transkriptionellen Expression der GST nur ohne den Inhibitor festzustellen. Um die Ergebnisse der Immunoblot Analysen und der RT-PCR zu bestätigen, wurden weitere Experimente durchgeführt, welche die Aktivität des Proteasoms messen.

Da das Proteasom unterschiedliche proteolytische Aktivitäten besitzt, wurde mittels eines Proteasom Inhibitor Assays die Chymotrypsin-Aktivität des Proteasoms untersucht. Neben der Chymotrypsin-Aktivität kann das Proteasom auch eine Trypsin- oder eine Caspase-Aktivität ausüben. Die Art der Aktivität ist von der Struktur des Substrats abhängig.

Um eine mögliche Inhibition des Proteasoms durch die in dieser Arbeit verwendeten Substanzen festzustellen, wurden Hct 116 erneut 4h mit 50 μ M tBHQ und 50 μ M Apigenin, Quercetin, Kaempferol und Luteolin behandelt. Durch die Zugabe des Substrates, Aminoluziferin, das durch mehrere Aminosäuren maskiert ist, welche durch die Chymotrypsin-Aktivität des Proteasoms abgespalten werden, kann das lumineszente Substrat freigesetzt werden. Die Abnahme der Lumineszenz ist also direkt mit der Inhibition der Chymotrypsin-Aktivität des Proteasoms korreliert. Abbildung 3.28 zeigt die Abnahme der Lumineszenz resultierend aus der Behandlung mit tBHQ, Apigenin, Quercetin, Kaempferol, Luteolin und dem Proteasom-Inhibitor MG132.

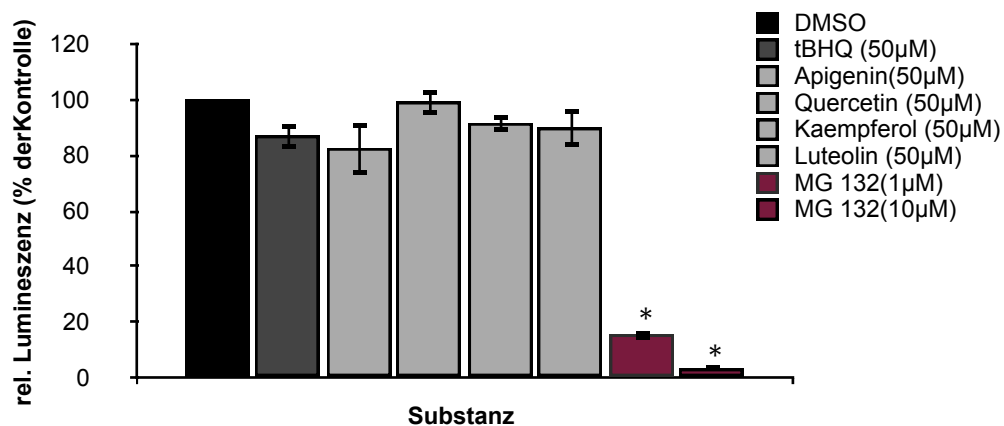


Abb.3.28: Proteasomale Inhibition

1 x 10⁶ Hct 116 Zellen/Well wurden für 24h in einer 96-Well-Platte bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 4h mit den angegebenen Substanzen inkubiert. Nach der Zugabe des Assayreagenz wurde die Umsetzung des Proteasomen-Substrates als Lumineszenz gemessen. Gezeigt sind die Mittelwerte der relativen Lumineszenzwerte nach 20 min Messung \pm SEM *= p<0,05, getestet mit Oneway ANOVA und Bonferroni post hoc Test gegen die Kontrolle.

MG132 diente in diesem Experiment als Positiv-Kontrolle und wurde in zwei Konzentrationen eingesetzt. Die eingesetzten Konzentrationen lagen nicht im toxischen Bereich, für sie konnte bei einer Inkubationsdauer von 4h kein EC₅₀ Wert gemessen

werden. Allerdings hat die Inkubation mit 1 μM MG132 eine stark inhibierende Wirkung, das Proteasom hatte nur noch 20 % der ursprünglichen Aktivität. Wie der Abbildung 3.28 zu entnehmen ist, wirkte tBHQ nicht inhibierend auf die Chymotrypsin-Aktivität des Proteasoms. Auch die verwendeten Flavonoide zeigten keine inhibierende Wirkung.

Unabhängig von dem Mechanismus der Nrf2 Aktivierung konnte in der vorliegenden Arbeit bereits gezeigt werden, dass Nrf2 in der Lage ist, das ARE zu aktivieren. Die Bindung von Nrf2 an dieses DNA-Element ist Voraussetzung für die vermehrte Expression von Phase-II- und antioxidativen Enzymen. Neben der Wirkung der Überexpression von Nrf2 (Abschnitt 3.2.2) auf das ARE wurde auch eine Reihe von Flavonoiden auf die Fähigkeit, das ARE zu aktivieren, untersucht.

Dazu wurde ein ARE-Luziferase-Reportergen-Konstrukt genutzt. In diesen Vektor wurde direkt vor die Sequenz des Luziferasegens die Konsensussequenz des ARE aus der Promotorregion der GSTY α kloniert. Der zugrunde liegende Luziferase Vektor besitzt nur einen schwachen konstitutiven Promoter, so dass die Expression der Luziferase nur durch die Bindung an die ARE-Konsensussequenz induziert werden kann. Es konnte gezeigt werden, dass Nrf2 an diese Sequenz bindet und das ursprüngliche Gen der GSTY α vermehrt exprimiert (Wasserman und Fahl, 1997). Im Folgenden wurden Hct 116 Zellen mit diesem Konstrukt transfiziert und anschließend 24h mit Flavonoiden inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen lysiert, mit Luziferin und ATP versetzt und die Menge an gebildetem Luziferin in einem Plattenlesegerät gemessen.

3.3 ARE-Aktivierung

Um festzustellen, ob die starke Akkumulation von Nrf2 im Nukleus auch eine Aktivierung des ARE auslöst, wurden Hct 116 Zellen mit einem ARE-Luziferase Reportergen Konstrukt transfiziert und mit tBHQ inkubiert. In Abbildung 3.29 ist die Luziferase-Aktivität als Maß für die Aktivierung des ARE für verschiedene Substanzen nach einer 24h Inkubation dargestellt. tBHQ zeigte eine 7-fache, Quercetin eine 6,5-fache Aktivierung, während die getesteten Flavonoide eine vergleichbar starke Aktivierung des ARE nicht zeigten.

Von den getesteten Flavonoiden zeigten nur Kaempferol (2-fach) und Fisetin (3,4-fach) eine zur Kontrolle verstärkte Aktivierung des ARE. Die anderen getesteten Flavonoide bewirkten keine signifikante Aktivierung des ARE unter den gegebenen experimentellen Bedingungen. Nach einer Inkubation mit 50 μM Chrysin reduzierte sich die relative Lumineszenz signifikant unter den Lumineszenzwert der Kontrolle.

3.3.1 ARE Aktivierung durch tBHQ

Weiter wurde die Konzentrations- und Zeitabhängigkeit der ARE-Aktivierung der tBHQ Inkubation untersucht, um den Zeitpunkt und die Konzentration des maximalen Effekts des Induktors zu bestimmen. In Abbildung 3.30 zeigt sich für tBHQ erst nach einer Inkubationszeit von 24h eine konzentrationsabhängige Zunahme der ARE-Aktivität, die bei einer Konzentration von 100 μM einen maximalen Lumineszenzwert erreicht. Nach 4h Inkubationszeit ist nur eine sehr schwache Aktivierung des ARE zu detektieren, der höchste Wert ist eine 1,5-fache Steigerung der Aktivierung bei 50 μM tBHQ. Nach 8h Inkubation kann eine 2-fache Aktivierung für 25 μM und 50 μM und eine 3-fache Aktivierung bei 100 μM tBHQ detektiert werden. Lediglich nach der 24h Inkubation konnte eine starke Lumineszenzsteigerung in Abhängigkeit von der Konzentration detektiert werden. So ist bei einer Inkubation mit 25 μM tBHQ eine 3-fache Aktivierung des ARE festzustellen, die auf eine 11-fache Aktivierung bei 100 μM tBHQ zunimmt. Somit ist die ARE-Aktivierung wie in Abbildung 3.30 dargestellt nach 24h Inkubation von der Konzentration abhängig. Nach kürzeren Inkubationszeiträumen zeigt sich diese Konzentrationsabhängigkeit nicht.

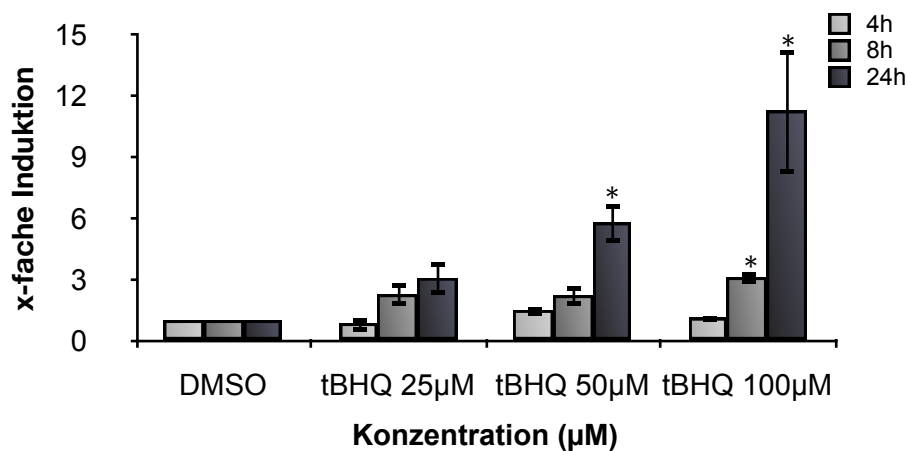


Abb. 3.30: Zeit- und konzentrationsabhängige ARE-Aktivierung durch tBHQ

0,5 x 10⁶ Hct 116 Zellen/Well wurden transfiziert, auf 6-Well-Platten ausgesät und nach 24h Anheftungszeit für 4h, 8h und 24h mit 10 μM , 25 μM , 50 μM und 100 μM tBHQ inkubiert. Nach der Lyse der Zellen wurden je 20 μl Lysat in einen Luziferase-Assay eingesetzt. Durch Zugabe von Luziferin und ATP in einem Multi-Well-Plattenlesegerät wurde die Reaktion gestartet und Lumineszenzentwicklung detektiert. Gezeigt sind die RLU-Mittelwerte \pm SEM aus drei unabhängigen Messungen bezogen auf die Kontrolle und auf die Proteinkonzentration normiert. Signifikanzen wurden mit einer Oneway ANOVA und einem Bonferroni post hoc Test gegen die Kontrolle; * = $p < 0,05$ ermittelt.

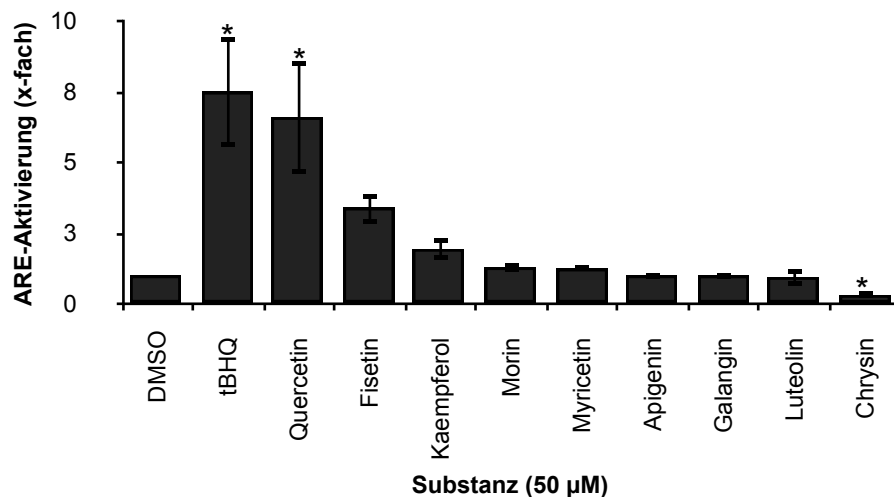


Abb. 3.29: ARE-Aktivierung durch tBHQ und Flavonoide

0,5 x 10⁶ Zellen/Well wurden transfiziert, auf eine 6-Well Platte ausgesät und für 24h bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Die Zellen wurden anschließend mit den angegebenen Substanzen 24h behandelt, lysiert und nach Zugabe von Luziferin und ATP wurde die Lumineszenz detektiert. Dargestellt sind die Mittelwerte der gemessenen relativen Lumineszenz bezogen auf die unbehandelten, transfizierten Zellen, normiert auf die Proteinkonzentration in den gemessenen wells, ± SEM; *= p<0,05, getestet mit Oneway ANOVA und Bonferroni post hoc Test gegen die Lösemittelkontrolle.

3.3.2 ARE Aktivierung durch Flavonoide

Um festzustellen ob für Flavonoide die ARE-Aktivierung auch einer Konzentrationsabhängigkeit folgt, wurde der ARE-Luziferase-Assay mit unterschiedlichen Quercetin-, Kaempferol und Fisetinkonzentrationen wiederholt. Abbildung 3.31 (A) zeigt für Quercetin eine konzentrationsabhängige Zunahme der ARE-Aktivität nach 24h Inkubation. Bei 10 µM Quercetin wurde eine 2,6-fache, bei 25 µM eine 7-fache und bei 50 µM eine 8-fache Aktivität des ARE im Vergleich zu der Kontrolle detektiert.

Für Kaempferol (Abb.3.31 (B)) konnte nach 24h eine 5-fache Induktion bei 50 µM gemessen werden. Fisetin zeigte dagegen eine moderate Induktion mit einer nur 3,4-fachen Steigerung bei 50 µM (Abb. 3.31 (C)). Weiterhin zeigte Fisetin bei kürzeren Inkubationszeiten keine Aktivierung des ARE. Auch Apigenin, Luteolin, Galangin und Morin wurden auf ihre Fähigkeit das ARE zu aktivieren untersucht, es wurden jedoch keine weiteren Anstiege der ARE Aktivität detektiert (Abb. 3.31 (D)). Nachdem für tBHQ, Quercetin, Kaempferol und Fisetin eine Aktivierung des Nrf2-Signalwegs gezeigt worden ist, wurde weiter die Wirkung dieser Substanzen auf die Induktion von antioxidativen Enzymen untersucht. Als Zielgen wurde zunächst die Hämoxxygenase (HO-1) untersucht. Es ist bekannt, dass die HO-1 durch Stresszustände wie oxidativen Stress induziert wird (He, Chen et al., 2008; Lee, Heo et al., 2006) aber auch Substanzen wie Hemin, Kohlenmonoxid oder tBHQ sind in der Lage die HO-1 Expression zu induzieren (Li, Zhong et al., 2007). Dabei besteht ein direkter

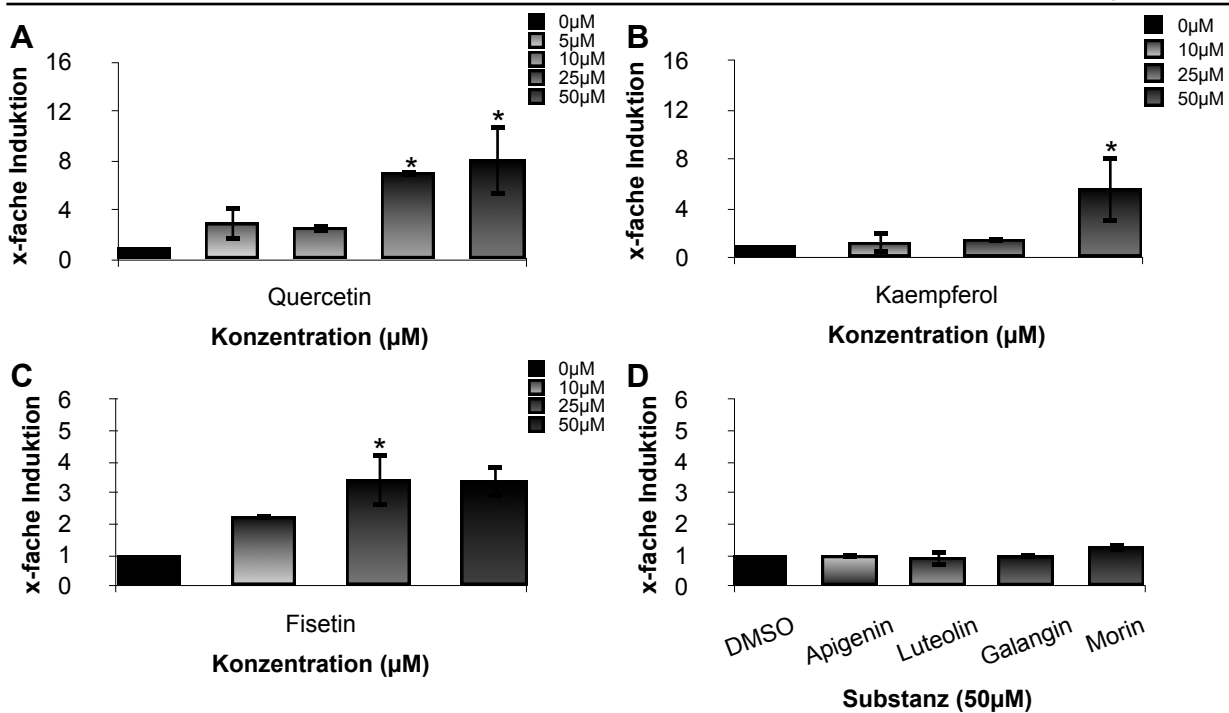


Abb. 3.31: ARE-Aktivierung durch Flavonoide

0,5 x 10⁶ Hct 116 Zellen/Well wurden auf eine 6-Well-Platte ausgesät und transfiziert. Nach 24h Anhaftungszeit wurde für 4h mit 10 µM, 25 µM und 50 µM (A) Quercetin, (B) Kaempferol, (C) Fisetin und mit (D) 50 µM Apigenin, Luteolin, Galangin und Morin inkubiert. Nach der Lyse der Zellen wurden je 20µl Lysat in einen Luziferase-Assay eingesetzt. Durch Zugabe von Luziferin und ATP in einem Multi-Well-Plattenlesegerät wurde die Reaktion gestartet und Lumineszenzentwicklung detektiert. Gezeigt sind die RLU-Mittelwerte ± SEM aus drei unabhängigen Messungen bezogen auf die Kontrolle und auf die Proteinkonzentration normiert. Signifikanzen wurden mit einer Oneway ANOVA und einem Bonferroni post hoc Test; p<0,05 ermittelt.

Zusammenhang zwischen der Aktivierung von Nrf2 und der Induktion der HO-1 (Prawan, Keum et al., 2008). Die Untersuchung der HO-1 Induktion wurde mittels semiquantitativer RT-PCR durchgeführt.

3.4 Regulation antioxidativer Enzyme

3.4.1 Regulation der HO-1

3.4.1.1 Induktion der HO-1 durch tBHQ

Um die Induktion der Hämoxygenase (HO-1) zu detektieren, wurden Hct 116 Zellen mit tBHQ oder Flavonoiden in verschiedenen Konzentrationen und für verschiedene Inkubationszeiträume inkubiert und mittels semiquantitativer RT-PCR untersucht.

In Abbildung 3.32 ist die Induktion der HO-1 durch 50 µM tBHQ in Abhängigkeit von der Zeit gezeigt. Bereits nach einer 4h Inkubation wurde die mRNA Menge der HO-1 um den Faktor 2 erhöht. Nach 8h Behandlung stieg die mRNA Menge auf das 3,7-Fache der Kontrolle an. Nach einer Inkubationszeit von 24h fiel der mRNA Level erneut auf das 2,4-Fache ab. Somit eignet sich tBHQ auch bei der Induktion der HO-1 Transkripte als Positiv-Kontrolle. Da sich die HO-1 durch den Induktor tBHQ in Hct 116 Zellen

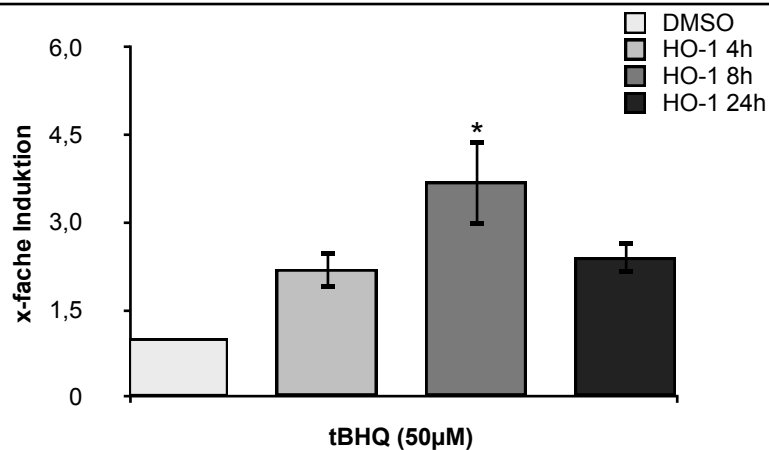


Abb.3.32: HO-1 Induktion durch tBHQ

0,5 x 10⁶ Hct 116 Zellen/Well wurden auf 6-Well-Platten ausgesät und nach 24h Anhaftungszeit für 4h, 8h und 24h mit 50 µM tBHQ inkubiert. Nach der RNA-Isolation mit TRIZOL[®] wurde eine reverse Transkription durchgeführt. Aus der RT-Reaktion wurden 2 µg RNA über 32 Zyklen in einer PCR amplifiziert und je 5 µl der HO-1 Amplifikation und 3 µl der GAPDH Amplifikation in einem 1,5% Agarosegel aufgetrennt. Die Abbildung zeigt die densitometrische Auswertung der Mittelwerte der Bandenintensitäten (OD-Bkg/mm²) bezogen auf die Kontrolle und normiert auf den Standard (GAPDH). Die Mittelwerte stammen aus drei unabhängigen Versuchen ± SEM; * = p<0,05, getestet mit Oneway ANOVA und Bonferroni post hoc Test gegen die Kontrolle.

nachweisbar induzieren ließ, wurde untersucht, ob Flavonoide die Expression dieses Enzyms ebenfalls in Hct 116 Zellen induzieren können.

Zu diesem Zweck wurden die humanen Kolon-Karzinomzellen mit 50 µM Quercetin 4h, 8h und 24h inkubiert.

3.4.1.2 Regulation der HO-1 durch Flavonoide

Neben der Wirkung von tBHQ auf die Expression der HO-1 wurde Quercetin auf einen regulierenden Einfluss hin untersucht. Allerdings ist aus der Abbildung 3.33 ersichtlich, dass es durch Quercetin zwar zu einer signifikanten Änderung der HO-1 Expression kam, jedoch die Erhöhung keine biologische Relevanz besitzt, da sie die mRNA Menge nur um das 1,5-Fache erhöhte. Auch für Kaempferol kam es zu keiner signifikanten Expressionssteigerung, wie aus Abbildung 3.34 ersichtlich wird. Auch für die ebenfalls untersuchten Flavonoide Apigenin, Galangin und Morin kam es zu keiner Änderung der HO-1 mRNA Menge. Da der Inkubationszeitraum von 24h für die transkriptionelle Induktion auch im Fall von tBHQ zu keinem signifikanten Anstieg der HO-1 Transkripte geführt hatte, wurden die Hct 116 Zellen mit Quercetin, Kaempferol, Apigenin und Luteolin inkubiert und die RT-PCR erneut durchgeführt.

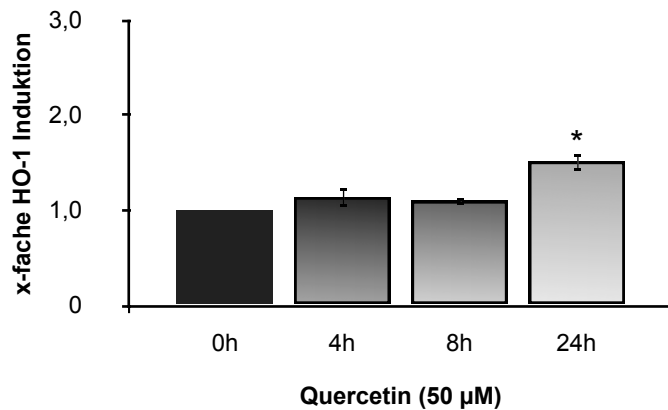


Abb. 3.33: HO-1 Induktion durch Quercetin

0,5 x 10⁶ Hct 116 Zellen/Well wurden auf 6-Well-Platten ausgesät und nach 24h Anhaftungszeit für 4h, 8h und 24h mit 50 µM Quercetin inkubiert. Nach der RNA-Isolation mit TRIZOL[®] wurde eine reverse Transkription durchgeführt. Aus der RT-Reaktion wurden 2 µg RNA über 32 Zyklen in einer PCR amplifiziert und je 5 µl der HO-1 Amplifikation und 3 µl der GAPDH Amplifikation in einem 1,5% Agarosegel aufgetrennt. Die Abbildung zeigt die densitometrische Auswertung der Mittelwerte der Bandenintensitäten (OD-Bkg/mm²) bezogen auf die Kontrolle und normiert auf den Standard (GAPDH). Die Mittelwerte stammen aus drei unabhängigen Versuchen ± SEM.; * = p<0,05, getestet mit Oneway ANOVA und Bonferroni post hoc Test gegen die Kontrolle.

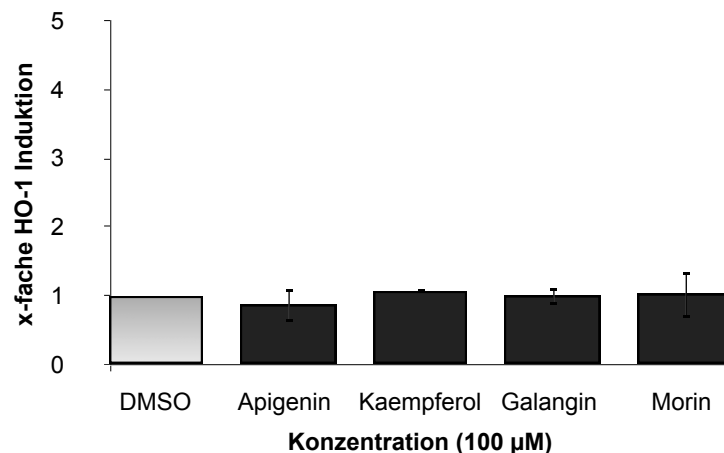


Abb. 3.34: HO-1 Induktion durch Apigenin, Kaempferol, Galangin und Morin nach 24h

0,5 x 10⁶ Hct 116 Zellen/Well wurden auf 6-Well-Platten ausgesät und nach 24h Anhaftungszeit für 24h mit 50 µM Apigenin, Kaempferol, Galangin und Morin inkubiert. Nach der RNA-Isolation mit TRIZOL[®] wurde eine reverse Transkription durchgeführt. Aus der RT-Reaktion wurden 2 µg RNA über 32 Zyklen in einer PCR amplifiziert und je 5 µl der HO-1 Amplifikation und 3 µl der GAPDH Amplifikation in einem 1,5% Agarosegel aufgetrennt. Die Abbildung zeigt die densitometrische Auswertung der Mittelwerte der Bandenintensitäten (OD-Bkg/mm²) bezogen auf die Kontrolle und normiert auf den Standard (GAPDH). Die Mittelwerte stammen aus drei unabhängigen Versuchen ± SEM

Werden Hct 116 Zellen für 4h mit Kaempferol inkubiert, zeigte sich wiederum keine Änderung der HO-1 Transkriptmenge (Abb.3.35 (B) & (D)). Ein vergleichbares Ergebnis wurde durch die 4h Inkubation mit Quercetin erzielt (Abb. 3.35 (A) & (C)).

Allerdings konnte für die Behandlung mit Apigenin und Luteolin eine Reduktion der HO-1 Expression nach 4h Inkubation detektiert werden. Abbildung 3.36 zeigt die HO-1 Reduktion durch Apigenin und Luteolin.

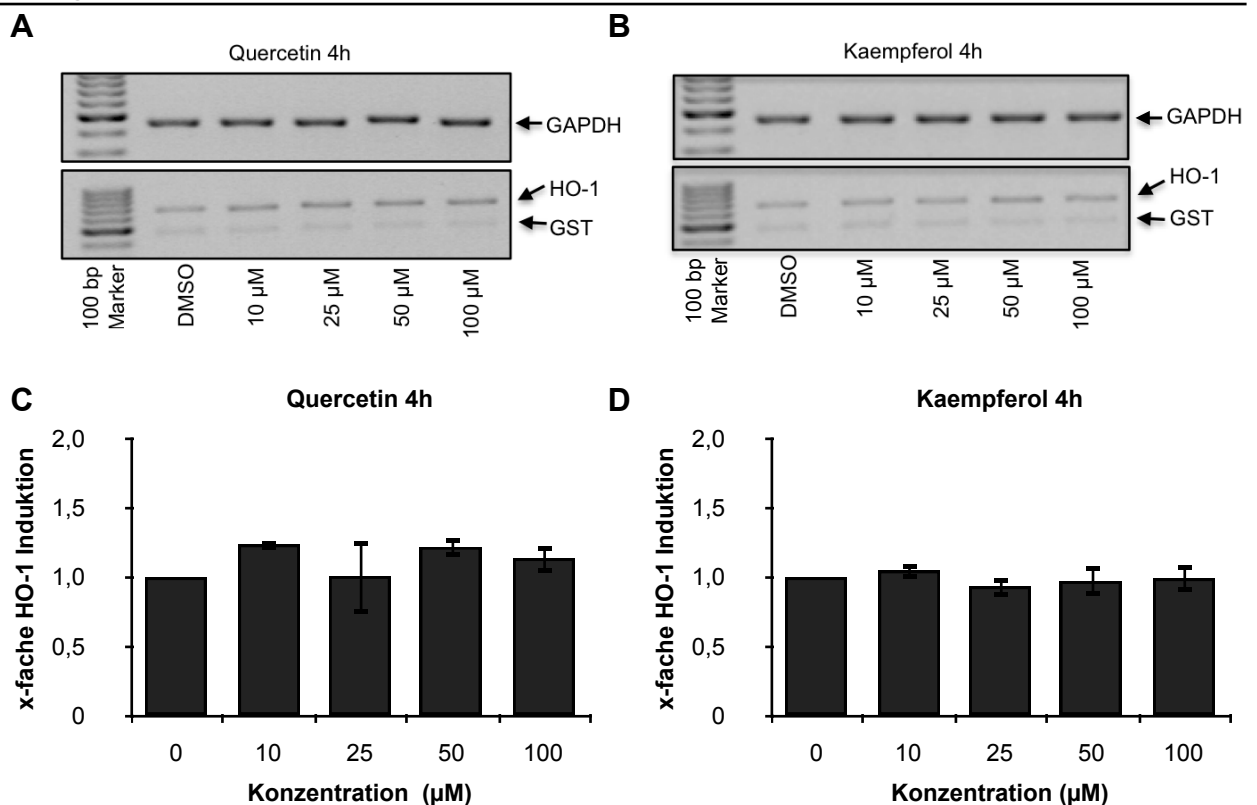


Abb. 3.35: HO-1 Induktion durch 4h Inkubation mit Quercetin und Kaempferol
 0,5 x 10⁶ Hct 116 Zellen/Well wurden auf 6-Well-Platten ausgesät und nach 24h Anhaftungszeit für 4h, mit den angegebenen Konzentrationen an (A) Quercetin und (B) Kaempferol inkubiert. Nach der RNA-Isolation mit TRIZOL[®] wurde eine reverse Transkription durchgeführt. Aus der RT-Reaktion wurden 2 µg RNA über 32 Zyklen in einer PCR amplifiziert und je 5 µl der HO-1 Amplifikation und 3 µl der GAPDH Amplifikation in einem 1,5% Agarosegel aufgetrennt. (A) und (B) zeigen die elektrophoretische Auftrennung der GST und der HO-1 Amplifikate. Die Abbildungen (C) und (D) zeigen die densitometrische Auswertung der Mittelwerte der Bandenintensitäten (OD-Bkg/mm²) bezogen auf die Kontrolle und normiert auf den Standard (GAPDH). Die Mittelwerte stammen aus drei unabhängigen Versuchen ± SEM

Dabei konnte Apigenin in einer 50 µM Inkubation die Expression um 40 % senken (Abb. 3.36 (C)). Abbildung 3.36 (D) zeigt, dass eine Reduktion um 40 % durch Luteolin erst bei einer Konzentration von 100 µM erreicht wird.

Für Quercetin und Kaempferol ergab sich nach einer 8h Inkubation ein zur 4h Behandlung vergleichbares Bild. Es kam erneut zu keiner Änderung der Transkriptmenge. Jedoch wurde nach einer 8h Inkubation mit Apigenin die HO-1 Expression genau wie bei der 4h Behandlung gesenkt (Abb. 3.37). Der Abbildung ist zu entnehmen, dass eine 8h Inkubation mit 50 µM Apigenin die Transkriptmenge der HO-1 um 80 % reduziert.

Wurden Hct 116 Zellen 24h mit 100 µM Apigenin und Luteolin behandelt, war die zuvor detektierte Reduktion der Expression nicht mehr festzustellen.

Abbildung 3.34 zeigt, dass es auch bei Apigenin, Kaempferol, Galangin und Morin nicht zu einer signifikanten transkriptionellen Regulation der HO-1 kam.

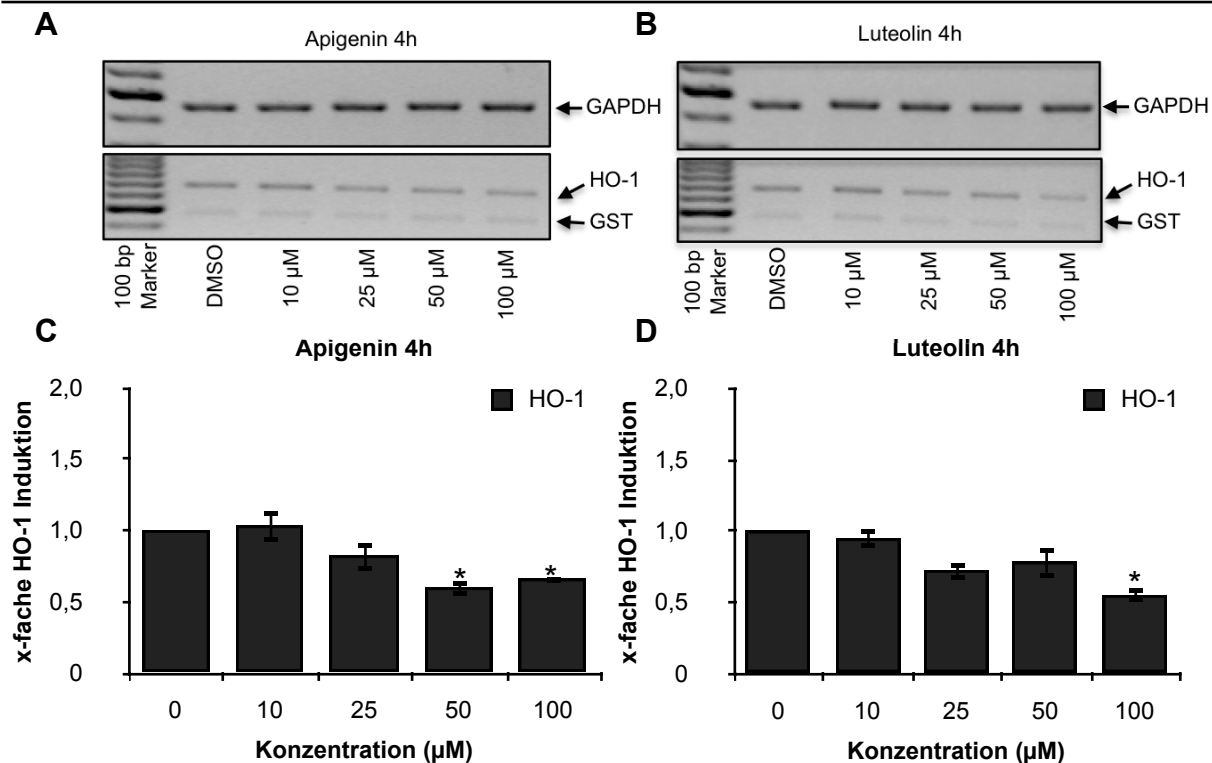


Abb. 3.36: HO-1 Induktion durch Apigenin und Luteolin

$0,5 \times 10^6$ Hct 116 Zellen/Well wurden auf 6-Well-Platten ausgesät und nach 24h Anheftungszeit für 4h, mit den angegebenen Konzentrationen an (A) Apigenin und (B) Luteolin inkubiert. Nach der RNA-Isolation mit TRIZOL® wurde eine reverse Transkription durchgeführt. Aus der RT-Reaktion wurden 2 µg RNA über 32 Zyklen in einer PCR amplifiziert und je 5 µl der HO-1 Amplifikation und 3 µl der GAPDH Amplifikation in einem 1,5% Agarosegel aufgetrennt. (A) und (B) zeigen die elektrophoretische Auftrennung der GST und der HO-1 Amplifikate. Die Abbildungen (C) und (D) zeigen die densitometrische Auswertung der Mittelwerte der Bandenintensitäten (OD-Bkg/mm²) bezogen auf die Kontrolle und normiert auf den Standard (GAPDH). Die Mittelwerte stammen aus drei unabhängigen Versuchen ± SEM; * = $p < 0,05$, getestet mit Oneway ANOVA und Bonferroni post hoc Test gegen die Kontrolle.

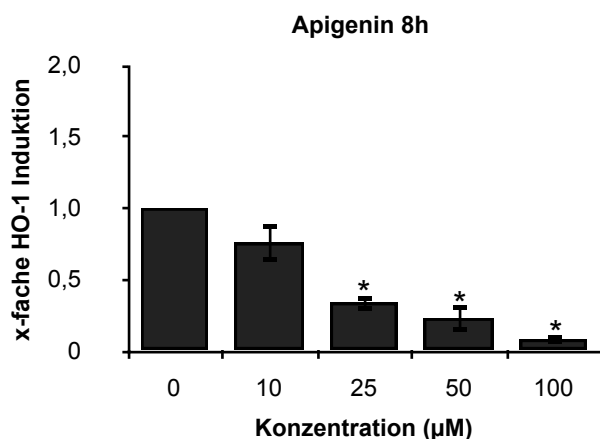


Abb. 3.37: HO-1 Induktion durch 8h Apigenin

$0,5 \times 10^6$ Hct 116 Zellen/Well wurden auf 6-Well-Platten ausgesät und nach 24h Anheftungszeit für 8h, mit den angegebenen Konzentrationen an Apigenin inkubiert. Nach der RNA-Isolation mit TRIZOL® wurde eine reverse Transkription durchgeführt. Aus der RT-Reaktion wurden 2 µg RNA über 32 Zyklen in einer PCR amplifiziert und je 5 µl der HO-1 Amplifikation und 3 µl der GAPDH Amplifikation in einem 1,5% Agarosegel aufgetrennt. Die Abbildung zeigt die densitometrische Auswertung der Mittelwerte der Bandenintensitäten (OD-Bkg/mm²) bezogen auf die Kontrolle und normiert auf den Standard (GAPDH). Die Mittelwerte stammen aus drei unabhängigen Versuchen ± SEM; * = $p < 0,05$, getestet mit Oneway ANOVA und Bonferroni post hoc Test gegen die Kontrolle.

Da im Gegensatz zu den Ergebnissen in der Literatur keine verstärkte transkriptionelle Expression der HO-1 detektiert werden konnte (Yang, Zhang et al., 2009), wurde der Versuch unternommen, die Induktion der HO-1 durch Flavonoide durch eine Vorinkubation mit Hemin zu verstärken. Es ist bekannt, dass Hemin die HO-1 durch die Bindung von Bach 1, eines Repressors der Transkription, die Expression der HO-1 reguliert (Zenke-Kawasaki, Dohi et al., 2007).

3.4.1.3 Steigerung der HO-1 Induktion durch Hemin

Die Expression der HO-1 wird nicht nur durch Nrf2 aktiviert (Harada, Sugimoto et al., 2008), sondern auch durch andere regulatorische Proteine reprimiert. Bach 1 ist ein prominenter Inhibitor der transkriptionellen HO-1 Expression (Sakoda, Igarashi et al., 2008). Es konnte in alveolaren Makrophagen festgestellt werden, dass die Induktion der HO-1 stark mit einem zu Gunsten von Nrf2 verschobenen Gleichgewicht zwischen den beiden Faktoren einhergeht (Goven, Boutten et al., 2008). In humanen Hepatomzellen (Huh-7) konnte gezeigt werden, dass eine durch Kobalt Protoporphyrin ausgelöste Destabilisierung des Bach 1 Proteins mit einer Stabilisierung von Nrf2 korreliert ist (Shan, Lambrecht et al., 2006). Diesen Untersuchungen liegt zugrunde, dass Bach 1 durch Strukturverwandte des Hemins reprimiert wird (Tsiftoglou, Tsamadou et al., 2006). Hemin bindet an Bach 1, welches wiederum durch die Bindung von seinem responsiven DNA-Element entfernt wird (Reichard, Motz et al., 2007). Da die transkriptionelle HO-1 Induktion durch Flavonoide, welche den Nrf2-Signalweg aktivieren schwer zu detektieren war, wurden Hct 116 zusätzlich zu Quercetin mit Hemin inkubiert, um eine Reprimierung durch Bach 1 während der Inkubation auszuschließen. Abbildung 3.38 (B) zeigt das Ergebnis der densitometrischen Auswertungen der durchgeführten RT-PCR. Hct 116 Zellen wurden für 1h mit Hemin (5 μ M) vorinkubiert. Nachdem das heminhaltige Medium entfernt worden war, wurden die Zellen entweder nur mit DMSO (Kontrolle) oder mit 50 μ M Quercetin für 4h inkubiert. Aus der Abbildung lässt sich entnehmen, dass die HO-1 Expression nicht durch die Vorinkubation mit Hemin gesteigert werden konnte. Werden die Zellen nach der Vorinkubation mit Quercetin behandelt, so kam es zu einem Anstieg der transkriptionellen HO-1 Expression. Vergleicht man die Induktion der HO-1 der Quercetin Inkubationen mit der Induktion der zusätzlich mit Hemin inkubierten Zellen, so stellt man jedoch keine Steigerung der HO-1 Induktion durch die Behandlung mit Hemin fest.

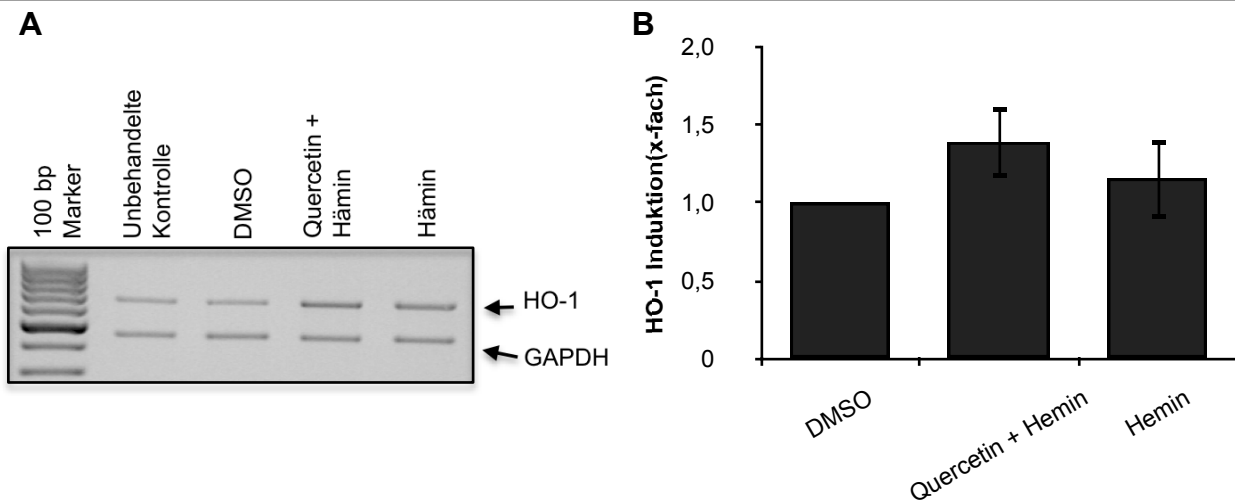


Abb. 3.38: Gesteigerte HO-1 Induktion durch Hemin

$0,5 \times 10^6$ Hct 116 Zellen/Well wurden nach 24h Anhaftungszeit in 6-Well-Platten für 4h mit $5 \mu\text{M}$ Hemin für 1h inkubiert. Anschließend wurden das Hemin-haltige Medium entfernt und durch frisches Medium ersetzt. Die Zellen wurden für weitere 4h mit $50 \mu\text{M}$ Quercetin wie angegeben inkubiert. Nach der RNA-Isolation mit TRIZOL[®] wurde eine reverse Transkription durchgeführt. Aus der RT-Reaktion wurden $2 \mu\text{g}$ RNA über 32 Zyklen in einer PCR amplifiziert und je $5 \mu\text{l}$ der HO-1 Amplifikation und $3 \mu\text{l}$ der GAPDH Amplifikation in einem 1,5% Agarosegel aufgetrennt. (A) zeigt eine repräsentative elektrophoretische Auftrennung. Die Abbildung (B) zeigt die densitometrische Auswertung der Mittelwerte der Bandenintensitäten ($\text{OD-Bkg}/\text{mm}^2$) bezogen auf die Kontrolle und normiert auf den Standard (GAPDH). Die Mittelwerte stammen aus drei unabhängigen Versuchen \pm SEM; * = $p < 0,05$, getestet mit Oneway ANOVA und Bonferroni post hoc Test gegen die Kontrolle.

3.4.2 Regulation der GST

3.4.2.1 Induktion der GST durch tBHQ

Um ein weiteres Zielgen des Nrf2-Signalwegs zu untersuchen, wurde die GST-Transkriptmenge in Hct 116 sowohl mit tBHQ als auch mit Quercetin, Kaempferol, Luteolin und Apigenin untersucht. Die Glutathion-S-Transferasen sind Enzyme des Phase II-Metabolismus, welche induzierbar sind und als zelluläre Antwort auf Stresszustände der Zelle vermehrt exprimiert werden. Es konnte bereits gezeigt werden, dass bestimmte Isoformen der großen und hochkonservierten GST-Familie durch oxidativen (Mathers, Fraser et al., 2004) und chemisch induzierten Stress (Tanaka, Aleksunes et al., 2008) reguliert werden. Die Induktion dieser GST-Isoformen, wie der humanen GST A2, verläuft unter anderem über den Transkriptionsfaktor Nrf2. Neben den für die Induktion durch Nrf2 notwendigen ARE-Bindemotiven sind jedoch in den Promotorregionen der meisten GST-Isoformen auch XREs (*xenobiotic responsive elements*) lokalisiert, so dass eine Beteiligung von anderen regulatorischen Signalwegen nicht ausgeschlossen werden kann.

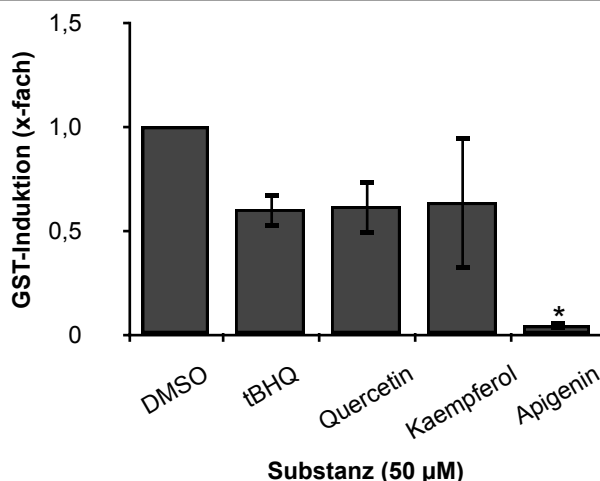


Abb. 3.39: GST Induktion durch 24h Inkubation mit tBHQ, Quercetin, Kaempferol und Apigenin

0,5 x 10⁶ Hct 116 Zellen/Well wurden auf 6-Well-Platten ausgesät und nach 24h Anhaftungszeit für 24h mit 50 µM tBHQ, Quercetin, Kaempferol und Apigenin inkubiert. Nach der RNA-Isolation mit TRIZOL[®] wurde eine reverse Transkription durchgeführt. Aus der RT-Reaktion wurden 2 µg RNA über 32 Zyklen in einer PCR amplifiziert und je 5 µl der GST Amplifikation und 3 µl der GAPDH Amplifikation in einem 1,5% Agarosegel aufgetrennt. Die Abbildung zeigt die densitometrische Auswertung der Bandenintensitäten (OD-Bkg/mm²) bezogen auf die Kontrolle und normiert auf den Standard (GAPDH). Die Mittelwerte stammen aus drei unabhängigen Versuchen ± SEM; * = p<0,05, getestet mit Oneway ANOVA und Bonferroni post hoc Test gegen die Kontrolle.

In dieser Arbeit wurden für die Expressionsanalyse der GST Primer eingesetzt, welche gegen das humane GST A2 Enzym gerichtet sind. Die durchgeführten RT-PCR Experimente zeigten jedoch divergierende Ergebnisse zu den Ergebnissen der HO-1 Induktion.

Im Gegensatz zur HO-1 konnte die GST nach 24 h Inkubation mit 100 µM tBHQ und Kaempferol um den Faktor 2 induziert werden, während Quercetin und Apigenin unter diesen experimentellen Bedingungen die Expression der GST A2 senkten.

Abbildung 3.33 zeigt die densitometrische Auswertung der 24h Inkubation. Genau wie bei der Detektion der HO-1 Transkript Menge wurden auch bei den Experimenten zu der GST Induktion die Zellen 4h mit den zu untersuchenden Flavonoiden inkubiert. Allerdings ließ sich auch hier keine Steigerung der GST Expression feststellen.

3.4.2.2 Induktion der GST durch Flavonoide

Abbildungen 3.40 (A) und (B) zeigen die densitometrischen Auswertungen für eine 4h Inkubation mit Quercetin und Kaempferol. Es sind keine signifikanten Änderungen festzustellen. In Abbildung 3.40 (C) und (D) sind die densitometrischen Auswertungen für die 4h Inkubationen mit Apigenin und Luteolin gezeigt. Beide zeigten eine Tendenz zur Reduktion der GST mRNA Menge.

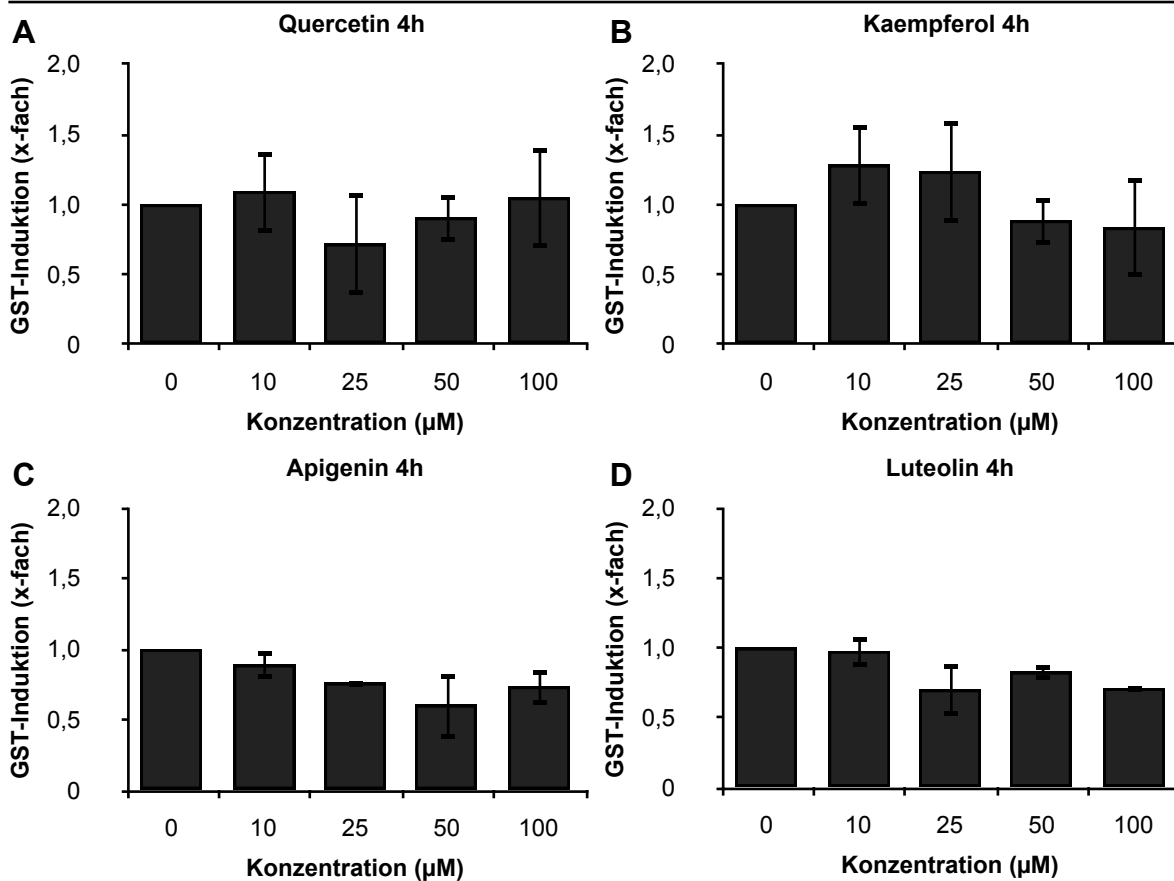


Abb. 3.40: GST Induktion durch 4h Inkubation mit Quercetin, Kaempferol, Luteolin und Apigenin

0,5 x 10⁶ Hct 116 Zellen/Well wurden auf 6-Well-Platten ausgesät und nach 24h Anhaftungszeit für 4h mit den angegebenen Konzentrationen (A) Quercetin, (B) Kaempferol, (C) Apigenin und (D) Luteolin inkubiert. Nach der RNA-Isolation mit TRIZOL[®] wurde eine reverse Transkription durchgeführt. Aus der RT-Reaktion wurden 2 µg RNA über 32 Zyklen in einer PCR amplifiziert und je 5 µl der HO-1 Amplifikation und 3 µl der GAPDH Amplifikation in einem 1,5% Agarosegel aufgetrennt. Die Abbildung zeigt die densitometrische Auswertung der Mittelwerte der Bandenintensitäten (OD-Bkg/mm²) bezogen auf die Kontrolle und normiert auf den Standard (GAPDH). Die Mittelwerte stammen aus drei unabhängigen Versuchen ± SEM

Ähnliche Ergebnisse wurden für eine 8h Inkubation mit Apigenin erzielt. Es kam zwar zu einer verringerten GST mRNA Menge durch die Behandlung mit verschiedenen Apigenin Konzentrationen, jedoch zeigte sich keine signifikante Änderung der GST Expression.

Anders verhielt es sich bei einer 8h Behandlung mit verschiedenen Quercetin und Kaempferol Konzentrationen. Hier konnte eine konzentrationsabhängige Abnahme der GST beobachtet werden (Abb. 3.41 (A) & (B)). Die Transkriptmenge wurde sowohl bei Quercetin als auch bei Kaempferol um mehr als 50 % reduziert. Quercetin reduzierte die Expression bei 50 µM um 50%, Kaempferol erreichte diese Reduktion bei 100 µM.

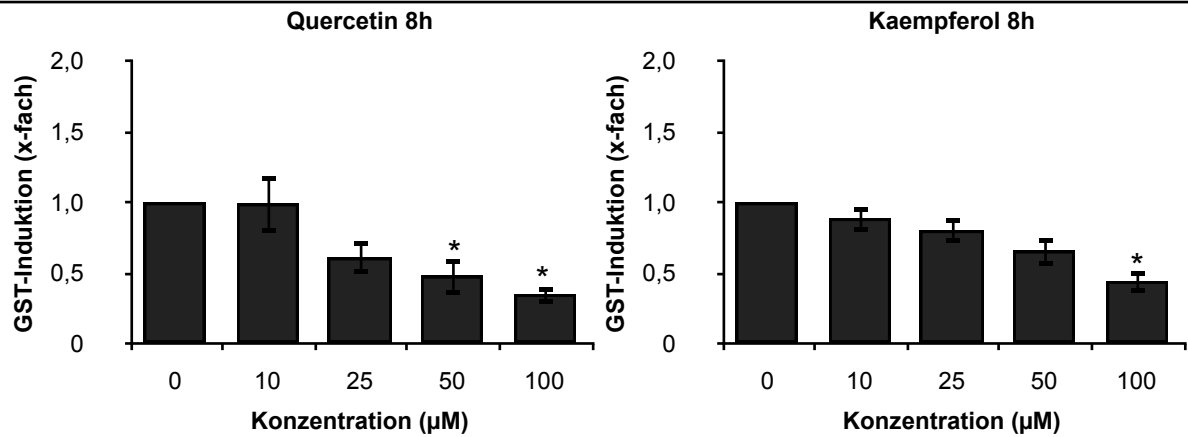


Abb. 3.41: GST Induktion durch 8h Inkubation mit Quercetin und Kaempferol
0,5 x 10⁶ Hct 116 Zellen/Well wurden auf 6-Well-Platten ausgesät und nach 24h Anhaftungszeit für 8h mit den angegebenen Konzentrationen (A) Quercetin, (B) Kaempferol inkubiert. Nach der RNA-Isolation mit TRIZOL[®] wurde eine reverse Transkription durchgeführt. Aus der RT-Reaktion wurden 2 µg RNA über 32 Zyklen in einer PCR amplifiziert und je 5 µl der HO-1 Amplifikation und 3 µl der GAPDH Amplifikation in einem 1,5% Agarosegel aufgetrennt. Die Abbildung zeigt die densitometrische Auswertung der Mittelwerte der Bandenintensitäten (OD-Bkg/mm²) bezogen auf die Kontrolle und normiert auf den Standard (GAPDH). Die Mittelwerte stammen aus drei unabhängigen Versuchen ± SEM; * = p<0,05, getestet mit Oneway ANOVA und Bonferroni post hoc Test gegen die Kontrolle.

4.Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden die Wirkungen der verschiedenen strukturverwandten Flavonoide Quercetin, Kaempferol, Luteolin, Apigenin, Chrysin, Galangin, Myricetin, Morin und Fisetin auf den redoxsensitiven Nrf2-ARE-Signalweg in humanen Kolon-Karzinomzellen untersucht.

Der erste Teil der Arbeit beschäftigt sich mit den strukturbedingten Wirkungen dieser Verbindungen sowie mit den zytotoxischen Effekten, die durch diese Substanzen ausgelöst werden.

Von großer Bedeutung ist dabei die antioxidative Kapazität, die für die protektiven Wirkungen dieser Verbindungen verantwortlich gemacht wird (Sang, Hou et al., 2005). Durch die Modulation des intrazellulären Redoxstatus sind Flavonoide in der Lage, wichtige Zellfunktionen zu verändern (Rahman, Biswas et al., 2006). Des Weiteren schützen sie durch ihre Eigenschaft als Radikalfänger zelluläre Bestandteile, wie Nukleinsäuren, Lipide und Proteine vor der Schädigung durch ROS. Auf Grund dieser Fähigkeit werden ihnen auch antikanzerogene (Lee und Lee, 2006), antiinflammatorische (Rahman, Biswas et al., 2006) und antiallergene (Pietta, 2000) sowie antimikrobielle (Heinonen, 2007) Eigenschaften zugeschrieben. Dabei können die protektiven Effekte nicht nur durch die Verminderung oxidativer Stresszustände vermittelt werden. Auch die direkte strukturbedingte Modulation von Signalwegen konnte anhand der Aktivierung und Inhibition des Arylhydrokarbon-Rezeptors durch Flavonoide nachgewiesen werden (Amakura, Tsutsumi et al., 2008). Die wichtigsten Charakteristika, welche zur Bestimmung der antioxidativen Kapazität herangezogen werden, sind die Hydroxylgruppen an Ring A und B des Flavan-Grundgerüsts sowie eine Hydroxylgruppe und eine Ketogruppe am heterozyklischen Ring C.

Hier wurde die antioxidative Kapazität sowohl zellfrei mit Hilfe des TEAC- und des DPPH- Assays bestimmt als auch mit Hilfe des fluoreszenten Dichlordihydrofluorescein in einem zellbasierten DCF Assay nachgewiesen, um den Einfluss dieser Verbindungen mit ihren strukturellen Merkmalen zu korrelieren.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde die Wirkung von Flavonoiden auf den redoxsensitiven Transkriptionsfaktor Nrf2 untersucht. Die Aktivierung dieses Signalwegs durch Antioxidantien wie tBHQ oder Naturstoffe konnte zuvor in Hepatomzellen nachgewiesen werden (Xu, Li et al., 2005). Ziel dieser Arbeit war es, die Wirkung von Flavonoiden auf humane Kolon-Karzinomzellen zu untersuchen, da diese Zellen als Modell für das erste Kontaktorgan dienen. Die Wirkung des Nrf2 Signalwegs ist in Kolon-Karzinomzellen bis zu diesem Zeitpunkt nicht intensiv untersucht worden.

In Caco 2 Zellen konnte kürzlich die Induktion der UGT1A durch Nrf2 gezeigt werden (Zhang, Yang et al., 2009), jedoch wird die UGT1A Familie nicht ausschliesslich durch Nrf2, sondern auch durch den Arylhydrokarbon-Rezeptor reguliert (Münzel, Schmohl et al., 2003). In Hct 116 Zellen ist dieser Signalweg noch nicht untersucht worden, so dass es Ziel dieser Arbeit war, den Nrf2 Signalweg in Hct 116 Zellen zu charakterisieren. Dazu wurden die verschiedenen Komponenten des Signalwegs durch den bekannten Induktor tBHQ untersucht. Im Verlauf der Arbeit wurden die Effekte von tBHQ und ausgesuchten Flavonoiden auf die Translokation von Nrf2, die Aktivierung des durch Nrf2 regulierten responsiven DNA-Elements, das ARE, den proteasomalen Abbau von Nrf2 als auch auf die transkriptionelle Expression der Nrf2 Zielgene HO-1 und GST A2 untersucht.

4.1 Strukturbedingte Eigenschaften der Flavonoide

4.1.1 Antioxidative Eigenschaften

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Flavonoide zeigten sowohl im TEAC Assay als auch im DPPH Assay unterschiedlich ausgeprägte antioxidative Kapazitäten. Während Quercetin, Kaempferol, Luteolin, Myricetin, Fisetin und Morin im direkten Vergleich zu der Referenzsubstanz Trolox eine vergleichbar hohe antioxidative Kapazität aufwiesen, zeigten Galangin, Chrysin und Apigenin ein schwaches antioxidatives Potential im TEAC Assay. Das Reduktionspotential der Verbindungen nimmt mit steigender Hydroxylierung an Ring B zu. So ist Myricetin mit drei Hydroxylierungen an Ring B auch das Flavonoid mit der stärksten antioxidativen Kapazität nach Quercetin in diesem zellfreien Assay. Aus den Daten des TEAC Assays ergibt sich das stärkste antioxidative Potential für Quercetin, welches zwei Hydroxylgruppen an Ring A, eine Hydroxylgruppe an Ring C und zwei Hydroxylgruppen an Ring B trägt. Das Auftreten einer weiteren Hydroxylgruppe an Ring B, wie bei Myricetin, steigert dagegen die antioxidative Kapazität nicht. Vielmehr besitzt Fisetin, welchem an Ring A eine Hydroxylgruppe im Vergleich zu Quercetin fehlt, ein stärkeres antioxidatives Potential als Myricetin. Für die Fähigkeit, Radikale zu reduzieren, muss die Möglichkeit aufgenommene Elektronen über das Ringsystem zu delokalisieren und eine chinoide Struktur bilden zu können gegeben sein.

Luteolin, welchem die Hydroxylgruppe am heterozyklischen Ring C fehlt, welches jedoch eine zweite Hydroxylgruppe an Ring A trägt, liegt in der antioxidativen Kapazität direkt hinter Myricetin. Ist die Hydroxyfunktion an Ring C vorhanden und fehlt an Ring

B, wie beim Kaempferol, sinkt die Fähigkeit Radikale abzufangen weiter. Die chinoiden Struktur muss sich dann über Ring B und C ausbilden. Dabei ist das Reduktionspotential des gesamten Flavonoids nur so stark wie das desjenigen Ringes mit dem schwächeren Reduktionspotential. Das Reduktionspotential von Morin ist noch niedriger als das von Kaempferol. Es besitzt zwar zwei Hydroxylgruppen an Ring B, jedoch scheint die Stellung der beiden phenolischen Gruppen (2' und 4') für die Ausbildung einer chinoiden Struktur weniger begünstigt. Als Flavonoide mit ausgesprochen niedrigem Reduktionspotential erweisen sich Apigenin, Chrysin und Galagin. Dabei kann Apigenin nur über eine Hydroxylfunktion an Ring B Elektronen abgeben und Chrysin besitzt keine Hydroxylgruppe an Ring B mehr. Beide Flavonoide besitzen auch an Ring C keine Hydroxylgruppe. Wobei eine zusätzliche phenolische Gruppe an Ring C, wie bei Galagin, die antioxidative Kapazität sogar noch verringert.

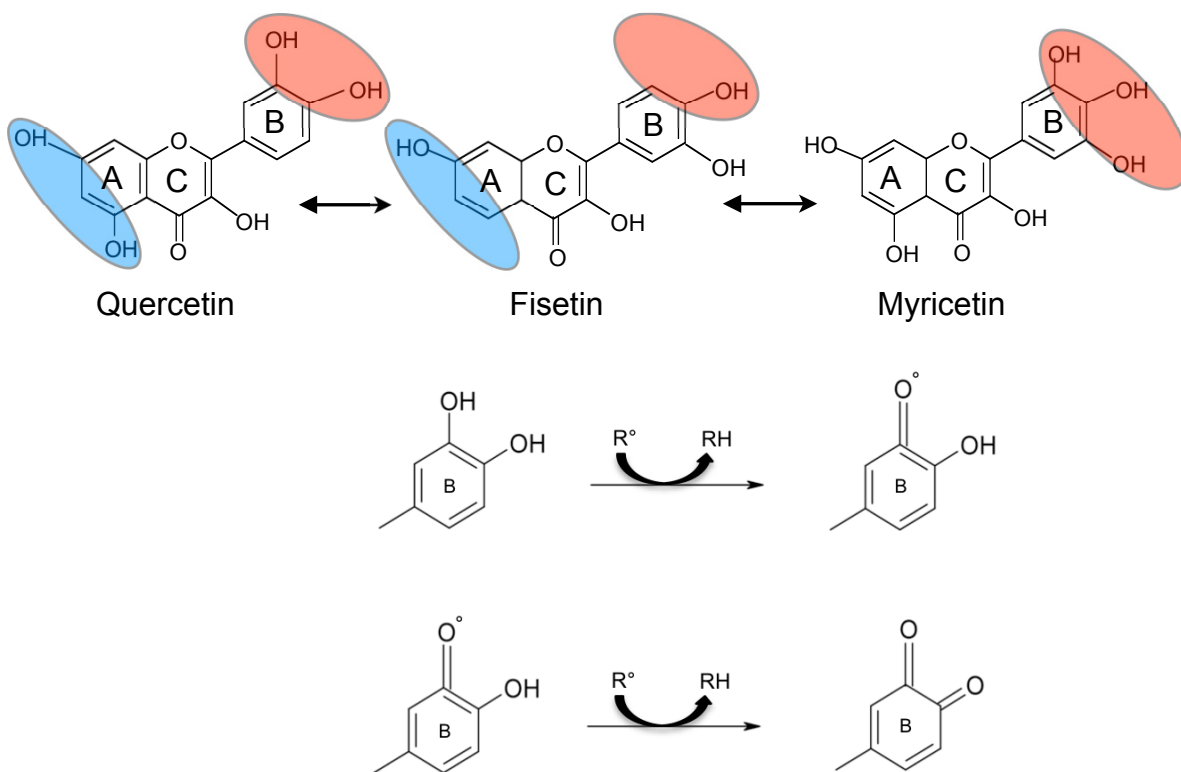


Abb.4.1: Struktur-Wirkungsbeziehung von Quercetin, Fisetin und Myricetin

Dargestellt sind die jeweiligen Flavonoide mit ihren Strukturcharakteristika, den Hydroxylgruppen an Ring A (dunkelgrau) und an Ring B (hellgrau). Des Weiteren ist die Ausbildung der Chinonstruktur, welche preferentiell an Ring B gebildet wird, dargestellt. Durch die Abgabe eines H-Atoms sowie eines Elektrons an ein Radikal entsteht eine radikalische Semichinonstruktur, die mit einem weiteren Radikal zum Chinon reagieren kann.

In erster Linie ist also die Hydroxygruppe an Ring B bei der Reduktion von Radikalen beteiligt. Nimmt die Anzahl der Hydroxylgruppen an Ring B ab, kann das daraus resultierende abnehmende Reduktionspotential durch die 3-Hydroxygruppe an Ring C

partiell kompensiert werden (Arora, Nair et al., 1998). Fehlt auch diese phenolische Gruppe, sinkt die antioxidative Kapazität dramatisch.

Die hier erstellten antioxidativen Potentiale der untersuchten Flavonoide lassen sich bis auf die Einordnung von Galangin und Kaempferol ähnlich einordnen wie die antioxidativen Kapazitäten in der Literatur (Pietta, 2000; Rice-Evans, Miller et al., 1996). Für die untersuchten Flavonoide ergab sich bei Pietta (2000) folgende Reihenfolge in Bezug auf ihre antioxidative Kapazität:

Quercetin > Myricetin > Luteolin > Galangin > Apigenin > Chrysin > Kaempferol

Rice-Evans et al. (1996) konnten eine leicht veränderte Reihenfolge detektieren:

Myricetin > Morin > Luteolin > Apigenin > Chrysin > Kaempferol

Hier konnte die Fähigkeit, Radikale abzufangen mit der Anzahl der Hydroxylgruppen an Ring A und B korreliert werden. Erst bei geringen antioxidativen Kapazitäten ist die zusätzliche 3-Hydroxylfunktion von Bedeutung.

Die Arbeitsgruppe um Ishige et al. (2001) testete alle hier verwendeten Flavonoide im TEAC-Assay und legte für diese Verbindungen folgende Reihenfolge fest:

Myricetin > Morin > Quercetin > Fisetin > Luteolin > Kaempferol > Apigenin > Galangin > Chrysin

Trotz des starken antioxidativen Potentials von Myricetin, Morin, Quercetin, Fisetin und Luteolin, welche zwei und im Fall von Myricetin drei Hydroxyfunktionen an Ring B tragen, wurde die Effektivität, als Radikalfänger zu fungieren der 3-Hydroxyfunktion zugeschrieben, da Verbindungen wie Chrysin trotz der Hydroxylgruppen an Ring A im TEAC Assay ineffektiv waren (Ishige, Schubert et al., 2001).

Die Unterschiede sind vermutlich in der nicht vollständig kongruenten Versuchsdurchführung begründet. Die Werte des TEAC Assays wurden in der vorliegenden Arbeit nach 2 min gemessen, wohingegen die Werte in der Literatur nach bis zu 6 min (Prior, Wu et al., 2005; Re, Pellegrini et al., 1999) detektiert wurden. Durch die längere Messzeit werden auch Antioxidantien erfasst, welche einen langsameren Reaktionsverlauf zeigen. Grundsätzlich konnte jedoch gezeigt werden, dass die Reduktion des ABTS-Radikals nach 2 min abgeschlossen ist (Re, Pellegrini et al., 1999). Aus diesem Grund wurden die gezeigten Daten nach 2 min erfasst.

Aus den ermittelten Daten des TEAC Assays leitet sich folgende Reihenfolge für die Fähigkeit, Radikale abzufangen ab:

Quercetin > Fisetin > Myricetin > Luteolin > Kaempferol > Morin > Apigenin > Chrysin
> Galangin

Aus den DPPH-Daten ergibt sich eine nur wenig veränderte Reihenfolge für das Reduktionspotential der Flavonoide:

Fisetin > Myricetin > Morin > Luteolin > Quercetin > Kaempferol > Chrysin/Apigenin/
Galangin.

Lediglich Quercetin zeigte im DPPH-Assay eine erheblich schwächere antioxidative Kapazität im Vergleich zum TEAC-Assay. Auch im DPPH-Assay zeigen die Flavonoide mit phenolischen Gruppen an Ring B und Ring C die höchste antioxidative Kapazität. Die Unterschiede zwischen den beiden Messungen sind durch Schwankungen der Einzelmessungen zu erklären. Im DPPH Assay zeigt sich bei einigen Flavonoiden (Myricetin, Morin), eingesetzt in hohen Konzentrationen (100 μ M), ein deutlicher und schneller Anstieg des Reduktionspotentials. Des Weiteren ist DPPH nicht nur Radikal, sondern auch Oxidant zugleich, wodurch falsch-negative Befunde bezüglich des antioxidativen Potentials auftreten können (Prior, Wu et al., 2005).

Sowohl TEAC Assay als auch DPPH Assay eignen sich sehr gut, um die in der Struktur der Aglykone begründeten antioxidativen Eigenschaften zu messen, jedoch liegen Flavonoide in Pflanzen als glykosidische Verbindungen vor, die ein verändertes antioxidatives Potential zeigen (Williamson und Manach, 2005). Nach der Aufnahme von Flavonoiden aus der pflanzlichen Nahrung können die Zuckerreste durch Darmbakterien abgespalten werden. Des Weiteren werden Flavonoide, nachdem sie in die Zellen aufgenommen wurden, metabolisiert. Es entstehen sulfatierte, methylierte und glucuronidierte Metabolite, welche auch eine geänderte antioxidative Kapazität aufweisen (Manach, Scalbert et al., 2004). Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit die Wirkung von Flavonoiden auf den ROS-Status der Zellen in einem zellbasierten DCF-Assay untersucht.

Zum Einen wurde die ROS-Bildung während der Inkubation mit den verschiedenen Flavonoiden, zum Anderen die Wirkung dieser Substanzen auf akkumulierte ROS durch Zugabe von H₂O₂ untersucht.

Die DCF-Werte differieren zum Teil erheblich von den TEAC/DPPH-Daten. So zeigen nach H₂O₂ Bolusgabe die Flavonoide Quercetin, Luteolin Fisetin, Kaempferol und Morin im direkten Vergleich ähnliche Radikalfängereigenschaften. Sie reduzieren die ROS-Menge in Hct 116 Zellen alle bis auf ungefähr 40 % der Ausgangsmenge an ROS. Galangin und Myricetin reduzieren die ROS-Menge um ca. 25 %. Im zellfreien TEAC/DPPH System zeigte Myricetin jedoch eine viel höhere antioxidative Kapazität.

Galangin hatte im TEAC Assay wie auch im DPPH Assay keine Wirkung, zeigt jedoch im DCF Assay eine schwache Wirkung. Auch die DCF-Messung ohne H₂O₂ Zugabe zeigt ein deutlich anderes Bild als die zellfreien Messungen und der DCF Assay mit H₂O₂ Zugabe. Hier besitzen Fisetin und Morin ein äußerst schwaches Reduktionspotential, Chrysin, Galangin und Apigenin zeigen keine Aktivität und Luteolin, Quercetin und Kaempferol zeigen sehr starke antioxidative Eigenschaften. Auch für Myricetin wurde hier ein unerwartetes Ergebnis erzielt. Trotz der drei phenolischen Gruppen an Ring B ist Myricetin nicht in der Lage, die intrazellulären ROS oder die extrazellulär durch H₂O₂ generierten ROS zu neutralisieren. Aber auch Morin und Fisetin besitzen nach den Ergebnissen des DCF Assays kaum antioxidative Kapazität, wohingegen im TEAC/DPPH Assay das Reduktionspotential erheblich höher ist.

Mögliche Ursache für die Unterschiede zwischen zellfreiem TEAC/DPPH und zellbasiertem DCF Assay ist die nicht genügende Aufnahme der Flavonoide, durch die Anlagerung an zelluläre Strukturen, beim DCF Assay, wodurch keine Reduktion der intrazellulären ROS Menge detektierbar wäre. Für Myricetin und Galangin wurde die antioxidative Aktivität mit DCF in humanen Endothelzellen bereits gezeigt (Kim, Liu et al., 2006). Es ist also davon auszugehen, dass Galangin und Myricetin entweder nicht in die Zelle aufgenommen werden oder im Fall des DCF Assays mit H₂O₂ Bolusgabe zwar in die Zellen aufgenommen wurden, jedoch an Zellbestandteile binden und somit durch zelluläre Strukturen maskiert werden, so dass sie nicht reagieren können. Im Vergleich mit der Literatur zeigen Quercetin (Hanneken, Lin et al., 2006), Kaempferol (Matsuo, Sasaki et al., 2005), Luteolin (Ruweler, Anker et al., 2008) und Fisetin (Yao, Zhang et al., 2008) vergleichbare antioxidative Kapazitäten im DCF Assay. Allerdings wurden für Myricetin nach H₂O₂ Gabe stärkere Aktivitäten nachgewiesen (Kim, Liu et al., 2006).

Die Verbindungen, welche bereits in den zellfreien Assays keine Reaktivität gezeigt hatten, sind auch im DCF Assay nicht in der Lage, Elektronen über das Ringsystem zu delokalisieren, da ihnen die dafür benötigten Hydroxystrukturen an Ring B fehlen. Flavonoide mit Hydroxystrukturen an Ring B und C besitzen ein delokalisiertes π -Elektronensystem und sind nach der Abgabe eines ungepaarten Elektrons bestrebt, durch die Aufnahme eines anderen ungepaarten Elektrons eine stabilere Chinonstruktur anzunehmen. Bei Verbindungen, in welchen die Delokalisation der Elektronen durch die Positionen der Hydroxylgruppen begünstigt ist und welche schneller zur Chinonstruktur oxidiert werden, sind auch stärkere Radikalfängereigenschaften zu messen. Sind diese

Strukturen nicht vorhanden, fehlt eine derartige Aktivität wie bei Apigenin. Allerdings birgt die Eigenschaft Radikale abzufangen auch die Möglichkeit, dass Flavonoide selbst zu reaktiven Verbindungen werden und ROS generieren.

Die Generierung von ROS ist zudem sehr unterschiedlich, so konnte für Apigenin, Quercetin und Luteolin nach 24h Inkubation eine Steigerung der ROS-Menge durch die Behandlung mit diesen Flavonoiden und somit eine Steigerung der Toxizität in der Reihenfolge: Luteolin > Apigenin > Quercetin in kultivierten humanen Endothelzellen und humanen Lungenfibroblasten nachgewiesen werden (Matsuo, Sasaki et al., 2005).

4.1.2 Wirkung auf die Viabilität

Für die nachfolgenden Untersuchungen in humanen Kolon-Karzinom Zellen war der Nrf2-Signalweg noch nicht beschrieben worden. Es war für die Charakterisierung des Signalwegs notwendig, eine geeignete Positivkontrolle zu etablieren, da die bisherigen Untersuchungen zumeist in Hepatomzelllinien durchgeführt wurden. Keum et al. (2006) behandelten primäre Rattenhepatozyten mit Butyl-hydroxyanisol (BHA) und mit tBHQ und fanden eine Induktion der HO-1 wie auch der NQO 1, die mit einer starken Nrf2 Expression korreliert war. Neben tBHQ kann auch Arsenit den Nrf2-Signalweg aktivieren. Durch die Induktion von oxidativem Stress führt die Behandlung mit Arsenit zu einer Heraufregulation zytoprotektiver Enzyme, wie der HO-1, in HaCaT Zellen (Cooper, Liu et al., 2007). Aber auch in geringeren, nicht toxischen Konzentrationen ist Arsenit in der Lage die HO-1 über den Nrf2-Signalweg in murinen Fibroblasten zu induzieren (Harada, Sugimoto et al., 2008).

Um die geeignete Konzentration eines Induktors für die weiteren Untersuchungen zu bestimmen, wurden zwei Induktoren, tBHQ und Natrium-Arsenit, im MTT-Assay auf ihre Zytotoxizität überprüft. Für tBHQ ergab sich dabei für die hier eingesetzten Hct 116 Zellen ein EC₅₀-Wert von 75 µM und ungefähr 40µM für Na-Arsenit. Im Vergleich mit der humanen Hepatom Zelllinie HepG2 und den Ratten-Hepatomzellen H4IIE fielen Unterschiede in Bezug auf die Sensitivität auf. Der EC₅₀-Wert für tBHQ in HepG2 Zellen liegt bei 180 µM und in H4IIE bei 150 µM. H4IIE Zellen sind gegenüber Na-Arsenit viel sensitiver, hier liegt der EC₅₀-Wert bei 10 µM.

Damit liegt der EC₅₀-Wert für tBHQ in den untersuchten Hepatom Zelllinien in einem ähnlich hohen Bereich wie der aus der Literatur bestimmte EC₅₀-Wert für andere Hepatom Zelllinien.

Gharavi et. al (2005) konnten für Hepa 1c1c7 Zellen bei 500µM tBHQ eine Abnahme der Viabilität um 60 % feststellen.

Andere Studien setzten für die Induktion des Zelltods bei Hepatom Zelllinien ähnlich hohe (500 μM) Konzentrationen ein (Nakagawa, 1996).

Für die durchgeführten Versuche wurde in dieser Arbeit für tBHQ eine Konzentration von 50 μM und für Na-Arsenit von 10 μM eingesetzt, da beide Konzentrationen keinen starken Effekt auf die Viabilität der Zellen ausüben. tBHQ vermittelt bei einer Konzentration von 50 μM zwar eine signifikante Reduktion der Viabilität, der Wert liegt jedoch nur 10% unter dem Wert der Kontrolle. Arsenit hat bei einer Konzentration von 10 μM keinen Effekt auf Hct 116 Zellen.

Da sich die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit auf die Effekte von Flavonoiden im Darm bezieht, wurde die Wirkung von Flavonoiden auf die Viabilität in Kolon-Karzinom Zellen untersucht. Dabei zeigten beide untersuchten Zelllinien, Hct 116 und Caco 2, nur eine geringe Sensitivität gegenüber Flavonoiden in den eingesetzten Konzentrationen. Der EC_{50} -Wert wurde bei beiden Zelllinien selten erreicht. Am Beispiel von Apigenin konnte gezeigt werden, dass Hct 116 Zellen mit einem EC_{50} -Wert von 25 μM deutlich sensibler sind als Caco 2 Zellen, für welche kein EC_{50} -Wert von Apigenin im MTT Assay ermittelt werden konnte. Allerdings kam es doch zu einer Abnahme der Absorption. Da das Tetrazoliumsalz (MTT) durch mitochondriale Dehydrogenasen zum blauen Formazan reduziert wird, ist die Messung der Formazanmenge kein direkter Hinweis auf einen zytotoxischen Effekt. Vielmehr kann hier von einer Reduktion der metabolischen Aktivität gesprochen werden (Mosmann, 1983). Aus der abnehmenden metabolischen Aktivität resultiert eine gehemmte Proliferation der Zellen, so dass unter Kontrollbedingungen nach der Inkubationszeit mehr Zellen das Tetrazoliumsalz umsetzen können.

In Caco 2 Zellen reduzierte sich zwar die metabolische Aktivität, jedoch wurde nur für Galangin in einer hohen Konzentration (100 μM) ein EC_{50} -Wert gemessen. In Hct 116 Zellen wurde für Galangin ein ähnlicher Wert bestimmt. Für Chrysin ergab sich in Caco 2 Zellen keine signifikante Änderung der Viabilität, in Hct 116 konnte im Gegensatz ein EC_{50} -Wert von 25 μM ermittelt werden. Zudem ergaben sich bei der Kultivierung beider Zelllinien erhebliche Unterschiede. Hct 116 proliferieren stärker als Caco 2 Zellen, so dass für Hct 116 eine Subkultivierung im Abstand von 2-3 Tagen empfohlen wird (ATCC), im Fall der Caco 2 Zellen ist eine Subkultivierung einmal pro Woche ausreichend (ATCC). Auf Grund der besseren Kultivierbarkeit und der höheren Sensitivität gegenüber einzelnen Flavonoiden wurden für die nachfolgenden Versuche Hct 116 Zellen verwendet. Neben der Bestimmung der Wirkung auf die Viabilität nach

24h wurden Hct 116 für kürzere Zeitabstände mit den Flavonoiden inkubiert (4h und 8h). Weder nach 4h noch nach 8h konnte eine gesteigerte Toxizität oder eine Inhibition der Proliferation gemessen werden. Die nachfolgenden Versuche konnten durch die fehlende Toxizität mit hohen Konzentrationen durchgeführt werden. Neben dem Zytotoxizitätstest wurden die Zellen vor und nach Inkubation im Mikroskop auf morphologische Veränderungen untersucht. Am Beispiel von Fisetin war zu sehen, dass es tatsächlich zu keiner Änderung der Morphologie kommt, die ein erstes Anzeichen für vermehrten Zelltod darstellt. In der Literatur bewirkt Fisetin sowohl in HT-29 Zellen als auch in Caco 2 Zellen im Bereich von 50 μM eine Abnahme der Viabilität um 50 % (Kuntz, Wenzel et al., 1999).

Die Datenlage für die Wirkung auf humane Kolon-Karzinomzellen gibt zu den hier gezeigten Toxizitäten divergierende Werte an. Für Caco 2 ergaben sich in einer vergleichenden Studie zur Wirkung von Flavonoiden auf die Proliferation, die Zytotoxizität und Apoptose EC_{50} -Werte, die bei Apigenin, Luteolin, Chrysin, Kaempferol, Quercetin und Myricetin im Bereich von 100 μM lagen (Kuntz, Wenzel et al., 1999). Im Vergleich dazu war bei einer weiteren Kolon-Karzinom Zelllinie (HT-29) die Toxizität dieser Substanzen untersucht worden. Auch in HT-29 wurden EC_{50} -Werte im Bereich von 100 μM festgestellt. Bei einer späteren Untersuchung der antiproliferativen Eigenschaften von ausgesuchten phenolischen Verbindungen wurde für Quercetin in Caco 2 ein EC_{50} -Wert von mehr als 50 $\mu\text{g/ml}$ festgestellt (Lee, Hur et al., 2005).

In anderen Zelllinien, humanen promyelozytischen Leukämiezellen, wurde bereits durch die angewendete Methodik die Erfassung von Proliferation und Toxizität unterschieden. Für Apigenin, Luteolin und Chrysin wurde ein EC_{50} -Wert bei Konzentrationen unter 50 μM gefunden. Bei Quercetin lag dieser Wert über 50 μM und bezeichnete den Wert, ab dem eine eingesetzte Konzentration die Proliferation um 50 % hemmt.

In Karzinomzellen des Ösophagus wurden IC_{50} -Werte detektiert, welche im Fall von Luteolin erheblich von den hier gefunden abweichen (35 μM). Auch Apigenin und Myricetin zeigten toxische Effekte, welche erst bei Konzentrationen auftraten, die in dieser Arbeit nicht mehr untersucht wurden (112 μM , 233 μM) (Landis-Piwowar, Milacic et al., 2008).

4.2 Wirkung auf den Nrf2-ARE-Signalweg

Es konnte bereits in einigen Zelllinien gezeigt werden, dass Flavonoide neben ihren antioxidativen Eigenschaften auch modulierende Effekte auf die Signaltransduktion ausüben (Kampa, Nifli et al., 2007). Im Besonderen konnte gezeigt werden, dass bestimmte Zellen durch die Behandlung mit Antioxidantien fremdstoffmetabolisierende Enzyme der Phase II induzieren und so die zelluläre Antwort auf Stresszustände koordiniert werden kann (Yao, Nussler et al., 2007). Der Signalweg, welcher für die Regulation der Stressantwort verantwortlich gemacht wird, ist der Nrf2-Signalweg (Niture, Kaspar et al., 2009). Der Transkriptionsfaktor Nrf2 bindet nach seiner Aktivierung eine Konsensus-Sequenz, das ARE in der Promotorregion verschiedener Phase II Enzyme. Die Bezeichnung dieses Bindemotivs resultiert aus Untersuchungen, die eine Induktion der Expression durch Antioxidantien, wie BHA gefunden haben. Später wurde der oxidative Metabolit von BHA, tBHQ, für die Induktion verantwortlich gemacht.

4.2.1 Wirkung auf die Nrf2 Translokation

4.2.1.1 Wirkung von tBHQ auf die Nrf2 Translokation

Zur Charakterisierung der Aktivierung des Nrf2-Signalwegs in den humanen Kolon-Karzinom Zellen Hct 116 wurde zunächst der Einfluss von tBHQ auf die Translokation von Nrf2 untersucht.

tBHQ zeigte bereits in Hepatomzellen (Huang, Nguyen et al., 2000), Neuroblastomzellen (Lee, Moehlenkamp et al., 2001) oder neuronalen Stammzellen (Li, Johnson et al., 2005) eine Aktivierung des Nrf2-ARE Signalwegs. Auch in der vorliegenden Arbeit konnte tBHQ den Transkriptionsfaktor aktivieren.

tBHQ bewirkte bei einer Konzentration von 50 μ M innerhalb 30 min eine starke Akkumulation von Nrf2 in der nukleären Proteinfraction (8-fach). Dagegen war in der zytosolischen Proteinfraction kaum Nrf2 zu detektieren. Die Akkumulation von Nrf2 erreichte nach 1h Inkubation ihr Maximum (10-fach) und nahm dann im weiteren Verlauf bis 24h Inkubation weiter ab. Sie erreichte in dieser Zeitspanne jedoch nicht den Minimalwert, der in der Kontrolle gezeigt wurde. In der Kontrollprobe war sowohl in der nukleären als auch in der zytosolischen Fraktion nur eine schwache oder keine Nrf2-Detektion möglich.

Dieses Ergebnis zeigt nicht wie erwartet eine Translokation von Nrf2, also eine starke Detektion in der unbehandelten zytosolischen Proteinfraction, die mit der Dauer der Behandlung zugunsten eines starken Nrf2 Signals in der nukleären Fraktion abnimmt.

Vielmehr ist Nrf2 unter Kontrollbedingungen in Hct 116 nur in sehr geringen Mengen in der Zelle vorhanden. Die Abwesenheit von Nrf2-Protein im Zytosol wurde auch in der Literatur in anderen Zelltypen wie COS-1 oder NIH 3T3 Zellen beschrieben (Zhang und Hannink, 2003).

Da Nrf2 im Zytosol an Keap I gebunden ist und Keap I durch Ubiquitinierung für die Degradation von Nrf2 verantwortlich ist, war die zytosolische Nrf2 Menge auch nach der Behandlung mit tBHQ nicht detektierbar. Eine Möglichkeit für das Auftreten dieses Phänomens ist eine Modifikation von Cystein-Resten in der Nähe der DLG-Bindestelle durch die Behandlung mit tBHQ (Kobayashi und Tong, 2006). Durch die Modifikation wird die Konformation des Komplexes derart geändert, dass Nrf2 nicht mehr ubiquitiniert werden kann (Eggler, Small et al., 2009). Zudem gelangt Nrf2 über seine NLS (*nuclear localization sequence*) in den Nukleus und kann durch die Bindung an das ARE die Transkription zytoprotektiver Enzyme wie auch seine eigene Transkription induzieren (Kwak, Itoh et al., 2002). Die Autoregulation ist wahrscheinlich, da Nrf2 unter wiederhergestellten physiologischen Bedingungen auch die Transkription seines Inhibitors begünstigt (Jain, Mahajan et al., 2008).

Da Flavonoide, wie in Abschnitt 4.1 beschrieben, einen elektrophilen und antioxidativen Charakter haben, wurde in dieser Arbeit untersucht, ob sie in der Lage sind, die Nrf2-vermittelte Stressantwort auszulösen. Eine weitere Möglichkeit für die schnelle Akkumulation von Nrf2 im Kern könnte eine Phosphorylierung von Nrf2 sein, die den Komplex zu Keap I stört, so dass die Expression von Zielgenen induziert werden kann (Keum, Yu et al., 2006; Xu, Yuan et al., 2006). Verschiedene Studien zeigen einen Zusammenhang zwischen der Phosphorylierung von Nrf2 und der Induktion fremdstoffmetabolisierender Enzyme (Burdo, Schubert et al., 2008). Die Aktivierung von Nrf2 kann abhängig vom Gewebe und von der eingesetzten Substanz durch verschiedene Protein- oder Lipidkinasen erfolgen. So konnte eine Akkumulation von Nrf2 mit einer Phosphorylierung von ERK (Kang, Lee et al., 2007), JNK (Xu, Yuan et al., 2006), p38 (Yamamoto, Sawada et al., 2007) aber auch PKC (Rushworth, Ogborne et al., 2006) oder PI3K (Li, Cha et al., 2006) korreliert werden.

Die durch die Inkubation mit tBHQ erreichten hohen Nrf2 Mengen im Kern stehen im Einklang mit den in der Literatur gezeigten Aktivierungen des Nrf2-ARE Signalwegs. In humanen embryonalen Nierenzellen konnte bei der Charakterisierung weiterer

Aktivatoren der Nrf2 vermittelten ARE-Aktivierung durch die Inkubation mit tBHQ eine starke Nrf2 Akkumulation in der nukleären Proteinfraction detektiert werden (Hong, Sekhar et al., 2005). Auch bei ersten Untersuchungen zur Aufklärung der Signalweg Aktivierung in den humanen Neuroblastom Zellen IMR-32 konnte durch 100 µM tBHQ eine sehr starke Nrf2 Akkumulation im Zellkern detektiert werden. Allerdings trat im Vergleich zu den hier verwendeten Hct 116 Zellen auch in der zytosolischen Protein Fraktion ein Nrf2 Signal auf, welches durch die Behandlung mit tBHQ jedoch nicht verändert wurde (Lee, Moehlenkamp et al., 2001).

Das Ergebnis zeigt deutlich, dass tBHQ einen starken Induktor des Nrf2-ARE Signalwegs sind auch in Kolon-Karzinomzellen darstellt.

4.2.1.2 Wirkung von Flavonoiden auf die Translokation von Nrf2

Auch für die Flavonoide zeigte sich in den Immunoblot Analysen eine schnelle Akkumulation von Nrf2 in der nukleären Proteinfraction ähnlich der Akkumulation durch tBHQ.

Hct 116 Zellen wurden mit zunehmenden Konzentrationen Quercetin, Kaempferol, Luteolin und Apigenin zu zwei verschiedenen Zeitpunkten, 4h und 24h, behandelt. Für Quercetin und Kaempferol konnte zwar eine konzentrationsabhängige Zunahme der Nrf2 Akkumulation detektiert werden, die Signalstärke ist allerdings bei beiden Flavonoiden nach einer 4h Inkubation stärker als nach der 24h Inkubation. Quercetin zeigt eine ähnlich starke Akkumulation (17-fach, 50 µM; 4h) wie die tBHQ Inkubation. Kaempferol erreicht diese Akkumulationswerte nicht (5-fach 50 µM;4h). Die starke Akkumulation von Nrf2 durch Quercetin konnte bereits von Tanigawa et al. (2007) in humanen Hepatomzellen HepG2 gezeigt werden Die durch Kaempferol erzeugte Nrf2-Akkumulation wurde in epithelialen Cholea (HEI-OC1) Zellen nachgewiesen (Gao, Choi et al., 2010), jedoch konnten Gao et al. neben der nukleären Nrf2 Lokalisation auch in der zytosolischen Fraktion Nrf2 detektieren. In humanen Kolon-Karzinomzellen wurde die Akkumulation von Nrf2 durch Kaempferol jedoch noch nicht nachgewiesen.

Im Gegensatz zu Quercetin und Kaempferol kommt es bei Apigenin zu keinem signifikanten Anstieg der Nrf2 Proteinmenge im Kern. Die nicht signifikanten Unterschiede weisen lediglich einen Trend zur Nrf2 Aktivierung nach 4h Inkubation auf. Nach 24 Stunden Behandlung mit Apigenin und Luteolin war noch eine stärkere Aktivierung von Nrf2 als in der Kontrolle zu messen. Vielmehr kam es durch die Inkubation mit Apigenin zu einer signifikanten konzentrationsabhängigen Abnahme von Nrf2 (24h Inkubation). In der Literatur wurde beschrieben, dass Apigenin die HO-1,

welche durch den Nrf2-ARE Signalweg reguliert wird, in embryonalen Mäusefibroblasten herunterreguliert (Abate, Yang et al., 2005). Eine Möglichkeit für die Herunterregulation der HO-1 besteht in der Reduktion von Nrf2, allerdings ist dies in der Literatur noch nicht belegt. Die hier präsentierten Ergebnisse geben erste Hinweise auf die Wirkung von Apigenin in diesem Signalweg.

Luteolin zeigte in den hier vorgestellten Ergebnissen keine signifikante Wirkung auf die Nrf2 Akkumulation, so dass eine direkte Wirkung auf den Transkriptionsfaktor zwar ausgeschlossen wird, aber eine Induktion protektiver Enzyme dennoch über andere Signalwege erfolgen kann. Wruck et al. (2007) konnten die Aktivierung des ARE durch Luteolin in Phäochromozytom Zellen der Ratte (PC12) und den neuronalen Nagerzellen (C6) zeigen. Sie fanden allerdings auch eine Aktivierung von MAPKinase-Signalwegen und machten vorrangig diese für die Aktivierung verantwortlich. Die Aktivierung wurde weiter nicht durch Immunoblot Analysen gezeigt, sondern durch die Inhibition der Nrf2 Biosynthese, mittels siRNA Technik nachgewiesen. Ob die hier gezeigte Luteolin-vermittelte geringe Nrf2 Akkumulation zelltypspezifisch ist und die Akkumulation in anderen Zelllinien stärker ausgeprägt ist, bleibt offen.

Auch bei den Flavonoiden war weder in der nukleären Fraktion der Kontrolle noch in der zytosolischen Fraktion der Inkubationen Nrf2 zu detektieren. Also war auch hier Nrf2 in der Kontrolle, als auch in der zytosolischen Fraktion der behandelten Proben, nur in Mengen unterhalb der Nachweisgrenze vorhanden.

Der Nachweis der zytosolischen Form von Nrf2 erweist sich auch in der Literatur als problematisch, da auch bei anderen Arbeitsgruppen die zytosolische Detektion von Nrf2 nicht darzustellen war. Apopa et al. (2008) konnten im Gegensatz zu Lee et al. (2001) in humanen Neuroblastomzellen keine zytosolische Nrf2 Proteinfraction detektieren. Bei ihren Untersuchungen zur Relevanz einer Phosphorylierung von Nrf2 durch die Kaseinkinase 2 konnte durch die Inkubation mit 50 μ M tBHQ kein zytosolisches Nrf2 Signal festgestellt werden (Apopa, He et al., 2008). In anderen humanen neuronalen Zellen wurde die Wirkung von tBHQ zur Identifizierung von neuroprotektiven Substanzen untersucht. Auch hier konnte das im Zytosol lokalisierte Nrf2 nicht dargestellt werden (Sato, Okamoto et al., 2006). Keum et al. (2006) untersuchten die Wirkung des Naturstoffs Sulforaphan (Isothiocyanat), einem weiteren klassischen Induktor des Nrf2-Signalwegs, und transfizierten HepG2 Zellen mit Plasmiden, welche verschiedene Isoformen der p38 Kinase exprimierten. Sie stellten eine vermehrte Akkumulation von Nrf2 im Kern fest, erhielten jedoch kein zytosolisches Nrf2 Signal, nachdem die HepG2 Zellen mit Sulforaphan inkubiert worden waren (Keum, 2006). Hingegen zeigen

Rushworth et al. (2005) eine Abnahme von Nrf2 im Zytosol mit zeitlich versetzter Zunahme von Nrf2 im Nukleus. Und auch Gao et al. (2010) konnten eine zytosolische Detektion von Nrf2 zeigen, die zugunsten einer nukleären Lokalisation von Nrf2 durch Kaempferol verschoben wurde. Die Darstellung der Translokation oder vielmehr die zytosolische Lokalisation von Nrf2 ist in der Verwendung von Antikörpern gegen unterschiedliche Epitope des Proteins und möglicherweise durch den gewählten Zelltypus begründet. Hanneken et al. (2006) stellten bei ihren Untersuchungen nur die nukleäre Fraktion dar, konnten aber auch nach Inkubation mit Quercetin und Fisetin eine Akkumulation von Nrf2 detektieren.

Da Nrf2 unter Kontrollbedingungen an Keap I gebunden im Zytosol vorliegt, besteht die Möglichkeit, dass Nrf2 durch Keap I nicht nur sequestriert, sondern auch sehr schnell degradiert wird, so dass Nrf2 nicht detektiert werden kann. Für diese Hypothese spricht auch die schnelle Akkumulation von Nrf2 im Nukleus, welche nach einer Stunde bereits ein Maximum erreichte (tBHQ), sowie für die Abwesenheit eines Signals in der zytosolischen Fraktion aller Proben. Des Weiteren finden sich in der Literatur Ergebnisse, die eine schnelle Degradation von Nrf2 belegen (Furukawa und Xiong, 2005; Kobayashi und Tong, 2006). Andere Gruppen zeigten eine Stabilisierung des Nrf2 Proteins und korrelierten dies mit einer erhöhten Stressresistenz neuronaler Zellen gegenüber H₂O₂ induziertem Stress (Li, Johnson et al., 2005).

Um die in den Immunoblot-Analysen fehlende zytosolische Nrf2 Detektion dennoch in Hct 116 Zellen darzustellen, wurde in dieser Arbeit ein GFP-Nrf2-Fusionskonstrukt generiert.

4.2.1.3 Einfluss auf die Nrf2-GFP-Translokation

In der vorliegenden Arbeit wurde ein GFP-Nrf2-Reportergenkonstrukt erstellt, dabei wurde das komplette ORF (*open reading frame*) des Nrf2-Gens in einen Vektor mit GFP-Gen eingefügt, so dass nach der Transfektion dieses Konstrukts ein Nrf2-GFP-Fusionsprotein entstand.

Um sicherzustellen, dass das eingesetzte Nrf2-GFP-Konstrukt funktional ist, wurden zunächst neben der Sequenzierung des Konstrukts Immunoblot Analysen durchgeführt. In den Nrf2-GFP-exprimierenden Zellen konnte das Konstrukt nach der Umsetzung mit dem GFP-Antikörper bei einer Größe von 130 kDa und 30 kDa detektiert werden, wohingegen der leere GFP-Vektor nur bei ca. 30 kDa detektiert wurde. Durch den Nrf2-Antikörper wurde bei den Proteinproben der Nrf2-GFP exprimierenden Zellen eine Bande bei 130 kDa sichtbar. In den nicht-transfizierten Zellen konnte bei der

Umsetzung mit dem Nrf2-Antikörper bei 100 kDa ein Signal detektiert werden. Durch die Umsetzung mit dem GFP-Antikörper wurde in den nicht transfizierten Zellen kein Signal detektiert.

Dieses Ergebnis zeigt, dass bezogen auf die Proteingröße ein vollständiges Nrf2-GFP Fusionsprotein in die Zellen transfiziert wurde. Weder die Größe von 100 kDa noch die zusätzliche Detektion einer 30 kDa Bande in den Nrf2-GFP exprimierenden Zellen stehen im Widerspruch zu einem funktionalen Nrf2-GFP-Konstrukt. Wie bereits beschrieben, kommt es bei der Modifikation des Keap1-Nrf2 Komplexes durch oxidative und elektrophile Substanzen zu einer verminderten Ubiquitinierung von Nrf2 durch Keap 1, so dass weniger Nrf2 degradiert werden kann. Bei der Transfektion mit dem Nrf2-GFP-Reportergen-Konstrukt kam es zwar zu einer gesteigerten Expression von Nrf2, jedoch wird die Ubiquitinierung und Degradation durch die Überexpression nicht reduziert. Dabei könnten auch die GFP-Fusionsproteine degradiert werden, allerdings ist die Kapazität der Degradation geringer als der Überschuss an GFP-Nrf2-Proteinen, so dass es dennoch zu einer geringen Fluoreszenz kommt. Es kann also durch den konstitutiven Abbau von Nrf2, zu GFP-Fragmenten kommen, die durch die Umsetzung mit dem GFP-Antikörper detektiert werden. Die weiterhin bestehende Degradation unter Kontrollbedingungen ist auch eine Erklärung für die schlecht detektierbare zytosolische Fluoreszenz bei den mikroskopischen Untersuchungen.

Auch die Funktionalität des Nrf2-GFP-Konstrukts konnte in Abschnitt 4.2.4 gezeigt werden. Es ist wahrscheinlich, dass bei den Immunoblot-Analysen ein modifiziertes Nrf2 detektiert worden ist, da Nrf2 auf Grund seiner Anzahl an Aminosäuren ein ca. 65 kDa großes Protein ist (Itoh, Igarashi et al., 1995; Moi, Chan et al., 1994). In dieser Arbeit lässt sich nicht genau darstellen, ob es sich bei der Detektion um ein Nrf2-Dimer, eine Nrf2-Phosphorylierung oder um ein noch an Keap1 gebundenes Nrf2 handelt. Allerdings spricht gegen eine Phosphorylierung der erhebliche Größenunterschied zu dem nativen Nrf2 Protein. Gegen die Detektion eines Nrf2 Dimers spricht die denaturierende Behandlung der Proteinextrakte bei der elektrophoretischen Auftrennung. Die Detektion des Nrf2 Proteins bei ca. 100 kDa ist auch von anderen Arbeitsgruppen beschrieben worden. Lee et al. (2001) entdeckten zwar das veränderte Laufverhalten von Nrf2 in ihren Untersuchungen, gaben allerdings keine weitere Erklärung zu der Detektion eines weit größeren Nrf2-Proteins. Sie verwiesen auf andere Arbeitsgruppen, die Nrf2 bei ähnlichen Größen detektierten (Moi, Chan et al., 1994; Venugopal und Jaiswal, 1996). Huang et al. (2002) gaben an, natives Nrf2 in Immunoblot Analysen bei ca. 90 kDa detektiert zu haben, wobei die Größe durch eine

Phosphorylierung an Serin-40 weiter stieg. Li et al. (2005) detektierten Nrf2 ebenso bei einer Größe von 100 kDa und erklärten diesen Größenunterschied zwischen Proteingröße und Detektionsgröße mit einer Detektion von ubiquitiniertem Nrf2. Warabi et al. (2007) detektierten Nrf2 ohne Angabe von möglichen Ursachen bei ähnlichen Größen. Es könnten Nrf2 Homodimere oder Nrf2 Keap I Heterodimere detektiert worden sein. Copple et al. (2008) postulieren, dass die Degradation von Nrf2 auch durch eine Reaktion mit der DLG-Bindedomäne von Keap I inhibiert werden könnte. Dabei dissoziiert Nrf2 nicht von Keap I, sondern liegt gebunden an einem Keap I-Monomer vor. Bei Untersuchungen des Inhibitorproteins Keap1 konnte gezeigt werden, dass es zu Größenunterschieden auch bei der Detektion von Keap1 kommt, wenn Zellen mit einem Induktor inkubiert werden (Egler, Liu et al., 2005). Es wird davon ausgegangen, dass durch die Wirkung eines Induktors Nrf2 nicht weiter degradiert wird, weil Keap1 nicht in der Lage ist Nrf2 zu ubiquitinieren. Das bedeutet gleichzeitig, dass die Bindung zwischen Keap1 und Nrf2 nicht nur aus einfachen Disulfidbrückenbindungen besteht, sondern auch Proteinquervernetzungen den Komplex formen (Zhang und Hannink, 2003).

Nicht denaturierte Dimere könnten die Größenunterschiede zwischen nativem Protein und detektiertem Protein auch bei der Detektion von Nrf2 erklären. Wodurch die Verschiebung der Detektion von Nrf2 zustande kommt, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden.

Der Funktionalitätsprüfung dienten nicht nur die Sequenzierung des Nrf2-GFP Konstrukts und die Immunoblot-Analyse der transfizierten Zellen, es wurde auch geprüft, ob eine Nrf2-Überexpression eine gesteigerte ARE-Aktivierung verursacht. Dazu wurden Hct 116 Zellen mit einem ARE-Luziferase-Konstrukt und mit dem Nrf2-GFP-Konstrukt co-transfiziert, um die Nrf2 Abhängigkeit der ARE-Aktivierung zu verifizieren.

Der ARE-Luziferase-Reporter enthält ein 41 bp großes Fragment aus dem GSTYa-Promoter der Ratte, welches nur eine funktionale Bindestelle, das ARE enthält.

Bei der Co-Transfektion des ARE-Luziferase-Konstrukts und des Nrf2-GFP-Plasmids konnte eine moderate Aktivitätssteigerung des ARE beobachtet werden (4,3-fach), tBHQ und Quercetin lösen eine stärkere ARE Aktivierung aus (7-fach und 6,5-fach). Das Ergebnis zeigt, dass die durch die Transfektion mit dem Nrf2-GFP-Konstrukt erhöhte Menge an Nrf2 ausreichend ist, um das ARE zu aktivieren. Durch die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen konnte bereits gezeigt werden, dass auch das Nrf2-GFP-Konstrukt unter Kontrollbedingungen im Zytosol nicht zu detektieren ist. Die Degradation des Nrf2-GFP-Fusionsprotein findet also auch nach der Transfektion

statt, jedoch liegen die Zellen nach einer Transfektion mit einem erheblichen Überschuss an Nrf2 vor, so dass die ARE Aktivierung stärker ausfällt als unter Kontrollbedingungen, jedoch nicht so stark wie nach einer Inkubation mit tBHQ oder Quercetin. Nach der transienten Transfektion mit Nrf2-GFP und anschließender Inkubation mit 50 μ M tBHQ und 50 μ M der Flavonoide Quercetin, Kaempferol und Fisetin konnte jedoch im Fluoreszenzmikroskop erneut nur die Zunahme der nukleäre Lokalisation von Nrf2 beobachtet werden. Die zytosolische Nrf2-GFP Lokalisation konnte zwar bei extremer Überbelichtung detektiert werden, es wäre jedoch eine stärkere Fluoreszenz auch im Zytosol zu erwarten gewesen. Da bei der Transfektion das Konstrukt im Überschuss in die Zelle gelangt und auch nicht festgelegt ist, in welchem Kompartiment der Reporter exprimiert wird, sollte die Expression des GFP-Reporters in jedem Kompartiment gleich stark sein. Die Detektion des Konstrukts in der Kontrolle war auch in diesem Versuchssystem nicht möglich, da die Mengen an Nrf2 wider Erwarten äußerst gering waren.

4.2.2 Transkriptionelle Regulation von Nrf2

Abbildung 3.25 zeigt die mRNA-Level von Nrf2 in Hct 116 Zellen nach der Inkubation mit tBHQ zu verschiedenen Zeitpunkten. Die mRNA-Level wurden durch die Inkubation mit tBHQ nicht verändert. In der Literatur existieren kontroverse Ergebnisse bezogen auf die transkriptionelle Regulation von Nrf2. Gong und Cederbaum (2006) zeigten mittels der eingesetzten siRNA Technik, dass es zu einer transkriptionellen Induktion von Nrf2 kommt. Miao et al. (2005) zeigten eine transkriptionelle Induktion von Nrf2 durch den Ah-Rezeptor und verbanden somit die Induktion des Phase-II Metabolismus mit dem Phase-I Metabolismus als Antwort auf oxidativen Stress. Die transkriptionelle Induktion wurde auch nach der Behandlung mit D3T (3H-1, 2-dimethiol-3-thion; Oltipraz) in Nager Keratinozyten mittels Northern Blot Technik und Nrf2-Protmoter-Luciferase Reporter Assay nachgewiesen (Kwak, Itoh et al., 2002). Jedoch die meisten Untersuchungen beschrieben keinen Effekt auf die Nrf2 RNA-Menge. Dabei wurden die RNA-Mengen nach Inkubation mit Substanzen wie Häm (Alam, Killeen et al., 2003), Cadmiumchlorid (Stewart, Killeen et al., 2003) oder tBHQ (Li, Johnson et al., 2005) gemessen.

Da unter Kontrollbedingungen kein Nrf2 im Zytosol detektiert werden konnte, allerdings nach 30 min bereits eine starke Akkumulation von Nrf2 im Kern zu detektieren wurde, war zu hinterfragen, ob die Nrf2 Menge durch eine Induktion der Nrf2 Transkription

gesteigert wurde. Die beschriebenen Ergebnisse schließen eine transkriptionelle Regulation in Hct 116 Zellen aus. Jedoch zeigt sich in den Immunoblot-Analysen eine äußerst schnelle Bereitstellung großer Mengen an Nrf2 Protein, so dass neben der Messung der Transkriptmenge auch der proteasomale Abbau von Nrf2 untersucht wurde.

4.2.3 Proteasomale Degradation

Neben der transkriptionellen Regulation wurde in der Literatur auch die Stabilisierung von Nrf2 durch elektrophile Substanzen beschrieben (Hong, Sekhar et al., 2005). Dieser Theorie zu Grunde liegen Ergebnisse, die den schnellen Abbau von Nrf2 durch die Ubiquitinierung, ausgelöst durch Keap 1, und anschließende Degradation durch das Proteasom zeigen (Stewart, Killeen et al., 2003). Um den proteasomalen Abbau von Nrf2 zu untersuchen, wurde mit dem Induktor tBHQ und den Flavonoiden ein Proteasom Inhibitor-Assay durchgeführt sowie die Nrf2 Expression unter Einfluss von tBHQ und dem Proteasom-Inhibitor MG132 mittels Immunoblot Analysen und RT-PCR untersucht. Neben dem direkten Zusammenhang zwischen Nrf2 und Proteasom Inaktivierung wurde mittels RT-PCR die Induktion der HO-1- und GST- Transkripte durch alleinige Nrf2 Überexpression oder mit gleichzeitiger Proteasom-inhibition durch MG132 untersucht.

Auch in dieser Arbeit konnte eine Akkumulation von Nrf2 im Nukleus durch den Einsatz des Proteasom Inhibitors MG132 in Immunoblot-Analysen gezeigt werden. Neben der verstärkten Akkumulation im Nukleus kommt es allerdings auch, im Gegensatz zu der Behandlung mit tBHQ, zu einer Detektion von Nrf2 im Zytosol. Weiterhin wurde die Transkriptinduktion zweier Zielgene von Nrf2, der HO-1 und der GST, nach Inkubation mit dem Inhibitor MG132 und mit gleichzeitiger Überexpression von Nrf2 untersucht. Abbildung 3.27 zeigt, dass die Transkriptmenge der HO-1 durch die Inkubation mit MG132 leicht erhöht ist. Durch die Überexpression von Nrf2 ergibt sich eine Erhöhung der Transkriptmenge in einem ähnlichen Maße wie bei Inkubation mit MG132. Durch die gleichzeitige Überexpression und Proteasom-Inhibition liegt die mRNA-Menge der HO-1 über den zuvor detektierten Mengen. Es ergibt sich also tendenziell ein additiver Effekt, der für eine Stabilisierung von Nrf2 durch die Abnahme der proteasomalen Degradation und zu einer Induktion antioxidativer Enzyme führt. Für die Induktion der GST zeigt sich ein etwas verändertes Ergebnis. Die Transkriptmenge der GST ließ sich zwar durch die Überexpression von Nrf2 leicht induzieren, es ist aber kein additiver Effekt durch eine Inkubation mit MG132 messbar. Dieses Ergebnis kann auf unterschiedliche Weise

interpretiert werden. Zum Einen ist die erkennbare, aber nicht starke Induktion der HO-1 auf Grund der Anwesenheit von transkriptionsreprimierenden Faktoren, wie Bach 1, zu erklären. Auf die mögliche Rolle von Bach 1 in der HO-1 Induktion wird in Abschnitt 4.5 näher eingegangen. Zum Anderen ist die GST Transkriptmenge weniger effektiv zu detektieren. Durch die hohen Homologien der einzelnen GST-Isoformen innerhalb der großen GST-Familie kann es zu einer Art Redundanz kommen, so dass einige Vertreter dieser Familie nicht durch den Nrf2-Signalweg induziert werden, jedoch detektiert werden. Die Transkriptmenge beider Enzyme wird allerdings durch die Überexpression induziert.

Um zu untersuchen, ob es durch die die Inkubation mit dem Induktor tBHQ oder die durch die eingesetzten Flavonoide zu einer verzögerten proteasomalen Degradation kommt, wurde ein auf Lumineszenz beruhender Assay eingesetzt. Dazu wurden Hct 116 Zellen mit den zu untersuchenden Substanzen inkubiert und anschließend mit einem Substrat des Proteasoms, welches durch seine Chymotrypsinaktivität umgesetzt wird, versetzt.

Abbildung 3.28 zeigt, dass weder tBHQ noch die Flavonoide Quercetin, Apigenin, Luteolin und Kaempferol die Chymotrypsin-Aktivität hemmen konnten. Die korrekte Durchführung und Funktionalität des Assays konnte durch den Einsatz des Proteasom Inhibitors MG132 gezeigt werden, der mit 1 μ M die Lumineszenz bis auf 20 % der ursprünglichen Lumineszenz reduziert. Da das Proteasom neben der Chymotrypsin- auch eine Trypsin- und Caspase-ähnliche Aktivität aufweist, kann nicht ausgeschlossen werden, dass das Proteasom durch die eingesetzten Substanzen in einer der anderen Aktivitäten inhibiert wird. In der Literatur konnte mehrfach durch Inhibitoren des Proteasoms wie MG132 die Stabilisierung von Nrf2 gezeigt werden (Dreger, Westphal et al., 2009; Ma, Kinneer et al., 2004; Sahni, Rydkina et al., 2008). Allerdings zeigten Ma et al. (2004) sowie Sahni et al. (2008) nicht die Inaktivierung einer bestimmten Aktivität des Proteasoms, sondern nur den Effekt des Proteasom Inhibitors MG132. Dreger et al. (2009) zeigen zwar, dass MG132 in der Lage ist die Chymotrypsinaktivität des Proteasoms zu inhibieren, untersuchen aber nicht die Wirkung anderer Nrf2 Aktivatoren.

Da tBHQ wie auch die Flavonoide in den Immunoblots nur ein nukleäres Signal zeigten und die Inkubation mit MG132 zu einer Anhäufung von Nrf2 sowohl im Zytosol als auch im Kern führte, muss es neben der fehlenden proteasomalen Degradation von Nrf2 also noch andere Mechanismen zur Stabilisierung von Nrf2 geben.

Wie in Abschnitt 4.2.1 geschildert, gibt es verschiedene Ergebnisse, die eine Stabilisierung zeigten. Neben der Modifikation von Cystein-Resten an Keap I, die zu einer verminderten Ubiquitinierung von Nrf2 und zur Störung des Nrf2/Keap I-Komplexes führen (Copple, Goldring et al., 2008), wird auch die Phosphorylierung von Nrf2 als stabilisierendes Ereignis angesehen (Bloom und Jaiswal, 2003; Johnson, Andrews et al., 2002; Lee-Hilz, Boerboom et al., 2006; Numazawa, Ishikawa et al., 2003). Da die Phosphorylierung von Proteinen Bestandteil vieler Signalwege ist, ist eine direkte oder indirekte Aktivierung durch Phosphorylierung wahrscheinlich.

Es kann nicht vollkommen ausgeschlossen werden, dass tBHQ zu einer direkten Inhibierung des Proteasoms führt, da nur die Chymotrypsinaktivität des Proteasoms untersucht wurde.

Nachdem die Akkumulation von Nrf2 sowohl für tBHQ als auch für bestimmte Flavonoide in Hct 116 Zellen gezeigt werden konnte, wurde untersucht ob, die starke Nrf2 Akkumulation mit einer Aktivierung des ARE einhergeht.

Um die Aktivierung des ARE zu messen, wurden Hct 116 Zellen mit einem ARE-Luziferase-Reporter-gen-Konstrukt transfiziert und mit tBHQ und den Flavonoiden behandelt.

4.2.4 Wirkung auf die ARE-Aktivierung

Der Aktivierung des ARE geht eine Inhibition der Interaktion zwischen Nrf2 und Keap I sowie eine Translokation von Nrf2 voraus.

Um die ARE-Aktivierung durch tBHQ und Flavonoide zu untersuchen, wurden Hct 116 Zellen mit dem ARE-Luziferase-Konstrukt transfiziert und sowohl mit dem Induktor tBHQ als auch mit den Flavonoiden Quercetin, Kaempferol, Luteolin, Apigenin, Fisetin, Galangin, Myricetin, Morin und Chrysin inkubiert. Abb.3.29 zeigt die Zunahme der Lumineszenz als Maß für die Aktivierung des ARE. Sowohl der Induktor tBHQ (7-fach) als auch Quercetin (6,5-fach) zeigten eine starke Aktivierung des ARE. Die übrigen Flavonoide zeigen im Vergleich nur eine geringe oder gar keine Aktivierung des ARE. So konnte für Kaempferol und Fisetin noch ein signifikanter Anstieg der Lumineszenz gemessen werden (1,9-fach/3,4-fach). Die Behandlung der Zellen erfolgte mit zunehmender Konzentration sowie zu unterschiedlichen Zeitpunkten für die Flavonoide, welche einen Effekt nach 24 h Inkubation auslösen konnten. Die Aktivierung ist bei den Flavonoiden wie auch bei tBHQ konzentrationsabhängig. Allerdings hat die Aktivierung in allen Fällen ein Maximum nach Behandlung der Zellen mit höheren Konzentrationen.

Die Aktivierung des ARE durch tBHQ in Hct 116 Zellen zeigt auch für den ARE-Luziferase-Reporter-Gen-Assay eine ausreichende Sensitivität.

Die Funktionalität des Konstrukts wurde von der Arbeitsgruppe Wasserman et al. (1997a,b) mit tBHQ in HepG2 Zellen überprüft. In weiteren Arbeitsgruppen wurde das in dieser Arbeit verwendete Konstrukt ebenfalls erfolgreich mit tBHQ als Induktor eingesetzt (Yu, Lei et al., 1999; Yu, Mandlekar et al., 2000).

Die Flavonoide Quercetin, Kaempferol und Fisetin zeigten einen aktivierenden Effekt auf das ARE in dem hier durchgeführten Reporter-Gen Assay. Quercetin zeigte eine ähnlich starke Induktion wie tBHQ.

In HepG2 Zellen sorgte Quercetin für eine ähnlich starke Aktivierung des ARE (Tanigawa, Fujii et al., 2007). Für Kaempferol konnte eine ARE Aktivierung und anschließende Gamma-Glutamylsynthetase Induktion gezeigt werden (Myhrstad, Carlsen et al., 2002). Die direkte Wirkung von Fisetin auf das ARE konnte noch nicht gezeigt werden, allerdings wurde durch Hanneken et al. (2006) eine Nrf2 Akkumulation wie auch eine HO-1 Induktion in alveolaren Epithelzellen ARPE-1 Zellen dargestellt.

Die hier beschriebenen Ergebnisse deuten darauf hin, dass Nrf2 unter physiologischen Bedingungen schnell degradiert wird. Sie lassen aber offen, ob die gesteigerte Nrf2 Menge, welche zu einer ARE-Aktivierung führt, auf eine Stabilisierung des Nrf2-Proteins oder auf eine transkriptionelle Induktion von Nrf2, also eine *de novo* Synthese zurückzuführen ist.

Nach der Aktivierung des ARE wurde die Induktion der antioxidativen Enzyme HO-1 und GST mittels RT-PCR untersucht.

4.3 Induktion antioxidativer und fremdstoffmetabolisierender Enzyme

4.3.1 HO-1 Induktion

Die HO-1 katalysiert den Abbau von Häm und bietet somit einen Schutz vor oxidativem Stress. Zu den protektiven Eigenschaften der HO-1 gehören die Degradation von prooxidativem Häm, die Freisetzung von den antioxidativen Verbindungen Biliverdin und Bilirubin, die Freisetzung von entzündungshemmendem, antiapoptotischem und antiproliferativem Kohlenmonoxid (CO) und auch die Induktion der Ferritin Synthese, welche freies Eisen bindet. Die HO-1 wird wie andere antioxidative und Phase-II Enzyme durch Nrf2 reguliert. In seiner Promotorregion wurden mehrere ARE Sequenzen gefunden (Elbirt und Bonkovsky, 1999). Auch konnte die Induktion der HO-1 durch tBHQ in Hepatozyten (Keum, Han et al., 2006) wie auch in den

Mammakarzinomzellen MCF-7 nach der Inkubation mit Cadmiumchlorid (Alam, 2000) gezeigt werden.

Die Behandlung von Hct 116 Zellen mit tBHQ führte in dieser Arbeit zu einer Induktion der HO-1 ähnlich der Induktion in Hepatozyten. Dabei hat die Induktion ein Maximum bei einer Inkubation mit 50 μM tBHQ für 8h. Auch Quercetin zeigt eine Induktion der HO-1. Bei den weiteren untersuchten Flavonoiden kommt es jedoch zu keiner Induktion der HO-1. Dieses Resultat kann durch unterschiedliche Faktoren in der Nrf2 Aktivierung begründet liegen. Zum Einen muss es zu einer Stabilisierung und starken Aktivierung von Nrf2 durch die Behandlung mit einer elektrophilen Substanz kommen (Alam, Killeen et al., 2003; Numazawa, Ishikawa et al., 2003) und zum Anderen muss der Inhibitor der HO-1 Transkription Bach 1 entsprechend inaktiviert werden (Suzuki, Tashiro et al., 2003). Die Inaktivierung von Bach 1 erfordert die Bindung von Hemin oder einer ähnlich elektrophilen Verbindung, um eine vollständige Aktivierung des Nrf2/ARE Signalwegs zu ermöglichen (Sun, Brand et al., 2004). Dabei wird die HO-1 auch durch komplexe Signalwege wie den MAPKinasen reguliert (Keum, Yu et al., 2006; Kocanova, Buytaert et al., 2007), welche aktiviert werden, wenn die Zelle in oxidativen Stress gerät. Es kann also durch verschiedene Signalwege zu einer Induktion der HO-1 kommen.

Für tBHQ ist auf Grund der Ergebnisse eine Kombination verschiedener Signalwege denkbar. tBHQ ist bekannt als starker Induktor von Phase-II Enzymen und besitzt elektrophilen Charakter. Es entsteht bei der Umsetzung von BHA durch CYP450-Monooxygenasen und wird zum tert-Butylchinon autooxidiert.

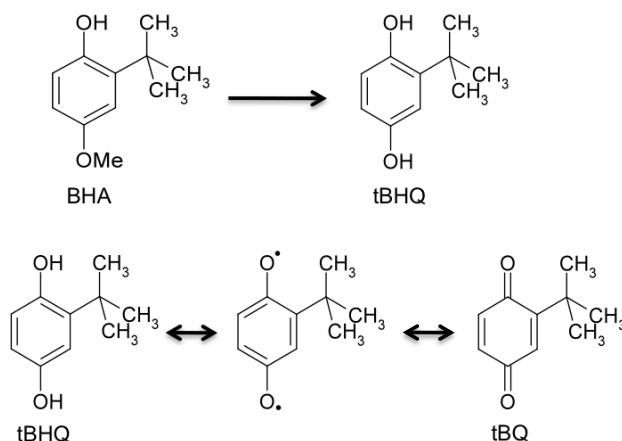


Abb. 4.1 Reaktionen vom BHA zu tBHQ

tert-Butylhydroanisol (BHA) wird zu tert-Butylhydrochinon (tBHQ) umgesetzt. Anschließend kann die Autooxidation zu tert-Butylchinon erfolgen, dabei entsteht ein reaktives Semichinon. tBHQ ist ein Redoxcyclus und kann in einem steten Kreislauf zur Produktion von ROS beitragen.

Die Freisetzung von tBHQ führt wiederum zu Redox-Cycling und zu der vermehrten Bildung von ROS (Kahl, Weinke et al., 1989). Durch die Steigerung der ROS Menge kann es zu einer Aktivierung von MAPKinase-Kaskaden kommen, die in Zusammenhang mit der Induktion von Phase-II Enzymen stehen (Yu, Lei et al., 1999). Keum et al. (2006) konnten zeigen, dass die HO-1 in primären Ratten Hepatozyten nicht durch BHA, aber durch tBHQ induziert wird und dass die Induktion über eine ERK/

JNK-vermittelte Nrf2 Aktivierung verläuft. Auch für andere Substanzen mit meist prooxidativem Charakter wie Sulforaphan konnte gezeigt werden, dass die Induktion der Nrf2-vermittelten Transkription über die Aktivierung von MAPKinasen verlaufen kann (Kong, Owuor et al., 2001).

Die HO-1 Induktion kann sowohl über die Inaktivierung des Repressors Bach 1 (Owuor und Kong, 2002) als auch über eine Phosphorylierung von Nrf2 verlaufen. Die Nrf2 Aktivierung kann über die Modifikation von Cystein-Resten an Keap I und Bach 1 erfolgen, wobei diese Modifikation zu einer Inaktivierung dieser Moleküle führt. Mit der durch ROS initiierten Inaktivierung der Repressormoleküle ist auch eine Aktivierung intrazellulärer Signalwege wie den MAPKinase-Kaskaden korreliert. Die mögliche Aktivierung des Nrf2-ARE Signalwegs ist in Abbildung 4.2 gezeigt.

Für die Flavonoide ergibt sich ein anderes Bild. Flavonoide haben nicht nur ein antioxidatives Potential, welches sie befähigt, ROS zu neutralisieren, sie können auch durch die Abgabe von H⁺-Atomen zu reaktiven Verbindungen reagieren. Unter den in dieser Arbeit untersuchten Flavonoiden war Quercetin als einzige Verbindung in der Lage, die HO-1 zu induzieren. Die Struktur zeigt im Vergleich zu den weiteren Verbindungen 5 Hydroxylgruppen verteilt über das Ringsystem. Neben den beiden phenolische Gruppen jeweils an Ring A und B in 7- und 5-Position und in 3'- und 4'-Position besitzt Quercetin eine weitere 3-Hydroxylgruppe neben der 4-Oxogruppe an Ring C. Die phenolische Gruppen an Ring B sowie die Hydroxygruppe an Ring C können sowohl für die antioxidative Kapazität als auch für die aktivierende Wirkung auf den Nrf2-ARE Signalweg von Bedeutung zu sein. Auch die HO-1 wird in der vorliegenden Arbeit durch Quercetin marginal induziert.

Um zu untersuchen, ob die Induktion der HO-1 induziert werden kann, wenn Bach 1 durch einen zusätzlichen Stimulus inhibiert wird, wurden Hct 116 Zellen zusätzlich zu dem Induktor tBHQ mit Hemin behandelt. Eine zusätzliche Inkubation mit Hemin zeigte allerdings nicht das erwartete Ergebnis. Es konnte keine erhöhte Induktion durch die Zugabe von Hemin erreicht werden, so dass davon auszugehen ist, dass zu einer Induktion der HO-1 die Phosphorylierung von Nrf2, also die Beteiligung von MAPKinase-Kaskaden, notwendig ist. Für diesen Verlauf spricht auch das Ergebnis von Überexpressionsversuchen mit dem Nrf2/GFP-Konstrukt. Durch die Überexpression allein kommt es zwar zu einer ARE Aktivierung, allerdings reicht die Überexpression für eine HO-1 Induktion nicht aus.

4.3.2 GST Induktion

Neben der HO-1 als Nrf2 Zielgen wurde im Verlauf dieser Arbeit auch die Induktion der GST A2 mittels RT-PCR untersucht. Die GSTs der α Familie gehören zu der Superfamilie der GSTs, die sich in weitere Untergruppen unterteilen lassen. Es ist eines der wichtigsten und bekanntsten fremdstoffmetabolisierenden Enzyme, da es an der Konjugation vieler Xenobiotika beteiligt ist. Der Gehalt an GSTs beträgt ungefähr 5% des Gesamtleberproteins und ist somit stark im menschlichen Organismus vertreten. Für verschiedene Klassen der GSTs konnte bereits eine Regulation über den Nrf2-Signalweg gezeigt werden (Ki, Cho et al., 2005). Auf Grund der Induzierbarkeit der GST α Familie in Ratten (Kang, Choi et al., 2002) und Mäusen (Chanas, Jiang et al., 2002) und der hohen Orthologie der Enzyme zwischen den Spezies wurden auch Vertreter der humanen GST α Familie untersucht (Nguyen, Sherratt et al., 2003). Aus diesem Grund wurde auch in dieser Arbeit eine Isoform der GST α Familie, GST A2 mittels untersucht. Die Abbildungen 3.39 bis 3.41 zeigen deutlich, dass die transkriptionelle Expression der GST A2 nach Inkubation mit tBHQ von der Transkriptmenge der HO-1 abweicht. Im Gegensatz zur Expression der HO-1 ist bei der GST A2 keine Induktion zu erkennen. Nicht nur in behandelten Zellen, sondern auch in der Kontrolle weicht die Expression ab. Die GST A2 wird bereits unter Kontrollbedingungen zu einem geringen Maße exprimiert. In Bezug auf die geringe Expression in Geweben des Gastrointestinaltraktes sind die hier erhaltenen Ergebnisse kongruent zur Literatur. Im Mausmodell konnte nachgewiesen werden, dass die durch ein Hirntrauma verursachte Schädigung der Darmmucosa mit einer Reduktion von Nrf2 und einer Repression sowohl der NQO 1 als auch der GST A1, einer GST Isoform, die eine äußerst hohe Homologie zur GST A2 aufweist, einhergeht (Wei-Jin et al., 2009). Auch in humanem Gewebe des Gastrointestinaltraktes konnte die Verteilung der unterschiedlichen GST Isoformen untersucht werden. Coles et al. (2009) detektierten die GST A2 zwar im proximalen Teil des Gastrointestinaltraktes, allerdings nahm die Menge distal fortschreitend ab. Stark verringerte Mengen im Vergleich zum Duodenum wurden im Kolon detektiert (Coles et al., 2009).

Allerdings bieten diese Ergebnisse keine Erklärung für die verringerte GST Transkriptmenge nach Inkubation mit tBHQ oder den untersuchten Flavonoiden. Die GST A2 besitzt neben ARE Sequenzen noch weitere Bindestellen, welche spezifisch für andere regulatorische Proteine sind. So induziert das Schistosomizid Oltipraz die GST A2 abhängig von der eingesetzten Konzentration über das C/EBP beta Protein, welches an eigene responsive Bindeelemente in der Promotorregion des GST Gens bindet.

Allerdings gilt tBHQ immer noch als Induktor des Nrf2-Signalwegs. Unter der Annahme, dass die GST A2 nur sehr schwach im Kolon exprimiert wird, besteht die Möglichkeit, dass andere dort exprimierte GST Isoformen durch Nrf2 reguliert werden und es zu keiner nachweisbaren Induktion der GST A2 kommt.

4.4 Wirkmechanismus von Flavonoiden auf den Nrf2-Signalweg

Es ist davon auszugehen, dass durch die Neutralisation von ROS durch Quercetin dieses selbst in der Art reaktiv wird, dass es in der Lage ist, die Expression der zytoprotektiven HO-1 zu induzieren. Dabei kann über den genauen Mechanismus der Aktivierung des Nrf2-ARE Signalwegs auf Grund der hier erhaltenen Ergebnisse nur spekuliert werden. Es konnte gezeigt werden, dass die strukturverwandten Flavonoide eine sehr divergierende Wirkung auf den Nrf2 Signalweg ausüben. Die Einteilung der Flavonoide nach der Stärke ihres antioxidativen Potentials korreliert nicht mit der vollständigen Aktivierung des Nrf2 Signalwegs. Trotz der Fähigkeit eine Nrf2 Kern-Lokalisation auszulösen, gehören Flavonoide wie Luteolin oder Kaempferol, nicht zu den stärksten Antioxidantien im TEAC Assay. Von den untersuchten Flavonoiden waren Quercetin, Kaempferol, Luteolin und Fisetin in der Lage Nrf2 zu aktivieren. Für Apigenin, Galangin und auch Myricetin ergab sich zwar eine nukleäre Akkumulation von Nrf2, diese war jedoch nicht so stark ausgeprägt wie bei den zuvor erwähnten Verbindungen.

In dieser Arbeit ergibt sich kongruent zu den Angaben in der Literatur für die untersuchten Flavonoide eine Reihenfolge für das durch den TEAC Assay bestimmte antioxidative Potential der Art:

Quercetin > Fisetin > Myricetin > Luteolin > Kaempferol > Morin > Apigenin > Chrysin > Galangin

Dabei ist nur Quercetin in der Lage, den Nrf2-ARE Signalweg vollständig zu aktivieren. Die Aktivierung des ARE konnte durch Quercetin, Kaempferol und Fisetin erreicht werden. Die Nrf2 Akkumulation erfolgte durch Quercetin, Kaempferol und Fisetin sowie durch Luteolin und Apigenin, wobei Luteolin und Apigenin eine konzentrationsabhängige Abnahme der Akkumulation zeigten.

Myricetin, welches 3 Hydroxylgruppen an Ring B sowie 2 Hydroxylgruppen an Ring A trägt, zeigte erstaunlicherweise in dieser Arbeit lediglich im TEAC- und im DPPH-Assay antioxidative Eigenschaften. Es konnte nur eine schwache Nrf2 Akkumulation durch Myricetin detektiert werden, die ARE Aktivierung und die HO-1 Induktion konnte durch Myricetin nicht gezeigt werden. Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen

könnte eine mangelnde Inhibition des Proteasoms durch Myricetin sein. Allerdings lässt sich diese Annahme nicht bestätigen, da Myricetin auf Grund der fehlenden ARE-Aktivierung nicht mit Hilfe des Proteasom-Inhibitor Assays untersucht wurde. In Jurkat-Zellen konnte bereits gezeigt werden, dass Quercetin und Apigenin potentere Proteasom-Inhibitoren sind als Myricetin (Chen, Daniel et al., 2005).

In Lungenepithelzellen (A549 Zellen) sorgte die dritte phenolische Gruppe an Ring B für die biologische Inaktivität dieser Verbindung bei der Induktion von Entzündungsmediatoren (Chen, Chow et al., 2004). Des Weiteren besitzen die letztendlich entstandenen Metabolite der Flavonoide unterschiedliche Reaktivitäten, so dass auf diese Weise die Unterschiede in ihren aktivierenden Eigenschaften erklärt werden können. Auch die mangelnde Inaktivierung von Repressoren des Nrf2-ARE Signalwegs, wie Bach 1 könnten eine Ursache für die doch unterschiedlichen Effekte der Flavonoide darstellen. Für eine vollständige Aktivierung des Nrf2-Signalwegs scheinen noch weitere regulatorische Proteine notwendig zu sein.

4.4.1 Regulation des Nrf2 Signalwegs durch Modifikation von Keap I

Für die Aktivierung des redoxsensitiven Nrf2 Signalwegs wurde häufig die Modifikation von Keap I an distinkten Cystein-Resten durch elektrophile Substanzen verantwortlich gemacht (Dinkova-Kostova, Holtzclaw et al., 2002). Keap I dient in erster Linie der Ubiquitinierung und somit auch der schnellen Degradation von Nrf2 (Kaspar, Niture et al., 2009). Es konnte bereits gezeigt werden, dass Keap I unter Stressbedingungen an bestimmten Cystein-Resten modifiziert wird und nicht mehr in der Lage ist, Nrf2 zu ubiquitinieren (Tong, Katoh et al., 2006). In frühen Studien wurde postuliert, dass Nrf2 vollständig von Keap I dissoziieren muss, um in den Kern zu translozieren und die Expression seiner Zielgene zu induzieren (Jaiswal, 2000; Levonen, Landar et al., 2004; Zipper und Mulcahy, 2002). In Veröffentlichungen, welche die Struktur des Inhibitorproteins untersuchten, konnte später festgestellt werden, dass Keap I neben den Bindestellen für Nrf2 *shuttling* Sequenzen besitzt, die einen Export von Nrf2 aus dem Kern bewirken (Itoh, Wakabayashi et al., 2003). Aus diesem Grund wurde angenommen, dass Nrf2 nicht vollständig von Keap I dissoziieren muss, sondern weiterhin gebunden bleibt und nach Beendigung der zellulären Antwort auf einen Stress-Stimulus für den Transport von Nrf2 aus dem Kern sorgt (Velichkova und Hasson, 2005). Andere Gruppen schlugen einen davon abweichenden Mechanismus vor. Es wurde angenommen, dass Keap I in den Kern transloziert und Nrf2 dort

ubiquitiniert und nur unter Stressbedingungen ins Zytosol gelangt (Nguyen, Sherratt et al., 2005). Unter der Annahme, dass Nrf2 an Keap I gebunden bleibt, selbst wenn Keap I oxidiert wird, wäre der Inhibitor gesättigt und neu synthetisiertes Nrf2 wäre dann in der Lage, in den Kern zu translozieren und die Expression zu induzieren (Tong, Kobayashi et al., 2006). Unabhängig von dem genauen Verlauf dieses Mechanismus zeigten verschiedene Untersuchungen den Zusammenhang zwischen bestimmten Strukturmerkmalen der Induktoren dieses Signalwegs und der Nrf2-Stabilisierung durch verminderte Ubiquitinierung durch Keap I (Dinkova-Kostova, Holtzclaw et al., 2002; Satoh, Saitoh et al., 2009). Es konnte gezeigt werden, dass Keap I durch Naturstoffe modifiziert wird, die einen elektrophilen und potentiell prooxidativen Charakter haben (Buckley, Li et al., 2008; Zhang, Lo et al., 2004). Naturstoffe wie, Xanthohumol (Dietz, Kang et al., 2005) und Sulforaphan (Hong, Freeman et al., 2005), zeigten eine oxidierende Wirkung auf die Cystein-Reste des Inhibitorproteins. Auch für den in dieser Arbeit verwendeten Induktor tBHQ wurde eine direkte Interaktion mit Keap I nachgewiesen (Satoh, Saitoh et al., 2009). Die Vermutung liegt nahe, dass auch Flavonoide abhängig von ihrer Fähigkeit, eine Chinonstruktur zu bilden, den Nrf2 Inhibitor oxidieren können. Allerdings konnte mit den in dieser Arbeit angewandten Methoden die direkte Interaktion von Flavonoiden und Keap I nicht nachgewiesen werden. Da jedoch die Flavonoide zu einem unterschiedlichen Ausmaß Nrf2 aktivieren und auch die ARE Aktivierung für die einzelnen Flavonoide unterschiedlich stark ausgeprägt ist, könnte die Fähigkeit, mit Keap I zu interagieren, eine Erklärung für die divergierende Wirkung sein. Die Abbildung 4.2 zeigt eine Übersicht über die potentielle Wirkung der Flavonoide auf den Nrf2-Inhibitor Keap I. Durch die Modifikation der Cystein-Reste an Keap I kommt es zu einer Lockerung der Bindung zwischen Nrf2 und Keap I, so dass Nrf2 nicht weiter ubiquitiniert werden kann. Nrf2 ist dann in der Lage, in den Kern zu translozieren, das ARE zu binden und die Expression antioxidativer und fremdstoffmetabolisierender Enzyme zu induzieren.

Neben der Beeinflussung des Nrf2-Inhibitors Keap I könnte die Beteiligung anderer Signalwege, besonders die Phosphorylierung durch Proteinkinasen, eine Rolle bei der unterschiedlichen Wirkung der Flavonoide spielen.

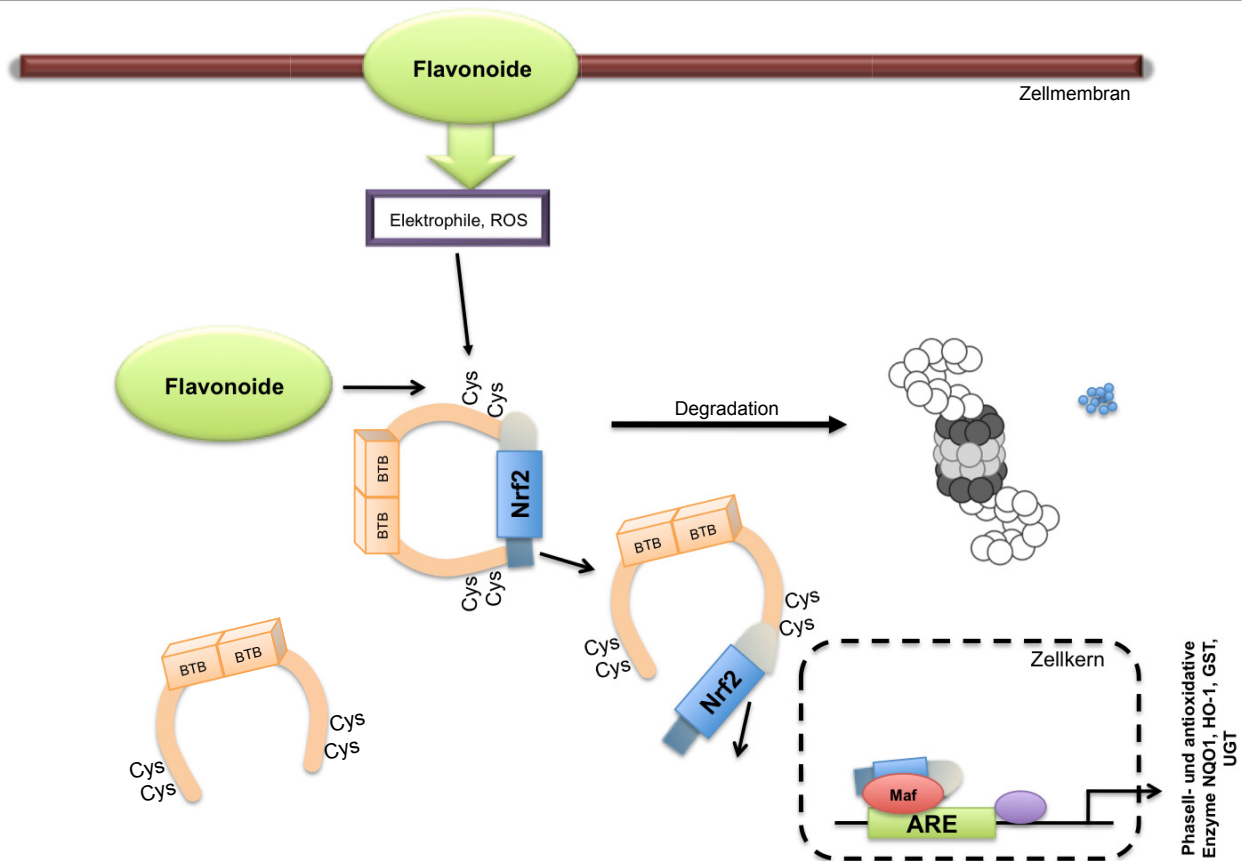


Abbildung 4.2 Aktivierung von Nrf2 durch Keap I Modifikation

Flavonoide reagieren entweder direkt mit Cystein-Resten an Keap I oder reagieren mit ROS, nehmen prooxidativen Charakter an und oxidieren anschließend die Cystein-Reste. Durch die Modifikation löst sich Nrf2 aus der Verankerung an Keap I und ist in der Lage in den Kern zu translozieren, mit weiteren regulatorischen Proteinen an das ARE zu binden und die Expression antioxidativer und fremdstoffmetabolisierender Enzyme zu induzieren.

4.4.2 Regulation des Nrf2-Signalwegs durch Kinasen

Die Aktivierung des Nrf2 Signalwegs wurde in der Literatur häufig auch mit der Phosphorylierung von Nrf2 durch Proteinkinasen in Verbindung gebracht (Zipper und Mulcahy, 2000). Neben den Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK) existieren weitere Berichte über die Phosphorylierung durch die Proteinkinase C (PKC) (Huang, Nguyen et al., 2002) oder durch die Proteinkinase-R ähnliche Kinase des endoplasmatischen Retikulums (PERK) (Cullinan, Zhang et al., 2003). Des Weiteren konnte die Beteiligung der Phosphoinositid-3-Kinasen (PI3Ks) bei der Nrf2 vermittelten Stressantwort nachgewiesen werden (Kocanova, Buytaert et al., 2007).

Abhängig von dem Zelltypus und der Struktur des Induktors, konnte gezeigt werden, dass diese Kinase Kaskaden einen Einfluss auf die Aktivierung dieses Signalwegs besitzen (Andreadi, Howells et al., 2006). Flavonoide können auf verschiedene Komponenten dieser Signalwege direkt oder durch die Modulation des Redoxstatus einwirken (Williams, Spencer et al., 2004).

Allerdings konnte durch die Behandlung mit Flavonoiden auch eine Aktivierung der p38 Kinase gezeigt werden.

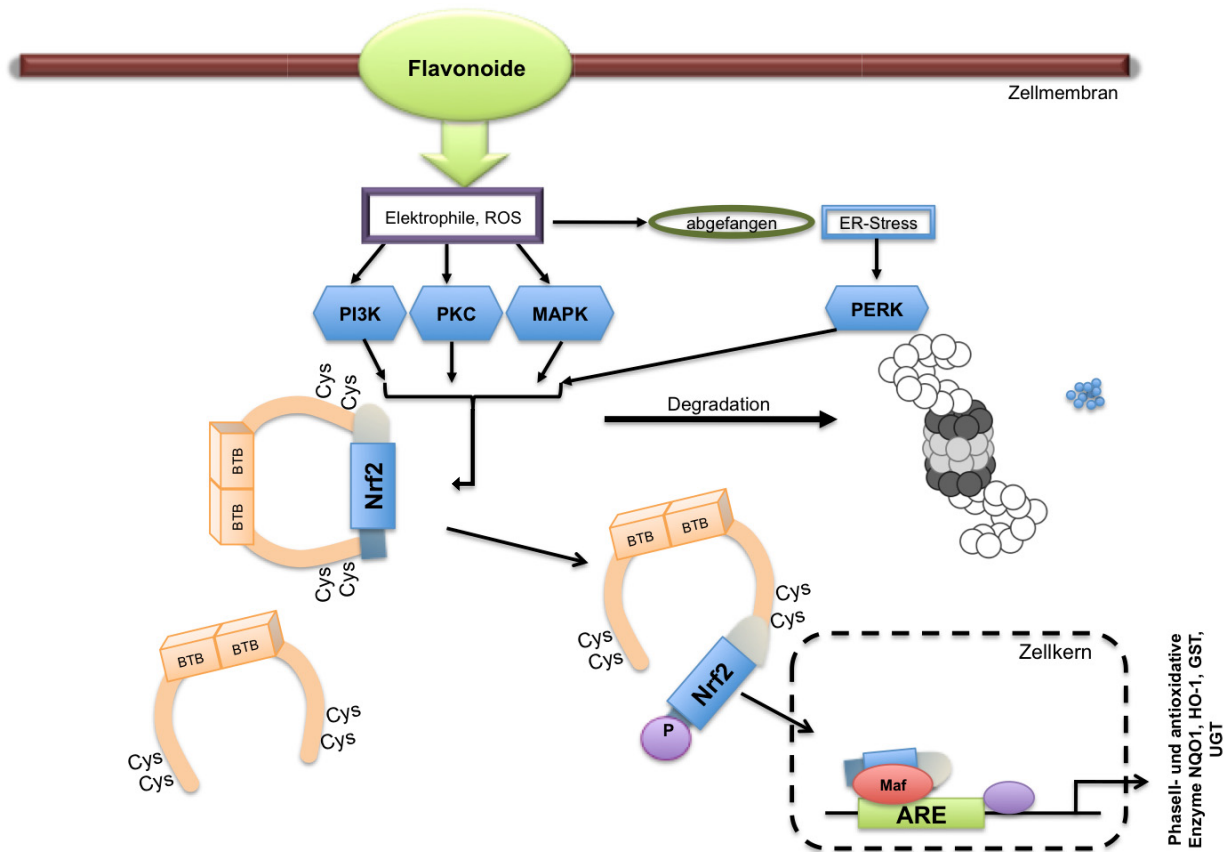


Abbildung 4.3 Aktivierung über Kinase Kaskaden

Das an Keap I gebundene Nrf2 wird durch Kinasen phosphoryliert. Durch die Phosphorylierung wird der Komplex zwischen Nrf2 und Keap I gestört und Nrf2 kann in den Kern translozieren, mit anderen regulatorischen Proteinen an das ARE binden und die Expression von antioxidativen und fremdstoffmetabolisierenden Enzymen induzieren.

Verschiedene Untersuchungen konnten die Induktion der HO-1 mit einer Aktivierung der p38 in renalen Epithelzellen (Balogun, Hoque et al., 2003) oder in primären Rattenhepatozyten (Kietzmann, Samoylenko et al., 2003) zeigen.

Wie auch die Kinase p38 wird die JNK durch Flavonoide in vielen Fällen inhibiert (Kimata, Shichijo et al., 2000). Quercetin wie auch Epigallocatechin-Gallat vermitteln einen Schutz vor ROS in humanen epithelialen Zellen durch die Inhibition der Phosphorylierung der JNK (Choi, Jeong et al., 2005). Da nicht nur übergeordnete MAPKKinasen einer Kinase-Kaskade die ausführende Kinase aktivieren, sondern auch ausführende Kinasen anderer Kaskaden diese aktivieren können, kann es bei der Modulation eines Signalweges durch einen Stimulus auch zu Quervernetzungen kommen. So wird JNK durch ERK aktiviert, wenn der ERK Signalweg durch einen Endothelzellen-Wachstumsfaktor wie VEGF initiiert wird. Die Aktivierung ist also auch in diesem Signalweg von der Art des Stimulus abhängig (Zhang und Liu, 2002). Eine solche Quervernetzung ist auch bei der Aktivierung durch Flavonoide denkbar.

Der PI3K-Signalweg scheint ebenso wie die MAPKinasen eine Rolle bei der Regulation des Nrf2 Signalwegs zu spielen. In Neuroblastomzellen konnte Nrf2 PI3K-vermittelt aktiviert werden (Nakaso, Yano et al., 2003). Die Wirkung von polyphenolischen Verbindungen zeigte in unterschiedlichen Zelllinien keine Beteiligung der PI3K (Andreadi, Howells et al., 2006).

Abschließend soll an dieser Stelle noch die Phosphorylierung durch die PERK, einer Proteinkinase, welche im endoplasmatischen Retikulum lokalisiert ist, genannt werden. Die PERK-vermittelte Phosphorylierung von Nrf2 ist in verschiedenen Zelltypen, wie Endothelzellen (Kim, Pae et al., 2007) oder embryonalen Mausfibroblasten (Cullinan, Zhang et al., 2003) gezeigt worden.

Die Aktivierung von Nrf2 kann also in einigen Fällen mit einer Phosphorylierung durch Proteinkinasen korreliert werden. In diesen Untersuchungen konnte jedoch eine Stabilisierung von Nrf2 durch die Modifikation von Keap I nicht ausgeschlossen werden. Die mögliche Aktivierung von Nrf2 ist in Abbildung 4.3 gezeigt. Nrf2 kann durch unterschiedliche Kinasen phosphoryliert werden. Die Phosphorylierung hat wiederum die Stabilisierung von Nrf2 durch die fehlende Keap I vermittelte Ubiquitinierung zur Folge. Nrf2 akkumuliert im Kern und bindet das ARE um die Expression antioxidativer und fremdstoffmetabolisierender Enzyme zu induzieren.

Die Gewichtung der beiden beschriebenen Aktivierungsmechanismen ist Bestandteil einiger Untersuchungen und wird kontrovers diskutiert (Niture, Jain et al., 2009). Es ist davon auszugehen, dass eine Phosphorylierung von Nrf2 durch Proteinkinasen nicht ausreichend ist, um diesen Transkriptionsfaktor zu aktivieren. Vielmehr scheint ein Zusammenwirken mehrerer Mechanismen für die endgültige Aktivierung nötig zu sein. Im Gegensatz zu Quercetin konnte für Kaempferol in Hct 116 Zellen keine Induktion der HO-1 beobachtet werden. Auch die Akkumulation von Nrf2 im Nukleus wurde nur zu einem reduzierten Maße festgestellt. Hong et al. (2009) zeigten jedoch eine Induktion der HO-1 durch Kaempferol in PC12 Zellen, welche mit der Aktivierung des ERK und p38 Signalwegs korreliert war. Ob ein Flavonoid die Induktion antioxidativer Enzyme über das ARE aktivieren und speziell die Induktion der HO-1 auslösen kann, hängt neben den strukturellen Gegebenheiten des Flavonoids auch von den untersuchten Zellen ab. In embryonalen Mausfibroblasten konnten weder Quercetin noch Apigenin die HO-1 induzieren (Abate, Yang et al., 2005), vielmehr reduzierte Apigenin die HO-1 Expression. In Hct 116 Zellen reduzierte Apigenin im Einklang zu diesen Ergebnissen die Nrf2 Akkumulation.

Die Beteiligung von Signalwegen, die nicht mit einer direkten Reaktion von elektrophiler Verbindung mit dem Aktivator oder Repressor des Signalwegs verbunden ist, scheint jedoch zu der Induktion antioxidativer Enzyme, wie der HO-1, beizutragen. Nicht nur die Zugänglichkeit von Keap I könnte ein Wirkmechanismus sein, auch die Inhibierung von Repressoren der Zielgen-Expression durch regulatorische Proteine oder die Beteiligung anderer Proteine bei der Induktion der Transkription sind mögliche Ursachen für die mangelnde Induktion der HO-1 in dieser Arbeit.

4.5 Wirkung von Flavonoiden als Nahrungsergänzungsmittel

Die Ergebnisse dieser Dissertation zeigen eine deutliche Wirkung von Flavonoiden auf die intrazelluläre Signaltransduktion. Abhängig von den strukturellen Voraussetzungen der Flavonoide sowie von ihrer Konzentration können sie durch die Aktivierung des Nrf2-ARE Signalwegs protektive Effekte vermitteln. Im Fall von Apigenin allerdings zeigte sich eine Reduktion des Signalwegs, so dass in diesem Fall von adversen Effekten gesprochen werden kann. Im Folgenden sollen deshalb die Wirkungen von Flavonoiden in Abhängigkeit von der Konzentration und unter der Berücksichtigung der in der Literatur aufgezeigten Plasmakonzentrationen betrachtet werden.

Die tägliche Aufnahme von Flavonoiden mit der Nahrung variiert stark und ist im hohen Maße von der Metabolisierung abhängig. Auf Grund der unterschiedlichen und mitunter schwierigen Detektion einzelner Flavonoide finden sich Aufnahmemengen, die zwischen ca. 1g (Kühnau, 1976) und 16mg/d (Hertog, Hollman et al., 1993) liegen, je nachdem, ob die Aufnahmemengen sich auf einzelne Flavonoide oder auf die Polyphenolgesamtaufnahme beziehen. Dazu sind die Aufnahmemengen von der Art der Ernährung abhängig. Da der Trend sich zu einer gesünderen, vitaminreicheren Ernährung verlagert und auch Präparate zur Nahrungsergänzung vermehrt eingesetzt werden, muss man von höheren täglichen Polyphenoldosen ausgegangen werden. Die durch die gezielte Dosierung in klinischen Studien erreichten Plasmakonzentrationen variieren zwischen 5 µM nach Gabe von 150 mg Quercetin-3-glykosid (Olthof, Hollman et al., 2001) und 7,65 µM nach 100 mg Quercetin (Graefe et al., 2001). Quercetin wird durch den Verzehr von Zwiebeln, Äpfeln und Tee, in welchen Quercetin in höheren Konzentrationen vorhanden ist, aufgenommen. Nach den hier aufgeführten Daten über die aufgenommene Konzentration von Quercetin, werden 7mg Quercetin pro 20g Zwiebeln aufgenommen. Wird die Dosis durch Nahrungsergänzungsmittel erhöht und wird eine Dosis von etwa 1-2g aufgenommen, was einer Plasmakonzentration von 10-50 µM entspricht, wird schon ein Bereich erreicht, der eine Wirkung auf zelluläre

Signale ausübt. Im Fall von Quercetin kann nach den hier vorgestellten Ergebnissen von einer protektiven Wirkung ausgegangen werden, da Quercetin in der Lage war, die Nrf2-vermittelte Expression der HO-1 zu induzieren. Andere Flavonoide jedoch bewirken unter Umständen eine Reduktion zytoprotektiver Proteine. Apigenin zeigte hier eine reprimierende Wirkung auf die Expression der HO-1. Auch in der Literatur sind ähnlich Wirkungen beschrieben worden (Abate, Yang et al., 2005). Für Kaempferol konnten modulatorische Effekte auf Signalwege sowohl in Zellkultursystemen (Chen, Chow et al., 2004; Leung, Po et al., 2004; Puppala, Gairola et al., 2007), in zum Teil geringen Konzentrationen von 10 μ M, als auch in Modellorganismen wie *C.elegans* (Kampkötter, Gombitang Nkwonkam et al., 2007) nachgewiesen werden. Fisetin zeigt im *in vitro*-System in geringen Konzentrationen protektive Effekte in Ratten-Hepatom Zellen (Wätjen, Michels et al., 2005). Auch in Konzentrationen von bis zu 30 μ M kann Fisetin die Signaltransduktion in Mastzellen beeinflussen (Park, Lee et al., 2007).

Allerdings sind für die in dieser Arbeit unwirksamen Flavonoide Galangin, Myricetin, Morin und Chrysin Wirkungen auf intrazelluläre Signalwege gefunden worden (Lee, Kang et al., 2007; Tolomeo, Grimaudo et al., 2008; Weng, Ho et al., 2005; Zhang, Kang et al., 2009). Die Wirkungen von Flavonoiden sind vielfältig und können in verschiedenen Zelltypen durchaus auch unterschiedliche Effekte ausüben.

4.6 Ausblick

Auf Grund der in dieser Dissertation erzielten Ergebnisse ergeben sich mehrere Komponenten, welche weiter bearbeitet werden können. Da die nukleäre Akkumulation von Nrf2 durch verschiedene Flavonoide gezeigt werden konnte und auch die Nrf2-vermittelte Aktivierung des ARE durch Flavonoide dargestellt werden konnte, wären diese Endpunkte gut dazu geeignet Naturstoffe auf ihre Signalweg-modulierenden Eigenschaften zu testen. Allerdings konnte die Induktion von Nrf2 Zielgenen nicht durch alle Nrf2-aktivierenden Verbindungen gezeigt werden. Um den Wirkmechanismus von Naturstoffen vollständig nachzuvollziehen, ist es notwendig alle an der Induktion beteiligten Komponenten zu untersuchen. So sollte die Beteiligung von anderen Signalwegen entweder nachgewiesen oder ausgeschlossen werden. Eine Analyse von MAPKinase Kaskaden könnte die Beteiligung bei der Aktivierung anzeigen. Es ist allerdings auch möglich, dass auf Grund der Beteiligung von Proteinkinasen an vielen Zellfunktionen eine Aktivierung detektiert wird, die durch einen anderen Stimulus ausgelöst wurde.

Ein weiterer Endpunkt, der einen Aufschluss über die Wirkung des Nrf2-Signalwegs geben könnte ist die Untersuchung der direkten Modifikation von Keap I durch die zu untersuchenden Stoffe. Nicht nur die direkte Interaktion sollte untersucht werden, auch die Detektion von ubiquitiniertem Nrf2 oder die Bestimmung der Cul3-Ligase Aktivität könnten mögliche Endpunkte darstellen.

Des Weiteren sollte die Inhibierung anderer Aktivitäten des Proteasoms ausgeschlossen werden. Die vorgelegten Ergebnisse zeigen nur die Bestimmung der Chymotrypsinaktivität des Proteasoms. Die Beteiligung der Trypsinaktivität sowie der Caspaseaktivität des Proteasoms sollte bestimmt werden.

Eine weitere Möglichkeit die Keap I Abhängigkeit der Nrf2-Aktivierung zu zeigen wäre der Einsatz von Inhibitoren einzelner Proteinkinasen.

Um weitere Proteine mit der Nrf2 Aktivierung in Verbindung zu bringen, könnte mittels des Electro Mobility Shift Assay (EMSA) die Bindung regulatorischer Proteine wie Bach 1 oder Maf-Proteinen detektiert werden. Um die Menge an regulatorischen Proteinen zu detektieren, könnte die transkriptionelle Expression mit semiquantitativer RT-PCR oder *real-time* PCR nach der Inkubation mit der zu untersuchenden Verbindung bestimmt werden.

Zur Abschätzung der Wirkung einer Substanz sollte der genaue Wirkmechanismus speziell in metabolisch stark aktiven Zellen, wie Hepatomzellen oder in Darmzellen als Modell des *first site of contact* untersucht werden.

4.7 Zusammenfassung

Auf Grund der in epidemiologischen Studien postulierten gesundheitsförderlichen Eigenschaften sind Flavonoide auch in konzentrierter Form als Nahrungsergänzungsmittel erhältlich. Als Nahrungsergänzungsmittel bedürfen sie jedoch keiner Zulassung mit entsprechenden toxikologischen Prüfungen, sondern lediglich einer Anmeldung. Für eine toxikologische Bewertung von Flavonoiden ist die Identifizierung ihrer zellulären und molekularen Wirkmechanismen essentiell.

In dieser Arbeit wurden 9 strukturverwandte Flavonoide untersucht. Da der Darm ein erstes Zielorgan der Flavonoide darstellt, wurde die Toxizität der verwendeten Flavonoide vergleichend in Hct 116 und Caco2 Kolon-Karzinomzelllinien bis zu einer Konzentration von 100 μ M untersucht. In Hct 116 Zellen konnte für 90 μ M Galangin, 25 μ M Apigenin und 25 μ M Chrysin nach 24h Inkubation ein EC₅₀ Wert abgeleitet werden.

In Caco2 Zellen konnte lediglich für 50 μM Galangin nach 24h Inkubation ein EC_{50} Wert bestimmt werden. Somit zeigen die untersuchten Flavonoide eine geringe Zytotoxizität gegenüber den eingesetzten Darmzelllinien. Zur Ermittlung der antioxidativen Kapazität wurden die Flavonoide sowohl zellfrei (TEAC) als auch im Zellkultursystem (DCF) untersucht. Im TEAC-Assay zeigten die Flavonoide bis auf Galangin, Apigenin und ein relativ hohes Reduktionspotential. Im zellbasierten DCF-Assay bestätigten sich im Wesentlichen die Ergebnisse des TEAC-Assays.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden molekulare Wirkungen der verwendeten Substanzen auf den redox-sensitiven Nrf2-Signalweg untersucht. Der Transkriptionsfaktor Nrf2 reguliert über die Bindung an eine Konsensus-Sequenz, das *antioxidant responsive element* (ARE), die Expression antioxidativer und fremdstoff-metabolisierender Enzyme und vermittelt so einen Schutz gegenüber zellulärem Stress. Als bekannter Aktivator des Nrf2-Signalwegs führte sowohl die Inkubation mit tBHQ als auch die Inkubation mit Quercetin und Fisetin zu einer Translokation und nukleären Akkumulation von Nrf2. Mit tBHQ konnte bereits mit einer Konzentration von 50 μM und nach 30 min eine deutliche Anreicherung von Nrf2 im Kern gezeigt werden. Quercetin zeigte nach 4h eine nukleäre Lokalisation von Nrf2 in einer Konzentration von 25 μM . Fisetin bewirkte in niedrigeren Konzentrationen (5 μM) nach 4h eine Kern-Akkumulation und auch die Inkubation mit 50 μM Kaempferol führte nach 4h zu einer 5-fachen Nrf2-Kernakkumulation. Die nukleäre Nrf2-Akkumulation durch Quercetin, Kaempferol und Fisetin konnte mikroskopisch durch den Einsatz eines Nrf2-GFP-Fusionsprotein-Konstrukts bestätigt werden. Mit Hilfe eines ARE-Luziferase-Reportergen-Konstrukts wurde überprüft, ob die nukleäre Akkumulation von Nrf2 mit einer Aktivierung des ARE einhergeht. Die Inkubation von Hct 116 Zellen mit 50 μM tBHQ führte zu einer 7-fachen Zunahme der ARE-abhängigen Luziferase Aktivität. 50 μM Quercetin bewirkten eine zu tBHQ vergleichbare Aktivitätszunahme, für 50 μM Fisetin konnte eine 3,4-fache Induktion und für 50 μM Kaempferol eine 5-fache Induktion der ARE-abhängigen Luziferase Aktivität gemessen werden.

In einem weiteren experimentellen Ansatz wurde die Expression des Nrf2-abhängigen Gens Hämoxxygenase 1 (HO-1) untersucht. tBHQ bewirkte eine 4-fache Induktion des HO-1 Transkripts, wohingegen Quercetin die HO-1 nur leicht induzierte und die anderen Flavonoide die HO-1 Expression nicht induzieren konnten. Dies deutet darauf hin, dass die nukleäre Akkumulation von Nrf2 nach Flavonoidinkubation ausreichend ist für die signifikante Transaktivierung am ARE-Element, jedoch sind vermutlich an der Regulation der HO-1 Expression weitere regulatorische Proteine beteiligt. Nach einem

der aktuell diskutierten Modelle der Nrf2 Regulation wird an seinen Inhibitor (Keap1) gebundenes zytosolisches Nrf2 ständig über das Proteasom degradiert und muss konstitutiv neu synthetisiert werden. Dieses Modell wird durch die Ergebnisse gestützt. Zum Einen erfolgt die nukleäre Nrf2-Akkumulation nach Inkubation mit tBHQ innerhalb weniger Minuten, zum Anderen wurde die Nrf2 Expression des Transkriptionsfaktors auf mRNA Ebene nicht durch tBHQ verändert. Ein weiterer Hinweis, welcher für dieses Modell spricht, ist die Tatsache, dass Nrf2 nur nach vorheriger Hemmung der proteosomalen Degradation mit MG132 in der zytosolischen Proteinfraction detektiert werden konnte. Obwohl einige der untersuchten Flavonoide zu einer nukleären Akkumulation von Nrf2 führten, wirken sie nicht über Hemmung der Chymotrypsinaktivität des Proteasoms. Zusammengefasst zeigen die vorgestellten Ergebnisse, dass Flavonoide in der Lage sind, den redox-sensitiven Nrf2-Signalweg zu beeinflussen und somit die zelluläre Stressantwort zu verändern, was für eine abschließende toxikologische Beurteilung dieser Substanzen von Bedeutung ist.

4.8 Summary

Because of their beneficial effects on health shown by several epidemiologic studies flavonoids are offered as high-dosed dietary supplements. These dietary supplements do not need any approval or authorization. To be distributed supplements require only a registration. For toxicological risk assessment the estimation of their cellular and molecular effects is essential. Here we characterized the antioxidative capacity of nine structurally related flavonoids. Because colon cells are one of the first sites of contact for the flavonoids the toxicity of the tested flavonoids was assessed in a concentration up to 100 μM , in two colon carcinoma cell-lines, Hct 116 and Caco 2. Hct 116 revealed EC_{50} values for 90 μM galangin, 25 μM apigenin and 25 μM chrysin after 24h incubation. In Caco 2 cells only for 50 μM galangin an EC_{50} value could be detected. These results show a low flavonoid-mediated cytotoxicity in these two particular cell-lines. Further the antioxidative capacity of the flavonoids was measured using a cell-free system (TEAC) and a test assay based on colon carcinoma cells (DCF). In the TEAC-assay a relatively high reduction potential could be detected for all flavonoids but galangin, apigenin and chrysin and were in general confirmed by the results from the DCF-assay.

In the second part of this work the molecular effects of the used substances on the Nrf2 signaling pathway were analysed. The transcription factor Nrf2 regulates the cellular stress response by binding a consensus sequence called ARE, which is responsible for

the induction of antioxidative and phase II drug metabolising enzymes and thereby modifying the cellular stress response. Tertiary butylhydroquinone (tBHQ) as an established inductor elicited as well as quercetin, kaempferol and fisetin a translocation and nuclear accumulation of Nrf2. In immunoblot analyses tBHQ showed a strong accumulation of Nrf2 in the nucleus at a concentration of 50 μ M and within 30 min. 25 μ M quercetin showed similar results within 4h. Kaempferol mediated a 5-fold induction of nuclear Nrf2-accumulation and Fisetin induced this accumulation already in a concentration of 5 μ M within 4h either. The immunoblot results were further confirmed by using a Nrf2-GFP-fusion-construct.

Analysis of the transactivation activity of Nrf2 was performed using an ARE-luciferase-plasmid. Incubation of colon cells with 50 μ M tBHQ resulted in a 7-fold induction of ARE-dependent luciferase activity. Comparable to tBHQ 50 μ M quercetin showed a 6,5-fold activation and fisetin was able to activate the ARE dependent luciferase activity up to 3,4-fold. Further kaempferol was able to activate the luciferase activity up to 5-fold. In a second experimental approach the expression of the Nrf2-target gene heme oxygenase 1 (HO-1) was determined by RT-PCR. tBHQ was able to induce HO-1 expression up to 3,7-fold, whereas quercetin showed only a marginal induction. The other flavonoids had no effect on HO-1 induction. These results implicate that nuclear accumulation of Nrf2 after flavonoid treatment is sufficient for binding and transactivation of an artificial ARE-consensus element but needs further components for efficient induction of endogenous target genes like HO-1. In one of the currently discussed models of Nrf2 regulation, Nrf2 bound to its inhibitor is rapidly degraded by the proteasome and therefore needs to be synthesized constitutively. Our results are in line with this model of a rapid Nrf2 turnover, as shown by the very fast nuclear Nrf2 accumulation after incubation with tBHQ and the absence of transcriptional regulation of Nrf2 by tBHQ. The detection of cytosolic Nrf2 only after inhibiting proteasomal activity by the proteasome inhibitor MG132 was in accordance with the mentioned model. Although some of the flavonoids lead to a nuclear Nrf2 enrichment this accumulation was not due to their ability to inhibit proteasomal chymotrypsin-like activity.

Summarised, the results of this work showed, that flavonoids are able to modulate the redox-sensitive Nrf2 signaling pathway and can alter the cellular stress response. These findings on their molecular effects is an important step in toxicological risk assessment of flavonoids used as dietary supplements.

5. Literatur

- Abate, A., Yang, G., Wong, R. J., Schroder, H., Stevenson, D. K. und Dennerly, P. A. (2005). "Apigenin decreases hemin-mediated heme oxygenase-1 induction." Free Radic Biol Med 39(6): 711-8.
- Ahn, J., Lee, H., Kim, S., Park, J. und Ha, T. (2008). "The anti-obesity effect of quercetin is mediated by the ampk and mapk signaling pathways." Biochem Biophys Res Commun 373(4): 545-9.
- Alam, J. (1994). "Multiple elements within the 5' distal enhancer of the mouse heme oxygenase-1 gene mediate induction by heavy metals." J Biol Chem 269(40): 25049-56.
- Alam, J., J. Cai et al. (1994). "Isolation and characterization of the mouse heme oxygenase-1 gene. Distal 5' sequences are required for induction by heme or heavy metals." J Biol Chem 269(2): 1001-9.
- Alam, J. (2000). "Mechanism of heme oxygenase-1 gene activation by cadmium in mcf-7 mammary epithelial cells. Role of p38 kinase and nrf2 transcription factor." Journal of Biological Chemistry: 9.
- Alam, J., Killeen, E., Gong, P., Naquin, R., Hu, B., Stewart, D., Ingelfinger, J. R. und Nath, K. A. (2003). "Heme activates the heme oxygenase-1 gene in renal epithelial cells by stabilizing nrf2." Am J Physiol Renal Physiol 284(4): F743-52.
- Allen, R. G. und Tresini, M. (2000). "Oxidative stress and gene regulation." Free Radic Biol Med 28(3): 463-99.
- Amakura, Y., Tsutsumi, T., Sasaki, K., Nakamura, M., Yoshida, T. und Maitani, T. (2008). "Influence of food polyphenols on aryl hydrocarbon receptor-signaling pathway estimated by in vitro bioassay." Phytochemistry 69(18): 3117-30.
- Andreadi, C. K., Howells, L. M., Atherfold, P. A. und Manson, M. M. (2006). "Involvement of nrf2, p38, b-raf, and nuclear factor-kappa b, but not phosphatidylinositol 3-kinase, in induction of hemeoxygenase-1 by dietary polyphenols." Mol Pharmacol 69(3): 1033-40.
- Apopa, P. L., He, X. und Ma, Q. (2008). "Phosphorylation of nrf2 in the transcription activation domain by casein kinase 2 (ck2) is critical for the nuclear translocation and transcription activation function of nrf2 in imr-32 neuroblastoma cells." J Biochem Mol Toxicol 22(1): 63-76.
- Arora, A., Nair, M. G. und Strasburg, G. M. (1998). "Structure-activity relationships for antioxidant activities of a series of flavonoids in a liposomal system." Free Radic Biol Med 24(9): 1355-63.
- Arts, I. C. W. und Hollman, P. C. H. (2005). "Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies." Am J Clin Nutr 81(1 Suppl): 317S-325S.
- Balogun, E., Hoque, M., Gong, P., Killeen, E., Green, C. J., Foresti, R., Alam, J. und Motterlini, R. (2003). "Curcumin activates the haem oxygenase-1 gene via regulation of nrf2 and the antioxidant-responsive element." Biochem J 371(Pt 3): 887-95.
- Bestwick, C. S. und L. Milne (2001). "Quercetin modifies reactive oxygen levels but exerts only partial protection against oxidative stress within HL-60 cells." Biochim Biophys Acta 1528(1): 49-59
- Bloom, D. A. und Jaiswal, A. K. (2003). "Phosphorylation of nrf2 at ser40 by protein kinase c in response to antioxidants leads to the release of nrf2 from inrf2, but is not required for nrf2 stabilization/accumulation in the nucleus and transcriptional activation of antioxidant response element-mediated nad(p)h:Quinone oxidoreductase-1 gene expression." J Biol Chem 278(45): 44675-82.
- Bondy, S. C. und Naderi, S. (1994). "The formation of reactive oxygen species in a fraction of rat brain by metabolism of nitric oxide." Neurosci Lett 168(1-2): 34-6.
- Bors, W. und Michel, C. (2002). "Chemistry of the antioxidant effect of polyphenols." Ann N Y Acad Sci 957: 57-69.
- Brand, W., Padilla, B., van Bladeren, P. J., Williamson, G. und Rietjens, I. M. (2010). "The effect of co-administered flavonoids on the metabolism of hesperetin and the disposition of its metabolites in caco-2 cell monolayers." Mol Nutr Food Res.

- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E. und Berset, C. (1995). "Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity." Lebensm. Wiss. Technol. 28(1): 25-30.
- Buckley, B. J., Li, S. und Whorton, A. R. (2008). "Keap1 modification and nuclear accumulation in response to s-nitrosocysteine." Free Radic Biol Med 44(4): 692-8.
- Buckley, B. J., Marshall, Z. M. und Whorton, A. R. (2003). "Nitric oxide stimulates nrf2 nuclear translocation in vascular endothelium." Biochem Biophys Res Commun 307(4): 973-9.
- Burdo, J., Schubert, D. und Maher, P. (2008). "Glutathione production is regulated via distinct pathways in stressed and non-stressed cortical neurons." Brain Res 1189: 12-22.
- Burkhardt, S., Reiter, R. J., Tan, D. X., Hardeland, R., Cabrera, J. und Karbownik, M. (2001). "DNA oxidatively damaged by chromium(iii) and h(2)o(2) is protected by the antioxidants melatonin, n(1)-acetyl-n(2)-formyl-5-methoxykynuramine, resveratrol and uric acid." Int J Biochem Cell Biol 33(8): 775-83.
- Burow, S. und Valet, G. (1987). "Flow-cytometric characterization of stimulation, free radical formation, peroxidase activity and phagocytosis of human granulocytes with 2,7-dichlorofluorescein (dcf)." Eur J Cell Biol 43(1): 128-33.
- Cali, J. J., Niles, A., Valley, M. P., O'Brien, M. A., Riss, T. L. und Shultz, J. (2008). "Bioluminescent assays for admet." Expert Opin Drug Metab Toxicol 4(1): 103-20.
- Camhi, S. L., Alam, J., Wiegand, G. W., Chin, B. Y. und Choi, A. M. (1998). "Transcriptional activation of the ho-1 gene by lipopolysaccharide is mediated by 5' distal enhancers: Role of reactive oxygen intermediates and ap-1." Am J Respir Cell Mol Biol 18(2): 226-34.
- Chan, J. Y., Cheung, M. C., Moi, P., Chan, K. und Kan, Y. W. (1995). "Chromosomal localization of the human nf-e2 family of bzip transcription factors by fluorescence in situ hybridization." Hum Genet 95(3): 265-9.
- Chanas, S. A., Jiang, Q., McMahon, M., McWalter, G. K., McLellan, L. I., Elcombe, C. R., Henderson, C. J., Wolf, C. R., Moffat, G. J., Itoh, K., Yamamoto, M. und Hayes, J. D. (2002). "Loss of the nrf2 transcription factor causes a marked reduction in constitutive and inducible expression of the glutathione s-transferase gsta1, gsta2, gstm1, gstm2, gstm3 and gstm4 genes in the livers of male and female mice." Biochem J 365(Pt 2): 405-16.
- Chen, C. C., Chow, M. P., Huang, W. C., Lin, Y. C. und Chang, Y. J. (2004). "Flavonoids inhibit tumor necrosis factor-alpha-induced up-regulation of intercellular adhesion molecule-1 (icam-1) in respiratory epithelial cells through activator protein-1 and nuclear factor-kappab: Structure-activity relationships." Mol Pharmacol 66(3): 683-93.
- Chen, D., Daniel, K. G., Chen, M. S., Kuhn, D. J., Landis-Piowowar, K. R. und Dou, Q. P. (2005). "Dietary flavonoids as proteasome inhibitors and apoptosis inducers in human leukemia cells." Biochem Pharmacol 69(10): 1421-32.
- Chen, J. und Regan, R. F. (2004). "Heme oxygenase-2 gene deletion increases astrocyte vulnerability to hemin." Biochem Biophys Res Commun 318(1): 88-94.
- Chen, T. J., Jeng, J. Y., Lin, C. W., Wu, C. Y. und Chen, Y. C. (2006). "Quercetin inhibition of ros-dependent and -independent apoptosis in rat glioma c6 cells." Toxicology 223(1-2): 113-26.
- Cheng, H. Y., Hsieh, M. T., Tsai, F. S., Wu, C. R., Chiu, C. S., Lee, M. M., Xu, H. X., Zhao, Z. Z. und Peng, W. H. (2009). "Neuroprotective effect of luteolin on amyloid beta protein (25-35)-induced toxicity in cultured rat cortical neurons." Phytother Res.
- Choi, Y.-J., Jeong, Y.-J., Lee, Y.-J., Kwon, H.-M. und Kang, Y.-H. (2005). "(-)-epigallocatechin gallate and quercetin enhance survival signaling in response to oxidant-induced human endothelial apoptosis." J Nutr 135(4): 707-13.
- Chomczynski, P. und Sacchi, N. (1987). "Single-step method of rna isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction." Anal Biochem 162(1): 156-9.
- Chowdhury, K. (1991). "One step 'miniprep' method for the isolation of plasmid DNA." Nucleic Acids Res 19(10): 2792.
- Ciolino, H. P., Daschner, P. J. und Yeh, G. C. (1999). "Dietary flavonols quercetin and kaempferol are ligands of the aryl hydrocarbon receptor that affect cyp1a1 transcription differentially." Biochem J 340 (Pt 3): 715-22.

- Cooper, K. L., Liu, K. J. und Hudson, L. G. (2007). "Contributions of reactive oxygen species and mitogen-activated protein kinase signaling in arsenite-stimulated hemeoxygenase-1 production." Toxicol Appl Pharmacol 218(2): 119-27.
- Copple, I. M., Goldring, C. E., Kitteringham, N. R. und Park, B. K. (2008). "The nrf2-keap1 defence pathway: Role in protection against drug-induced toxicity." Toxicology 246(1): 24-33.
- Crozier, A., Jaganath, I. B. und Clifford, M. N. (2009). "Dietary phenolics: Chemistry, bioavailability and effects on health." Natural product reports 26(8): 1001-43.
- Cullinan, S. B. und Diehl, J. A. (2006). "Coordination of er and oxidative stress signaling: The perk/nrf2 signaling pathway." Int J Biochem Cell Biol 38(3): 317-32.
- Cullinan, S. B., Zhang, D., Hannink, M., Arvisais, E., Kaufman, R. J. und Diehl, J. A. (2003). "Nrf2 is a direct perk substrate and effector of perk-dependent cell survival." Mol Cell Biol 23(20): 7198-209.
- Davies, K. J. (1995). "Oxidative stress: The paradox of aerobic life." Biochem Soc Symp 61: 1-31.
- Dewa, Y., Nishimura, J., Muguruma, M., Jin, M., Saegusa, Y., Okamura, T., Tasaki, M., Umemura, T. und Mitsumori, K. (2008). "Beta-naphthoflavone enhances oxidative stress responses and the induction of preneoplastic lesions in a diethylnitrosamine-initiated hepatocarcinogenesis model in partially hepatectomized rats." Toxicology 244(2-3): 179-89.
- Dietz, B. M., Kang, Y.-H., Liu, G., Egger, A. L., Yao, P., Chadwick, L. R., Pauli, G. F., Farnsworth, N. R., Mesecar, A. D., van Breemen, R. B. und Bolton, J. L. (2005). "Xanthohumol isolated from humulus lupulus inhibits menadione-induced DNA damage through induction of quinone reductase." Chem Res Toxicol 18(8): 1296-305.
- Dinkova-Kostova, A. T., Holtzclaw, W. D., Cole, R. N., Itoh, K., Wakabayashi, N., Katoh, Y., Yamamoto, M. und Talalay, P. (2002). "Direct evidence that sulfhydryl groups of keap1 are the sensors regulating induction of phase 2 enzymes that protect against carcinogens and oxidants." Proc Natl Acad Sci USA 99(18): 11908-13.
- Dizdaroglu, M. (1992). "Oxidative damage to DNA in mammalian chromatin." Mutat Res 275 (3-6): 331-42.
- Dreger, H., Westphal, K., Weller, A., Baumann, G., Stangl, V., Meiners, S. und Stangl, K. (2009). "Nrf2-dependent upregulation of antioxidative enzymes - a novel pathway for proteasome inhibitor-mediated cardioprotection." Cardiovasc Res.
- Egger, A., Small, E., Hannink, M. und Mesecar, A. (2009). "Cul3-mediated nrf2 ubiquitination and are activation are dependent on the partial molar volume at position 151 of keap1." Biochem J.
- Egger, A. L., Liu, G., Pezzuto, J. M., van Breemen, R. B. und Mesecar, A. D. (2005). "Modifying specific cysteines of the electrophile-sensing human keap1 protein is insufficient to disrupt binding to the nrf2 domain neh2." Proc Natl Acad Sci USA 102(29): 10070-5.
- Elbirt, K. K. und Bonkovsky, H. L. (1999). "Heme oxygenase: Recent advances in understanding its regulation and role." Proc Assoc Am Physicians 111(5): 438-47.
- Farombi, E. O. und Surh, Y. J. (2006). "Heme-oxygenase-1 as a potential therapeutic target for hepatoprotection." Journal of Biochemistry and Molecular Biology 39(5): 479-491.
- Favreau, L. V. und C. B. Pickett (1991). "Transcriptional regulation of the rat NAD(P)H:quinone reductase gene. Identification of regulatory elements controlling basal level expression and inducible expression by planar aromatic compounds and phenolic antioxidants." J Biol Chem 266(7): 4556-61.
- Favreau, L. V. und Pickett, C. B. (1993). "Transcriptional regulation of the rat nad(p)h:Quinone reductase gene. Characterization of a DNA-protein interaction at the antioxidant responsive element and induction by 12-o-tetradecanoylphorbol 13-acetate." J Biol Chem 268(26): 19875-81.
- Finkel, T. und Holbrook, N. J. (2000). "Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing." Nature 408(6809): 239-47.
- Fogh, J., Fogh, J. M. und Orfeo, T. (1977). "One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice." J Natl Cancer Inst 59(1): 221-6.

- Forman, H. J. und Torres, M. (2001). "Signaling by the respiratory burst in macrophages." IUBMB Life 51(6): 365-71.
- Forman, H. J. und Torres, M. (2002). "Reactive oxygen species and cell signaling: Respiratory burst in macrophage signaling." Am J Respir Crit Care Med 166(12 Pt 2): S4-8.
- Forman, H. J., Torres, M. und Fukuto, J. (2002). "Redox signaling." Mol Cell Biochem 234-235 (1-2): 49-62.
- Fraga, C. G., Actis-Goretti, L., Ottaviani, J. I., Carrasquedo, F., Lotito, S. B., Lazarus, S., Schmitz, H. H. und Keen, C. L. (2005). "Regular consumption of a flavanol-rich chocolate can improve oxidant stress in young soccer players." Clin Dev Immunol 12(1): 11-7.
- Fridovich, I. (1978). "The biology of oxygen radicals." Science 201(4359): 875-80.
- Friling, R. S., A. Bensimon et al. (1990). "Xenobiotic-inducible expression of murine glutathione S-transferase Ya subunit gene is controlled by an electrophile-responsive element." Proc Natl Acad Sci USA 87(16): 6258-62.
- Furukawa, M. und Xiong, Y. (2005). "Btb protein keap1 targets antioxidant transcription factor nrf2 for ubiquitination by the cullin 3-roc1 ligase." Mol Cell Biol 25(1): 162-71.
- Galloway, D. C., Blake, D. G., Shepherd, A. G. und McLellan, L. I. (1997). "Regulation of human gamma-glutamylcysteine synthetase: Co-ordinate induction of the catalytic and regulatory subunits in hepg2 cells." Biochem J 328 (Pt 1): 99-104.
- Gao, S. S., Choi, B.-M., Chen, X. Y., Zhu, R. Z., Kim, Y., So, H., Park, R., Sung, M. und Kim, B.-R. (2010). "Kaempferol suppresses cisplatin-induced apoptosis via inductions of heme oxygenase-1 and glutamate-cysteine ligase catalytic subunit in hei-oc1 cell." Pharm Res 27(2): 235-45.
- Gharavi, N. und El-Kadi, A. O. S. (2005). "Tert-butylhydroquinone is a novel aryl hydrocarbon receptor ligand." Drug Metab Dispos 33(3): 365-72.
- Girotti, A. W. (1998). "Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems." J Lipid Res 39(8): 1529-42.
- Giudice, A. und Montella, M. (2006). "Activation of the nrf2-are signaling pathway: A promising strategy in cancer prevention." Bioessays 28(2): 169-81.
- Gong, P., D. Stewart et al. (2002). "Multiple basic-leucine zipper proteins regulate induction of the mouse heme oxygenase-1 gene by arsenite." Arch Biochem Biophys 405(2): 265-74.
- Gopalakrishna, R. und Jaken, S. (2000). "Protein kinase c signaling and oxidative stress." Free Radic Biol Med 28(9): 1349-1361.
- Goven, D., Boutten, A., Leçon-Malas, V., Marchal-Sommé, J., Amara, N., Crestani, B., Fournier, M., Lesèche, G., Soler, P., Boczkowski, J. und Bonay, M. (2008). "Altered nrf2/keap1-bach1 equilibrium in pulmonary emphysema." Thorax 63(10): 916-24.
- Guarrera, S., Sacerdote, C., Fiorini, L., Marsala, R., Polidoro, S., Gamberini, S., Saletta, F., Malaveille, C., Talaska, G., Vineis, P. und Matullo, G. (2007). "Expression of DNA repair and metabolic genes in response to a flavonoid-rich diet." Br J Nutr 98(3): 525-33.
- Gutierrez-Venegas, G., Jimenez-Estrada, M. und Maldonado, S. (2007). "The effect of flavonoids on transduction mechanisms in lipopolysaccharide-treated human gingival fibroblasts." Int Immunopharmacol 7(9): 1199-210.
- Halliwell, B. und Dizdaroglu, M. (1992). "The measurement of oxidative damage to DNA by hplc and gc/ms techniques." Free Radic Res Commun 16(2): 75-87.
- Hanneken, A., Lin, F.-F., Johnson, J. und Maher, P. (2006). "Flavonoids protect human retinal pigment epithelial cells from oxidative-stress-induced death." Invest Ophthalmol Vis Sci 47(7): 3164-77.
- Harada, H., Sugimoto, R., Watanabe, A., Taketani, S., Okada, K., Warabi, E., Siow, R., Itoh, K., Yamamoto, M. und Ishii, T. (2008). "Differential roles for nrf2 and ap-1 in upregulation of ho-1 expression by arsenite in murine embryonic fibroblasts." Free Radic Res 42(4): 297-304.
- Harborne, J. B. und Williams, C. A. (2000). "Advances in flavonoid research since 1992." Phytochemistry 55(6): 481-504.
- Hayes, J. D. und McLellan, L. I. (1999). "Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a co-ordinately regulated defence against oxidative stress." Free Radic Res 31(4): 273-300.

- He, X., Chen, M. G. und Ma, Q. (2008). "Activation of nrf2 in defense against cadmium-induced oxidative stress." Chem Res Toxicol 21(7): 1375-83.
- He, X. und Ma, Q. (2010). "Critical cysteine residues of kelch-like ech-associated protein 1 in arsenic sensing and suppression of nuclear factor erythroid 2-related factor 2." J Pharmacol Exp Ther 332(1): 66-75.
- Heinonen, M. (2007). "Antioxidant activity and antimicrobial effect of berry phenolics--a finnish perspective." Mol Nutr Food Res 51(6): 684-91.
- Hertog, M. G., Feskens, E. J., Hollman, P. C., Katan, M. B. und Kromhout, D. (1994). "Dietary flavonoids and cancer risk in the zutphen elderly study." Nutrition and cancer 22(2): 175-84.
- Hertog, M. G., Hollman, P. C., Katan, M. B. und Kromhout, D. (1993). "Intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults in the netherlands." Nutrition and cancer 20(1): 21-9.
- Hong, F., Freeman, M. L. und Liebler, D. C. (2005). "Identification of sensor cysteines in human keap1 modified by the cancer chemopreventive agent sulforaphane." Chem Res Toxicol 18(12): 1917-26.
- Hong, F., Sekhar, K. R., Freeman, M. L. und Liebler, D. C. (2005). "Specific patterns of electrophile adduction trigger keap1 ubiquitination and nrf2 activation." J Biol Chem 280(36): 31768-75.
- Huang, H. C., Nguyen, T. und Pickett, C. B. (2000). "Regulation of the antioxidant response element by protein kinase c-mediated phosphorylation of nf-e2-related factor 2." Proc Natl Acad Sci U S A 97(23): 12475-80.
- Huang, H. C., Nguyen, T. und Pickett, C. B. (2002). "Phosphorylation of nrf2 at ser-40 by protein kinase c regulates antioxidant response element-mediated transcription." J Biol Chem 277(45): 42769-74.
- Hung, H. (2007). "Dietary quercetin inhibits proliferation of lung carcinoma cells." Forum Nutr 60: 146-57.
- Igarashi, K. und Sun, J. (2006). "The heme-bach1 pathway in the regulation of oxidative stress response and erythroid differentiation." Antioxid Redox Signal 8(1-2): 107-18.
- Ikeda, H., Nishi, S. und Sakai, M. (2004). "Transcription factor nrf2/maf regulates rat placental glutathione s-transferase gene during hepatocarcinogenesis." Biochem J 380(Pt 2): 515-21.
- Ishige, K., Schubert, D. und Sagara, Y. (2001). "Flavonoids protect neuronal cells from oxidative stress by three distinct mechanisms." Free Radic Biol Med 30(4): 433-446.
- Ishikawa, T. (1992). "The atp-dependent glutathione s-conjugate export pump." Trends Biochem Sci 17(11): 463-8.
- Itoh, K., Igarashi, K., Hayashi, N., Nishizawa, M. und Yamamoto, M. (1995). "Cloning and characterization of a novel erythroid cell-derived cnc family transcription factor heterodimerizing with the small maf family proteins." Mol Cell Biol 15(8): 4184-93.
- Itoh, K., Tong, K. I. und Yamamoto, M. (2004). "Molecular mechanism activating nrf2-keap1 pathway in regulation of adaptive response to electrophiles." Free Radic Biol Med 36(10): 1208-13.
- Itoh, K., Wakabayashi, N., Katoh, Y., Ishii, T., O'Connor, T. und Yamamoto, M. (2003). "Keap1 regulates both cytoplasmic-nuclear shuttling and degradation of nrf2 in response to electrophiles." Genes Cells 8(4): 379-91.
- Jain, A. K., Mahajan, S. und Jaiswal, A. K. (2008). "Phosphorylation and dephosphorylation of tyrosine 141 regulate stability and degradation of inrf2: A novel mechanism in nrf2 activation." J Biol Chem 283(25): 17712-20.
- Jaiswal, A. K. (2000). "Regulation of genes encoding nad(p)h:Quinone oxidoreductases." Free Radic Biol Med 29(3-4): 254-62.
- Jaiswal, A. K. (2004). "Nrf2 signaling in coordinated activation of antioxidant gene expression." Free Radic Biol Med 36(10): 1199-207.
- Jeong, J. C., Kim, M. S., Kim, T. H. und Kim, Y. K. (2009). "Kaempferol induces cell death through erk and akt-dependent down-regulation of xiap and survivin in human glioma cells." Neurochem Res 34(5): 991-1001.

- Johnson, D. A., Andrews, G. K., Xu, W. und Johnson, J. A. (2002). "Activation of the antioxidant response element in primary cortical neuronal cultures derived from transgenic reporter mice." J Neurochem 81(6): 1233-41.
- Kahl, R., Weinke, S. und Kappus, H. (1989). "Production of reactive oxygen species due to metabolic activation of butylated hydroxyanisole." Toxicology 59(2): 179-94.
- Kampa, M., Nifli, A.-P., Notas, G. und Castanas, E. (2007). "Polyphenols and cancer cell growth." Rev Physiol Biochem Pharmacol 159: 79-113.
- Kampkötter, A., Gombitang Nkwonkam, C., Zurawski, R. F., Timpel, C., Chovolou, Y., Watjen, W. und Kahl, R. (2007). "Effects of the flavonoids kaempferol and fisetin on thermotolerance, oxidative stress and foxo transcription factor daf-16 in the model organism *caenorhabditis elegans*." Arch Toxicol 81(12): 849-58.
- Kang, K. A., Lee, K. H., Park, J. W., Lee, N. H., Na, H. K., Surh, Y. J., You, H. J., Chung, M. H. und Hyun, J. W. (2007). "Triphlorethol-a induces heme oxygenase-1 via activation of erk and nf-e2 related factor 2 transcription factor." FEBS Lett 581(10): 2000-8.
- Kang, K. W., Choi, S. H. und Kim, S. G. (2002). "Peroxyntirite activates nf-e2-related factor 2/ antioxidant response element through the pathway of phosphatidylinositol 3-kinase: The role of nitric oxide synthase in rat glutathione s-transferase a2 induction." Nitric Oxide 7 (4): 244-53.
- Kang, K. W., Park, E. Y. und Kim, S. G. (2003). "Activation of ccaat/enhancer-binding protein beta by 2'-amino-3'-methoxyflavone (pd98059) leads to the induction of glutathione s-transferase a2." Carcinogenesis 24(3): 475-82.
- Kaspar, J., Niture, S. und Jaiswal, A. (2009). "Nrf2:Inrf2 (keap1) signaling in oxidative stress." Free Radic Biol Med.
- Katz, M., Amit, I. und Yarden, Y. (2007). "Regulation of mapks by growth factors and receptor tyrosine kinases." Biochimica et Biophysica Acta 1773: 1161-1176.
- Kauffmann, H. M., Pfannschmidt, S., Zöller, H., Benz, A., Vorderstemann, B., Webster, J. I. und Schrenk, D. (2002). "Influence of redox-active compounds and pxx-activators on human mrp1 and mrp2 gene expression." Toxicology 171(2-3): 137-46.
- Kaul, N. und Forman, H. J. (1996). "Activation of nf kappa b by the respiratory burst of macrophages." Free Radic Biol Med 21(3): 401-5.
- Keller, H., Dreyer, C., Medin, J., Mahfoudi, A., Ozato, K. und Wahli, W. (1993). "Fatty acids and retinoids control lipid metabolism through activation of peroxisome proliferator-activated receptor-retinoid x receptor heterodimers." Proc Natl Acad Sci U S A 90(6): 2160-4.
- Keum, Y.-S., Han, Y.-H., Liew, C., Kim, J.-H., Xu, C., Yuan, X., Shakarjian, M. P., Chong, S. und Kong, A.-N. (2006). "Induction of heme oxygenase-1 (ho-1) and nad[p]h: Quinone oxidoreductase 1 (nqo1) by a phenolic antioxidant, butylated hydroxyanisole (bha) and its metabolite, tert-butylhydroquinone (tbhq) in primary-cultured human and rat hepatocytes." Pharm Res 23(11): 2586-2594.
- Keum, Y.-S., Yu, S., Chang, P. P.-J., Yuan, X., Kim, J.-H., Xu, C., Han, J., Agarwal, A. und Kong, A.-N. T. (2006). "Mechanism of action of sulforaphane: Inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase isoforms contributing to the induction of antioxidant response element-mediated heme oxygenase-1 in human hepatoma hepg2 cells." Cancer Res 66 (17): 8804-13.
- Ki, S. H., Cho, I. J., Choi, D. W. und Kim, S. G. (2005). "Glucocorticoid receptor (gr)-associated smrt binding to c/ebpbeta tad and nrf2 neh4/5: Role of smrt recruited to gr in gsta2 gene repression." Mol Cell Biol 25(10): 4150-65.
- Kietzmann, T., Samoylenko, A. und Immenschuh, S. (2003). "Transcriptional regulation of heme oxygenase-1 gene expression by map kinases of the jnk and p38 pathways in primary cultures of rat hepatocytes." J Biol Chem 278(20): 17927-36.
- Kim, J. D., Liu, L., Guo, W. und Meydani, M. (2006). "Chemical structure of flavonols in relation to modulation of angiogenesis and immune-endothelial cell adhesion." Journal of Nutritional Biochemistry 17: 165-176.
- Kim, K. M., Pae, H.-O., Zheng, M., Park, R., Kim, Y.-M. und Chung, H.-T. (2007). "Carbon monoxide induces heme oxygenase-1 via activation of protein kinase r-like endoplasmic reticulum kinase and inhibits endothelial cell apoptosis triggered by endoplasmic reticulum stress." Circ Res 101(9): 919-27.

- Kim, M.-R., Lee, J. Y., Lee, H.-H., Aryal, D. K., Kim, Y. G., Kim, S. K., Woo, E.-R. und Kang, K. W. (2006). "Antioxidative effects of quercetin-glycosides isolated from the flower buds of tussilago farfara l." Food Chem Toxicol 44(8): 1299-307.
- Kimata, M., Shichijo, M., Miura, T., Serizawa, I., Inagaki, N. und Nagai, H. (2000). "Effects of luteolin, quercetin and baicalein on immunoglobulin e-mediated mediator release from human cultured mast cells." Clin Exp Allergy 30(4): 501-8.
- Knekt, P., Kumpulainen, J., Järvinen, R., Rissanen, H., Heliövaara, M., Reunanen, A., Hakulinen, T. und Aromaa, A. (2002). "Flavonoid intake and risk of chronic diseases." Am J Clin Nutr 76(3): 560-8.
- Knowles, B. B., Howe, C. C. und Aden, D. P. (1980). "Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis b surface antigen." Science 209(4455): 497-9.
- Kobayashi, A., Kang, M.-I., Watai, Y., Tong, K. I., Shibata, T., Uchida, K. und Yamamoto, M. (2006). "Oxidative and electrophilic stresses activate nrf2 through inhibition of ubiquitination activity of keap1." Mol Cell Biol 26(1): 221-9.
- Kobayashi, A. und Tong, K. I. (2006). "[oxidative/electrophilic stress sensor keap1 regulates the rapid turnover of transcription factor nrf2]." Tanpakushitsu Kakusan Koso 51(10 Suppl): 1304-8.
- Kocanova, S., Buytaert, E., Matroule, J.-Y., Piette, J., Golab, J., de Witte, P. und Agostinis, P. (2007). "Induction of heme-oxygenase 1 requires the p38mapk and pi3k pathways and suppresses apoptotic cell death following hypericin-mediated photodynamic therapy." Apoptosis 12(4): 731-41.
- Kong, A. N., Owuor, E., Yu, R., Hebbar, V., Chen, C., Hu, R. und Mandlekar, S. (2001). "Induction of xenobiotic enzymes by the map kinase pathway and the antioxidant or electrophile response element (are/epre)." Drug Metab Rev 33(3-4): 255-71.
- Kulling, S. E. und Metzler, M. (1997). "Induction of micronuclei, DNA strand breaks and hprt mutations in cultured chinese hamster v79 cells by the phytoestrogen coumestrol." Food Chem Toxicol 35(6): 605-13.
- Kuntz, S., Wenzel, U. und Daniel, H. (1999). "Comparative analysis of the effects of flavonoids on proliferation, cytotoxicity, and apoptosis in human colon cancer cell lines." European journal of nutrition 38(3): 133-42.
- Kusano, Y., Horie, S., Shibata, T., Satsu, H., Shimizu, M., Hitomi, E., Nishida, M., Kurose, H., Itoh, K., Kobayashi, A., Yamamoto, M. und Uchida, K. (2008). "Keap1 regulates the constitutive expression of gst a1 during differentiation of caco-2 cells." Biochemistry 47(23): 6169-77.
- Kwak, M.-K., Itoh, K., Yamamoto, M. und Kensler, T. W. (2002). "Enhanced expression of the transcription factor nrf2 by cancer chemopreventive agents: Role of antioxidant response element-like sequences in the nrf2 promoter." Mol Cell Biol 22(9): 2883-92.
- Kwon, O., Eck, P., Chen, S., Corpe, C. P., Lee, J. H., Kruhlak, M. und Levine, M. (2007). "Inhibition of the intestinal glucose transporter glut2 by flavonoids." FASEB J 21(2): 366-77.
- Kwon, S. H., Nam, J. I., Kim, S. H., Kim, J. H., Yoon, J. H. und Kim, K. S. (2009). "Kaempferol and quercetin, essential ingredients in ginkgo biloba extract, inhibit interleukin-1beta-induced muc5ac gene expression in human airway epithelial cells." Phytother Res 23(12): 1708-12.
- Landis-Piowar, K. R., Milacic, V. und Ping Dou, Q. (2008). "Relationship between the methylation status of dietary flavonoids and their growth-inhibitory and apoptosis-inducing activities in human cancer cells." J. Cell. Biochem. 105: 514-523.
- Lee, B.-S., Heo, J., Kim, Y.-M., Shim, S. M., Pae, H.-O., Kim, Y.-M. und Chung, H.-T. (2006). "Carbon monoxide mediates heme oxygenase 1 induction via nrf2 activation in hepatoma cells." Biochem Biophys Res Commun 343(3): 965-72.
- Lee, J. M., Moehlenkamp, J. D., Hanson, J. M. und Johnson, J. A. (2001). "Nrf2-dependent activation of the antioxidant responsive element by tert-butylhydroquinone is independent of oxidative stress in imr-32 human neuroblastoma cells." Biochem Biophys Res Commun 280(1): 286-92.

- Lee, J. S., Kim, S. Y., Kwon, C. H. und Kim, Y. K. (2006). "Egfr-dependent erk activation triggers hydrogen peroxide-induced apoptosis in ok renal epithelial cells." Arch Toxicol 80(6): 337-46.
- Lee, K. W., Hur, J. H., Lee, H. J. und Lee, C. Y. (2005). "Antiproliferative effects of dietary phenolic substances and hydrogen peroxide." J. Agric. Food Chem. 53: 1990-1995.
- Lee, K. W., Kang, N. J., Rogozin, E. A., Kim, H.-G., Cho, Y. Y., Bode, A. M., Lee, H. J., Surh, Y.-J., Bowden, G. T. und Dong, Z. (2007). "Myricetin is a novel natural inhibitor of neoplastic cell transformation and mek1." Carcinogenesis 28(9): 1918-27.
- Lee, K. W. und Lee, H. J. (2006). "The roles of polyphenols in cancer chemoprevention." Biofactors 26(2): 105-21.
- Lee, S. F. und Lin, J. K. (1997). "Inhibitory effects of phytopolyphenols on tpa-induced transformation, pkc activation, and c-jun expression in mouse fibroblast cells." Nutrition and cancer 28(2): 177-83.
- Lee-Hilz, Y. Y., Boerboom, A.-M. J. F., Westphal, A. H., Berkel, W. J. H. v., Aarts, J. M. M. J. G. und Rietjens, I. M. C. M. (2006). "Pro-oxidant activity of flavonoids induces epre-mediated gene expression." Chem Res Toxicol 19(11): 1499-505.
- Leung, L. K., Po, L. S., Lau, T. Y. und Yuen, Y. M. (2004). "Effect of dietary flavonols on oestrogen receptor transactivation and cell death induction." Br J Nutr 91(6): 831-9.
- Levonen, A.-L., Landar, A., Ramachandran, A., Ceaser, E. K., Dickinson, D. A., Zanoni, G., Morrow, J. D. und Darley-Usmar, V. M. (2004). "Cellular mechanisms of redox cell signalling: Role of cysteine modification in controlling antioxidant defences in response to electrophilic lipid oxidation products." Biochem J 378(Pt 2): 373-82.
- Li, H. Y., Zhong, Y. F., Wu, S. Y. und Shi, N. (2007). "Nf-e2 related factor 2 activation and heme oxygenase-1 induction by tert-butylhydroquinone protect against deltamethrin-mediated oxidative stress in pc12 cells." Chem Res Toxicol 20(9): 1242-51.
- Li, J., Johnson, D., Calkins, M., Wright, L., Svendsen, C. und Johnson, J. (2005). "Stabilization of nrf2 by tbhq confers protection against oxidative stress-induced cell death in human neural stem cells." Toxicol Sci 83(2): 313-28.
- Li, M.-H., Cha, Y.-N. und Surh, Y.-J. (2006). "Peroxyntirite induces ho-1 expression via pi3k/akt-dependent activation of nf-e2-related factor 2 in pc12 cells." Free Radic Biol Med 41(7): 1079-91.
- Lim, J. H., Park, H.-S., Choi, J.-K., Lee, I.-S. und Choi, H. J. (2007). "Isoorientin induces nrf2 pathway-driven antioxidant response through phosphatidylinositol 3-kinase signaling." Arch Pharm Res 30(12): 1590-8.
- Long, B. H., Willson, J. K., Brattain, D. E., Musial, S. und Brattain, M. G. (1984). "Effects of mitomycin on human colon carcinoma cells." J Natl Cancer Inst 73(4): 787-92.
- Long, D. J., 2nd und Jaiswal, A. (2000). "Nrh:Quinone oxidoreductase2 (nqo2) " Chemico-Biological Interactions 129: 99-112.
- Lord, J. M., Davey, J., Frigerio, L. und Roberts, L. M. (2000). "Endoplasmic reticulum-associated protein degradation." Semin Cell Dev Biol 11(3): 159-64.
- Luepertz, R., Chovolou, Y., Kampkotter, A., Watjen, W. und Kahl, R. (2008). "Catalase overexpression impairs tnf-alpha induced nf-kappab activation and sensitizes mcf-7 cells against tnf-alpha." J Cell Biochem 103(5): 1497-511.
- Ma, Q., Kinneer, K., Bi, Y., Chan, J. Y. und Kan, Y. W. (2004). "Induction of murine nad(p) h:Quinone oxidoreductase by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin requires the cnc (cap 'n' collar) basic leucine zipper transcription factor nrf2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2): Cross-interaction between ahr (aryl hydrocarbon receptor) and nrf2 signal transduction." Biochem J 377(Pt 1): 205-13.
- Maggiolini, M., Recchia, A. G., Bonofiglio, D., Catalano, S., Vivacqua, A., Carpino, A., Rago, V., Rossi, R. und Andò, S. (2005). "The red wine phenolics piceatannol and myricetin act as agonists for estrogen receptor alpha in human breast cancer cells." J Mol Endocrinol 35(2): 269-81.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Remesy, C. und Jimenez, L. (2004). "Polyphenols: Food sources and bioavailability." Am J Clin Nutr 79(5): 727-47.

- Manach, C., Williamson, G., Morand, C., Scalbert, A. und Remesy, C. (2005). "Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies." Am J Clin Nutr 81(1 Suppl): 230S-242S.
- Manthey, J. A., Grohmann, K. und Guthrie, N. (2001). "Biological properties of citrus flavonoids pertaining to cancer and inflammation." Curr Med Chem 8(2): 135-53.
- Masella, R., Di Benedetto, R., Vari, R., Filesi, C. und Giovannini, C. (2005). "Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: Involvement of glutathione and glutathione-related enzymes." J Nutr Biochem 16(10): 577-86.
- Masella, R., Vari, R., D'Archivio, M., Di Benedetto, R., Matarrese, P., Malorni, W., Scazzocchio, B. und Giovannini, C. (2004). "Extra virgin olive oil biophenols inhibit cell-mediated oxidation of ldl by increasing the mrna transcription of glutathione-related enzymes." J Nutr 134(4): 785-91.
- Mathers, J., Fraser, J. A., McMahan, M., Saunders, R. D. C., Hayes, J. D. und McLellan, L. I. (2004). "Antioxidant and cytoprotective responses to redox stress." Biochem Soc Symp (71): 157-76.
- Matsuo, M., Sasaki, N., Saga, K. und Kaneko, T. (2005). "Cytotoxicity of flavonoids toward cultured normal human cells." Biol Pharm Bull 28(2): 253-9.
- McCubrey, J. A., LaHair, M. M. und Franklin, R. A. (2006). "Reactive oxygen species-induced activation of the map kinase signaling pathways." Antioxid Redox Signal 8(9 & 10): 1775-1789.
- McMahon, M., Itoh, K., Yamamoto, M., Chanas, S. A., Henderson, C. J., McLellan, L. I., Wolf, C. R., Cavin, C. und Hayes, J. D. (2001). "The cap'n'collar basic leucine zipper transcription factor nrf2 (nf-e2 p45-related factor 2) controls both constitutive and inducible expression of intestinal detoxification and glutathione biosynthetic enzymes." Cancer Res 61(8): 3299-307.
- McMahon, M., Thomas, N., Itoh, K., Yamamoto, M. und Hayes, J. D. (2006). "Dimerization of substrate adaptors can facilitate cullin-mediated ubiquitylation of proteins by a "Tethering" Mechanism: A two-site interaction model for the nrf2-keap1 complex." J Biol Chem 281(34): 24756-68.
- Mehlhase, J. und Grune, T. (2002). "Proteolytic response to oxidative stress in mammalian cells." Biol Chem 383: 559-567.
- Moi, P., Chan, K., Asunis, I., Cao, A. und Kan, Y. W. (1994). "Isolation of nf-e2-related factor 2 (nrf2), a nf-e2-like basic leucine zipper transcriptional activator that binds to the tandem nf-e2/ap1 repeat of the beta-globin locus control region." Proc Natl Acad Sci USA 91(21): 9926-30.
- Monteiro, R., Faria, A., Mateus, N., Calhau, C. und Azevedo, I. (2008). "Red wine interferes with oestrogen signalling in rat hippocampus." J Steroid Biochem Mol Biol 111(1-2): 74-9.
- Moon, Y. J., Wang, X. und Morris, M. E. (2006). "Dietary flavonoids: Effects on xenobiotic and carcinogen metabolism." Toxicol In Vitro 20(2): 187-210.
- Mosmann, T. (1983). "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays." J Immunol Methods 65(1-2): 55-63.
- Mullis, K. B. und Faloona, F. A. (1987). "Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction." Methods Enzymol 155: 335-50.
- Münzel, P. A., Schmohl, S., Buckler, F., Jaehrling, J., Raschko, F. T., Köhle, C. und Bock, K. W. (2003). "Contribution of the ah receptor to the phenolic antioxidant-mediated expression of human and rat udp-glucuronosyltransferase ugt1a6 in caco-2 and rat hepatoma 5l cells." Biochem Pharmacol 66(5): 841-7.
- Murray, T. J., Yang, X. und Sherr, D. H. (2006). "Growth of a human mammary tumor cell line is blocked by galangin, a naturally occurring bioflavonoid, and is accompanied by down-regulation of cyclins d3, e, and a." Breast Cancer Res 8(2): R17.
- Myhrstad, M. C. W., Carlsen, H., Nordström, O., Blomhoff, R. und Moskaug, J. Ø. (2002). "Flavonoids increase the intracellular glutathione level by transactivation of the gamma-glutamylcysteine synthetase catalytical subunit promoter." Free Radic Biol Med 32(5): 386-93.
- Najafzadeh, M., Reynolds, P. D., Baumgartner, A. und Anderson, D. (2009). "Flavonoids inhibit the genotoxicity of hydrogen peroxide (h₂o₂) and of the food mutagen 2-amino-3-

- methylimadazo[4,5-f]-quinoline (iq) in lymphocytes from patients with inflammatory bowel disease (ibd)." Mutagenesis 24(5): 405-11.
- Nakagawa, Y. (1996). "Effects of dicoumarol on cytotoxicity caused by tert-butylhydroquinone in isolated rat hepatocytes." Toxicol Lett 84(2): 63-8.
- Nakaso, K., Yano, H., Fukuhara, Y., Takeshima, T., Wada-Isoe, K.und Nakashima, K. (2003). "Pi3k is a key molecule in the nrf2-mediated regulation of antioxidative proteins by hemin in human neuroblastoma cells." FEBS Lett 546(2-3): 181-4.
- Nguyen, T., Sherratt, P. J., Huang, H. C., Yang, C. S.und Pickett, C. B. (2003). "Increased protein stability as a mechanism that enhances nrf2-mediated transcriptional activation of the antioxidant response element. Degradation of nrf2 by the 26 s proteasome." J Biol Chem 278(7): 4536-41.
- Nguyen, T., Sherratt, P. J., Nioi, P., Yang, C. S.und Pickett, C. B. (2005). "Nrf2 controls constitutive and inducible expression of are-driven genes through a dynamic pathway involving nucleocytoplasmic shuttling by keap1." J Biol Chem 280(37): 32485-92.
- Niering, P., Michels, G., Watjen, W., Ohler, S., Steffan, B., Chovolou, Y., Kampkotter, A., Proksch, P.und Kahl, R. (2005). "Protective and detrimental effects of kaempferol in rat h4iie cells: Implication of oxidative stress and apoptosis." Toxicol Appl Pharmacol 209(2): 114-22.
- Nikolic, D.und van Breemen, R. B. (2004). "New metabolic pathways for flavanones catalyzed by rat liver microsomes." Drug Metab Dispos 32(4): 387-97.
- Nioi, P.und Hayes, J. D. (2004). "Contribution of nad(p)h:Quinone oxidoreductase 1 to protection against carcinogenesis, and regulation of its gene by the nrf2 basic-region leucine zipper and the arylhydrocarbon receptor basic helix-loop-helix transcription factors." Mutat Res 555(1-2): 149-71.
- Niture, S., Kaspar, J., Shen, J.und Jaiswal, A. (2009). "Nrf2 signaling and cell survival." Toxicol Appl Pharmacol.
- Niture, S. K., Jain, A. K.und Jaiswal, A. K. (2009). "Antioxidant-induced modification of inrf2 cysteine 151 and pkc-delta-mediated phosphorylation of nrf2 serine 40 are both required for stabilization and nuclear translocation of nrf2 and increased drug resistance." J Cell Sci 122(Pt 24): 4452-64.
- Numazawa, S., Ishikawa, M., Yoshida, A., Tanaka, S.und Yoshida, T. (2003). "Atypical protein kinase c mediates activation of nf-e2-related factor 2 in response to oxidative stress." Am J Physiol, Cell Physiol 285(2): C334-42.
- Ogawa, K., Sun, J., Taketani, S., Nakajima, O., Nishitani, C., Sassa, S., Hayashi, N., Yamamoto, M., Shibahara, S., Fujita, H.und Igarashi, K. (2001). "Heme mediates derepression of maf recognition element through direct binding to transcription repressor bach1." EMBO J 20(11): 2835-43.
- Olthof, M. R., Hollman, P. C., Zock, P. L.und Katan, M. B. (2001). "Consumption of high doses of chlorogenic acid, present in coffee, or of black tea increases plasma total homocysteine concentrations in humans." Am J Clin Nutr 73(3): 532-8.
- Osburn, W. O.und Kensler, T. W. (2008). "Nrf2 signaling: An adaptive response pathway for protection against environmental toxic insults." Mutat Res 659(1-2): 31-9.
- Owuor, E. D.und Kong, A. N. (2002). "Antioxidants and oxidants regulated signal transduction pathways." Biochem Pharmacol 64(5-6): 765-70.
- Papaiahgari, S., Zhang, Q., Kleeberger, S. R., Cho, H.-Y.und Reddy, S. P. (2006). "Hyperoxia stimulates an nrf2-are transcriptional response via ros-egfr-pi3k-akt/erk map kinase signaling in pulmonary epithelial cells." Antioxid Redox Signal 8(1-2): 43-52.
- Park, H. H., Lee, S., Oh, J. M., Lee, M. S., Yoon, K. H., Park, B. H., Kim, J. W., Song, H.und Kim, S. H. (2007). "Anti-inflammatory activity of fisetin in human mast cells (hmc-1)." Pharmacol Res 55(1): 31-7.
- Patel, R.und Maru, G. (2008). "Polymeric black tea polyphenols induce phase ii enzymes via nrf2 in mouse liver and lungs." Free Radic Biol Med 44(11): 1897-911.
- Pietta, P. G. (2000). "Flavonoids as antioxidants." J Nat Prod 63(7): 1035-42.
- Prawan, A., Keum, Y.-S., Khor, T. O., Yu, S., Nair, S., Li, W., Hu, L.und Kong, A.-N. T. (2008). "Structural influence of isothiocyanates on the antioxidant response element (are)-mediated heme oxygenase-1 (ho-1) expression." Pharm Res 25(4): 836-44.

- Prestera, T. und P. Talalay (1995). "Electrophile and antioxidant regulation of enzymes that detoxify carcinogens." Proc Natl Acad Sci USA 92(19): 8965-9.
- Prior, R. L., Wu, X. und Schaich, K. (2005). "Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements." J Agric Food Chem 53: 4290-4302.
- Puppala, D., Gairola, C. G. und Swanson, H. I. (2007). "Identification of kaempferol as an inhibitor of cigarette smoke-induced activation of the aryl hydrocarbon receptor and cell transformation." Carcinogenesis 28(3): 639-47.
- Rahman, I., Biswas, S. K. und Kirkham, P. A. (2006). "Regulation of inflammation and redox signaling by dietary polyphenols." Biochem Pharmacol 72(11): 1439-52.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. und Rice-Evans, C. (1999). "Antioxidant activity applying an improved abts radical cation decolorization assay." Free Radic Biol Med 26(9/10): 1231-1237.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. und Rice-Evans, C. (1999). "Antioxidant activity applying an improved abts radical cation decolorization assay." Free Radic Biol Med 26(9/10): 1231-1237.
- Reichard, J. F., Motz, G. T. und Puga, A. (2007). "Heme oxygenase-1 induction by nrf2 requires inactivation of the transcriptional repressor bach1." Nucleic Acids Res 35(21): 7074-86.
- Reichard, J. F., Sartor, M. A. und Puga, A. (2008). "Bach1 is a specific repressor of hmx1 that is inactivated by arsenite." J Biol Chem 283(33): 22363-70.
- Reisman, S. A., Yeager, R. L., Yamamoto, M. und Klaassen, C. D. (2009). "Increased nrf2 activation in livers from keap1-knockdown mice increases expression of cytoprotective genes that detoxify electrophiles more than those that detoxify reactive oxygen species." Toxicol Sci 108(1): 35-47.
- Reuber, M. D. (1961). "A transplantable bile-secreting hepatocellular carcinoma in the rat." J Natl Cancer Inst 26: 891-9.
- Rice-Evans, C. (2001). "Flavonoid antioxidants." Curr Med Chem 8(7): 797-807.
- Rice-Evans, C., Miller, N. J. und Paganga, G. (1996). "Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids." Free Radic Biol Med 20(7): 933-956.
- Rushmore, T. H. und Kong, A. N. (2002). "Pharmacogenomics, regulation and signaling pathways of phase i and ii drug metabolizing enzymes." Curr Drug Metab 3(5): 481-90.
- Rushmore, T. H., Morton, M. R. und Pickett, C. B. (1991). "The antioxidant responsive element. Activation by oxidative stress and identification of the DNA consensus sequence required for functional activity." J Biol Chem 266(18): 11632-9.
- Rushmore, T. H. und Pickett, C. B. (1990). "Transcriptional regulation of the rat glutathione s-transferase ya subunit gene. Characterization of a xenobiotic-responsive element controlling inducible expression by phenolic antioxidants." J Biol Chem 265(24): 14648-53.
- Rushmore, T. H. und Pickett, C. B. (1991). "Xenobiotic responsive elements controlling inducible expression by planar aromatic compounds and phenolic antioxidants." Meth Enzymol 206: 409-20.
- Rushworth, S. A., Chen, X.-L., Mackman, N., Osborne, R. M. und O'Connell, M. A. (2005). "Lipopolysaccharide-induced heme oxygenase-1 expression in human monocytic cells is mediated via nrf2 and protein kinase c." J Immunol 175(7): 4408-15.
- Rushworth, S. A., Osborne, R. M., Charalambos, C. A. und O'Connell, M. A. (2006). "Role of protein kinase c delta in curcumin-induced antioxidant response element-mediated gene expression in human monocytes." Biochem Biophys Res Commun 341(4): 1007-16.
- Ruweler, M., Anker, A., Gulden, M., Maser, E. und Seibert, H. (2008). "Inhibition of peroxide-induced radical generation by plant polyphenols in c6 astrogloma cells." Toxicol In Vitro 22(5): 1377-81.
- Sahni, S. K., Rydkina, E. und Sahni, A. (2008). "The proteasome inhibitor mg132 induces nuclear translocation of erythroid transcription factor nrf2 and cyclooxygenase-2 expression in human vascular endothelial cells." Thrombosis Research 122(6): 820-5.

- Sakoda, E., Igarashi, K., Sun, J., Kurisu, K.und Tashiro, S. (2008). "Regulation of heme oxygenase-1 by transcription factor bach1 in the mouse brain." Neurosci Lett 440(2): 160-5.
- Sang, S., Hou, Z., Lambert, J. D.und Yang, C. S. (2005). "Redox properties of tea polyphenols and related biological activities." Antioxid Redox Signal 7(11-12): 1704-14.
- Sankaranarayanan, K.und Jaiswal, A. K. (2004). "Nrf3 negatively regulates antioxidant-response element-mediated expression and antioxidant induction of nad(p)h:Quinone oxidoreductase1 gene." J Biol Chem 279(49): 50810-7.
- Satoh, T., Okamoto, S.-i., Cui, J., Watanabe, Y., Furuta, K., Suzuki, M., Tohyama, K.und Lipton, S. A. (2006). "Activation of the keap1/nrf2 pathway for neuroprotection by electrophilic [correction of electrophilic] phase ii inducers." Proc Natl Acad Sci USA 103(3): 768-73.
- Satoh, T., Saitoh, S., Hosaka, M.und Kosaka, K. (2009). "Simple ortho- and para-hydroquinones as compounds neuroprotective against oxidative stress in a manner associated with specific transcriptional activation." Biochem Biophys Res Commun 379(2): 537-41.
- Shan, Y., Lambrecht, R. W., Donohue, S. E.und Bonkovsky, H. L. (2006). "Role of bach1 and nrf2 in up-regulation of the heme oxygenase-1 gene by cobalt protoporphyrin." The FASEB Journal 20(14): 2651-3.
- Shibahara, S., Han, F., Li, B.und Takeda, K. (2007). "Hypoxia and heme oxygenases: Oxygen sensing and regulation of expression " Antioxidants & Redox Signaling 9(12): 2209-2225.
- Shih, P. H., Yeh, C. T.und Yen, G. C. (2007). "Anthocyanins induce the activation of phase ii enzymes through the antioxidant response element pathway against oxidative stress-induced apoptosis." J Agric Food Chem 55(23): 9427-35.
- Shih, Y. W., Wu, P. F., Lee, Y. C., Shi, M. D.und Chiang, T. A. (2009). "Myricetin suppresses invasion and migration of human lung adenocarcinoma a549 cells: Possible mediation by blocking the erk signaling pathway." J Agric Food Chem 57(9): 3490-9.
- Sies, H. (1997). "Oxidative stress: Oxidants and antioxidants." Experimental Physiology 82: 291-295.
- Sikorski, E. M., Hock, T., Hill-Kapturczak, N.und Agarwal, A. (2004). "The story so far: Molecular regulation of the heme oxygenase-1 gene in renal injury." Am J Physiol Renal Physiol 286(3): F425-41.
- Snyder, R. D.und Gillies, P. J. (2003). "Reduction of genistein clastogenicity in chinese hamster v79 cells by daidzein and other flavonoids." Food Chem Toxicol 41(10): 1291-8.
- Spencer, J. P. (2008). "Flavonoids: Modulators of brain function?" Br J Nutr 99 E Suppl 1: ES60-77.
- Steffan, B., Watjen, W., Michels, G., Niering, P., Wray, V., Ebel, R., Edrada, R., Kahl, R.und Proksch, P. (2005). "Polyphenols from plants used in traditional indonesian medicine (jamu): Uptake and antioxidative effects in rat h4iie hepatoma cells." J Pharm Pharmacol 57(2): 233-40.
- Stewart, D., Killeen, E., Naquin, R., Alam, S.und Alam, J. (2003). "Degradation of transcription factor nrf2 via the ubiquitin-proteasome pathway and stabilization by cadmium." J Biol Chem 278(4): 2396-402.
- Strange, R. C., Spiteri, M. A., Ramachandran, S.und Fryer, A. D. (2001). "Glutathione-s-transferase family of enzymes." Mutation Research 482: 21-26.
- Strnisková, M., Baraněík, M.und Ravingerová, T. (2002). "Mitogen-activated protein kinases and their role in regulation of cellular processes." Gen Physiol Biophys 21: 231-255.
- Sugihara, N., Arakawa, T., Ohnishi, M.und Furuno, K. (1999). "Anti- and pro-oxidative effects of flavonoids on metal-induced lipid hydroperoxide-dependent lipid peroxidation in cultured hepatocytes loaded with alpha-linolenic acid." Free Radic Biol Med 27(11-12): 1313-23.
- Sun, J., Brand, M., Zenke, Y., Tashiro, S., Groudine, M.und Igarashi, K. (2004). "Heme regulates the dynamic exchange of bach1 and nf-e2-related factors in the maf transcription factor network." Proc Natl Acad Sci USA 101(6): 1461-6.
- Surh, Y. J., Kundu, J. K., Na, H. K.und Lee, J. S. (2005). "Redox-sensitive transcription factors as prime targets for chemoprevention with anti-inflammatory and antioxidative phytochemicals." J Nutr 135(12 Suppl): 2993S-3001S.

- Suzuki, H., Tashiro, S., Sun, J., Doi, H., Satomi, S. und Igarashi, K. (2003). "Cadmium induces nuclear export of bach1, a transcriptional repressor of heme oxygenase-1 gene." J Biol Chem 278(49): 49246-53.
- Tanaka, K. (1998). "Molecular biology of the proteasome." Biochem Biophys Res Commun 247(3): 537-41.
- Tanaka, Y., Aleksunes, L. M., Goedken, M. J., Chen, C., Reisman, S. A., Manautou, J. E. und Klaassen, C. D. (2008). "Coordinated induction of nrf2 target genes protects against iron nitrotriacetate (fenta)-induced nephrotoxicity." Toxicol Appl Pharmacol 231(3): 364-73.
- Tanigawa, S., Fujii, M. und Hou, D. X. (2007). "Action of nrf2 and keap1 in are-mediated nqo1 expression by quercetin." Free Radic Biol Med 42(11): 1690-703.
- Tasset, I., Perez-De La Cruz, V., Elinos-Calderon, D., Carrillo-Mora, P., Gonzalez-Herrera, I. G., Luna-Lopez, A., Konigsberg, M., Pedraza-Chaverri, J., Maldonado, P. D., Ali, S. F., Tunez, I. und Santamaria, A. (2009). "Protective effect of tert-butylhydroquinone on the quinolinic-acid-induced toxicity in rat striatal slices: Role of the nrf2-antioxidant response element pathway." Neurosignals 18(1): 24-31.
- Tolomeo, M., Grimaudo, S., Di Cristina, A., Pipitone, R. M., Dusonchet, L., Meli, M., Crosta, L., Gebbia, N., Invidiata, F. P., Titone, L. und Simoni, D. (2008). "Galangin increases the cytotoxic activity of imatinib mesylate in imatinib-sensitive and imatinib-resistant bcr-abl expressing leukemia cells." Cancer Lett 265(2): 289-97.
- Tong, K. I., Katoh, Y., Kusunoki, H., Itoh, K., Tanaka, T. und Yamamoto, M. (2006). "Keap1 recruits neh2 through binding to etge and dlg motifs: Characterization of the two-site molecular recognition model." Mol Cell Biol 26(8): 2887-900.
- Tong, K. I., Kobayashi, A., Katsuoka, F. und Yamamoto, M. (2006). "Two-site substrate recognition model for the keap1-nrf2 system: A hinge and latch mechanism." Biol Chem 387(10-11): 1311-20.
- Tsiftoglou, A. S., Tsamadou, A. I. und Papadopoulou, L. C. (2006). "Heme as key regulator of major mammalian cellular functions: Molecular, cellular, and pharmacological aspects." Pharmacol Ther 111(2): 327-45.
- Tsuji, P. A. und Walle, T. (2008). "Cytotoxic effects of the dietary flavones chrysin and apigenin in a normal trout liver cell line." Chem Biol Interact 171(1): 37-44.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T. D., Mazur, M. und Telser, J. (2007). "Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease." 39: 44-84.
- Valko, M., Rhodes, C. J., Moncol, J., Izakovic, M. und Mazur, M. (2006). "Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer." Chem Biol Interact 160(1): 1-40.
- van Hoorn, D. E., Nijveldt, R. J., Boelens, P. G., Hofman, Z., van Leeuwen, P. A. und van Norren, K. (2006). "Effects of preoperative flavonoid supplementation on different organ functions in rats." JPEN J Parenter Enteral Nutr 30(4): 302-8.
- Velichkova, M. und Hasson, T. (2005). "Keap1 regulates the oxidation-sensitive shuttling of nrf2 into and out of the nucleus via a crm1-dependent nuclear export mechanism." Mol Cell Biol 25(11): 4501-13.
- Venugopal, R. und Jaiswal, A. K. (1996). "Nrf1 and nrf2 positively and c-fos and fra1 negatively regulate the human antioxidant response element-mediated expression of nad(p) h:Quinone oxidoreductase1 gene." Proc Natl Acad Sci USA 93(25): 14960-5.
- Wang, W. und Jaiswal, A. K. (2006). "Nuclear factor nrf2 and antioxidant response element regulate nrh:Quinone oxidoreductase 2 (nqo2) gene expression and antioxidant induction." Free Radic Biol Med 40(7): 1119-30.
- Wang, X.-J., Sun, Z., Chen, W., Li, Y., Villeneuve, N. F. und Zhang, D. D. (2008). "Activation of nrf2 by arsenite and monomethylarsonous acid is independent of keap1-c151: Enhanced keap1-cul3 interaction." Toxicol Appl Pharmacol 230(3): 383-9.
- Wang, X.-J., Sun, Z., Villeneuve, N. F., Zhang, S., Zhao, F., Li, Y., Chen, W., Yi, X., Zheng, W., Wondrak, G. T., Wong, P. K. und Zhang, D. D. (2008). "Nrf2 enhances resistance of cancer cells to chemotherapeutic drugs, the dark side of nrf2." Carcinogenesis 29(6): 1235-43.
- Warabi, E., Takabe, W., Minami, T., Inoue, K., Itoh, K., Yamamoto, M., Ishii, T., Kodama, T. und Noguchi, N. (2007). "Shear stress stabilizes nf-e2-related factor 2 and induces

- antioxidant genes in endothelial cells: Role of reactive oxygen/nitrogen species." Free Radic Biol Med 42(2): 260-9.
- Wasserman, W. W.und Fahl, W. E. (1997). "Functional antioxidant responsive elements." Proc Natl Acad Sci USA 94(10): 5361-6.
- Wätjen, W., Chovolou, Y., Kampkötter, A.und Kahl, R. (2006). "Anti- and prooxidative effects of flavonoids, in: Leading edge antioxidant research (editor: H.V. Panglossi)." Nova Science Publishers, Inc. N.Y.: ISBN: 1-60021-274-3.
- Wätjen, W., Michels, G., Steffan, B., Niering, P., Chovolou, Y., Kampkötter, A., Tran-Thi, Q.-H., Proksch, P.und Kahl, R. (2005). "Low concentrations of flavonoids are protective in rat h4iie cells whereas high concentrations cause DNA damage and apoptosis." J Nutr 135 (3): 525-31.
- Weng, M. S., Ho, Y. S.und Lin, J. K. (2005). "Chrysin induces g1 phase cell cycle arrest in c6 glioma cells through inducing p21waf1/cip1 expression: Involvement of p38 mitogen-activated protein kinase." Biochem Pharmacol 69(12): 1815-27.
- Wilce, M. C.und Parker, M. W. (1994). "Structure and function of glutathione s-transferases." Biochim Biophys Acta 1205(1): 1-18.
- Williams, R. J., Spencer, J. P. E.und Rice-Evans, C. (2004). "Flavonoids: Antioxidants or signalling molecules?" Free Radic Biol Med 36(7): 838-849.
- Williamson, G.und Manach, C. (2005). "Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. li. Review of 93 intervention studies." Am J Clin Nutr 81(1 Suppl): 243S-255S.
- Wong, C. P., Bray, T. M.und Ho, E. (2009). "Induction of proinflammatory response in prostate cancer epithelial cells by activated macrophages." Cancer Lett 276(1): 38-46.
- Wruck, C. J., Claussen, M., Fuhrmann, G., Romer, L., Schulz, A., Pufe, T., Waetzig, V., Peipp, M., Herdegen, T.und Gotz, M. E. (2007). "Luteolin protects rat pc12 and c6 cells against mpp+ induced toxicity via an erk dependent keap1-nrf2-are pathway." J Neural Transm Suppl(72): 57-67.
- Wu, C. H., Wu, C. F., Huang, H. W., Jao, Y. C.und Yen, G. C. (2009). "Naturally occurring flavonoids attenuate high glucose-induced expression of proinflammatory cytokines in human monocytic thp-1 cells." Mol Nutr Food Res 53(8): 984-95.
- Xu, C., Li, C. Y.-T.und Kong, A.-N. T. (2005). "Induction of phase i, ii and iii drug metabolism/transport by xenobiotics." Arch Pharm Res 28(3): 249-68.
- Xu, C., Yuan, X., Pan, Z., Shen, G., Kim, J.-H., Yu, S., Khor, T. O., Li, W., Ma, J.und Kong, A.-N. T. (2006). "Mechanism of action of isothiocyanates: The induction of are-regulated genes is associated with activation of erk and jnk and the phosphorylation and nuclear translocation of nrf2." Mol Cancer Ther 5(8): 1918-26.
- Xu, W., Hellerbrand, C., Kohler, U. A., Bugnon, P., Kan, Y. W., Werner, S.und Beyer, T. A. (2008). "The nrf2 transcription factor protects from toxin-induced liver injury and fibrosis." Lab Invest 88(10): 1068-78.
- Yamamoto, N., Sawada, H., Izumi, Y., Kume, T., Katsuki, H., Shimohama, S.und Akaike, A. (2007). "Proteasome inhibition induces glutathione synthesis and protects cells from oxidative stress: Relevance to parkinson disease." J Biol Chem 282(7): 4364-72.
- Yamamoto, T., Suzuki, T., Kobayashi, A., Wakabayashi, J., Maher, J., Motohashi, H.und Yamamoto, M. (2008). "Physiological significance of reactive cysteine residues of keap1 in determining nrf2 activity." Mol Cell Biol 28(8): 2758-70.
- Yang, C., Zhang, X., Fan, H.und Liu, Y. (2009). "Curcumin upregulates transcription factor nrf2, ho-1 expression and protects rat brains against focal ischemia." Brain Res.
- Yao, K., Zhang, L., Zhang, Y., Ye, P.und Zhu, N. (2008). "The flavonoid, fisetin, inhibits uv radiation-induced oxidative stress and the activation of nf-kappab and mapk signaling in human lens epithelial cells." Mol Vis 14: 1865-71.
- Yao, P., Nussler, A., Liu, L., Hao, L., Song, F., Schirmeier, A.und Nussler, N. (2007). "Quercetin protects human hepatocytes from ethanol-derived oxidative stress by inducing heme oxygenase-1 via the mapk/nrf2 pathways☆." J Hepatol 47(2): 253-261.
- Yu, R., Lei, W., Mandlekar, S., Weber, M. J., Der, C. J., Wu, J.und Kong, A. N. (1999). "Role of a mitogen-activated protein kinase pathway in the induction of phase ii detoxifying enzymes by chemicals." J Biol Chem 274(39): 27545-52.

- Yu, R., Mandlekar, S., Lei, W., Fahl, W. E., Tan, T. H. und Kong, A. N. (2000). "P38 mitogen-activated protein kinase negatively regulates the induction of phase ii drug-metabolizing enzymes that detoxify carcinogens." *J Biol Chem* 275(4): 2322-7.
- Yu, R., et al. (2000). "Activation of mitogen-activated protein kinase pathways induces antioxidant response element-mediated gene expression via a Nrf2-dependent mechanism." *J Biol Chem* 275(51): 39907-13.
- Yuan, J.-H., Li, Y.-Q. und Yang, X.-Y. (2008). "Protective effects of epigallocatechin gallate on colon preneoplastic lesions induced by 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f] quinoline in mice." *Mol Med* 14(9-10): 590-8.
- Yuan, J. H., Li, Y. Q. und Yang, X. Y. (2007). "Inhibition of epigallocatechin gallate on orthotopic colon cancer by upregulating the nrf2-ugt1a signal pathway in nude mice." *Pharmacology* 80(4): 269-78.
- Yuan, X., Xu, C., Pan, Z., Keum, Y.-S., Kim, J.-H., Shen, G., Yu, S., Oo, K. T., Ma, J. und Kong, A.-N. T. (2006). "Butylated hydroxyanisole regulates are-mediated gene expression via nrf2 coupled with erk and jnk signaling pathway in hepg2 cells." *Mol Carcinog* 45(11): 841-50.
- Zenke-Kawasaki, Y., Dohi, Y., Katoh, Y., Ikura, T., Ikura, M., Asahara, T., Tokunaga, F., Iwai, K. und Igarashi, K. (2007). "Heme induces ubiquitination and degradation of the transcription factor bach1." *Mol Cell Biol* 27(19): 6962-71.
- Zhang, D., Lu, H., Li, J., Shi, X. und Huang, C. (2006). "Essential roles of erks and p38k in up-regulation of gst a1 expression by maotai content in human hepatoma cell line hep3b." *Mol Cell Biochem* 293(1-2): 161-71.
- Zhang, D. D. und Hannink, M. (2003). "Distinct cysteine residues in keap1 are required for keap1-dependent ubiquitination of nrf2 and for stabilization of nrf2 by chemopreventive agents and oxidative stress." *Mol Cell Biol* 23(22): 8137-51.
- Zhang, D. D., Lo, S. C., Cross, J. V., Templeton, D. J. und Hannink, M. (2004). "Keap1 is a redox-regulated substrate adaptor protein for a cul3-dependent ubiquitin ligase complex." *Mol Cell Biol* 24(24): 10941-53.
- Zhang, L., Jie, G., Zhang, J. und Zhao, B. (2009). "Significant longevity-extending effects of egcg on caenorhabditis elegans under stress." *Free Radic Biol Med* 46(3): 414-21.
- Zhang, R., Kang, K. A., Piao, M. J., Maeng, Y. H., Lee, K. H., Chang, W. Y., You, H. J., Kim, J. S., Kang, S. S. und Hyun, J. W. (2009). "Cellular protection of morin against the oxidative stress induced by hydrogen peroxide." *Chem Biol Interact* 177(1): 21-7.
- Zhang, W. und Liu, H. T. (2002). "Mapk signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells." *Cell Res* 12(1): 9-18.
- Zhang, Y., Munday, R., Jobson, H. E., Munday, C. M., Lister, C., Wilson, P., Fahey, J. W. und Mhaweche-Fauceglia, P. (2006). "Induction of gst and nqo1 in cultured bladder cells and in the urinary bladders of rats by an extract of broccoli (brassica oleracea italica) sprouts." *J Agric Food Chem* 54(25): 9370-6.
- Zhang, Z.-m., Yang, X.-Y., Yuan, J.-H., Sun, Z.-y. und Li, Y.-Q. (2009). "Modulation of nrf2 and ugt1a expression by epigallocatechin-3-gallate in colon cancer cells and balb/c mice." *Chin Med J* 122(14): 1660-5.
- Zipper, L. M. und Mulcahy, R. T. (2000). "Inhibition of erk and p38 map kinases inhibits binding of nrf2 and induction of gcs genes." *Biochem Biophys Res Commun* 278(2): 484-92.
- Zipper, L. M. und Mulcahy, R. T. (2002). "The keap1 btb/poz dimerization function is required to sequester nrf2 in cytoplasm." *J Biol Chem* 277(39): 36544-52.

6. Anhang

Rohdatentabellen

Tabelle 1.1: TEAC Assay (Abb. 3.1 und 3.2)

	Substanz						
Versuch	Quercetin	Kontrolle	5 µM	10 µM	25 µM	50 µM	100 µM
1		0,751	0,269	0,113	0,063	0,058	0,053
2		0,740	0,395	0,182	0,059	0,057	0,054
3		0,755	0,459	0,136	0,088	0,066	0,061
	Galangin	Kontrolle	5 µM	10 µM	25 µM	50 µM	100 µM
1		0,741	0,808	0,802	0,777	0,762	0,701
2		0,734	0,742	0,733	0,720	0,724	0,689
3		0,785	0,768	0,701	0,668	0,716	0,701
	Kaempferol	Kontrolle	5 µM	10 µM	25 µM	50 µM	100 µM
1		0,801	0,716	0,539	0,346	0,061	0,057
2		0,734	0,583	0,522	0,259	0,061	0,055
3		0,713	0,547	0,529	0,233	0,064	0,058
	Luteolin	Kontrolle	5 µM	10 µM	25 µM	50 µM	100 µM
1		0,785	0,657	0,575	0,259	0,074	0,068
2		0,748	0,557	0,475	0,230	0,080	0,065
3		0,783	0,612	0,413	0,163	0,077	0,065
	Apigenin	Kontrolle	5 µM	10 µM	25 µM	50 µM	100 µM
1		0,772	0,782	0,843	0,804	0,802	0,765
2		0,765	0,752	0,799	0,785	0,751	0,776
3		0,704	0,692	0,693	0,690	0,702	0,713
	Myricetin	Kontrolle	5 µM	10 µM	25 µM	50 µM	100 µM
1		0,754	0,339	0,217	0,061	0,056	0,055
2		0,779	0,388	0,245	0,062	0,055	0,051
3		0,786	0,409	0,252	0,081	0,067	0,063
	Morin	Kontrolle	5 µM	10 µM	25 µM	50 µM	100 µM
1		0,784	0,525	0,511	0,181	0,058	0,048
2		0,737	0,611	0,535	0,162	0,062	0,043
3		0,779	0,596	0,523	0,127	0,067	0,054
	Chrysin	Kontrolle	5 µM	10 µM	25 µM	50 µM	100 µM
1		0,793	0,799	0,796	0,811	0,840	0,835
2		0,763	0,744	0,756	0,749	0,802	0,810
3		0,744	0,773	0,721	0,733	0,761	0,749
	Fisetin	Kontrolle	5 µM	10 µM	25 µM	50 µM	100 µM
1		0,753	0,419	0,252	0,081	0,063	0,054
2		0,763	0,426	0,230	0,096	0,060	0,061
3		0,702	0,420	0,202	0,061	0,057	0,058
	Trolox	Kontrolle	5 µM	10 µM	25 µM	50 µM	100 µM
1		0,723	0,486	0,341	0,282	0,141	0,067
2		0,735	0,561	0,322	0,213	0,101	0,055
3		0,715	0,530	0,319	0,246	0,143	0,063

Tabelle 1.2: DPPH

Versuch	Quercetin	Kontrolle	5 µM	10 µM	25 µM	50 µM	100 µM
1		0,721	0,681	0,493	0,296	0,273	0,191
2		0,746	0,631	0,506	0,31	0,207	0,159
3		0,787	0,689	0,494	0,283	0,191	0,187
	Galangin	Kontrolle	5 µM	10 µM	25 µM	50 µM	100 µM
1		0,745	0,75	0,754	0,721	0,743	0,754
2		0,743	0,759	0,754	0,752	0,744	0,773
3		0,713	0,735	0,709	0,714	0,728	0,741
	Kaempferol	Kontrolle	5 µM	10 µM	25 µM	50 µM	100 µM
1		0,745	0,684	0,562	0,443	0,281	0,043
2		0,747	0,695	0,527	0,493	0,201	0,068
3		0,704	0,676	0,56	0,451	0,275	0,058
	Luteolin	Kontrolle	5 µM	10 µM	25 µM	50 µM	100 µM
1		0,712	0,654	0,539	0,298	0,167	0,146
2		0,751	0,64	0,461	0,218	0,172	0,043
3		0,721	0,651	0,544	0,289	0,155	0,137
	Apigenin	Kontrolle	5 µM	10 µM	25 µM	50 µM	100 µM
1		0,726	0,723	0,741	0,75	0,748	0,759
2		0,756	0,758	0,717	0,728	0,729	0,751
3		0,736	0,722	0,736	0,723	0,741	0,715

Tabelle 1.2 DPPH Fortsetzung

Versuch	Myricetin	Kontrolle	5 µM	10 µM	25 µM	50 µM	100 µM
1		0,727	0,511	0,476	0,274	0,095	0,093
2		0,736	0,624	0,564	0,359	0,083	0,076
3		0,733	0,63	0,551	0,342	0,091	0,069
	Morin	Kontrolle	5 µM	10 µM	25 µM	50 µM	100 µM
1		0,757	0,608	0,553	0,321	0,074	0,053
2		0,732	0,606	0,557	0,316	0,0813	0,064
3		0,716	0,612	0,549	0,333	0,085	0,073
	Chrysin	Kontrolle	5 µM	10 µM	25 µM	50 µM	100 µM
1		0,742	0,749	0,737	0,756	0,752	0,733
2		0,726	0,719	0,702	0,714	0,723	0,733
3		0,729	0,703	0,714	0,721	0,719	0,746
	Fisetin	Kontrolle	5 µM	10 µM	25 µM	50 µM	100 µM
1		0,712	0,534	0,542	0,282	0,152	0,136
2		0,729	0,522	0,446	0,293	0,149	0,116
3		0,728	0,515	0,431	0,282	0,176	0,123
	Trolox	Kontrolle	5 µM	10 µM	25 µM	50 µM	100 µM
1		0,75	0,451	0,369	0,321	0,137	0,053
2		0,731	0,547	0,351	0,204	0,119	0,048
3		0,742	0,562	0,332	0,251	0,163	0,051

Tabelle 2: DCF Assay exogen (H₂O₂ Zugabe) (Abb.3.3 und 3.4)

Kaempferol	Kontrolle			25 µM			50 µM			100 µM		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
0	30986,0	22994,0	27677,0	14503,0	11095,3	12894,3	11469,3	8959,7	10025,7	9061,7	7480,3	7841,3
5	41487,3	31135,0	41874,5	23692,0	16201,7	22271,0	18016,7	12651,0	15422,7	14318,7	10052,3	12615,7
10	58746,0	40128,0	64163,7	36150,3	23726,7	37483,3	27049,0	17801,3	24318,3	21145,0	13410,7	19331,3
15	78418,2	50182,2	92078,2	51182,7	30980,7	57480,0	38531,0	23163,7	36897,7	29177,0	17057,0	28974,0
20	98766,0	60912,3	122520,5	67901,0	39050,7	82454,7	51815,0	29200,3	52132,7	39304,0	21053,0	41356,0
25	121366,3	73620,8	154311,0	87837,0	48280,3	108552,3	67973,0	36142,3	70066,7	51344,3	25712,3	56365,3
30	145823,8	86961,3	185717,2	111186,0	59207,7	136378,0	88054,0	44198,0	89220,0	66813,3	30796,3	75021,7
35	169878,0	102703,0	219482,3	134356,0	71972,7	165399,3	109742,7	53604,0	110462,3	84608,3	37506,0	97683,3
40	193685,2	118872,2	254155,5	157624,3	86225,7	195429,3	131754,0	64912,7	133046,7	104158,3	45163,3	124489,3
45	216840,3	136658,3	288461,7	180983,0	102039,0	225557,3	154188,0	77898,3	156642,0	124525,0	53803,3	152589,7
50	240411,2	154467,8	321415,8	204386,3	118131,3	253707,7	176105,7	91535,3	179313,7	145357,3	63145,7	180373,0

Luteolin	Kontrolle			25 µM			50 µM			100 µM		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
0	30986,0	22994,0	27677,0	23010,7	19257,7	22504,0	20141,0	15842,3	18066,0	12242,0	11151,7	13357,3
5	41487,3	31135,0	41874,5	33016,0	27795,0	34160,7	29490,0	22966,3	27482,7	16841,7	15770,0	19450,3
10	58746,0	40128,0	64163,7	46289,3	35878,7	51406,7	41179,0	29274,0	40111,0	23010,0	20649,0	28351,7
15	78418,2	50182,2	92078,2	60436,7	44928,0	73410,3	53798,0	36608,3	56973,0	29696,7	25986,0	39612,3
20	98766,0	60912,3	122520,5	75936,3	54516,3	97293,0	68422,0	44519,3	74623,7	37186,3	31237,0	51921,0
25	121366,3	73620,8	154311,0	93145,7	65756,0	121502,3	83813,7	53919,0	93182,0	45270,3	37855,0	65487,0
30	145823,8	86961,3	185717,2	111987,0	77776,7	145910,7	101580,3	63588,7	111667,3	55300,3	45478,7	79137,0
35	169878,0	102703,0	219482,3	131420,0	91904,0	171652,0	118121,7	75160,7	130953,7	65173,7	53563,3	93897,0
40	193685,2	118872,2	254155,5	150040,7	106250,7	197630,7	135958,7	87269,7	150526,3	74776,3	62417,3	109038,0
45	216840,3	136658,3	288461,7	166931,0	121601,0	223122,3	152738,7	99760,0	168944,3	84693,7	71793,3	124278,7
50	240411,2	154467,8	321415,8	185767,7	137376,0	247427,0	168360,3	112850,3	186721,0	94371,3	81330,7	139236,0

Fortsetzung Tabelle 2 DCF (exogen) (Abb. 3.3 und 3.4)

Quercetin	Kontrolle			25 µM			50 µM			100 µM		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
0	30986,0	22994,0	27677,0	16191,7	13643,3	18021,3	12227,7	10666,7	13803,7	9771,0	8747,3	9948,3
5	41487,3	31135,0	41874,5	24994,3	19384,0	27751,0	18457,0	15011,7	21061,0	14322,0	11978,7	15559,3
10	58746,0	40128,0	64163,7	35731,3	26264,0	43286,3	26385,7	19999,3	33025,7	20325,3	15537,7	24158,0
15	78418,2	50182,2	92078,2	48482,0	33666,7	63422,7	35745,3	25201,7	48774,0	27664,7	19619,0	35046,0
20	98766,0	60912,3	122520,5	62694,3	41595,3	86324,0	45833,7	31357,0	66963,3	35372,7	24128,3	48138,7
25	121366,3	73620,8	154311,0	78240,0	51292,7	109891,3	57725,7	38016,7	86337,7	43940,3	29151,0	62377,0
30	145823,8	86961,3	185717,2	95902,7	61791,3	134770,7	70871,0	45768,3	105941,7	53879,7	34777,3	77416,7
35	169878,0	102703,0	219482,3	113704,7	73279,7	159968,7	84448,3	54311,3	126567,3	64537,0	41102,3	93698,0
40	193685,2	118872,2	254155,5	132002,7	86106,7	185653,3	98723,7	64205,7	148793,0	75361,3	48362,7	111063,7
45	216840,3	136658,3	288461,7	149932,3	100188,7	212442,0	113092,3	74500,0	171557,3	86244,0	56099,3	129169,7
50	240411,2	154467,8	321415,8	168420,7	114420,7	239046,7	127369,0	86385,0	194260,0	97418,7	64622,0	147122,0

Apigenin	Kontrolle			25 µM			50 µM			100 µM		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
0	30986,0	22994,0	27677,0	31325,0	21240,3	26342,7	30007,7	20010,0	26720,3	25697,7	18670,0	22982,0
5	41487,3	31135,0	41874,5	38507,7	28101,0	39333,0	39492,7	27473,0	39591,0	39189,0	26060,0	36460,7
10	58746,0	40128,0	64163,7	54870,3	37420,0	59438,3	55727,3	36430,0	60556,7	55679,7	35664,3	56267,0
15	78418,2	50182,2	92078,2	73804,0	47211,3	85827,0	74741,3	46316,3	86808,3	75092,3	46003,3	82617,0
20	98766,0	60912,3	122520,5	93518,7	57699,3	114654,7	94806,3	56923,7	115822,7	96289,3	56875,3	110335,7
25	121366,3	73620,8	154311,0	114243,0	70224,7	143746,7	115960,3	68965,3	145537,3	118003,0	69135,7	139191,3
30	145823,8	86961,3	185717,2	138232,3	82888,7	173602,3	139109,3	82021,0	174701,3	143436,0	82234,7	167716,0
35	169878,0	102703,0	219482,3	161531,3	97560,0	203548,3	162633,3	96514,0	205544,7	168199,7	97117,3	197024,3
40	193685,2	118872,2	254155,5	184482,0	113418,0	234900,7	186295,0	112863,7	236635,7	192407,3	113698,7	227423,0
45	216840,3	136658,3	288461,7	206566,3	130427,3	265558,0	208653,0	130144,3	269378,3	217088,0	131382,7	257959,0
50	240411,2	154467,8	321415,8	228490,0	148608,7	296142,7	232662,0	148405,3	299407,0	240614,7	149494,3	286905,7

Galangin	Kontrolle			25 µM			50 µM			100 µM		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
0	30986,0	22994,0	27677,0	19337,0	15527,3	19484,0	17878,0	12813,3	16194,0	15766,3	11714,3	15279,7
5	41487,3	31135,0	41874,5	29299,0	23011,3	31656,7	27077,3	19038,7	27415,7	24313,0	16983,0	25804,7
10	58746,0	40128,0	64163,7	42169,0	29801,7	48431,7	38996,0	25310,0	42649,0	34922,3	21885,7	39652,0
15	78418,2	50182,2	92078,2	56485,7	38299,0	70551,0	53002,3	32184,0	61912,7	46856,3	27957,3	58412,3
20	98766,0	60912,3	122520,5	72575,7	46826,3	94483,7	68993,3	39591,7	83726,3	61444,0	34487,0	79026,7
25	121366,3	73620,8	154311,0	90293,0	56675,3	119439,7	85941,7	48189,7	107595,7	76923,0	42500,0	102702,0
30	145823,8	86961,3	185717,2	110526,0	67192,3	144892,0	105999,7	57846,3	131990,0	95866,3	50973,7	128234,0
35	169878,0	102703,0	219482,3	130640,3	79948,7	173587,3	126057,0	69206,3	159070,3	114130,3	60485,7	156356,3
40	193685,2	118872,2	254155,5	151850,3	93814,7	202274,3	146416,3	80764,3	186894,3	133507,3	71480,0	187057,3
45	216840,3	136658,3	288461,7	172342,3	108829,3	231380,0	167050,0	94896,7	215632,7	152436,3	83560,0	218546,7
50	240411,2	154467,8	321415,8	193047,0	123377,3	259412,0	188020,7	108218,0	242790,7	172911,0	95197,3	248219,7

Morin	Kontrolle			25 µM			50 µM			100 µM		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
0	30986,0	22994,0	27677,0	13425,0	10791,7	11435,0	10301,7	8195,0	9336,3	8351,7	7066	8045
5	41487,3	31135,0	41874,5	21427,3	17108,3	20096,7	15922,3	10878,0	15626,7	11815,7	8967	11750
10	58746,0	40128,0	64163,7	32393,7	23690,0	32385,0	23598,0	13983,7	25008,3	16315,7	10830	17651
15	78418,2	50182,2	92078,2	45061,0	31445,7	49488,3	32177,3	17262,0	38037,0	21656,3	13102	25827
20	98766,0	60912,3	122520,5	60008,7	39840,7	69803,3	42693,7	21038,7	53667,7	27701,3	15609	35250
25	121366,3	73620,8	154311,0	78408,3	50530,3	93359,7	55587,0	26002,7	73618,7	34933,3	18575	46555
30	145823,8	86961,3	185717,2	101481,3	61917,3	119049,7	71795,3	31628,0	95747,0	44578,0	21813	59989
35	169878,0	102703,0	219482,3	123282,0	76510,3	147449,3	89081,0	38147,0	122580,3	54638,7	25778	77154
40	193685,2	118872,2	254155,5	147536,7	92300,3	176806,7	108114,0	46280,3	150595,3	66147,7	30419	96919
45	216840,3	136658,3	288461,7	170357,7	110333,7	207602,7	128148,0	55993,7	181148,0	78565,0	35653	119228
50	240411,2	154467,8	321415,8	193817,3	129249,7	236269,0	148584,0	66238,3	210630,3	91905,7	41125	143309

Fortsetzung Tabelle 2 DCF (exogen)(Abb. 3.3 und 3.4)

Myricetin	Kontrolle			25 µM			50 µM			100 µM		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
0	107095,7	81415,3	47055,7	97318,3	73180,7	41604,7	93820,0	70729,7	41185,0	88120,0	66160,7	39263,3
5	125866,3	95926,3	69500,3	111589,3	86758,3	58958,3	107007,7	82699,7	56672,3	102211,0	77193,0	52808,7
10	143355,0	113553,3	94221,3	128912,0	102435,0	80850,3	122868,7	99288,3	76390,3	116118,3	90949,3	70664,7
15	163849,7	130259,0	123614,3	146404,0	118258,0	103767,0	139550,3	114431,3	98112,7	130990,7	103483,7	89842,3
20	185151,0	149587,7	155629,7	164209,0	134951,0	130619,7	156380,7	131275,7	122910,7	146815,3	117744,3	111851,3
25	207162,0	169086,7	189092,3	183530,3	152543,0	158666,0	175032,3	148561,3	148830,3	163191,3	132678,7	134949,3
30	227479,0	189112,7	221313,7	202266,7	171635,0	186004,3	193840,3	166766,7	175696,7	181034,7	148102,0	159130,7
35	248040,3	210081,7	252621,3	220820,7	191643,3	213019,0	212824,7	185876,3	201503,0	197324,7	164973,3	182492,7
40	268624,0	231508,3	283850,3	240054,0	211886,7	239435,7	230536,3	206186,0	226695,3	214174,7	182463,7	206709,3
45	290145,3	253475,3	314774,3	260495,0	231823,3	265599,0	249821,7	225456,7	252143,3	231905,0	200131,0	230495,3
50	308752,7	274170,3	344800,3	277716,7	251606,7	291506,3	268396,0	244160,3	277556,3	247800,7	217027,3	254286,0

Chrysin	Kontrolle			25 µM			50 µM			100 µM		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
0	107095,7	81415,3	47055,7	103507,0	79821,7	47558,3	100674,3	78087,7	44979,7	103702,0	79192,7	45441,3
5	125866,3	95926,3	69500,3	119763,7	95541,7	68312,0	118200,0	92407,3	65570,0	121787,3	94763,3	67527,7
10	143355,0	113553,3	94221,3	138290,3	113038,0	94080,0	138127,7	110198,0	89821,0	142562,3	113827,3	94029,3
15	163849,7	130259,0	123614,3	159786,7	129783,3	121714,0	159917,3	126556,3	116399,3	164900,3	132523,7	123214,3
20	185151,0	149587,7	155629,7	179682,0	148596,3	151642,0	180368,7	145389,7	145563,7	187274,0	153331,3	155319,3
25	207162,0	169086,7	189092,3	200842,0	168994,7	183049,3	202382,3	164155,7	176682,0	210315,7	174764,0	188412,7
30	227479,0	189112,7	221313,7	221734,0	188556,0	213535,7	224065,0	184562,0	205340,7	233870,3	196442,0	221409,0
35	248040,3	210081,7	252621,3	241978,7	209965,7	242470,7	244683,7	206756,7	234131,3	256761,0	219722,3	253359,3
40	268624,0	231508,3	283850,3	262424,3	231034,7	270873,7	266521,7	228333,0	261924,7	279821,0	244029,0	285449,3
45	290145,3	253475,3	314774,3	283878,3	251851,0	300285,3	287753,3	249105,3	290368,7	302723,0	268276,3	317921,3
50	308752,7	274170,3	344800,3	303308,3	270993,7	327139,3	307840,3	270002,0	317504,3	325615,0	290980,3	348566,0

Fisetin	Kontrolle			25 µM			50 µM			100 µM		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
0	107095,7	81415,3	47055,7	90177,7	66239,7	38001,0	84646,3	61784,7	35096,3	81382,7	58822,0	33023,0
5	125866,3	95926,3	69500,3	102779,0	77838,0	51099,7	93633,3	69457,7	44948,0	87587,0	65288,7	40410,3
10	143355,0	113553,3	94221,3	117133,7	90780,0	69001,7	103806,7	78993,0	57454,7	95095,7	71906,7	50006,0
15	163849,7	130259,0	123614,3	131509,0	104007,0	88233,3	114130,7	88589,0	71971,7	102972,7	78328,7	60360,0
20	185151,0	149587,7	155629,7	145766,7	117418,0	109229,0	124088,0	98567,3	87791,3	110860,3	85756,0	72289,3
25	207162,0	169086,7	189092,3	161499,3	131734,7	131955,7	135726,3	109274,3	105222,0	118556,3	93694,7	85447,0
30	227479,0	189112,7	221313,7	176916,3	148923,0	154682,7	147068,3	120576,7	123244,7	127637,7	101106,3	98792,3
35	248040,3	210081,7	252621,3	192711,7	163989,3	176107,3	158417,0	131651,3	140260,3	135102,7	109576,0	112092,0
40	268624,0	231508,3	283850,3	208739,0	180141,3	198366,0	169896,0	143631,7	157654,3	143243,7	118682,7	125524,7
45	290145,3	253475,3	314774,3	225103,7	198203,0	219680,7	182155,3	155629,0	175794,3	152041,3	127539,7	139181,3
50	308752,7	274170,3	344800,3	240531,0	213608,0	241957,3	193045,0	166986,7	193170,7	159358,3	135431,0	153833,3

Tabelle 2.1: DCF Assay endogen (ohne H₂O₂ Zugabe) (Abb. 3.5 und 3.6)

Quercetin	Kontrolle			25 µM			50 µM			100 µM		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
0	28128	28128	24531	15409	15409	11581	14571	14571	10705	14272	14272	11243
5	37047	37047	36252	18827	18827	14602	17076	17076	12872	16785	16785	13389
10	48258	48258	49729	22992	22992	17952	20226	20226	15292	19787	19787	15259
15	60622	60622	64203	27864	27864	21792	23846	23846	17800	22887	22887	17411
20	76049	76049	80873	33475	33475	26448	27817	27817	20705	26171	26171	19610
25	93103	93103	100213	39881	39881	31911	33009	33009	24192	30405	30405	22191
30	112763	112763	122379	47554	47554	38248	38924	38924	28310	35051	35051	24885
35	135874	135874	147209	56325	56325	45143	45919	45919	33312	40807	40807	28339
40	165132	165132	173924	68193	68193	53056	55713	55713	38926	49027	49027	32182
45	198285	198285	202990	81245	81245	61908	66761	66761	45539	58175	58175	36754
50	235343	235343	234330	95375	95375	71840	79082	79082	52442	68587	68587	41940

Fortsetzung Tabelle 2.1 DCF (endogen) (Abb. 3.5 und 3.6)

Kaempf-	Kontrolle			25 µM			50 µM			100 µM		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
0	28128	28128	24531	17614	17614	13432	17821	17821	12352	16740	16740	12142
5	37047	30953	36252	21346	21346	17160	20806	20806	15678	19712	19712	15067
10	48258	48531	49729	26940	26940	21841	25653	25653	19262	23740	23740	18292
15	60622	71681	64203	33207	33207	27278	31040	31040	23356	28823	28823	21972
20	76049	102244	80873	40267	40267	33191	37251	37251	28343	34497	34497	26153
25	93103	140919	100213	49175	49175	40120	44198	44198	33776	40713	40713	30809
30	112763	186954	122379	58701	58701	48026	52040	52040	39860	48049	48049	36184
35	135874	237355	147209	69799	69799	57377	61200	61200	47023	56275	56275	42574
40	165132	290620	173924	84437	84437	67829	72659	72659	55141	67038	67038	49455
45	198285	345290	202990	101888	101888	79493	86070	86070	64447	79414	79414	56842
50	235343	401164	234330	120958	120958	92162	100677	100677	74491	92907	92907	65726

Luteolin	Kontrolle			25 µM			50 µM			100 µM		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
0	28128	28128	24531	16009	16009	11649	16010	16010	11602	15358	15358	11907
5	37047	30953	36252	19463	19463	14410	19502	19502	14254	18199	18199	14521
10	48258	48531	49729	23765	23765	17346	23302	23302	17102	21676	21676	17582
15	60622	71681	64203	28862	28862	20881	27801	27801	20526	25687	25687	20900
20	76049	102244	80873	34127	34127	24825	32537	32537	24273	30060	30060	24668
25	93103	140919	100213	40244	40244	29191	38361	38361	28351	35134	35134	28782
30	112763	186954	122379	47192	47192	34099	44790	44790	33187	40364	40364	33508
35	135874	237355	147209	55041	55041	39527	51771	51771	38265	47216	47216	39057
40	165132	290620	173924	65272	65272	45920	61292	61292	44347	55600	55600	45387
45	198285	345290	202990	76287	76287	52605	71839	71839	51188	65022	65022	52231
50	235343	401164	234330	88056	88056	59891	83384	83384	58315	75414	75414	60198

Apigenin	Kontrolle			25 µM			50 µM			100 µM		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
0	28128	28128	24531	28071	28071	29301	28026	28026	30865	27268	27268	30064
5	37047	30953	36252	37343	37343	42448	38069	38069	45633	37800	37800	45472
10	48258	48531	49729	50298	50298	59052	51856	51856	63523	51546	51546	62816
15	60622	71681	64203	64632	64632	78301	67281	67281	84159	66659	66659	83370
20	76049	102244	80873	81729	81729	98911	84597	84597	106813	84503	84503	106073
25	93103	140919	100213	100589	100589	121675	104938	104938	131703	105071	105071	130638
30	112763	186954	122379	121898	121898	147329	127537	127537	159518	128065	128065	159387
35	135874	237355	147209	147166	147166	175540	153982	153982	190202	154617	154617	190469
40	165132	290620	173924	178769	178769	205690	187178	187178	223562	190125	190125	224215
45	198285	345290	202990	214207	214207	238304	225326	225326	258655	228174	228174	260181
50	235343	401164	234330	254287	254287	272635	266519	266519	296431	271867	271867	299155

Morin	Kontrolle			25 µM			50 µM			100 µM		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
0	13694,0	14269,8	14835,0	13345,0	13811,0	14186,0	13195,0	13652,0	13625,0	12736,0	13143	13257
5	15390,0	15578,7	17106,0	14891,0	15182,3	16024,0	14642,0	15110,0	15338,0	14028,0	14250	14668
10	16408,0	16613,0	18729,0	15915,0	16263,3	17607,0	15341,0	15894,3	16681,0	14659,0	15061	15732
15	17445,0	17827,8	20508,0	16964,0	17332,0	18899,0	16396,0	16992,3	17876,0	15542,0	15925	17035
20	18738,0	19190,5	22258,0	18052,0	18575,0	20475,0	17180,0	17996,0	19058,0	16298,0	16705	18063
25	20213,0	20264,0	24308,0	19391,0	19736,3	22009,0	18506,0	19037,3	20334,0	17204,0	17616	19280
30	21587,0	21820,7	26426,0	20782,0	20961,0	24034,0	19690,0	20300,7	22200,0	18123,0	18664	20877
35	23346,0	23240,2	29101,0	22167,0	22558,3	26371,0	21066,0	21463,3	24118,0	19391,0	19534	22376
40	25064,0	24887,0	25064,0	23628,0	23939,3	28389,0	22455,0	22703,7	25682,0	20527,0	20786	23843
45	27070,0	26555,0	31551,0	25869,0	25596,3	31290,0	24441,0	23864,0	27962,0	21891,0	21730	25811
50	29034,0	28437,2	34748,0	27742,0	27284,3		25680,0	25720,7		23494,0	23108	

Fortsetzung Tabelle 2.1 DCF (endogen) (Abb. 3.5 und 3.6)

Galangi	Kontrolle			25 µM			50 µM			100 µM		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
0	13694,0	14269,8	14835,0	13563,0	14045,0	14375,0	13374,0	14163,0	14909,0	13540,0	13879,3	14761,0
5	15390,0	15578,7	17106,0	14792,0	15264,3	16471,0	14967,0	15762,7	17278,0	15310,0	15279,0	17096,0
10	16408,0	16613,0	18729,0	15883,0	16426,0	17957,0	16003,0	16842,7	18784,0	16368,0	16475,3	18684,0
15	17445,0	17827,8	20508,0	17166,0	17500,0	19569,0	17132,0	17981,3	20487,0	17612,0	17617,3	20538,0
20	18738,0	19190,5	22258,0	18353,0	18655,7	21002,0	18436,0	19218,0	22139,0	18983,0	19123,3	22302,0
25	20213,0	20264,0	24308,0	19601,0	19828,7	23003,0	19927,0	20708,7	24334,0	20381,0	20194,7	24363,0
30	21587,0	21820,7	26426,0	21048,0	21171,3	25041,0	21074,0	21973,7	26832,0	21893,0	21870,0	26765,0
35	23346,0	23240,2	29101,0	22749,0	22420,3	27255,0	22861,0	23586,0	29207,0	23852,0	23555,0	29125,0
40	25064,0	24887,0	25064,0	24307,0	24153,0	29748,0	24715,0	25560,3	31708,0	25806,0	25499,3	32020,0
45	27070,0	26555,0	31551,0	26220,0	25899,7	32680,0	26850,0	27399,0	34829,0	27971,0	27612,3	35083,0
50	29034,0	28437,2	34748,0	28290,0	27608,0	35603,0	28976,0	29284,7	37788,0	30067,0	29574,0	38190,0

Mvriceti	Kontrolle			25 µM			50 µM			100 µM		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
0	13694,0	14269,8	14835,0	13010,0	13683,7	14196,0	12974,0	14006,7	13955,0	13005,0	13991,0	13952,0
5	15390,0	15578,7	17106,0	14421,0	15153,3	15790,0	14044,0	15311,0	15492,0	14297,0	15334,7	15574,0
10	16408,0	16613,0	18729,0	15349,0	16302,3	16997,0	14968,0	16259,3	16653,0	14998,0	16253,0	16562,0
15	17445,0	17827,8	20508,0	16288,0	17097,3	18267,0	15980,0	17061,7	18031,0	15950,0	17468,7	17935,0
20	18738,0	19190,5	22258,0	17190,0	18198,0	19636,0	16800,0	18402,7	19141,0	16869,0	18640,7	18924,0
25	20213,0	20264,0	24308,0	18465,0	19350,7	21368,0	17832,0	19467,7	20734,0	17876,0	19803,0	20401,0
30	21587,0	21820,7	26426,0	19532,0	20572,0	23069,0	18820,0	20948,7	22456,0	19085,0	21276,0	21759,0
35	23346,0	23240,2	29101,0	20887,0	22040,7	24786,0	20076,0	21988,0	24397,0	20029,0	22421,7	23680,0
40	25064,0	24887,0	25064,0	22446,0	23445,3	27120,0	21142,0	23503,3	26207,0	21289,0	24204,0	25422,0
45	27070,0	26555,0	31551,0	24043,0	24981,3	29484,0	22558,0	25132,0	28492,0	22884,0	25661,0	27742,0
50	29034,0	28437,2	34748,0	25644,0	26665,0	32080,0	24399,0	26832,7	30952,0	24602,0	27181,3	29760,0

Chrysin	Kontrolle			25 µM			50 µM			100 µM		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
0	13694,0	14269,8	14835,0	13257,0	13903,3	14416,0	13579,0	14168,3	14886,0	13461,0	14207,7	14929,0
5	15390,0	15578,7	17106,0	14832,0	15421,0	16443,0	15079,0	15880,3	17358,0	15116,0	15833,3	17198,0
10	16408,0	16613,0	18729,0	15829,0	16501,3	17973,0	16406,0	16891,3	18733,0	16388,0	17034,3	18823,0
15	17445,0	17827,8	20508,0	16900,0	17588,0	19501,0	17700,0	18146,0	20569,0	17540,0	18290,3	20749,0
20	18738,0	19190,5	22258,0	18102,0	18574,3	20920,0	18777,0	19406,3	22252,0	18768,0	19750,0	22446,0
25	20213,0	20264,0	24308,0	19291,0	19776,0	22984,0	20303,0	20832,0	24421,0	20472,0	21253,3	24874,0
30	21587,0	21820,7	26426,0	20748,0	20880,7	25110,0	21840,0	22460,0	26800,0	21946,0	22633,7	27183,0
35	23346,0	23240,2	29101,0	22244,0	22455,7	27222,0	23317,0	23944,0	29230,0	23880,0	24598,3	29986,0
40	25064,0	24887,0	25064,0	23964,0	23724,7	29681,0	25438,0	25715,7	31752,0	25878,0	26669,0	32966,0
45	27070,0	26555,0	31551,0	25986,0	25299,3	32321,0	27363,0	27240,7	34812,0	28331,0	28681,0	36199,0
50	29034,0	28437,2	34748,0	28070,0	27038,7	35037,0	29655,0	29517,7	38248,0	30797,0	31115,3	40172,0

Fisetin	Kontrolle			25 µM			50 µM			100 µM		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
0	13694,0	14269,8	14835,0	13048,0	13908,0	13926,0	12502,0	13192,3	12809,0	12242,0	13155,3	13456,0
5	15390,0	15578,7	17106,0	14551,0	15137,3	15823,0	13746,0	14482,7	13970,0	13197,0	14205,0	15162,0
10	16408,0	16613,0	18729,0	15356,0	16163,7	17144,0	14528,0	15369,3	14977,0	13844,0	15156,0	16100,0
15	17445,0	17827,8	20508,0	16147,0	17131,7	18519,0	15213,0	16393,3	15746,0	14553,0	15906,0	17328,0
20	18738,0	19190,5	22258,0	17028,0	18209,7	19776,0	16173,0	17198,3	16597,0	15163,0	16804,0	18521,0
25	20213,0	20264,0	24308,0	18166,0	19392,7	21495,0	16919,0	18339,7	17707,0	16073,0	17694,0	19884,0
30	21587,0	21820,7	26426,0	19307,0	20450,3	23107,0	17915,0	19405,3	18837,0	16721,0	18748,3	21158,0
35	23346,0	23240,2	29101,0	20480,0	21895,0	25085,0	19032,0	20583,3	19948,0	17701,0	19931,3	22900,0
40	25064,0	24887,0	25064,0	21851,0	23146,7	26963,0	20265,0	21730,7	21307,0	18457,0	20903,0	24445,0
45	27070,0	26555,0	31551,0	23470,0	24704,7	29099,0	21472,0	23024,3	22677,0	19758,0	22263,7	26407,0
50	29034,0	28437,2	34748,0	24920,0	26351,7		22706,0	24407,0		20871,0	23568,7	

Tabelle 3: MTT-Assay Hct 116 tBHQ und Na-Arsenit (Abb. 3.7)

	Kontrolle	Arsenit			
		10 µM	20 µM	30 µM	40 µM
1	0,454	0,457	0,441	0,394	0,088
	0,564	0,447	0,379	0,418	0,127
	0,512	0,446	0,398	0,343	0,132
	0,482				
	0,559				
	0,459				
Mittelwert	0,505	0,450	0,406	0,385	0,116
2	0,480	0,457	0,452	0,388	0,162
	0,479	0,488	0,390	0,397	0,141
	0,454	0,482	0,413	0,415	0,147
	0,526				
	0,544				
	0,544				
Mittelwert	0,504	0,476	0,418	0,400	0,150
3	0,492	0,560	0,446	0,374	0,140
	0,538	0,509	0,428	0,398	0,126
	0,517	0,543	0,413	0,406	0,103
	0,531				
	0,491				
	0,496				
Mittelwert	0,511	0,538	0,429	0,393	0,123
4	0,460	0,395	0,263	0,309	0,137
	0,468	0,472	0,421	0,308	0,185
	0,425	0,494	0,408	0,329	0,131
	0,467				
	0,418				
	0,422				
Mittelwert	0,444	0,454	0,364	0,315	0,151

	Kontrolle	tBHQ			
		25 µM	50 µM	100 µM	250 µM
1	0,479	0,459	0,412	0,044	0,037
	0,451	0,400	0,380	0,037	0,039
	0,412	0,358	0,262	0,035	0,038
	0,431				
	0,497				
	0,419				
Mittelwert	0,448	0,406	0,352	0,039	0,038
2	0,438	0,472	0,374	0,041	0,035
	0,427	0,374	0,318	0,040	0,037
	0,514	0,474	0,196	0,039	0,037
	0,448				
	0,594				
	0,467				
Mittelwert	0,481	0,440	0,296	0,040	0,036
3	0,407	0,415	0,428	0,038	0,037
	0,404	0,410	0,368	0,065	0,048
	0,384	0,407	0,267	0,036	0,039
	0,330				
	0,426				
	0,431				
Mittelwert	0,397	0,410	0,354	0,046	0,041
4	0,386	0,435	0,413	0,035	0,038
	0,376	0,485	0,330	0,038	0,035
	0,348	0,357	0,244	0,041	0,038
	0,413				
	0,359				
	0,481				
Mittelwert	0,394	0,426	0,329	0,038	0,037

Tabelle 3.1: MTT-Assay Caco 2 tBHQ und Na-Arsenit (Abb. 3.8)

	Kontrolle	Arsenit			
		10 µM	20 µM	30 µM	40 µM
1	0,791	0,714	0,709	0,734	0,680
	0,767	0,704	0,686	0,733	0,743
	0,778	0,724	0,664	0,726	0,725
	0,703				
	0,714				
	0,723				
	Mittelwert	0,746	0,714	0,686	0,731
2	0,724	0,709	0,540	0,634	0,455
	0,725	0,577	0,713	0,702	0,743
	0,739	0,722	0,711	0,722	0,680
	0,680				
	0,768				
	0,719				
Mittelwert	0,726	0,669	0,655	0,686	0,626
3	0,389	0,442	0,427	0,327	0,307
	0,437	0,443	0,330	0,402	0,361
	0,444	0,449	0,396	0,385	0,333
	0,463				
	0,438				
	0,429				
Mittelwert	0,433	0,445	0,384	0,371	0,334
4	0,496	0,506	0,439	0,374	0,381
	0,562	0,472	0,381	0,410	0,372
	0,439	0,450	0,478	0,371	0,387
	0,481				
	0,507				
	0,411				
Mittelwert	0,483	0,476	0,432	0,385	0,380

	Kontrolle	tBHQ			
		25 µM	50 µM	100 µM	250 µM
1	0,789	0,568	0,583	0,314	0,042
	0,678	0,473	0,671	0,325	0,042
	0,627	0,595	0,630	0,139	0,054
	0,652				
	0,628				
	0,608				
Mittelwert	0,66	0,545	0,628	0,259	0,046
2	0,558	0,587	0,640	0,522	0,050
	0,593	0,589	0,679	0,301	0,040
	0,593	0,667	0,700	0,122	0,038
	0,465				
	0,601				
	0,628				
Mittelwert	0,573	0,615	0,673	0,315	0,043
3	0,390	0,453	0,377	0,039	0,041
	0,360	0,461	0,439	0,037	0,038
	0,428	0,428	0,440	0,037	0,036
	0,449				
	0,436				
	0,410				
Mittelwert	0,412	0,448	0,418	0,038	0,039
4	0,577	0,479	0,445	0,047	0,044
	0,475	0,454	0,468	0,043	0,040
	0,499	0,507	0,397	0,037	0,045
	0,417				
	0,483				
	0,551				
Mittelwert	0,500	0,480	0,436	0,043	0,043

Tabelle 4: MTT-Assay Flavonoide Hct 116
24h (Abb. 3.11)

	Kontrolle	Quercetin		
		25 µM	50 µM	100 µM
1	0,620	0,621	0,477	0,416
	0,548	0,644	0,481	0,375
	0,522			
	0,550			
	0,619			
Mittelwert	0,534			
2	0,56	0,63	0,48	0,40
	0,632	0,626	0,550	0,390
	0,523	0,508	0,499	0,471
	0,478			
	0,523			
Mittelwert	0,475			
3	0,434			
	0,54	0,57	0,52	0,43
	0,638	0,579	0,465	0,380
	0,560	0,619	0,426	0,280
	0,618			
Mittelwert	0,492			
	0,465			
	0,528			
	0,55	0,60	0,45	0,33

	Kontrolle	Luteolin		
		25 µM	50 µM	100 µM
1	0,620	0,621	0,477	0,416
	0,548	0,644	0,481	0,375
	0,522			
	0,550			
	0,619			
Mittelwert	0,534			
2	0,56	0,63	0,48	0,40
	0,632	0,626	0,550	0,390
	0,523	0,508	0,499	0,471
	0,478			
	0,523			
Mittelwert	0,475			
3	0,434			
	0,54	0,57	0,52	0,43
	0,638	0,579	0,465	0,380
	0,560	0,619	0,426	0,280
	0,618			
Mittelwert	0,492			
	0,465			
	0,528			
	0,55	0,60	0,45	0,33

	Kontrolle	Apigenin		
		25 µM	50 µM	100 µM
1	0,521	0,228	0,299	0,237
	0,553	0,236	0,334	0,251
	0,535			
	0,561			
	0,586			
Mittelwert	0,425			
2	0,53	0,23	0,32	0,24
	0,549	0,327	0,331	0,221
	0,461	0,343	0,318	0,225
	0,482			
	0,481			
Mittelwert	0,469			
3	0,446			
	0,48	0,33	0,32	0,22
	0,521	0,228	0,299	0,237
	0,553	0,236	0,334	0,251
	0,535			
Mittelwert	0,561			
	0,586			
	0,425			
	0,53	0,23	0,32	0,24

Tabelle 4: MTT-Assay Flavonoide Hct 116
24h (Abb. 3.11) Forstsetzung

	Kontrolle	Galangin		
		25 µM	50 µM	100 µM
1	0,620	0,427	0,420	0,276
	0,548	0,481	0,495	0,143
	0,522			
	0,550			
	0,619			
Mittelwert	0,534			
2	0,57	0,45	0,46	0,21
	0,632	0,377	0,385	0,375
	0,523	0,437	0,472	0,161
	0,478			
	0,523			
Mittelwert	0,475			
3	0,434			
	0,51	0,41	0,43	0,27
	0,638	0,500	0,433	0,206
	0,560	0,525	0,531	0,108
	0,618			
Mittelwert	0,492			
	0,465			
	0,528			
	0,55	0,51	0,48	0,16

	Kontrolle	Myricetin		
		25 µM	50 µM	100 µM
1	0,620	0,522	0,528	0,347
	0,548	0,591	0,582	0,457
	0,522			
	0,550			
	0,619			
Mittelwert	0,534			
2	0,57	0,56	0,56	0,40
	0,632	0,593	0,535	0,473
	0,523	0,520	0,583	0,490
	0,478			
	0,523			
Mittelwert	0,475			
3	0,434			
	0,51	0,56	0,56	0,48
	0,638	0,532	0,530	0,445
	0,560	0,560	0,572	0,374
	0,618			
Mittelwert	0,492			
	0,465			
	0,528			
	0,55	0,55	0,55	0,41

	Kontrolle	Morin		
		25 µM	50 µM	100 µM
1	0,620	0,528	0,575	0,519
	0,548	0,555	0,571	0,618
	0,522			
	0,550			
	0,619			
Mittelwert	0,534			
2	0,57	0,54	0,57	0,57
	0,632	0,499	0,304	0,502
	0,523	0,450	0,531	0,514
	0,478			
	0,523			
Mittelwert	0,475			
3	0,434			
	0,51	0,47	0,42	0,51
	0,638	0,560	0,510	0,580
	0,560	0,520	0,580	0,585
	0,618			
Mittelwert	0,492			
	0,465			
	0,528			
	0,55	0,54	0,55	0,58

Tabelle 4: MTT-Assay Flavonoide Hct 116 24h (Abb. 3.11) Fortsetzung

	Kontrolle	Chrysin		
		25 µM	50 µM	100 µM
1	0,382	0,131	0,138	0,183
	0,468	0,124	0,234	0,128
	0,461			
	0,531			
	0,531			
Mittelwert	0,48	0,13	0,19	0,16
2	0,521	0,258	0,302	0,280
	0,553	0,300	0,340	0,309
	0,535			
	0,561			
	0,586			
Mittelwert	0,53	0,28	0,32	0,29
3	0,549	0,258	0,278	0,230
	0,461	0,271	0,289	0,207
	0,482			
	0,481			
	0,469			
Mittelwert	0,48	0,26	0,28	0,22

	Kontrolle	Fisetin		
		25 µM	50 µM	100 µM
1	0,382	0,278	0,227	0,190
	0,468	0,308	0,235	0,165
	0,461			
	0,531			
	0,531			
Mittelwert	0,48	0,29	0,23	0,18
2	0,521	0,457	0,377	0,386
	0,553	0,421	0,366	0,338
	0,535			
	0,561			
	0,586			
Mittelwert	0,53	0,44	0,37	0,36
3	0,549	0,324	0,270	0,253
	0,461	0,337	0,274	0,321
	0,482			
	0,481			
	0,469			
Mittelwert	0,48	0,33	0,27	0,29

	Kontrolle	Kaempferol		
		25 µM	50 µM	100 µM
1	0,382	0,418	0,393	0,285
	0,468	0,344	0,279	0,314
	0,461			
	0,531			
	0,531			
Mittelwert	0,48	0,38	0,34	0,30
2	0,521	0,538	0,587	0,589
	0,553	0,602	0,579	0,459
	0,535			
	0,561			
	0,586			
Mittelwert	0,53	0,57	0,58	0,52
3	0,549	0,405	0,554	0,373
	0,461	0,459	0,426	0,365
	0,482			
	0,481			
	0,469			
Mittelwert	0,48	0,43	0,49	0,37

Tabelle 5: MTT-Assay Flavonoide Caco 2 24h (Abb. 3.12)

	Kontrolle	Quercetin		
		25 µM	50 µM	100 µM
1	0,831	0,804	0,886	0,664
	0,777	0,809	0,882	0,725
	0,789			
	0,754			
	0,736			
Mittelwert	0,78	0,81	0,88	0,69
2	0,640	0,694	0,648	0,693
	0,557	0,573	0,516	0,444
	0,534			
	0,550			
	0,510			
Mittelwert	0,55	0,63	0,58	0,57
3	0,293	0,244	0,194	0,203
	0,253	0,260	0,225	0,165
	0,267			
	0,280			
	0,260			
Mittelwert	0,27	0,25	0,21	0,18

	Kontrolle	Kaempferol		
		25 µM	50 µM	100 µM
1	0,623	0,711	0,743	0,691
	0,700	0,711	0,733	0,754
	0,717			
	0,731			
	0,727			
Mittelwert	0,70	0,71	0,74	0,72
2	0,558	0,444	0,381	0,304
	0,563	0,504	0,430	0,427
	0,509			
	0,498			
	0,526			
Mittelwert	0,52	0,47	0,41	0,37
3	0,308	0,211	0,203	0,168
	0,346	0,219	0,153	0,137
	0,279			
	0,255			
	0,297			
Mittelwert	0,29	0,22	0,18	0,15

	Kontrolle	Luteolin		
		25 µM	50 µM	100 µM
1	0,831	0,662	0,745	0,841
	0,777	0,644	0,749	0,844
	0,789			
	0,754			
	0,736			
Mittelwert	0,78	0,65	0,75	0,84
2	0,640	0,324	0,443	0,515
	0,557	0,318	0,331	0,461
	0,534			
	0,550			
	0,510			
Mittelwert	0,55	0,32	0,39	0,49
3	0,293	0,180	0,222	0,182
	0,253	0,111	0,127	0,113
	0,267			
	0,280			
	0,260			
Mittelwert	0,27	0,15	0,17	0,15

Tabelle 5: MTT-Assay Flavonoide Caco 2 24h

(Abb. 3.12) Fortsetzung

	Kontrolle	Apigenin		
		25 µM	50 µM	100 µM
1	0,623	0,578	0,598	0,568
	0,700	0,624	0,680	0,635
	0,717			
	0,731			
	0,727			
	0,691			
Mittelwert	0,70	0,60	0,64	0,60
2	0,558	0,598	0,644	0,607
	0,563	0,520	0,641	0,703
	0,509			
	0,498			
	0,526			
	0,491			
Mittelwert	0,52	0,56	0,64	0,66
3	0,308	0,330	0,311	0,178
	0,346	0,348	0,341	0,252
	0,279			
	0,255			
	0,297			
	0,285			
Mittelwert	0,29	0,34	0,33	0,22

	Kontrolle	Galangin		
		25 µM	50 µM	100 µM
1	0,831	0,854	0,854	0,456
	0,777	0,758	0,850	0,498
	0,789			
	0,754			
	0,736			
	0,816			
Mittelwert	0,78	0,81	0,85	0,48
2	0,640	0,492	0,516	0,301
	0,557	0,513	0,506	0,283
	0,534			
	0,550			
	0,510			
	0,483			
Mittelwert	0,55	0,50	0,51	0,29
3	0,293	0,212	0,191	0,089
	0,253	0,223	0,172	0,118
	0,267			
	0,280			
	0,260			
	0,279			
Mittelwert	0,27	0,22	0,18	0,10

	Kontrolle	Myricetin		
		25 µM	50 µM	100 µM
1	0,831	0,810	0,859	0,771
	0,777	0,806	0,762	0,811
	0,789			
	0,754			
	0,736			
	0,816			
Mittelwert	0,78	0,81	0,81	0,79
2	0,640	0,665	0,623	0,597
	0,557	0,606	0,528	0,371
	0,534			
	0,550			
	0,510			
	0,483			
Mittelwert	0,55	0,64	0,58	0,48
3	0,293	0,231	0,114	0,150
	0,253	0,251	0,212	0,243
	0,267			
	0,280			
	0,260			
	0,279			
Mittelwert	0,27	0,24	0,16	0,20

Tabelle 5: MTT-Assay Flavonoide Caco 2 24h

(Abb. 3.12) Fortsetzung

	Kontrolle	Morin		
		25 µM	50 µM	100 µM
1	0,831	0,770	0,785	0,821
	0,777	0,820	0,805	0,781
	0,789			
	0,754			
	0,736			
	0,816			
Mittelwert	0,831	0,770	0,785	0,80
2	0,640	0,568	0,560	0,584
	0,557	0,542	0,591	0,539
	0,534			
	0,550			
	0,510			
	0,483			
Mittelwert	0,55	0,55	0,58	0,56
3	0,293	0,240	0,257	0,260
	0,253	0,272	0,277	0,256
	0,267			
	0,280			
	0,260			
	0,279			
Mittelwert	0,27	0,26	0,27	0,26

	Kontrolle	Chrysin		
		25 µM	50 µM	100 µM
1	0,623	0,657	0,648	0,619
	0,700	0,625	0,640	0,528
	0,717			
	0,731			
	0,727			
	0,691			
Mittelwert	0,70	0,64	0,64	0,57
2	0,558	0,493	0,491	0,634
	0,563	0,479	0,496	0,549
	0,509			
	0,498			
	0,526			
	0,491			
Mittelwert	0,52	0,49	0,49	0,59
3	0,308	0,200	0,261	0,227
	0,346	0,265	0,255	0,214
	0,279			
	0,255			
	0,297			
	0,285			
Mittelwert	0,29	0,23	0,26	0,22

Tabelle 6: MTT-Assay Hct 116 4h

	Kontrolle	Quercetin		
		25 µM	50 µM	100 µM
1	0,193	0,328	0,344	0,309
	0,287	0,372	0,346	0,303
	0,318	0,300	0,312	0,297
	0,341			
	0,336			
	0,208			
Mittelwert	0,285	0,328	0,344	0,309
2	0,346	0,427	0,309	0,307
	0,443	0,378	0,420	0,360
	0,366	0,368	0,399	0,354
	0,405			
	0,394			
	0,318			
Mittelwert	0,342	0,378	0,326	0,308
3	0,146	0,232	0,165	0,201
	0,147	0,221	0,269	0,239
	0,199	0,241	0,255	0,255
	0,186			
	0,215			
	0,183			
Mittelwert	0,223	0,305	0,246	0,254

Tabelle 6: MTT-Assay Hct 116 4h

Tabelle 7: MTT-Assay Hct 116 8h

Fortsetzung

	Kontrolle	Kaempferol		
		25 µM	50 µM	100 µM
1	0,193	0,282	0,350	0,279
	0,287	0,343	0,328	0,245
	0,318	0,293	0,247	0,112
	0,341			
	0,336			
	0,208			
Mittelwert	0,280	0,306	0,308	0,212
2	0,346	0,411	0,351	0,342
	0,443	0,425	0,457	0,382
	0,366	0,461	0,392	0,331
	0,405			
	0,394			
	0,318			
Mittelwert	0,379	0,432	0,400	0,352
3	0,146	0,205	0,241	0,161
	0,147	0,242	0,238	0,236
	0,199	0,262	0,253	0,210
	0,186			
	0,215			
	0,183			
Mittelwert	0,179	0,237	0,244	0,202

	Kontrolle	Luteolin		
		25 µM	50 µM	100 µM
1	0,149	0,325	0,308	0,261
	0,304	0,339	0,332	0,236
	0,312	0,322	0,321	0,243
	0,329			
	0,334			
	0,194			
Mittelwert	0,270	0,329	0,320	0,247
2	0,374	0,396	0,376	0,215
	0,438	0,378	0,334	0,385
	0,401	0,377	0,356	0,285
	0,436			
	0,495			
	0,390			
Mittelwert	0,422	0,384	0,355	0,295
3	0,086	0,184	0,116	0,142
	0,112	0,178	0,177	0,152
	0,093	0,188	0,160	0,170
	0,120			
	0,112			
	0,063			
Mittelwert	0,098	0,184	0,151	0,155

	Kontrolle	Apigenin		
		25 µM	50 µM	100 µM
1	0,193	0,340	0,338	0,277
	0,287	0,334	0,371	0,324
	0,318	0,289	0,287	0,251
	0,341			
	0,336			
	0,208			
Mittelwert	0,280	0,321	0,332	0,284
2	0,346	0,356	0,433	0,362
	0,443	0,338	0,438	0,307
	0,366	0,395	0,413	0,293
	0,405			
	0,394			
	0,318			
Mittelwert	0,379	0,363	0,428	0,321
3	0,146	0,154	0,238	0,199
	0,147	0,209	0,189	0,206
	0,199	0,227	0,272	0,238
	0,186			
	0,215			
	0,183			
Mittelwert	0,179	0,197	0,233	0,214

	Kontrolle	Quercetin		
		25 µM	50 µM	100 µM
1	0,193	0,341	0,285	0,283
	0,287	0,304	0,274	0,246
	0,318	0,318	0,311	0,250
	0,341			
	0,336			
	0,208			
Mittelwert	0,280	0,321	0,290	0,260
2	0,346	0,370	0,316	0,278
	0,443	0,326	0,330	0,300
	0,366	0,369	0,321	0,292
	0,405			
	0,394			
	0,318			
Mittelwert	0,379	0,355	0,322	0,290
3	0,146	0,170	0,198	0,221
	0,147	0,224	0,204	0,185
	0,199	0,237	0,215	0,186
	0,186			
	0,215			
	0,183			
Mittelwert	0,179	0,210	0,206	0,197

	Kontrolle	Kaempferol		
		25 µM	50 µM	100 µM
1	0,193	0,335	0,280	0,131
	0,287	0,316	0,325	0,268
	0,318	0,321	0,327	0,313
	0,341			
	0,336			
	0,208			
Mittelwert	0,280	0,324	0,311	0,237
2	0,346	0,441	0,437	0,431
	0,443	0,455	0,439	0,430
	0,366	0,426	0,387	0,431
	0,405			
	0,394			
	0,318			
Mittelwert	0,379	0,441	0,421	0,431
3	0,146	0,227	0,234	0,156
	0,147	0,194	0,185	0,203
	0,199	0,184	0,238	0,159
	0,186			
	0,215			
	0,183			
Mittelwert	0,179	0,201	0,219	0,173

	Kontrolle	Luteolin		
		25 µM	50 µM	100 µM
1	0,149	0,286	0,269	0,187
	0,304	0,291	0,247	0,179
	0,312	0,273	0,218	0,196
	0,329			
	0,334			
	0,194			
Mittelwert	0,270	0,283	0,244	0,188
2	0,374	0,297	0,281	0,273
	0,438	0,305	0,298	0,257
	0,401	0,299	0,300	0,277
	0,436			
	0,495			
	0,390			
Mittelwert	0,422	0,300	0,293	0,269
3	0,086	0,103	0,202	0,125
	0,112	0,152	0,166	0,170
	0,093	0,162	0,172	0,151
	0,120			
	0,112			
	0,063			
Mittelwert	0,098	0,139	0,180	0,148

Tabelle 7: MTT-Assay Hct 116 8h
Fortsetzung

	Kontrolle	Apigenin		
		25 µM	50 µM	100 µM
1	0,193	0,165	0,279	0,248
	0,287	0,223	0,269	0,188
	0,318	0,258	0,240	0,215
	0,341			
	0,336			
	0,208			
Mittelwert	0,280	0,215	0,263	0,217
2	0,346	0,343	0,400	0,291
	0,443	0,428	0,409	0,267
	0,366	0,403	0,355	0,262
	0,405			
	0,394			
	0,318			
Mittelwert	0,379	0,391	0,388	0,273
3	0,146	0,246	0,204	0,169
	0,147	0,210	0,175	0,159
	0,199	0,146	0,168	0,166
	0,186			
	0,215			
	0,183			
Mittelwert	0,179	0,201	0,183	0,165

Tabelle 8: MTT Assay H4IIE tBHQ und Na-Arsenit (Abb. 3.9)

	Kontrolle	tBHQ			
		25 µM	50 µM	100 µM	250 µM
1	0,384	0,377	0,392	0,236	0,039
	0,402	0,340	0,384	0,261	0,052
	0,390	0,330	0,255	0,176	0,034
	0,427				
	0,375				
	0,388				
Mittelwert	0,39438934	0,34887	0,3433	0,22446	0,04169
2	0,387	0,402	0,434	0,401	0,067
	0,407	0,403	0,408	0,479	0,045
	0,388	0,339	0,397	0,397	0,042
	0,405				
	0,438				
	0,392				
Mittelwert	0,36473599	0,34359	0,375	0,38777	0,01363
3	0,234	0,310	0,374	0,210	0,038
	0,261	0,326	0,339	0,276	0,038
	0,321	0,345	0,320	0,128	0,038
	0,315				
	0,295				
	0,312				
Mittelwert	0,25267547	0,2897	0,30722	0,16737	0,00116
4	0,389	0,264	0,348	0,382	0,041
	0,382	0,377	0,347	0,376	0,037
	0,361	0,368	0,353	0,258	0,042
	0,373				
	0,355				
	0,378				
Mittelwert	0,33514983	0,29803	0,31141	0,30042	0,00189

Tabelle 8: MTT Assay H4IIE tBHQ und Na-Arsenit (Abb. 3.9) Fortsetzung

	Kontrolle	Na-Arsenit			
		2,5 µM	5 µM	10 µM	25 µM
1	0,373	0,287	0,273	0,443	0,068
	0,443	0,263	0,291	0,342	0,071
	0,433	0,311	0,263	0,245	0,060
	0,428				
	0,432				
	0,390				
Mittelwert	0,41658419	0,28673	0,27591	0,3435	0,06618
2	0,426	0,275	0,254	0,439	0,086
	0,437	0,326	0,240	0,433	0,424
	0,448	0,259	0,195	0,104	0,055
	0,452				
	0,370				
	0,295				
Mittelwert	0,40467117	0,28668	0,22954	0,32546	0,18844
3	0,381	0,312	0,239	0,129	0,085
	0,425	0,264	0,228	0,091	0,084
	0,447	0,260	0,222	0,075	0,062
	0,410				
	0,403				
	0,403				
Mittelwert	0,41146298	0,27839	0,22951	0,09836	0,07692
4	0,356	0,315	0,223	0,135	0,067
	0,391	0,282	0,218	0,119	0,053
	0,427	0,254	0,216	0,076	0,070
	0,389				
	0,397				
	0,351				
Mittelwert	0,38500984	0,28382	0,21909	0,11018	0,06343

Tabelle 9: MTT Assay HepG2 tBHQ und Na-Arsenit (Abb. 3.10)

	Kontrolle	tBHQ			
		25 µM	50 µM	100 µM	250 µM
1	0,356	0,397	0,435	0,396	0,261
	0,385	0,454	0,424	0,460	0,255
	0,425	0,386	0,382	0,353	0,288
	0,483				
	0,459				
	0,403				
Mittelwert	0,41842513	0,41205	0,41374	0,40264	0,26816
2	0,183	0,210	0,156	0,048	0,035
	0,181	0,211	0,169	0,039	0,037
	0,214	0,211	0,128	0,039	0,036
	0,219				
	0,224				
	0,209				
Mittelwert	0,20482365	0,21063	0,15082	0,04202	0,03579
3	0,692	0,688	0,691	0,572	0,294
	0,711	0,607	0,671	0,516	0,271
	0,525	0,631	0,609	0,455	0,241
	0,724				
	0,679				
	0,541				
Mittelwert	0,64505199	0,64192	0,657114	0,51431	0,26884
4	0,361	0,572	0,540	0,421	0,333
	0,509	0,561	0,475	0,396	0,358
	0,598	0,671	0,444	0,339	0,349
	0,890				
	0,599				
	0,504				
Mittelwert	0,57683919	0,60137	0,48666	0,38505	0,34669
5	0,690	0,860	0,830	0,613	0,445
	0,715	0,625	0,858	0,783	0,502
	0,714	0,767	0,840	0,721	0,515
	0,848				
	0,741				
	0,825				
Mittelwert	0,75548183	0,75082	0,84291	0,70578	0,48749

Tabelle 9: MTT Assay HepG2 tBHQ und Na-Arsenit (Abb. 3.10) Fortsetzung

	Kontrolle	Na-Arsenit			
		2,5 µM	5 µM	10 µM	25 µM
1	0,364	0,121	0,071	0,093	0,066
	0,377	0,225	0,067	0,065	0,069
	0,328	0,097	0,07	0,064	0,074
Mittelwert	0,35633333	0,14767	0,06933	0,074	0,06967
2	0,364	0,122	0,117	0,088	0,050
	0,377	0,137	0,111	0,098	0,051
	0,328	0,151	0,119	0,091	0,052
Mittelwert	0,35633333	0,1367	0,115678	0,09244	0,05064
3	0,364	0,691	0,651	0,586	0,435
	0,377	0,701	0,627	0,594	0,533
	0,328	0,641	0,651	0,588	0,477
Mittelwert	0,35633333	0,67791	0,64295	0,58897	0,48176
4	0,364	0,633	0,571	0,525	0,307
	0,377	0,646	0,530	0,489	0,341
	0,328	0,443	0,491	0,442	0,333
Mittelwert	0,35633333	0,5739	0,53045	0,48551	0,32674
5	0,465	0,790	0,827	0,739	0,638
	0,425	0,382	0,766	0,651	0,561
	0,829	0,706	0,744	0,670	0,549
Mittelwert	0,57336915	0,6261	0,77904	0,68684	0,5829

Tabelle 10: MTT Assay Hct 116: MG132 Kinetik: Inkubation mit 10 µM MG132

	MG132					
	1h		2h		6h	
	Kontrolle	10 µM	Kontrolle	10 µM	Kontrolle	10 µM
1	0,351	0,320	0,367	0,373	0,342	0,314
2	0,322	0,398	0,418	0,379	0,345	0,318
3	0,575	0,565	0,583	0,435	0,513	0,402
MW	0,415899	0,42781	0,45613	0,3955	0,399829	0,3445

Tabelle 12: Nrf2 Akkumulation nach tBHQ Inkubation (Zeitverlauf (Abb. 3.13))

Nrf2	tBHQ 50 µM					
	0h	0,5h	1h	3h	18h	24h
Densitometrie	113573680,0	451520883,0	488668243,0	557368006,0	434475965,0	269802994,0
(x-fach)	1,0	4,0	4,3	4,9	3,8	2,4
Densitometrie	96659091,0	693630682,0	773801136,0	587892045,0	322147727,0	301363636,0
(x-fach)	1,0	7,2	8,0	6,1	3,3	3,1
Densitometrie	49393939,0	690232008,0	879815341,0	904891098,0	556837121,0	221231061,0
(x-fach)	1,0	14,0	17,8	18,3	11,3	4,5

Tabelle 11: MTT Assay Hct 116 4h Inkubation mit Hemin in den angegebenen Konzentrationen

	Hemin				
	Kontrolle	1 µM	2,5 µM	5 µM	10 µM
1	0,223	0,258	0,233	0,238	0,245
2	0,28381483	0,384951	0,3570435	0,345444	0,2955479
3	0,33	0,444	0,432	0,375	0,341
MW	0,27880097	0,362285	0,340569	0,319571	0,2937086

Tabelle 13: Nrf2 Akkumulation nach 24h Inkubation (Abb. 3.14)

Nrf2	Quercetin				
	0 μM	10 μM	25 μM	50 μM	100 μM
Densitometrie	4612,54	20896,81	28566,00	38680,29	33887,14
(x-fach)	1,00	4,53	6,19	8,39	7,35
Densitometrie	405,23	1377,76	1337,70	1273,64	1019,33
(x-fach)	1,00	3,40	3,30	3,14	2,52
Densitometrie	833,99	742,78	869,76	1339,75	1191,88
(x-fach)	1,00	0,89	1,04	1,61	1,43
Densitometrie	2437,98	8560,10	11926,45	13008,34	11648,14
(x-fach)	1,00	3,51	4,89	5,34	4,78

Tabelle 14: Nrf2 Akkumulation nach 24h Inkubation (Abb. 3.15)

Nrf2	Kaempferol				
	0 μM	10 μM	25 μM	50 μM	100 μM
Densitometrie	981030,49	1432802,76	2639666,44	1670190,65	2401636,89
(x-fach)	1,00	1,85	2,23	2,00	1,83
Densitometrie	313184,59	770809,67	343206,20	759419,35	655629,06
(x-fach)	1,00	1,64	0,82	1,39	0,90
Densitometrie	145071,67	237121,76	306351,24	128307,68	6095,82
(x-fach)	1,00	1,63	2,11	0,99	0,05
Densitometrie	171513,00	201436,00	263064,00	327894,00	164734,00
(x-fach)	1,00	1,12	1,32	1,72	1,62

Tabelle 15: Nrf2 Akkumulation nach 24h Inkubation (Abb. 3.16)

Nrf2	Luteolin			
	0 μM	10 μM	25 μM	50 μM
Densitometrie	1339,43	1169,26	392,54	129,02
(x-fach)	1,00	0,87	0,29	0,10
Densitometrie	9750,71	22609,00	31092,62	5084,20
(x-fach)	1,00	2,31	3,19	5,21
Densitometrie	197891,99	198810,84	198316,28	147398,43
(x-fach)	1,00	1,00	1,00	0,74

Tabelle 16: Nrf2 Akkumulation nach 24h Inkubation (Abb. 3.17)

Nrf2	Apigenin				
	0 μM	10 μM	25 μM	50 μM	100 μM
Densitometrie	758,52	655,85	233,53	172,43	162,86
(x-fach)	1,00	0,86	0,31	0,23	0,21
Densitometrie	39065,90	36432,86	33060,39	14969,17	3205,09
(x-fach)	1,00	0,93	0,85	0,38	0,08
Densitometrie	9334,92	9561,75	8999,16	6080,44	4861,37
(x-fach)	1,00	1,02	0,96	0,65	0,52

Tabelle 17: Nrf2 Akkumulation nach 4h Inkubation (Abb. 3.14)

	Quercetin				
Nrf2	0 μM	10 μM	25 μM	50 μM	100 μM
Densitometrie	660,70	5.083,81	6.138,57	5.844,45	2.871,84
(x-fach)	1,00	7,69	9,29	8,85	4,35
Densitometrie	485,21	8.948,30	10.218,90	12.088,44	8.701,23
(x-fach)	1,00	18,44	21,06	24,91	17,93
Densitometrie	422,80	2.196,55	3.563,08	7.130,03	5.326,38
(x-fach)	1,00	5,20	8,43	16,86	12,60

Tabelle 18: Nrf2 Akkumulation nach 4h Inkubation (Abb. 3.15)

	Kaempferol				
Nrf2	0 μM	10 μM	25 μM	50 μM	100 μM
Densitometrie	6644,51	5712,89	9667,66	11598,62	5689,11
(x-fach)	1	0,8598	1,455	1,7456	0,8562
Densitometrie	11671,66	13827,49	4234,66	13453,43	10991,6
(x-fach)	1	1,1847	0,3628	1,1527	0,9417
Densitometrie	9401,9	7028,72	15616,93	17823	13988,04
(x-fach)	1	0,7476	1,661	1,8957	1,4878
Densitometrie	4664,37	10105,5	15035,65	15329,92	14474
(x-fach)	1	2,1665	3,2235	3,2866	3,1031

Tabelle 19: Nrf2 Akkumulation nach 4h Inkubation (Abb. 3.16)

	Luteolin				
Nrf2	0 μM	10 μM	25 μM	50 μM	100 μM
Densitometrie	381642,13	515311,29	197106,43	147930,04	134560,13
(x-fach)	1,00	1,35	0,52	0,39	0,35
Densitometrie	26046,55	41252,46	58676,55	138481,93	117425,98
(x-fach)	1,00	1,58	2,25	5,32	4,51
Densitometrie	43071,11	105600,50	32912,83	110711,34	118462,91
(x-fach)	1,00	2,45	0,76	2,57	2,75
Densitometrie	36982,01	95874,86	93882,67	21224,55	n.d.
(x-fach)	1,00	2,59	2,54	0,57	0,00

Tabelle 20: Nrf2 Akkumulation nach 4h Inkubation (Abb. 3.17)

	Apigenin				
Nrf2	0 μM	10 μM	25 μM	50 μM	100 μM
Densitometrie	21.366,67	14.091,89	12.016,77	9.749,75	6.765,58
(x-fach)	1,00	0,66	0,56	0,46	0,32
Densitometrie	694,26	1.743,43	2.916,64	5.730,73	3.672,47
(x-fach)	1,00	2,51	4,20	8,25	5,29
Densitometrie	684,51	1.404,43	843,11	2.269,86	n.d.
(x-fach)	1,00	2,05	1,23	3,32	

Tabelle 21: Nrf2 Akkumulation nach 4h Inkubation (3.18):

Nrf2	Fisetin				
	0 μ M	2,5 μ M	5 μ M	10 μ M	25 μ M
Densitometrie	6.423,134			17.752,894	17.214,016
(x-fach)	1			2,76389905613054	2,6800026280006
Densitometrie	8.049,326	11.066,468	16.323,116	16.705,986	13.758,075
(x-fach)	1	1,37483163186582	2,02788606151621	2,07545153469992	1,70922074717809
Densitometrie	4.301,477	8.249,426	11.240,418	12.542,409	10.407,690
(x-fach)	1	1,91781241652577	2,61315310996665	2,91583774596493	2,41956193186666

Tabelle 22: ARE-Aktivierung durch 50 μ M Quercetin, 50 μ M tBHQ und Nrf2 Überexpression; Die relativen Lumineszenzwerte sind auf die entsprechenden Proteingehalte normiert (Abbildung 3.22)

Nrf2	DMSO	tBHQ 50 μ M	Quercetin 50 μ M	Nrf2-Überexpression
relative Lumineszenz	12,424	55,376	33,733	37,933
rel. Lumineszenz/ Kontrolle	1,000	4,457	2,715	3,053
relative Lumineszenz	26,582	183,868	207,165	181,806
rel. Lumineszenz/ Kontrolle	1,000	6,917	7,794	6,840
relative Lumineszenz	4,686	52,074	43,514	14,488
rel. Lumineszenz/ Kontrolle	1,000	11,113	9,286	3,092

Tabelle 23: Nrf2 Translokation durch Inkubation mit tBHQ, Quercetin, Kaempferol, Fisetin; dargestellt sind die OD-Werte/Zellkern bezogen auf die Kontrolle

Nrf2/GFP	DMSO	tBHQ 50 μ M	Quercetin 50 μ M	Kaempferol 50 μ M	Fisetin 50 μ M
Densitometrie	29,77	19,62	44,45	24,24	40,85
(x-fach)	1,00	0,66	1,49	0,81	1,37
Densitometrie	15,83	27,72	16,70	32,79	29,47
(x-fach)	1,00	1,75	1,06	2,07	1,86
Densitometrie	18,36	28,25	24,89	21,01	29,26
(x-fach)	1,00	1,54	1,36	1,14	1,59
Densitometrie	8,27	61,89	33,90	40,84	29,93
(x-fach)	1,00	7,49	4,10	4,94	3,62

Tabelle 24: Nrf2-Transkriptmenge nach tBHQ Inkubation (RT-PCR) (Abb. 3.25)

Nrf2 Transkript	2h		4h		6h		8h	
	Densitometrie	(x-fach)	Densitometrie	(x-fach)	Densitometrie	(x-fach)	Densitometrie	(x-fach)
DMSO	296,640	1,000	250,510	1,000	318,060	1,000	360,250	1,000
tBHQ 50 µM	323,700	1,091	309,700	1,236	279,170	0,878	302,630	0,840
tBHQ 100 µM	277,830	0,937	244,350	0,975	320,900	1,009	429,160	1,191
DMSO	216,640	1,000	172,390	1,000	164,420	1,000	201,080	1,000
tBHQ 50 µM	161,280	0,744	202,400	1,174	201,460	1,225	182,470	0,907
tBHQ 100 µM	183,680	0,848	195,180	1,132	205,740	1,251	279,400	1,389
DMSO	227,030	1,000	226,070	1,000	241,320	1,000	250,640	1,000
tBHQ 50 µM	269,990	1,189	211,780	0,937	220,650	0,914		0,000
tBHQ 100 µM	271,460	1,196	229,240	1,014	242,830	1,006	291,120	1,162

Tabelle 25: Proteasomale Degradation (relative Lumineszenzwerte) (Abb. 3.28)

Proteasomale Degradation	DMSO	tBHQ (50 µM)	Apigenin (50 µM)	Quercetin (50 µM)	Kaempferol (50 µM)	Luteolin (50 µM)	MG 132 (1 µM)	MG 132 (10 µM)
Densitometrie	38179,50	34924,00	31291,50	42054,50	36558,50	32571,00	4917,50	1137,50
(x-fach)	1,00	0,91	0,82	1,10	0,96	0,85	0,13	0,03
Densitometrie	42853,00	33121,00	26407,50	39985,50	36029,00	33245,50	5680,50	1323,50
(x-fach)	1,00	0,77	0,62	0,93	0,84	0,78	0,13	0,03
Densitometrie	73018,50	59529,50	58197,50	65944,50	65776,50	64101,00	11200,50	2004,00
(x-fach)	1,00	0,82	0,80	0,90	0,90	0,88	0,15	0,03
Densitometrie	53926,00	52838,00	57795,00	55677,50	52056,50	58791,50	11210,00	2154,00
(x-fach)	1,00	0,98	1,07	1,03	0,97	1,09	0,21	0,04

Tabelle 26: HO-1- und GST-Induktion (Transkripte) nach alleiniger MG132 (1 µM) Inkubation (4h) oder nach Nrf2-GFP Transfektion + 4h MG132 (1 µM) Inkubation (Abb.3.27)

HO-1	pEGFP	Nrf2-pEGFP	MG132	Nrf2-pEGFP +MG132
Densitometrie	62,3	98,24	170,37	131,22
(x-fach)	1,0000	1,7688	0,9334	1,8277
Densitometrie	32,74	57,91	30,34	59,84
(x-fach)	1,0000	1,3496	1,9125	2,0167
Densitometrie	35,79	54,16	76,75	80,93
(x-fach)	1,0000	1,5769	2,2612	2,1063

Tabelle 27: HO-1- und GST-Induktion (Transkripte) nach alleiniger MG132 (1 µM) Inkubation (4h) oder nach Nrf2-GFP Transfektion + 4h MG132 (1 µM) Inkubation Fortsetzung

GST	pEGFP	Nrf2-pEGFP	MG132	Nrf2-pEGFP +MG132
Densitometrie	6,41	15,02	10,61	6,42
(x-fach)	1	2,3432137285	1,655226209	1,001560062403
Densitometrie	44,24	50,9	43,6	51,95
(x-fach)	1	1,1505424955	0,9855334539	1,174276672694
Densitometrie	18,22	24,79	15,6	21,37
(x-fach)	1	1,3605927552	0,8562019759	1,172886937431

Tabelle 28: ARE-Aktivierung durch 50 μM tBHQ, 10 μM Na-Arsenit, 50 μM Quercetin, 50 μM Kaempferol, 50 μM Apigenin, 50 μM Luteolin, 50 μM Myricetin, 50 μM Morin, 50 μM Galangin, 50 μM Chrysin und 50 μM Fisetin; Die relativen Lumineszenzwerte sind auf die entsprechenden Proteingehalte normiert (Abb. 3.29)

ARE-Aktivierung	DMSO	tBHQ 50 μM	Na-Arsenit 10 μM	Quercetin 50 μM	Kaempferol 50 μM	Apigenin 50 μM	Luteolin 50 μM
relative Lumineszenz	26,58	183,87	50,89	207,16	181,67	91,61	89,88
rel. Lumineszenz/ Kontrolle	1,00	6,92	1,91	7,79	1,78	0,90	0,88
relative Lumineszenz	12,42	55,38	36,31	33,73	272,91	114,28	150,06
rel. Lumineszenz/ Kontrolle	1,00	4,46	2,92	2,72	2,67	1,12	1,47
relative Lumineszenz	4,69	52,07	16,99	43,51	140,01	101,15	49,32
rel. Lumineszenz/ Kontrolle	1,00	11,11	3,63	9,29	1,37	0,99	0,48

ARE-Aktivierung	DMSO	Chrysin 50 μM	Myricetin 50 μM	Fisetin 50 μM	Galangin 50 μM	Morin 50 μM
relative Lumineszenz	2191,30	1371,55	2397,70	10920,68	2320,29	1374,31
rel. Lumineszenz/ Kontrolle	1,00	0,63	1,09	4,98	1,06	0,63
relative Lumineszenz	640,42	486,53	1041,51	6481,71	386,09	712,88
rel. Lumineszenz/ Kontrolle	1,00	0,76	1,63	10,12	0,60	1,11
relative Lumineszenz	1104,62	138,44	800,08	2709,46	603,82	823,84
rel. Lumineszenz/ Kontrolle	1,00	0,13	0,72	2,45	0,55	0,75

Tabelle 29: ARE Aktivierung durch tBHQ verschiedene Inkubationszeiten (Abb. 3.30)

Messung	tBHQ (50 μM)			
	DMSO	25 μM	50 μM	100 μM
4h				
1	79,64	18,17	114,99	67,92
2	13,52	10,24	14,50	14,15
3	10,23	16,03	20,15	14,84
rel. Lumineszenz/Kontrolle	1	0,228108214789429	1,44375262495792	0,852753823363493
rel. Lumineszenz/Kontrolle	1	0,757424474898538	1,07281552497555	1,04664555729372
rel. Lumineszenz/Kontrolle	1	1,5668742725499	1,96941495744356	1,45054347034298
8h				
1	62,18	163,86	198,22	160,06
2	15,03	43,95	26,69	53,05
3	14,20	17,45	23,94	45,42
rel. Lumineszenz/Kontrolle	1	2,63544790605202	3,18812657783819	2,5743490511884
rel. Lumineszenz/Kontrolle	1	2,92381150216023	1,7757615981908	3,5290010088698
rel. Lumineszenz/Kontrolle	1	1,22895076468337	1,68524161183244	3,19792270841729
24h				
	DMSO	25 μM	50 μM	100 μM

Messung	tBHQ (50 µM)			
	1	96,19	140,83	736,98
2	16,04	65,55	78,07	266,32
3	11,90	43,55	57,07	72,00
rel. Lumineszenz/Kontrolle	1	1,46406210695756	7,66183770926917	11,0940082546856
rel. Lumineszenz/Kontrolle	1	4,08601073538611	4,86640401783162	16,6006459047657
rel. Lumineszenz/Kontrolle	1	3,66113566367202	4,79738677989414	6,05205623584251

Tabelle 30: ARE-Aktivierung durch Quercetin; Die relativen Lumineszenzwerte sind auf die entsprechenden Proteingehalte normiert (Abb. 3.31)

ARE-Aktivierung	DMSO	Quercetin 5 µM	Quercetin 10 µM	Quercetin 25 µM	Quercetin 50 µM
relative Lumineszenz	56,40	107,60	149,48	509,00	548,97
rel. Lumineszenz/Kontrolle	1,00	1,58	2,20	7,48	8,06
relative Lumineszenz	112,93	171,52	260,33	796,33	1494,82
rel. Lumineszenz/Kontrolle	1,00	1,52	2,31	7,05	13,24
relative Lumineszenz	26,63	206,06	118,40	237,66	111,26
rel. Lumineszenz/Kontrolle	1,00	5,88	3,38	6,79	3,18

Tabelle 31: ARE-Aktivierung durch Kaempferol; Die relativen Lumineszenzwerte sind auf die entsprechenden Proteingehalte normiert (Abb. 3.31)

ARE-Aktivierung	DMSO	Kaempferol 10 µM	Kaempferol 25 µM	Kaempferol 50 µM
relative Lumineszenz	9372,06	8129,65	11413,68	32407,12
rel. Lumineszenz/Kontrolle	1,00	0,87	1,22	3,46
relative Lumineszenz	270335,57	807473,07	567911,05	3026447,64
rel. Lumineszenz/Kontrolle	1,00	2,99	2,10	11,20
relative Lumineszenz	222054,39		289626,09	505949,67
rel. Lumineszenz/Kontrolle	1,00	0,00	1,30	2,28

Tabelle 32: ARE-Aktivierung durch Fisetin; Die relativen Lumineszenzwerte sind auf die entsprechenden Proteingehalte normiert (Abb. 3.31)

ARE-Aktivierung	Fisetin 10 µM	Fisetin 25 µM	Fisetin 50 µM
relative Lumineszenz	8856,18	8297,06	10920,68
rel. Lumineszenz/Kontrolle	2,97	1,73	4,98
relative Lumineszenz	4442,11	141775,24	6481,71
rel. Lumineszenz/Kontrolle	3,15	2,94	10,12
relative Lumineszenz	3837,29	186773,30	2709,46
rel. Lumineszenz/Kontrolle	-0,05	5,47	2,45

Tabelle 33: HO-1 Induktion durch Inkubation mit tBHQ (RT-PCR) (Abb. (3.30))

HO-1 Transkripte	tBHQ 50 µM			
	0h	4h	8h	24h
Densitometrie				
(x-fach)				
Densitometrie				
(x-fach)				
Densitometrie				
(x-fach)				

Tabelle 34: HO-1 Induktion durch Inkubation mit Quercetin in Hct 116 (RT-PCR) (Abb. 3.33)

HO-1 Transkripte	Quercetin 50 µM			
	0h	4h	8h	24h
Densitometrie	10869	6082,67	7286	13009,75
(x-fach)	1	1,2454868	1,1071524	1,6239448
Densitometrie	9206,93	12702,14	11765,28	9536,65
(x-fach)	1	1,23648	1,0316931	1,3199841
Densitometrie	3208,14	5118,2	7867,55	5979,89
(x-fach)	1	0,9303242	1,1515302	1,5902864

Tabelle 35: HO-1 Induktion in Hct 116 Zellen durch Apigenin, Kaempferol, Galangin und Morin (RT-PCR) (Abb. 3.36)

HO-1 Transkripte	DMSO	Apigenin 50 µM	Kaempfero 50 µM	DMSO	Galangin 50 µM	Morin 50 µM
Densitometrie	9206,9	4794,4	9407,65	7727,12	8066,9	4645
(x-fach)	1	0,6187	1,059982	1	1,0155	0,791
Densitometrie	4805,4	10325		5111,57	8381,4	6758,9
(x-fach)	1	1,5195	0	1	0,9122	0,8066
Densitometrie	3208,1	1914,9	3689,56	7215,6	6712,3	5741,8
(x-fach)	1	0,5631	0,949097	1	0,9104	0,9147

Tabelle 36: HO-1 Induktion in Caco 2 Zellen durch tBHQ, Quercetin, Kaempferol, Apigenin und Luteolin:

HO-1 Transkripte	DMSO	tBHQ 50 µM	Quercetin 50 µM	Kaempfero 50 µM	Apigenin 50 µM	Luteolin 50 µM
Densitometrie	7982	8373,8	7568,75	8573,81	8788,5	10571
(x-fach)	1	1,0191	0,975347	1,04097	1,0622	1,2535
Densitometrie	5511	9906,4	4575,71	3357,71	3646,6	6346,3
(x-fach)	1	1,6868	0,825325	0,6119	0,6755	1,287
Densitometrie	3416	9069,5	3462,55			
(x-fach)	1	2,9743	1,384326	0	0	0

Tabelle 37: HO-1 Induktion durch 4h Inkubation Quercetin in Hct 116 Zellen (Abb. 3.34)

HO-1 Transkripte	Quercetin 4h				
	DMSO	10 µM	25 µM	50 µM	100 µM
Densitometrie	4088,88	5643,29	6266,96	5976,98	6082,67
(x-fach)	1	1,26145	1,34130114	1,231826	1,24549
Densitometrie	9150,68	13491	4317,14	10897,36	12702,1
(x-fach)	1	1,28207	0,4771094	1,090044	1,23648
Densitometrie	4313,96	5406,52	5698,68	5803,2	5118,2
(x-fach)	1	1,16644	1,2084552	1,335882	0,93032

Tabelle 38: GST Induktion durch 24h Inkubation mit tBHQ, Kaempferol, Quercetin und Apigenin 50 µM (Abb. 3.38)

GST	DMSO	tBHQ	Kaempferol	Quercetin	Apigenin
Densitometrie	12725,6	552,8	8327,3	4245,0	226,6
(x-fach)	1,0	1,5	1,5	0,4	0,0
Densitometrie	16369,8	11448,4	11268,1	7666,0	1265,4
(x-fach)	1,0	2,1	2,1	0,4	0,1
Densitometrie	3958,9	3092,3	3206,4	4013,9	2678,9
(x-fach)	1,0	3,1	3,1	0,7	0,1

Tabelle 39: GST Induktion in Hct 116 Zellen durch 4h Inkubation mit Quercetin (Abb. 3.39)

GST-Transkript	Quercetin 4h				
	DMSO	10 µM	25 µM	50 µM	100 µM
Densitometrie	1824	1586,84	1516,25	1466,75	1246,59
(x-fach)	1	0,79523	0,7275496	0,677713	0,57226
Densitometrie	2229	2074,67	185,45	1966,08	2094,67
(x-fach)	1	0,80936	0,0841346	0,807328	0,83705
Densitometrie	998,6	1801,56	1468,48	1240,8	2213,4
(x-fach)	1	1,67917	1,3453221	1,233969	1,73812

Tabelle 40: GST Induktion in Hct 116 Zellen durch 8h Inkubation mit Quercetin (Abb. 3.40)

GST-Transkript	Quercetin 8h				
	DMSO	10 µM	25 µM	50 µM	100 µM
Densitometrie	3488	3017	3044,67	1249,33	1192,67
(x-fach)	1	0,87854	0,7145953	0,332361	0,30325
Densitometrie	2959,02	2309,29	1316,96	1268,21	922,98
(x-fach)	1	0,711154	0,3817581	0,370276	0,26996
Densitometrie	1401,21	1992,07	1168,95	1139,13	721,67
(x-fach)	1	1,38741	0,7350583	0,742576	0,48122

Tabelle 41: GST Induktion in Hct 116 Zellen durch 4h Inkubation mit Kaempferol (Abb. 3.39)

GST-Transkript	Kaempferol 4h				
	DMSO	10 µM	25 µM	50 µM	100 µM
Densitometrie	1823,8	1898,5	1700,1	1626,3	1410,9
(x-fach)	1,0	0,9	0,8	0,7	0,7
Densitometrie	2229,1	2645,3	2203,4	428,1	1271,1
(x-fach)	1,0	1,2	1,0	0,2	0,7
Densitometrie	998,6	2014,2	2494,4	2002,1	1499,7
(x-fach)	1,0	1,7	2,0	1,7	1,1

Tabelle 42: GST Induktion in Hct 116 Zellen durch 8h Inkubation mit Kaempferol (Abb. 3.40)

GST-Transkript	Kaempferol 8h				
	DMSO	10 µM	25 µM	50 µM	100 µM
Densitometrie	3488	3388	3310,33	2414,67	1138
(x-fach)	1	0,90268	0,8926557	0,640375	0,28803
Densitometrie	2959,02	2436,94	2215,44	1729,21	1671,44
(x-fach)	1	0,72425	0,6266144	0,490552	0,49378
Densitometrie	1401,21	1597,49	1270,13	1276,83	769,33
(x-fach)	1	1,03907	0,8910209	0,846434	0,55137

Tabelle 43: GST Induktion in Hct 116 Zellen durch 4h Inkubation mit Apigenin (Abb. 3.39)

GST-Transkript	Apigenin 4h				
	DMSO	10 µM	25 µM	50 µM	100 µM
Densitometrie	3929,78	4513,45	4554,78	4873,1	6510,43
(x-fach)	1	0,75525	0,7278179	0,584325	0,63991
Densitometrie	1367,47	1464,42	1187,69	1515,31	1523,33
(x-fach)	1	1,07871	0,7913501	1,022469	0,98849
Densitometrie	1367,47	1464,42	1187,69	1515,31	1523,33
(x-fach)	1	0,83249	0,7635223	0,208466	0,57701

Tabelle 44: GST Induktion in Hct 116 Zellen durch 8h Inkubation mit Apigenin

Apigenin 8h					
GST Transkrip	DMSO	10 µM	25 µM	50 µM	100 µM
Densitom	5,15	4,2	4,96	4,92	2,37
(x-fach)	1	0,816	0,963	0,955	0,460
Densitom	22,07	11,1	13,29	12,7	9,01
(x-fach)	1	0,50295	0,6021749	0,575442	0,40825
Densitom	22,67	5,06	6,88	4,5	6,59
(x-fach)	1,000000	0,223202	0,303485	0,198500	0,290693

Tabelle 45: GST Induktion in Hct 116 Zellen durch 4h Inkubation mit Luteolin (Abb. 3.39)

Luteolin 4h					
GST Transkrip	DMSO	10 µM	25 µM	50 µM	100 µM
Densitom	6510,43	5763,63	5805,96	5047,37	4958,12
(x-fach)	1	0,87609	0,8787833	0,731124	0,71714
Densitom	1367,47	1772,56	1285,69	1125,42	921,33
(x-fach)	1	1,20481	0,8908086	0,849783	0,68314
Densitom	3254,28	3071,19	1420,77	3461,42	3129,98
(x-fach)	1,00	0,85	0,34	0,91	0,73

Tabelle 46: HO-1 Induktion in Hct 116 Zellen durch 4h Inkubation Kaempferol (Abb. 3.34)

Kaempferol 4h					
HO-1 Transkrip	DMSO	10 µM	25 µM	50 µM	100 µM
Densitom	4088,88	4643,59	4283,45	5602,67	4518,67
(x-fach)	1	0,98333	0,8599255	1,134951	0,99443
Densitom	9150,68	10392,5	8175,99	6422,58	8958,59
(x-fach)	1	1,15373	0,8608654	0,773042	1,15874
Densitom	4313,96	5040,32	5852,08	5110,96	4704,8
(x-fach)	1	1,00846	1,0819971	1,0087113	0,82431

Tabelle 47: HO-1 Induktion in Hct 116 Zellen durch 4h Inkubation Apigenin (Abb. 3.35)

Apigenin 4h					
HO-1 Transkrip	DMSO	10 µM	25 µM	50 µM	100 µM
Densitom	8181,03	6281,2	6297,18	5196,45	5916,35
(x-fach)	1	0,82884	0,7484541	0,614886	0,66752
Densitom	5121,4	5424,91	3906,11	3782,51	3520,44
(x-fach)	1	1,06699	0,6949269	0,681488	0,60997
Densitom	11495,9	13334,7	13194,16	7021,25	9421,77
(x-fach)	1	1,20197	1,0250737	0,498983	0,70206

Tabelle 48: HO-1 Induktion in Hct 116 Zellen durch 4h Inkubation Luteolin (Abb. 3.35)

Luteolin 4h					
HO-1 Transkrip	DMSO	10 µM	25 µM	50 µM	100 µM
Densitom	8181,03	6281,2	6297,18	5196,45	5916,35
(x-fach)	1	0,82884	0,7484541	0,614886	0,66752
Densitom	5121,4	5424,91	3906,11	3782,51	3520,44
(x-fach)	1	1,06699	0,6949269	0,681488	0,60997
Densitom	11495,9	13334,7	13194,16	7021,25	9421,77
(x-fach)	1	1,20197	1,0250737	0,498983	0,70206

Tabelle 49: HO-1 Induktion in Hct 116 durch 8h Quercetin Inkubation

Quercetin 8h					
HO-1 Transkrip	DMSO	10 µM	25 µM	50 µM	100 µM
Densitom	5836,33	6977	7830,67	3825	7286
(x-fach)	1	1,2142	1,0983873	0,608137	1,10715
Densitom	9869,65	11349,1	11206,12	11764,71	11765,3
(x-fach)	1	1,04784	0,9739061	1,029821	1,03169
Densitom	6383,64	7670,13	7943,79	8644,84	7867,55
(x-fach)	1	1,17257	1,0964491	1,23697	1,15153

Tabelle 50: HO-1 Induktion in Hct 116 durch 8h Kaempferol Inkubation

Kaempferol 8h					
HO-1 Transkrip	DMSO	10 µM	25 µM	50 µM	100 µM
Densitom	5836,33	4922,33	5903,67	4708,33	3741,33
(x-fach)	1	0,78378	0,9514181	0,746242	0,56593
Densitom	9869,65	9154,86	8748,22	9268,62	8653,87
(x-fach)	1	0,81572	0,7418332	0,788313	0,76648
Densitom	6383,64	6579,53	6593,53	7396,44	6566,55
(x-fach)	1	0,93937	1,0152957	1,076261	1,033

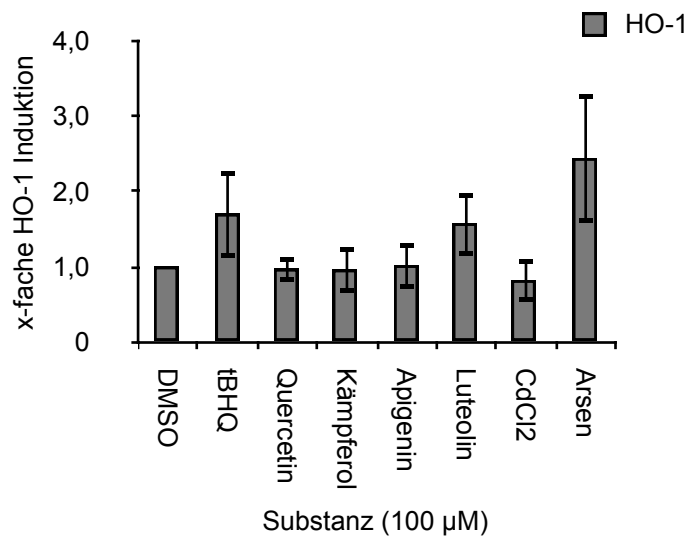
Tabelle 51: HO-1 Induktion in Hct 116 durch 8h Apigenin Inkubation

Apigenin 8h					
HO-1 Transkrip	DMSO	10 µM	25 µM	50 µM	100 µM
Densitom	8181,03	6281,200	6297,180	5196,450	5916,350
(x-fach)	1,000	1,010	0,240	0,420	0,0200
Densitom	8181,03	6281,200	6297,180	5196,450	5916,350
(x-fach)	1,000	0,696	0,419	0,146	0,12576
Densitom	8181,03	6281,200	6297,1800	5196,4500	5916,350

Tabelle 54: Nrf-GFP Sequenz erstellt mit SerialCloner Software im Vergleich zu der sequenzierten Sequenz der Nrf2-GFP Konstrukte (ein dunkler Hintergrund zeigt die Übereinstimmung an)

			1.300	
51-S1515-pEGFP-NRF-II-EGFP-C_C02.ab1	- - - - -	- - - NNNNNNG	7	
Nrf2 in pEGFP in frame	GTTTCGTGACC	GCCGCCGGGA	20	
51-S1515-pEGFP-NRF-I-EGFP-C_B02.ab1	- - - - -	- - - NNNNNNG	6	
Consensus	- - - - -	- - - GNNNNNG		
			1.320	
51-S1515-pEGFP-NRF-II-EGFP-C_C02.ab1	GNNNTCTCGG	CATGGACGAG	27	
Nrf2 in pEGFP in frame	TCACTCTCGG	CATGGACGAG	40	
51-S1515-pEGFP-NRF-I-EGFP-C_B02.ab1	GNNNTCTCGG	CATGGACGAG	26	
Consensus	GNNNTCTCGG	CATGGACGAG		
			1.340	
51-S1515-pEGFP-NRF-II-EGFP-C_C02.ab1	CTGTACAAGT	CCGGACTCAG	47	
Nrf2 in pEGFP in frame	CTGTACAAGT	CCGGACTCAG	60	
51-S1515-pEGFP-NRF-I-EGFP-C_B02.ab1	CTGTACAAGT	CCGGACTCAG	46	
Consensus	CTGTACAAGT	CCGGACTCAG		
			1.360	
51-S1515-pEGFP-NRF-II-EGFP-C_C02.ab1	ATCTCGAGTA	ATGATGGACT	67	
Nrf2 in pEGFP in frame	ATCTcgagta	atgatggact	80	
51-S1515-pEGFP-NRF-I-EGFP-C_B02.ab1	ATCTCGAGTA	ATGATGGACT	66	
Consensus	ATCTCGAGTA	ATGATGGACT		
			1.380	
51-S1515-pEGFP-NRF-II-EGFP-C_C02.ab1	TGGAGCTGCC	GCCGCCGGGA	87	
Nrf2 in pEGFP in frame	tggagctgcc	gccgccggga	100	
51-S1515-pEGFP-NRF-I-EGFP-C_B02.ab1	TGGAGCTGCC	GCCGCCGGGA	86	
Consensus	TGGAGCTGCC	GCCGCCGGGA		
			2.120	
51-S1515-pEGFP-NRF-II-EGFP-C_C02.ab1	TCAGCAGCAT	CCTCTCCACA	20	
Nrf2 in pEGFP in frame	tcagcagcat	cctctccaca	20	
51-S1515-pEGFP-NRF-I-EGFP-C_B02.ab1	TCAGCAGCAT	CCTCTCCACA	20	
Consensus	TCAGCAGCAT	CCTCTCCACA		
			2.140	
51-S1515-pEGFP-NRF-II-EGFP-C_C02.ab1	GAAGACCCCA	ACCAGTTGAC	40	
Nrf2 in pEGFP in frame	gaagacccca	accagt tgac	40	
51-S1515-pEGFP-NRF-I-EGFP-C_B02.ab1	GAAGANCCCA	AC - - - - -	32	
Consensus	GAAGACCCCA	ACCAGTTGAC		
			2.160	
51-S1515-pEGFP-NRF-II-EGFP-C_C02.ab1	AG - - - - -		42	
Nrf2 in pEGFP in frame	agtgaactca		50	
51-S1515-pEGFP-NRF-I-EGFP-C_B02.ab1	- - - - -		32	
Consensus	AG - - - - -			

Tabelle 55: HO-1 Induktion durch tBHQ, Quercetin, Kaempferol, Apigenin, Luteolin (je 100 μ M) in Caco 2 Zellen nach 24 h Inkubation



HO-1 Transkripte	DMSO	tBHQ	Quercetin	Kaempferol	Apigenin	Luteolin
Densitometrie	28,8	29,35	28,09	29,98	30,59	36,1
(x-fach)	1	1,019097222	0,97534722222	1,0409722222	1,06215278	1,25347222
Densitometrie	46,2	77,93	38,13	28,27	31,21	59,46
(x-fach)	1	1,686796537	0,82532467532	0,6119047619	0,675541126	1,28701299
Densitometrie	15,95	47,44	22,08			
(x-fach)	1	2,974294671	1,38432601881	0	0	0

Tabelle 56: HO-1 Induktion nach 4h Inkubation mit tBHQ, Quercetin mit Hemin Vorinkubation (1h) oder alleiniger Hemin Vorinkubation (1h)

HO-1	DMSO	tBHQ	Quercetin + Hemin	Hemin
Densitometrie	62,20	135,54	127,80	110,08
(x-fach)	1,00	2,18	2,05	1,77
Densitometrie	73,80	110,55	80,96	40,59
(x-fach)	1,00	1,50	1,10	0,55
Densitometrie	60,22	115,73	70,78	77,31
(x-fach)	1,00	1,92	1,18	1,28
Densitometrie	76,02	115,13	93,36	77,64
(x-fach)	1,00	1,51	1,23	1,02

7. Veröffentlichungen

Wätjen, W., Kulawik, A., Suckow-Schnitker, A. K., Rohrig, R., Ruhl, S., Chovolou, C., Kampkötter, A., Addae-Kyereme, J., Wright, C. W. und Passreiter, C. M. (2007) Pterocarpans phaseollin and neorautenol isolated from *Erythrina addisoniae* induce apoptotic cell death accompanied by inhibition of ERK phosphorylation. *Toxicology* 242, 71-79

Wätjen, W., Suckow-Schnitker, A. K., Rohrig, R., Kulawik, A., Addae-Kyereme J., Wright C. W., Passreiter, C. M. (2008) Prenylated flavonoid derivatives from the bark of *Erythrina addisoniae*. *Natural Products* April, 71 (4): 735-8

Posterpräsentationen:

Rohrig R., Kulawik A., Ruhl S., Chovolou Y., Kampkötter A., Suckow-Schnitker A. K., Passreiter C., Kahl R. und Wätjen W.; Proapoptotic properties of prenylated flavonoids from *Erythrina addisoniae*. 13.03.2007-15.03.2007, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz, Deutschland, 48. *Frühjahrstagung der DGPT*

Rohrig R., Kulawik A., Ruhl S., Chovolou Y., Kampkötter A., Suckow-Schnitker A.K., Passreiter C., Kahl R. und Wätjen W.; Proapoptotic properties of prenylated flavonoids from *Erythrina addisoniae*. 22.6.2007, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Deutschland, *Tag des wissenschaftlichen Nachwuchses*

Rohrig R., Ruhl S., Ohler S., Kahl R., Wätjen W.; Role of dietary flavonoids in the activation of the antioxidant responsive element (ARE) and the induction of phase II drug metabolizing enzymes. 4.10.2007-5.10.2007, *1st Symposium of the Graduate College GRK 1427: Food, gut and the immune system: A challenge in environmental medicine*

Rohrig R., Ruhl S., Ohler S., Chovolou Y., Kampkötter A., Kahl R. und Wätjen W. Modulation des "Antioxidant Responsive" Elements (ARE) und der Induktion von Phase II Enzymen durch Flavonoide. 11.03.2008-13.03.2008, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz, Deutschland, 49. *Frühjahrstagung der DGPT*

Rohrig R., Ruhl, S., Ohler, S., Kahl, R., Wätjen, W.; Role of dietary flavonoids in the activation of the antioxidant responsive element (ARE) and the induction of phase II drug metabolising enzymes. 3.4.2008-4.4.2008, *2nd Symposium of the Graduate College GRK 1427: Nutrition and Health: Intestinal effects of food constituents*

Rohrig R., Ruhl S., Schmitz R., Bergermann A., Chovolou Y., Kampkötter A., Kahl R., Wätjen W.; Influence of dietary flavonoids on Nrf2-mediated gene-expression. 5.3.2009-6.3.2009, *3rd Symposium of the Graduate College GRK 1427: Nanoparticles and the gastrointestinal tract*

Rohrig R., Ruhl S., Schmitz R., Bergermann A., Chovolou Y., Kampkötter A., Kahl R. und Wätjen W. Modulation der Nrf2 vermittelten Genexpression durch Flavonoide. 10.03.2009-12.03.2009, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz, Deutschland, 50. *Frühjahrstagung der DGPT*

Rohrig R., Ruhl S., Gassmann K., Schmitz R., Bergermann A., Chovolou Y., Kampkötter A., Kahl R., Fritsche E. und Wätjen W. Influence of dietary Flavonoids on Nrf2-mediated gene-expression. 13.09.2009-16.09.2009, International Congress Center, Dresden, Deutschland, *Eurotox 2009*

Rohrig R., Ruhl S., Gassmann K., Schmitz R., Bergermann A., Chovolou Y., Kampkötter A., Kahl R., Fritsche E. und Wätjen W. Influence of dietary flavonoids on Nrf2-mediated gene-expression. 8.10.2009-9.10.2009, 4th Symposium of the Graduate College GRK 1427: Endocrine Disruptors: Mode of action and exposure assessment

Rohrig R., Ruhl S., Havermann S., Gassmann K., Schmitz R., Bergermann A., Chovolou Y., Kampkötter A., Fritsche E., Kahl R., Wätjen W. Influence of dietary flavonoids on the Nrf2/ARE signaling pathway. 23.3.2010-25.3.2010, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz, Deutschland, *51. Jahrestagung der DGPT*

8.Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei PD Dr. Wim Wätjen für die Möglichkeit meine Promotion im Institut für Toxikologie und im Rahmen des Graduiertenkollegs 1427 "Nahrungsinhaltsstoffe als Signalgeber nukleärer Rezeptoren im Darm" durchführen zu können bedanken. Darüber hinaus möchte ich mich für die fachliche und menschliche Unterstützung während meiner Doktorarbeit bedanken.

Herrn Prof. Dr. Peter Proksch danke ich für die Bereitschaft meine Dissertation als Gutachter zu betreuen und für sein Interesse an meiner Arbeit.

Ein weiterer großer Dank gilt allen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern des Instituts für Toxikologie, die dafür gesorgt haben, dass die letzten drei Jahre unvergesslich bleiben.

- Frau Dr. Yvonne Chovolou danke ich für die zahlreichen Denkanstöße, in jeder Hinsicht und unter besonderer Berücksichtigung des verantwortungsvollen Arbeitens sowie für die uneingeschränkte Hilfsbereitschaft.

- PD Dr. Andreas Kampkötter danke ich für das Interesse an der Thematik und Diskussionsbereitschaft.

- Mein besonderer Dank richtet sich an die vielen guten Geister des Instituts, an Frau Ingrid Köhler und Frau Hermine Kannengießner für die Transfektionen und vielen Messungen und das "Mensch-bleiben", an Frau Sandra Ohler für die Tipps und Tricks (Ist da SDS drin?) und die Fürsorge (Hast du eigentlich schon was gegessen?), an Frau Kerstin DeMezzo für die Bestellungen und den dringend benötigten Kaffee und *last not least* an Frau Martina Bennat, die für uns Doktoranden alle bürokratischen Hürden aus dem Weg geräumt hat.

Den anderen beiden Teilen des Doktoranden-Dreigestirns möchte ich von Herzen für die tolle Zeit danken. Voran Regine Lüpertz sowohl für die fachliche als auch die freundschaftliche Diskussionsbereitschaft während und auch nach der Arbeitszeit und Sven Ruhl für seine permanent gute Laune, die manchmal selbst mich anzustecken vermochte. Danke an euch beide für die tollen Reisen zu den Fortbildungskursen und Kongressen.

Danke an alle Praktikanten, Medizin-Doktoranden, Diplomanden und Masterarbeitsstudenten, ihr habt mich immer wieder auf die Probe gestellt und so manches Mal eines Besseren belehrt. Besonderer Dank an Sarah J. Böddeker und bleib bloß so wie du bist!

Zum Schluss möchte ich meiner Familie für die nie versiegende Unterstützung in allen Belangen und den unerschütterlichen Glauben an mich danken. Allen meinen noch nicht genannten Freunden gebührt außerordentliches Lob für die engelsgleiche Geduld während der letzten drei Jahre.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass die vorliegende Arbeit von mir selbstständig und ohne fremde Hilfe angefertigt wurde. Es wurden keine als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet. Zitate wurden kenntlich gemacht.

Düsseldorf, den