

Abschlussbericht für das von der
Union zur Förderung von Oel- und Proteinpflanzen e.V. (UFOP)
geförderte Projekt

Rapsöl, ein Vitamin E-reiches Lebensmittel zur Prävention neurodegenerativer Erkrankungen

Projektleiter:

Prof. Dr. Gerald Rimbach

Stipendiatin:

M.Sc. Sonja Gaedicke

Institut für Humanernährung und Lebensmittelkunde

Christian Albrechts Universität

Hermann-Rodwald-Strasse 6

24118 Kiel

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	5
2	MATERIALIEN UND METHODISCHES VORGEHEN.....	8
2.1	Herstellung des Rapsöls.....	8
2.2	Aufreinigung des Öls zur Entfernung von Vitamin E und weiterer natürlicher Antioxidantien ...	8
2.3	Herstellung der Versuchsdiäten	9
2.4	Versuchsplan des Fütterungsexperiments	10
2.5	Vitamin E Analytik.....	10
2.6	Bestimmung der F ₂ -Isoprostane.....	11
2.7	Bestimmung der antioxidativen Enzyme Superoxiddismutase (SOD), Glutathionperoxidase (GPx) und Gesamtglutathion (GSH).....	11
2.8	Bestimmung der Expression alzheimerrelevanter Gene mittels real-time qRT-PCR.....	13
3	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	14
3.1	Rapssamen, Rapsöl und Diäten.....	14
3.2	Fettsäurezusammensetzung in Rapssamen	14
3.3	Tocopherolgehalte der Diäten	15
3.4	Futteraufnahme und Lebendmasseentwicklung	16
3.5	α - und γ -Tocopherolgehalte im Plasma und den Geweben	17
3.6	F ₂ -Isoprostane im Plasma	20
3.7	Status antioxidativer Enzyme im Gehirn	21
3.8	Genexpression alzheimerrelevanter Gene.....	23
4	ZUSAMMENFASSUNG.....	28
5	QUELLENVERZEICHNIS.....	29

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Tocopherolgehalte in Rapssamen und daraus hergestelltem kalt gepresstem Öl.	14
Abbildung 2: Fettsäurezusammensetzung der Rapssamen (S-NAP 944) und der daraus hergestellten Öle	15
Abbildung 3: Futtermittelaufnahme der Fischer 344 Ratten während der 24-wöchigen Fütterungsstudie....	16
Abbildung 4: Entwicklung der Lebendmasse der Fischer 344 Ratten während der 24-wöchigen Fütterungsstudie	16
Abbildung 5: α - und γ -Tocopherolgehalte im Plasma von Fischer 344 Ratten in Abhängigkeit vom α -Tocopherolgehalt der Diät.	18
Abbildung 6: α - und γ -Tocopherolgehalte in der Leber von Fischer 344 Ratten in Abhängigkeit vom α -Tocopherolgehalt der Diät.	18
Abbildung 7: α - und γ -Tocopherolgehalte im Cortex von Fischer 344 Ratten in Abhängigkeit vom α -Tocopherolgehalt der Diät.	19
Abbildung 8: α - und γ -Tocopherolgehalte im Cortex von Fischer 344 Ratten in Abhängigkeit vom α -Tocopherolgehalt der Diät.	19
Abbildung 9: α - und γ -Tocopherolgehalte im Muskel von Fischer 344 Ratten in Abhängigkeit vom α -Tocopherolgehalt der Diät.	20
Abbildung 10: 8-iso-Prostaglandin $F_{2\alpha}$ im Plasma von Fischer 344 Ratten in Abhängigkeit vom α -Tocopherolgehalt der Diät.	20
Abbildung 11: Aktivität der Superoxiddismutase im Cortex	21
Abbildung 12: Aktivität der Glutathionperoxidase im Cortex	22
Abbildung 13: Gesamtglutathionkonzentrationen im Cortex	22
Abbildung 14: Genexpression des Amyloid Vorstufenproteins in Cortex und Hippocampus in Abhängigkeit vom α -Tocopherolgehalt der Diät.	24
Abbildung 15: Genexpression des Amyloid beta Bindeproteins in Cortex und Hippocampus in Abhängigkeit vom α -Tocopherolgehalt der Diät.	24
Abbildung 16: Genexpression einer α -Sekretase in Cortex und Hippocampus in Abhängigkeit vom α -Tocopherolgehalt der Diät.	25
Abbildung 17: Genexpression einer β -Sekretase in Cortex und Hippocampus in Abhängigkeit vom α -Tocopherolgehalt der Diät.	25
Abbildung 18: Genexpression der Acetylcholinesterase in Cortex und Hippocampus in Abhängigkeit vom α -Tocopherolgehalt der Diät.	26
Abbildung 19: Genexpression von Bcl 2 in Cortex und Hippocampus in Abhängigkeit vom α -Tocopherolgehalt der Diät.	26
Abbildung 20: Genexpression von Bax in Cortex und Hippocampus in Abhängigkeit vom α -Tocopherolgehalt der Diät.	27
Abbildung 21: Ratio Bcl2/Bax in Cortex und Hippocampus in Abhängigkeit vom α -Tocopherolgehalt der Diät.	27

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Primersequenzen der analysierten Gene	13
Tabelle 2: Tocopherolgehalte der Diäten	15
Tabelle 3: Untersuchte Gene, die in der Pathogenese der AD eine Rolle spielen	23

1 Einleitung

Mit steigendem Lebensalter steigt auch gleichzeitig das Risiko für das Auftreten neurodegenerativer Erkrankungen signifikant an. Der Anteil älterer Menschen in der Bevölkerung nimmt in den Industrieländern stetig zu. Daher wird es bei gleichbleibender Inzidenz zu einer drastischen Erhöhung der Zahl der Demenzpatienten, von zur Zeit ca. 1 Mio. auf ca. 2 Mio. im Jahr 2050, kommen (Bickel 2001).

Die Alzheimer Demenz (AD), die auch als Morbus Alzheimer bezeichnet wird, ist die häufigste neurodegenerative Erkrankung. Klinische Symptome sind ein fortschreitender Gedächtnisverlust und die Beeinträchtigung der kognitiven Fähigkeiten. Histologische Merkmale sind extrazelluläre Plaques, bestehend aus dem Amyloid-beta Peptid, und intrazelluläre neurofibrilläre Bündel, bestehend aus hyperphosphoryliertem Tauprotein. Weitere Kennzeichen sind synaptische Dysfunktion, massiver progressiver Neuronenverlust, besonders in Hippocampus und Cortex, sowie die selektive Depletion von Neurotransmittersystemen (z.B. Acetylcholin) (Leuner et al. 2007). Auf zellulärer Ebene wird die AD unter anderem mit erhöhtem oxidativen Stress assoziiert. Neurodegeneration und oxidativer Stress sind eng miteinander verknüpft. Prozesse, die zum Absterben von Neuronen führen, beruhen auf oder führen zu einer vermehrten Bildung von reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies. Ein Ungleichgewicht zwischen Radikalbildung und -elimination wird kausal mit dem Auftreten der AD in Zusammenhang gebracht. Epidemiologische Studien sowie erste klinische Interventionsstudien beim Menschen weisen darauf hin, dass eine hohe Aufnahme von Vitamin E möglicherweise positive Effekte im Hinblick auf die Prävention altersabhängiger neurodegenerativer Erkrankungen, wie AD, haben könnte.

Auch im Tiermodell konnten Zusammenhänge zwischen der Vitamin E-Aufnahme und für die AD relevanten physiologischen Prozessen beobachtet werden. Mittels Genchiptechnologie wurden zum Beispiel bei der Labormaus Vitamin E-sensitive Gene identifiziert, die in der Prävention der AD eine wichtige Rolle spielen. Vitamin E modulierte in diesen Versuchen u.a. mRNA-Spiegel von Genen, die zentral an der „Clearance“ und Stabilisierung des neurotoxischen Amyloid-beta Proteins beteiligt

sind. Die Aggregation von Amyloid-beta ist ein molekulares Schlüsselereignis in der Pathogenese des AD und für die Bildung der sogenannten senilen Plaques verantwortlich. Weiterhin wurden im Gehirn von Ratten durch Vitamin E die Transkriptionsniveaus von Genen sehr deutlich verändert, die den programmierten Zelltod (Apoptose) und somit den Untergang von Neuronen verhindern (Rota et al. 2005).

Angesichts fehlender Therapien zur Linderung oder Heilung der AD ist die Erforschung der AD-Prävention von besonderer Bedeutung. Die Aufnahme natürlicher Antioxidantien, insbesondere durch Vitamin E-reiche Lebensmittel bzw. Vitamin E Supplementierung, zur Reduzierung des AD-Risikos ist seit Jahren Schwerpunkt wissenschaftlicher Diskussionen. Positive Effekte, die mit der Aufnahme von Vitamin E und der Verlangsamung der AD-Entwicklung (Sano et al. 1997; Joseph et al. 1998) oder der Reduzierung des AD-Risikos verbunden werden (Engelhart et al. 2002; Morris et al. 2002), stehen Studien gegenüber, die keine Assoziationen zwischen der Vitamin E-Aufnahme und der AD finden konnten (Blacker 2005; Fillenbaum et al. 2005) oder eine Empfehlung einer VE-Supplementierung aufgrund möglicher adverser Folgen in Frage stellen (Boothby & Doering 2005; Miller et al. 2005).

Rapsöl ist ein qualitativ hochwertiges Öl mit einer für die Humanernährung günstigen Fettsäurezusammensetzung und einem hohen Gehalt an Vitamin E. Züchterische Maßnahmen haben zur Etablierung von Rapsorten geführt, die mehr als 1000 ppm Vitamin E enthalten. Die biologische Verfügbarkeit von natürlichem Vitamin E (RRR-Tocopherol), wie es im Rapsöl vorliegt, ist ca. 40% höher als die des synthetisch hergestellten all rac-Tocopherols (Brigelius-Flohé & Traber 1999). Aus ernährungsphysiologischer Sicht ist es daher wünschenswert, die Aufnahme von Vitamin E aus natürlichen Quellen zu erhöhen.

Vitamin E ist der Oberbegriff für eine Gruppe von acht fettlöslichen Substanzen, vier Tocopherolen und vier Tocotrienolen, mit der biologischen Wirkung von α -Tocopherol. Alle diese Verbindungen weisen im Molekül ein Ringsystem (Chromanring) mit einer freien OH-Gruppe sowie eine gesättigte oder ungesättigte

isoprenoide Seitenkette auf. Je nach Anzahl und Position der Methylgruppen, die am Chromanring substituiert sind, werden die verschiedenen Tocopherole und Tocotrienole unterschieden in α -, β -, γ -, δ -Tocopherol und α -, β -, γ -, δ -Tocotrienol. Aufgrund der drei Chiralitätszentren an den C-Atomen 2, 4' und 8' der Tocopherole ergeben sich 8 verschiedene Stereoisomere (RRR, RSR, RRS, RSS, SRR, SSR, SRS, SSS) für jedes Tocopherol. Natürliche Tocopherole werden nur von photosynthetisch aktiven Organismen, vorwiegend Pflanzen, synthetisiert und liegen ausschließlich in der RRR-Konformation vor. Synthetisches (all rac-) α -Tocopherol ist ein racemisches Gemisch aller acht Stereoisomere. Die Vitamin E-Formen und deren Stereoisomere unterscheiden sich in ihrer biologischen Aktivität, RRR- α -Tocopherol ist die Vitamin E-Form, die mengenmäßig am meisten im menschlichen Blut und Gewebe vorkommt und die höchste biologische Aktivität aufweist (Brigelius-Flohé & Traber 1999).

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Einfluss von Vitamin E aus der natürlichen Quelle Rapsöl auf die Genexpression und Parameter des oxidativen Stresses im Gehirn von Labortieren systematisch zu untersuchen.

2 Materialien und methodisches Vorgehen

2.1 Herstellung des Rapsöls

Grundlage des in der Fütterungsstudie eingesetzten Rapsöls war die Rapsorte S-NAP 944. Es handelt sich dabei um eine durch züchterische Maßnahmen gewonnene tocopherolreiche Rapsorte. Diese wurde freundlicherweise durch die Norddeutsche Pflanzenzucht Hans-Georg Lembke KG (NPZ) zur Verfügung gestellt. Die Pressung des Rapsöls erfolgte im Unterauftrag bei der Pilot Pflanzenöltechnologie Magdeburg e.V. (PPM e.V.). Zu Beginn wurde der Raps einer Qualitätsbewertung unterzogen. Die Rapssamen waren ausgereift, hatten eine mittlere bis kleine Korngröße, waren ohne Besatz und ihr Geruch war neutral bis rapstypisch. Um die Ölausbeute zu erhöhen, wurden die Rapssamen in einer Haferquetsche vorgebrochen. Da eine Warmpressung eine anschließende Raffination erfordert, bei deren letztem Schritt, der Desodorierung, Vitamin E verloren geht (Willner et al. 1997), wurde eine kleintechnische, vitaminschonende Kaltpressung (Pressentyp: Komet S87G) durchgeführt. Das Pressöl hatte eine kräftige, gelbgrüne Farbe. Für eine bessere Haltbarkeit wurde es per Vakuumfiltration (Filterhilfsmittel: Filtrasit) filtriert und hatte danach eine goldgelbe Färbung und roch rapstypisch.

2.2 Aufreinigung des Öls zur Entfernung von Vitamin E und weiterer natürlicher Antioxidantien

Die im Rapsöl vorhandenen natürlichen Antioxidantien wurden mithilfe der Säulenchromatographie unter Verwendung von Aluminiumoxid als stationäre Phase entfernt. Dafür wurden 250 g Aluminiumoxid für 8 Stunden bei 100°C und für weitere 12 Stunden bei 200°C erhitzt. Die Öffnung einer Glassäule (60 cm Länge, 3 cm Innendurchmesser) wurde mit einem mit Hexan getränkten Wattebausch ausgelegt. Das Entfernen sämtlicher Luft aus der Watte war dabei von großer Bedeutung, um das Öl vor Oxidation zu schützen. Aus dem im Exsikkator abgekühlten Aluminiumoxid und n-Hexan wurde eine Suspension hergestellt und mit dieser schrittweise die Säule gepackt. Die Säule wurde mit einem weiteren Wattebausch verschlossen, um einen Sauerstoffeintritt und das Aufwirbeln der stationären Phase

beim Eingießen des Öls zu verhindern. Überstehendes n-Hexan wurde per Abfaßhahn aus der Säule abgelassen, bis der obere Wattebausch mit n-Hexan bedeckt war. Das zu strippende Öl wurde mit n-Hexan (1:1) gemischt und langsam auf die Säule gegeben. Um das auf der Säule stehende Öl vor Licht zu schützen wurde die Säule mit Aluminiumfolie umwickelt und das aufgereinigte („gestrippte“) Öl direkt in eine dunkle Flasche abgefüllt. Während der Chromatographie wurden Antioxidantien, besonders Vitamin E und Carotinoide, freie Fettsäuren und Mono- und Diglyceride an die stationäre Phase adsorbiert und dadurch aus dem Öl entfernt. Nachdem der gesamte Öl-Hexan-Mix über die Säule gelaufen war, wurde mit reinem n-Hexan nachgespült, um das restliche Öl von der Säule zu eluieren. Das aufgereinigte Rapsöl wurde mit Stickstoff begast und bedeckt und bei -20°C gelagert. Die Abwesenheit von Tocopherolen in dem gestrippten Öl wurde mittels HPLC mit einem Fluoreszenzdetektor verifiziert. Dafür wurden ca. 100 mg Öl in Eppendorfröhrchen eingewogen und 400 µl n-Heptan (mit 1 mg/ml BHT) hinzugefügt. Der Mix wurde 5 Sekunden gevortext und direkt in die HPLC injiziert (Säule: LiChrosphere Si 100, 5 µm, 10 x 250 mm; Fließmittel: n-Heptan/Isopropanol 100:1; Fließrate: 1,0 ml/min; $\lambda_{\text{Excitation}}$: 290 nm; $\lambda_{\text{Emission}}$: 328 nm). Das beim Strippen verwendete Hexan wurde mit Hilfe eines Rotationsverdampfers aus dem Öl entfernt, das Öl erneut mit Stickstoff begast und bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.3 Herstellung der Versuchsdäten

Bei den Versuchsdäten handelte es sich um halbsynthetische Diäten auf Basis von Casein, Maisquellstärke, Zucker, Cellulose, Mineralstoffen, Vitaminen (Prämix ohne Vitamin E) und Rapsöl aus S-NAP 944. Teile des nativen und des gestrippten Öles wurden so gemischt, dass vier verschiedene Öle mit steigenden Konzentrationen an α -Tocopherol entstanden. Das Rapsöl stellte die alleinige Fettquelle dar und der Fettanteil betrug jeweils 5% des Futters. Die Versuchsdäten wurden kalt pelletiert und in Einheiten à 1,5 kg mit Sauerstoffabsorberpad in PE-Beuteln verpackt. Die vier hergestellten Versuchsdäten unterschieden sich ausschließlich in ihren α -Tocopherolgehalten, welche per HPLC bestimmt wurden und bei <1, 8, 15 und 151 ppm (mg/kg Futter) lagen. Die Diäten wurden bei -20°C gelagert.

2.4 Versuchsplan des Fütterungsexperiments

Zweiunddreißig männliche Fischer 344-Ratten (Charles River Laboratories, Anfangsgewicht ca. 50 g, Endgewicht ca. 360 g) wurden über einen Zeitraum von 6 Monaten mit den jeweiligen Versuchsdiäten gefüttert. Hierzu wurden sie in 4 Gruppen à 8 Tiere aufgeteilt und paarweise unter Standardbedingungen gehalten (22°C, 55% rel. Luftfeuchte, Hell-Dunkel-Wechsel im 12 Stunden-Rhythmus). Der Futtermittelverbrauch wurde täglich und die Lebendmasse der Tiere wöchentlich erfasst. Am Ende der Fütterungsstudie wurden die Tiere mit CO₂-Gas betäubt und dekapitiert. Zielorgan war das Gehirn, es wurden aber auch andere Organe (Leber, Lunge, Muskel) zur Analyse entnommen. Jeweils ein Teil des Cortex und die Hippocampi wurden in RNAlater gelagert. Die restlichen präparierten Organe wurden sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

2.5 Vitamin E Analytik

Plasma

Pro Tier wurden jeweils in Doppelbestimmung 100 µl Plasma, 800 µl H₂O_{dejon.}, 2000 µl Ethanol (mit BHT, mg/ml) und 2000 µl Hexan in ein Reagensröhrchen mit Schraubdeckel gegeben, das Gefäß verschlossen, 60 Sekunden per Hand geschüttelt und anschließend für 5 Minuten bei 167x g zentrifugiert. Von der Hexanphase wurden 1000 µl abgenommen und im Stickstoffstrom eingeeengt. Der Rückstand wurde in 250 µl Methanol-Wasser-Gemisch (v/v, 98:2) aufgenommen, 15 Sekunden gevortext und mittels HPLC mit Fluoreszenzdetektor (stationäre Phase: Waters ODS-2, 100 mm x 4,6 mm; mobile Phase: MeOH/H₂O, v/v, 98:2; Fließgeschwindigkeit: 1,2 ml/min, λ_{Excitation}: 296 nm; λ_{Emission}: 325 nm) gemessen.

Gewebe

Pro Tier wurden jeweils in Doppelbestimmung 100 mg Gewebe in ein Reagensröhrchen mit Schraubdeckel eingewogen, dazu wurden jeweils 2000 µl Ethanol (mit 1% Ascorbinsäure), 700 µl H₂O_{dejon.} und 300 µl KOH gegeben. Das Gefäß wurde verschlossen und die Proben 30 Sekunden gevortext, 30 Minuten bei 70°C im Wasserbad verseift und anschließend im Eisbad abgekühlt. Zu den Proben

wurden jeweils 50 µl BHT in Ethanol (mg/ml) und 2000 µl Hexan gegeben, die Proben 60 Sekunden per Hand geschüttelt und 5 Minuten bei 167x g zentrifugiert. Von der Hexanphase wurden 1000 µl abgenommen und im Stickstoffstrom eingengt. Der Rückstand wurde in 250 µl Methanol-Wasser-Gemisch (v/v, 98:2) aufgenommen, 15 Sekunden gevortext und mittels HPLC (s.o.) gemessen.

2.6 Bestimmung der F₂-Isoprostane

Als Biomarker des oxidativen Stresses auf Lipidebene wurden F₂-Isoprostane mit Hilfe eines kommerziellen ELISA kits (Direct 8-iso-Prostaglandin F_{2α} Enzyme Immunoassay Kit, Assay Designs, Ann Arbor, MI, USA) nach Angaben des Herstellers quantifiziert.

2.7 Bestimmung der antioxidativen Enzyme Superoxiddismutase (SOD), Glutathionperoxidase (GPx) und Gesamtglutathion (GSH)

Die antioxidativen Enzyme SOD, GPx und GSH wurden in Gewebehomogenaten des Cortex bestimmt.

Herstellung der Gewebehomogenate

Die Gewebeproben aus den Cortices wurden in phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) mit einem Dispergiergerät für 5-10 Sekunden homogenisiert (1:10). Die Homogenate wurden zentrifugiert (10 Minuten, 3500 x g, 4°C), der Überstand in Eppendorfröhrchen pipettiert und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

Proteinbestimmung

Der Gesamtproteingehalt der Gewebehomogenate wurde mit dem BCA™ Protein Assay Kit (Pierce, Rockford, USA) nach Angaben des Herstellers bestimmt. Die Enzymaktivitäten wurden auf den Proteingehalt normalisiert.

SOD

Die Bestimmung der Gesamtaktivität der SOD erfolgte nach einer Methode von Marklund und Marklund (1974), die sowohl die Aktivität des Cu-Zn-abhängigen Enzyms als auch die der Mn-abhängigen Form erfasst. Das Prinzip dieser Methode beruht auf der SOD-katalysierten Hemmung der in wässriger Lösung stattfindenden Autoxidation von Pyrogallol. Die Zunahme des gelb gefärbten Oxidationsproduktes von Pyrogallol wurde anhand der Absorptionzunahme bei 420 nm spektrophotometrisch gemessen. Je größer die Zunahme des oxidierten Pyrogallols, ausgedrückt als Extinktionsänderung pro Minute, umso geringer die Aktivität der SOD. Eine Einheit (U) SOD wurde definiert als die Enzymmenge, die eine 50%ige Hemmung der Pyrogallolautoxidation vermittelt.

SeGPx

Die Aktivität der zellulären selenabhängigen GPx (SeGPx) wurde nach der Methode von Lawrence und Burk (1976) durchgeführt. Die GPx katalysiert in Anwesenheit von reduziertem Glutathion (GSH) die Reduktion von Hydrogenperoxid zu Wasser unter Entstehung von oxidiertem Glutathion (GSSG). Durch den Verbrauch von NADPH wird GSSG kontinuierlich sofort wieder durch die zugesetzte Glutathion-Reduktase (GR) reduziert, wobei NADP^+ entsteht. In Anwesenheit von Wasserstoffperoxid als Substrat lässt sich aus dem Verbrauch von NADPH/H^+ indirekt die Aktivität der SeGPx bestimmen, indem die Abnahme der Extinktion von NADPH/H^+ bei einer Wellenlänge von 340 nm verfolgt wird. Bovine GPx diente als Standard.

GSH

Zur Bestimmung des Gesamtglutathions (GS_x ; $\text{GSH} + 2 \text{GSSG}$) wurde die Methode nach Tietze (1969) mit Modifikationen nach Dringen und Hamprecht (1996) angewandt. Dabei wurde die Reaktivität der Thiolgruppe des Glutathions zur quantitativen Bestimmung herangezogen: Reduziertes Glutathion (GSH) reagiert spontan mit der synthetischen 5,5'-Dithio-bis(nitrobenzoesäure) (DTNB) unter Bildung von GSTNB (enthält oxidiertes Glutathion). Dabei entsteht ein chromogenes Thiolprodukt, das TNB, das photometrisch bei $\lambda = 405 \text{ nm}$ gemessen werden kann. Das oxidierte Glutathion im GSTNB wird in Anwesenheit von NADPH durch die Glutathion-Reduktase unter Freisetzung eines weiteren Moleküls TNB in reduziertem Glutathion rücküberführt, welches erneut mit DTNB reagieren kann. In der beschriebenen Reaktion wird der Gesamtgehalt an Glutathion erfasst.

2.8 Bestimmung der Expression alzheimerrelevanter Gene mittels real-time qRT-PCR

Isolierung der RNA

Die Gesamt-RNA wurde entsprechend dem RNeasy® Lipid Tissue Protokoll der Firma Qiagen isoliert. DNA-Verdau erfolgte mit dem RNase-Free DNase Set (Qiagen, Hilden, Deutschland). Die Konzentration der isolierten RNA wurde spektrophotometrisch bei 260 nm gemessen. Die Reinheit wurde durch das Verhältnis aus 260/280 nm bestimmt. Die Konzentration der RNA wurde auf 100 pg/µl eingestellt. Aliquote der RNA wurden bis zur Durchführung der PCR-Experimente bei -80°C gelagert.

qRT-PCR

Primersequenzen für die real-time RT-PCR-Experimente wurden mit Primer3 Software konzipiert und bei der Firma MWG (Ebersberg, Deutschland) gekauft. Einstufige quantitative reverse Transkriptase PCR wurde mit dem QuantiTect® SYBR® Green RT-PCR Kit (Qiagen) durchgeführt. Jede PCR Reaktion (finales Volumen von 20,0 µl) enthielt jeweils 0,45 µl sowohl des „Forward“ als auch des „Reverse“ Primers, 22,5 µl des QuantiTect® SYBR® Green RT-PCR Mastermixes, 0,45 µl QuantiTect RT-Mix, 3,15 µl Wasser und 18 µl RNA-Verdünnung. Die Amplifizierung erfolgte in einem Rotor-Gene 3000 Thermocycler (Corbett Research, Sydney, Australien). Die relativen Gehalte an mRNA der Gene wurde quantifiziert als das Verhältnis zwischen der Menge der mRNA des Zielgens und des Housekeeping-Gens β-Aktin.

Tabelle 1: Primersequenzen der analysierten Gene

Gen	Primersequenz vorwärts (5'-3')	Primersequenz rückwärts (5'-3')
β-Aktin	GGGGTGTTGAAGGTCTCAA	TGTCACCAACTGGGACGATA
APP	CAG CGT GTC ATC CCA AAG T	GCG TGC TCG TTC TCA TCT C
Apba1	AGC AGT AAG CCG GAT CAA GA	GAT CCT CTG GGT GGA GAT GA
Adam 10	GGG CAA TGT GCA GGT TCT AT	TGA ACT GCT TGT TCC ACT GC
Bace 1	AAT CAG TCC TTC CGC ATC AC	GGC TCG ATC AAA GAC CAC AT
Ache	CAG CAA TAC GTG AGC CTG AA	TTC CAG TGC ACC ATG TAG GA
Bax	AGC TGC AGA GGA TGA TTG CT	GAT CAG CTC GGG CAC TTT AG
Bcl-2	GGG ATG CCT TTG TGG AAC TA	CTC ACT TGT GGC CCA GGT AT

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Rapssamen, Rapsöl und Diäten

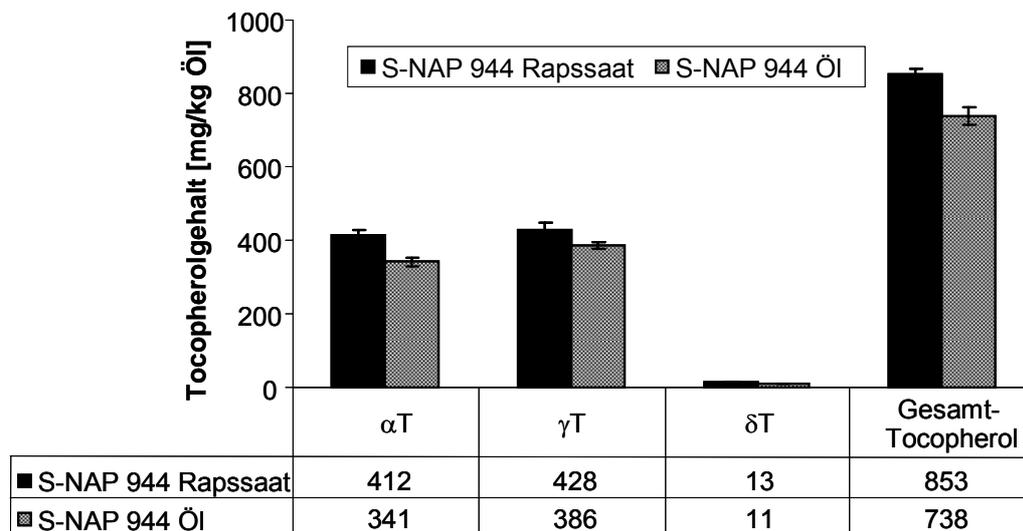


Abbildung 1: Tocopherolgehalte in Rapssamen und daraus hergestelltem kalt gepresstem Öl. Werte sind MW ± Standardabweichung

Trotz schonender Ölpresung konnte die Menge an Vitamin E, die im Rapssamen bestimmt wurde, nicht vollständig im Pressöl wiedergefunden werden, was möglicherweise an der Lokalisation des Tocopherols im Rapssamen liegt.

Tocochromanole werden ganz oder teilweise in Plastiden, z.B. in den Amyloplasten der Rapssamen, synthetisiert (DellaPenna & Pogson 2006). Diese werden möglicherweise nicht gänzlich durch die Kaltpressung zerstört, so dass nicht alle Tocopherole bei der Pressung aus den Plastiden in das Öl gelangen.

3.2 Fettsäurezusammensetzung in Rapssamen

Da Fettsäuren, wie z.B. die Ölsäure, einen Einfluss auf die Genregulation haben, sollte sichergestellt werden, dass sich die Öle und die daraus hergestellten Versuchsdieten lediglich in ihrem Gehalt an Tocopherolen unterscheiden. Aus diesem Grund wurden die Fettsäuremuster des gepressten und des aufgereinigten Öls sowie der Rapssamen bestimmt. Die Rapssamen, das gepresste und das aufgereinigte Öl wiesen identische Fettsäuremuster auf (Abb. 2).

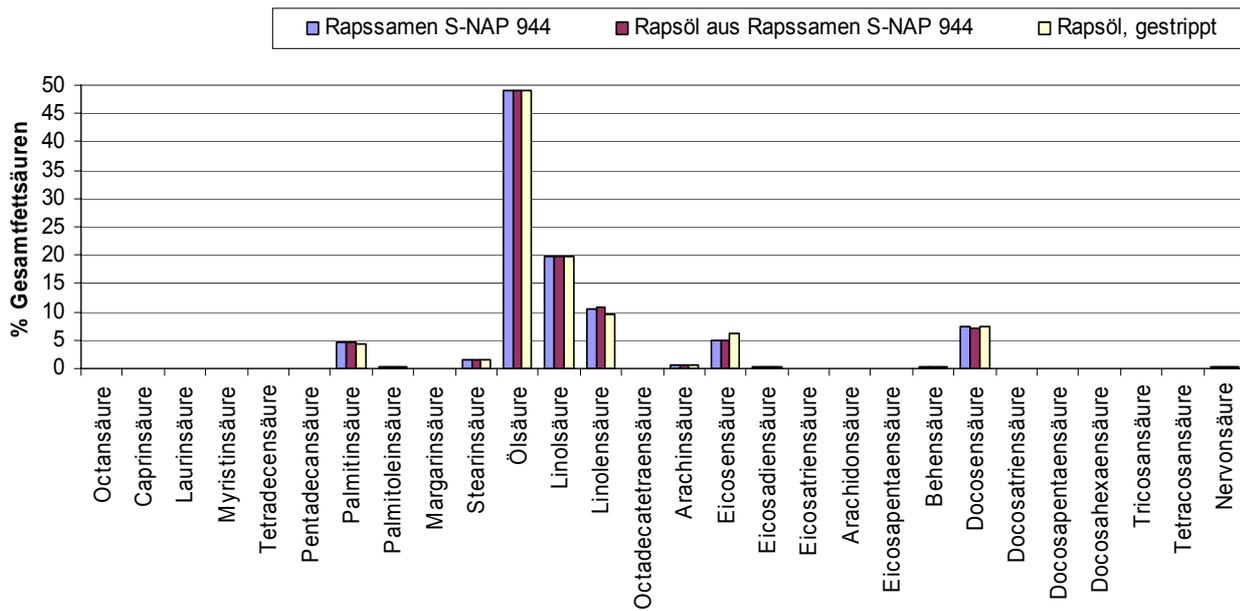


Abbildung 2: Fettsäurezusammensetzung der Rapssamen (S-NAP 944) und der daraus hergestellten Öle

3.3 Tocopherolgehalte der Diäten

In Tabelle 2 sind die Tocopherolgehalte der im Fütterungsversuch eingesetzten Diäten dargestellt.

Tabelle 2: Tocopherolgehalte der Diäten

Gruppe	VE-Gehalt Öl (ppm)				α -Toc-Gehalt Futter (ppm, berechnet)	α -Toc-Gehalt Futter (ppm, bestimmt)
	α	β	γ	δ		
I	-	-	-	-	-	<1
II	170	193	5	368	8-9	8
III	341	386	11	738	17	15
IV	4314	386	11	4738	217	151

Die berechneten α -Tocopherolgehalte stimmen vor allem bei der höchsten Konzentration nicht exakt mit den analysierten Werten überein. Dies könnte u.a. an Verlusten bei der Herstellung der Diäten oder an mangelnder Extraktionskraft des bei der Analyse eingesetzten Lösungsmittels liegen. Die α -Tocopherolgehalte waren so

abgestuft, dass sie bei Langzeitfütterung zu defizienter, marginaler, suffizienter und supraphysiologischer Vitamin E-Versorgung führen sollten.

3.4 Futtermittelaufnahme und Lebendmasseentwicklung

Futtermittelaufnahme

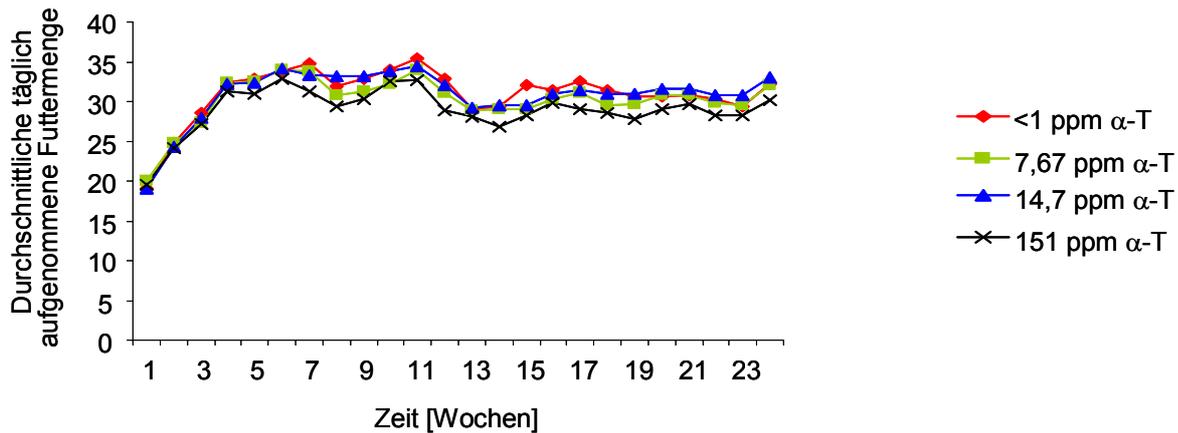


Abbildung 3: Futtermittelaufnahme der Fischer 344 Ratten während der 24-wöchigen Fütterungsstudie

Entwicklung der Lebendmasse

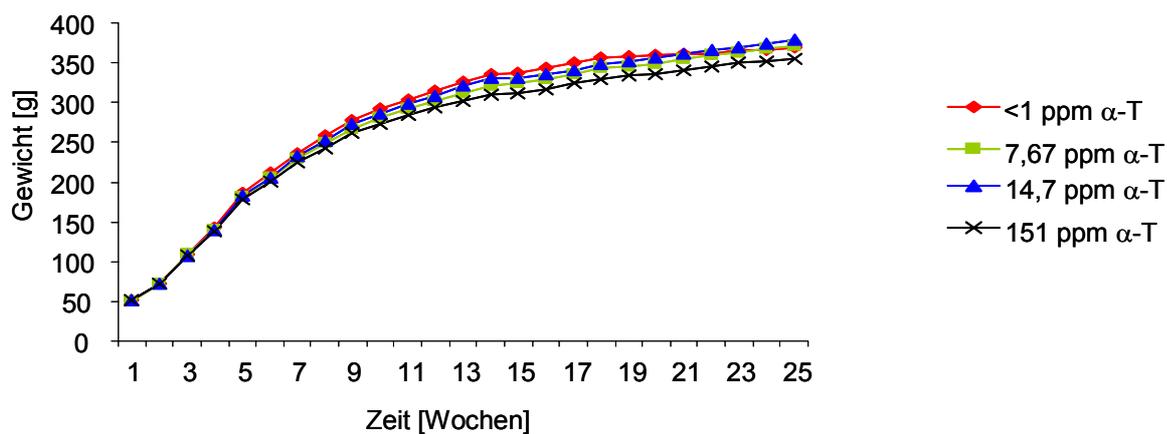


Abbildung 4: Entwicklung der Lebendmasse der Fischer 344 Ratten während der 24-wöchigen Fütterungsstudie

Die Futtermittelaufnahme der Tiere war in jeder Gruppe gleich. Die Tiere haben sich unabhängig vom α -Tocopherolgehalt in der Diät gleichmäßig entwickelt.

3.5 α - und γ -Tocopherolgehalte im Plasma und den Geweben

Die α -Tocopherolgehalte in Plasma, Leber, Cortex, Lunge und Muskel stiegen in Abhängigkeit von den im Futter enthaltenen Vitamin E-Konzentrationen signifikant an (Abb. 5-9). Sehr hohe Konzentrationen von α -Tocopherol in der Diät (151 ppm) reduzierten signifikant die Gehalte an γ -Tocopherol in sämtlichen untersuchten Geweben. Das Phänomen von reduzierten γ -Tocopherolspiegeln durch eine erhöhte Aufnahme von α -Tocopherol wurde bereits bei älteren Probanden (>50 Jahre; Durchschnittsalter $71,8 \pm 6,4$ Jahre) beschrieben (Handelman et al. 1985). Dies könnte zum Beispiel darauf zurückzuführen sein, dass hohe Konzentrationen α -Tocopherol zur Aktivierung des Kernrezeptors *Pregnane X Receptor* (PXR) führen, welcher die Expression von Cytochrom P450-Enzymen (CYP) kontrolliert (Landes et al. 2003). Die Aktivierung von PXR könnte so zu einer vermehrten Expression von CYP führen. CYP sind maßgeblich am Abbau von Vitamin E zu seinen wasserlöslichen Metaboliten beteiligt und metabolisieren alle anderen Vitamine mit deutlich höherer Aktivität als α -Tocopherol (Sontag & Parker 2002). Die Aktivierung von PXR könnte Teil eines Feedback-Mechanismus sein, um eine Anreicherung von Vitamin E, besonders der Vitamine mit höherer Zytotoxizität (McCormick & Parker 2004), über ein bestimmtes Maß hinaus zu verhindern.

Plasma

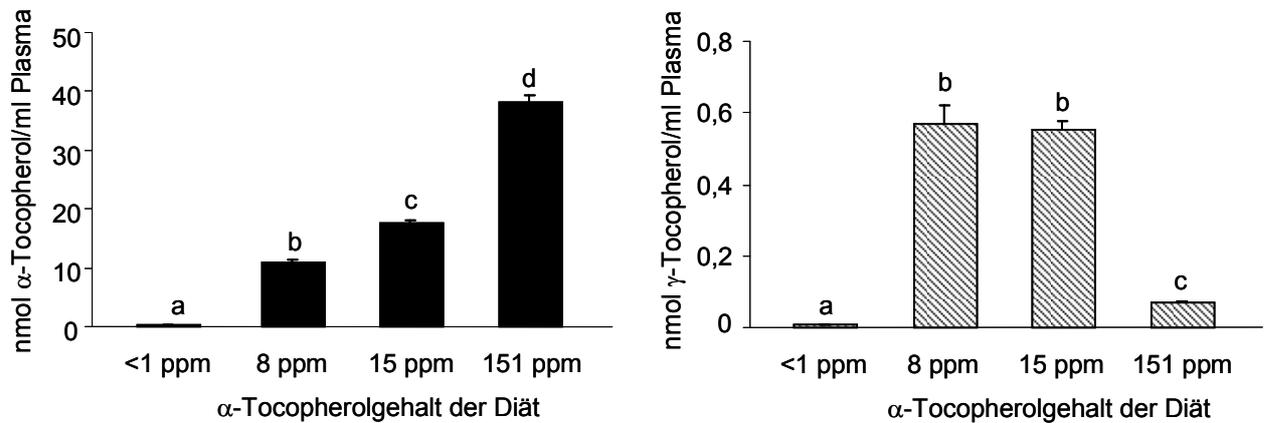


Abbildung 5: α - und γ -Tocopherolgehalte (MW \pm SEM) im Plasma von Fischer 344 Ratten in Abhängigkeit vom α -Tocopherolgehalt der Diät. Unterschiedliche Hochbuchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede ($p < 0,001$).

Leber

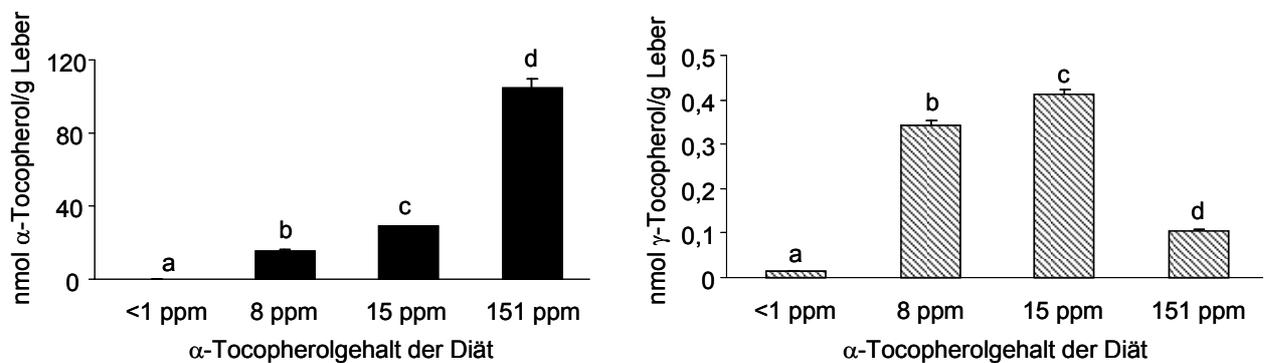


Abbildung 6: α - und γ -Tocopherolgehalte (MW \pm SEM) in der Leber von Fischer 344 Ratten in Abhängigkeit vom α -Tocopherolgehalt der Diät. Unterschiedliche Hochbuchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede ($p < 0,01$).

Cortex

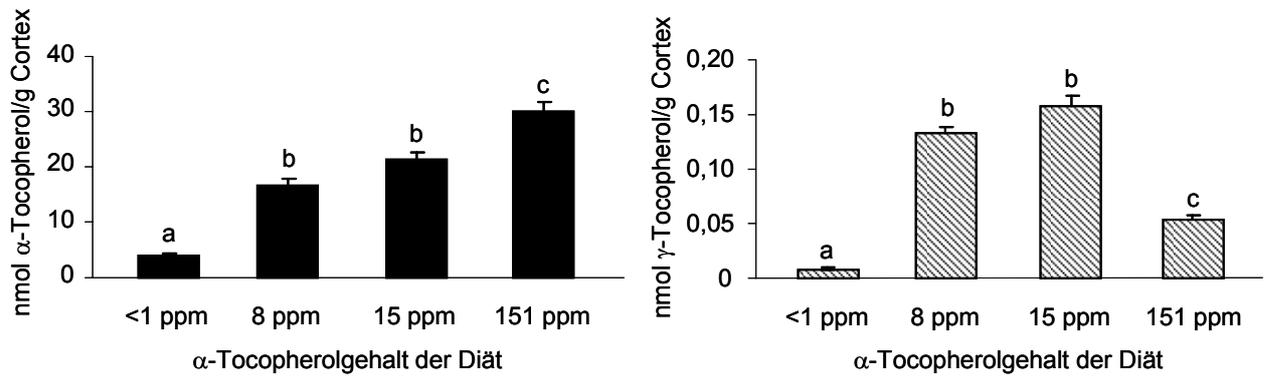


Abbildung 7: α - und γ -Tocopherolgehalte (MW \pm SEM) im Cortex von Fischer 344 Ratten in Abhängigkeit vom α -Tocopherolgehalt der Diät. Unterschiedliche Hochbuchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede ($p < 0,001$).

Lunge

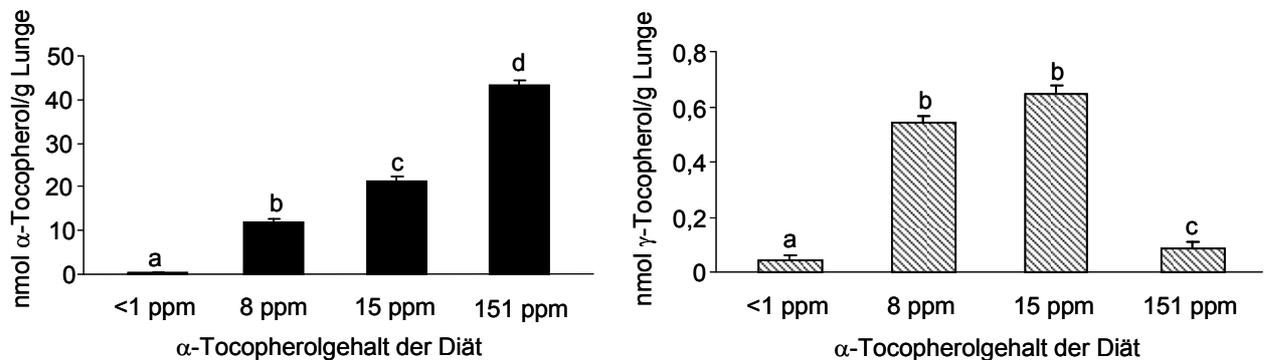


Abbildung 8: α - und γ -Tocopherolgehalte (MW \pm SEM) im Lungengewebe von Fischer 344 Ratten in Abhängigkeit vom α -Tocopherolgehalt der Diät. Unterschiedliche Hochbuchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede ($p < 0,01$).

Muskel

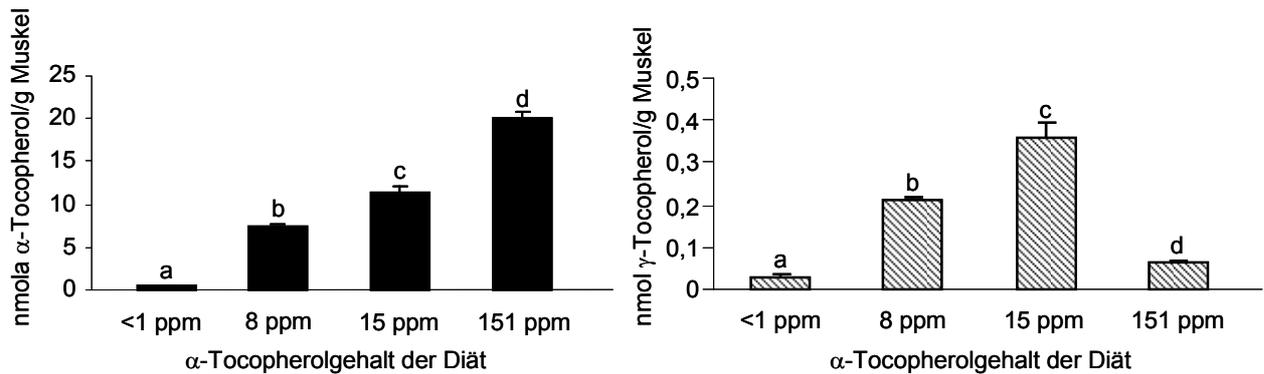


Abbildung 9: α - und γ -Tocopherolgehalte (MW \pm SEM) im Muskel von Fischer 344 Ratten in Abhängigkeit vom α -Tocopherolgehalt der Diät. Unterschiedliche Hochbuchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede ($p < 0,01$).

3.6 F₂-Isoprostane im Plasma

Mit steigendem Gehalt an Vitamin E in der Diät nahmen die Konzentrationen an F₂-Isoprostanen, einem sensitiven Biomarker für Lipidperoxidation im Plasma tendenziell, aber nicht statistisch signifikant, ab.

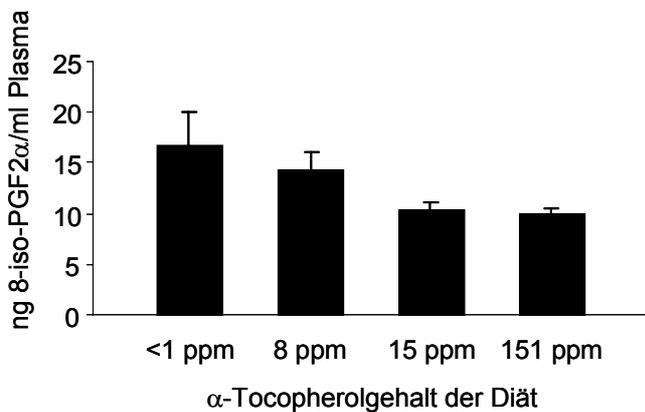


Abbildung 10: 8-iso-Prostaglandin F_{2 α} (MW \pm SEM) im Plasma von Fischer 344 Ratten in Abhängigkeit vom α -Tocopherolgehalt der Diät.

Um eine Aussage über den oxidativen Stress im Gehirn der Ratten treffen zu können, wurden Cortexproben an das Institut für Klinische Chemie und Pathologische Biochemie der Medizinischen Fakultät der Universität Magdeburg geschickt, in dem mittels GC-MS auch geringe F₂-Isoprostan-Konzentrationen quantifizieren werden können. Die zur Anwendung kommende GC-MS-Methode ist

deutlich spezifischer und sensitiver als der zur Bestimmung der Plasmakonzentrationen eingesetzte ELISA-Assay. Die Ergebnisse liegen noch nicht vor.

3.7 Status antioxidativer Enzyme im Gehirn

Superoxiddismutase

Superoxiddismutase (SOD) eliminiert spezifisch Superoxidanionen durch Umwandlung in Wasserstoffperoxid und Sauerstoff, ist stabil und in allen Eukaryonten vorhanden. Es existieren verschiedene Formen im Zytoplasma, den Mitochondrien und im Extrazellulärraum. Die Cu/Zn-SOD ist die im Zytoplasma, die Mn-SOD die in den Mitochondrien vorhandene Form der SOD (Gutteridge & Halliwell 2000). Der α -Tocopherolgehalt der Versuchsdiäten hatte nach 6-monatiger Fütterung keinen Einfluss auf die Aktivität der SOD im Cortex der Ratten (Abb. 11).

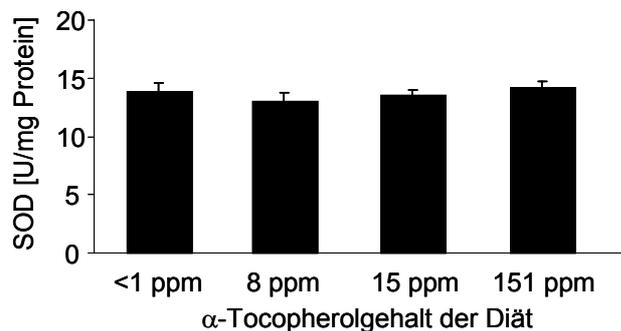


Abbildung 11: Aktivität der Superoxiddismutase (MW \pm SEM) im Cortex von Ratten, die über einen Zeitraum von 6 Monaten mit Versuchsdiäten mit unterschiedlichen Gehalten an α -Tocopherol (<1, 8, 15 oder 151 ppm) gefüttert wurden.

Glutathionperoxidase

Glutathionperoxidase (GPx) ist der generische Name einer Enzymfamilie mit Peroxidaseaktivität, welche die Glutathion-abhängige Reduktion von organischen Peroxiden und Wasserstoffperoxid vermittelt, wobei GSH zu GSSG oxidiert wird. GPx ist Bestandteil der zellulären Abwehr gegen reaktive Sauerstoffspezies. Der α -Tocopherolgehalt der Versuchsdiäten hatte nach 6-monatiger Fütterung keinen Einfluss auf die Aktivität der GPx im Cortex der Ratten (Abb. 12).

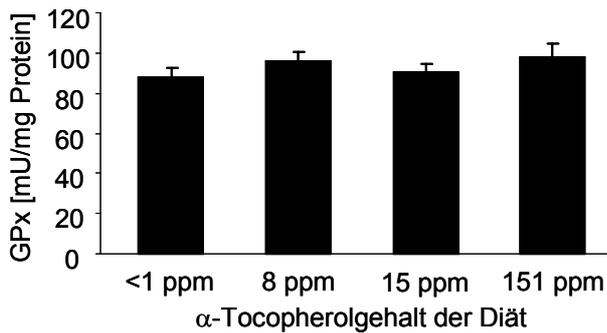


Abbildung 12: Aktivität der Glutathionperoxidase (MW \pm SEM) im Cortex von Ratten, die über einen Zeitraum von 6 Monaten mit Versuchsdiäten mit unterschiedlichen Gehalten an α -Tocopherol (<1, 8, 15 oder 151 ppm) gefüttert wurden.

Glutathion

Glutathion (GSH) ist ein Tripeptid, das aus den Aminosäuren Glutaminsäure, Cystein und Glycin gebildet wird. Es ist ein nicht-enzymatischer Regulator der intrazellulären Redox-Homöostase und kommt in allen Zelltypen vor. Glutathion liegt entweder in seiner reduzierten (GSH) oder oxidierten (GSSG, Glutathiondisulfid) Form vor und ist beteiligt an Redoxreaktionen durch die reversible Oxidation seiner aktiven Thiolgruppe. Unter normalen Bedingungen liegt hauptsächlich die reduzierte Form vor. Zusätzlich kann GSH, durch einen Glutathionylation genannten Prozess, kovalent an Proteine binden. GSH wirkt auch als Koenzym von zahlreichen Enzymen die beim Schutz von Zellen eine wichtige Rolle spielen (Masella et al. 2005).

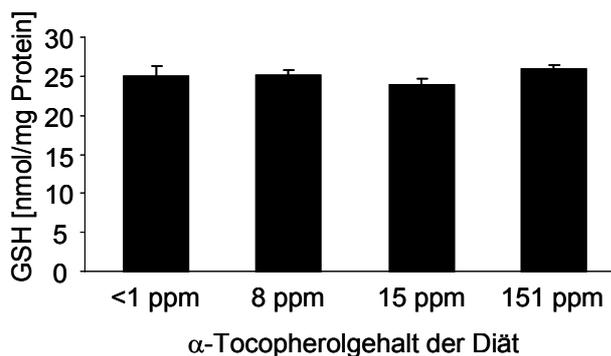


Abbildung 13: Gesamtglutathionkonzentrationen im Cortex (MW \pm SEM) von Ratten, die über einen Zeitraum von 6 Monaten mit Versuchsdiäten mit unterschiedlichen Gehalten an α -Tocopherol (<1, 8, 15 oder 151 ppm) gefüttert wurden.

Der α -Tocopherolgehalt der Versuchsdieten hatte nach 6-monatiger Fütterung keinen Einfluss auf die Konzentrationen von Glutathion im Cortex der Ratten (Abb. 13).

3.8 Genexpression alzheimerrelevanter Gene

Basierend auf den Vorversuchen von Rota et al. 2005 wurden in der vorliegenden Arbeit folgende Gene untersucht:

Tabelle 3: Untersuchte Gene, die in der Pathogenese der AD eine Rolle spielen

Gen	Gen Name	Funktion
APP	Amyloid beta (A4) precursor protein	Amyloid beta Vorstufenprotein
Apba1	Amyloid beta A4 precursor protein binding family A member 1	bindet und stabilisiert APP
Adam 10	A disintegrin and metallopeptidase domain 10	α -Sekretase
Bace 1	Beta-site APP-cleaving enzyme 1	β -Sekretase
Ache	Acetylcholinesterase	hydrolysiert den Neurotransmitter Acetylcholin an cholinergen Synapsen
Bcl-2	B-cell leukemia/lymphoma 2	anti-apoptotisch
Bax	Bcl2-associated X protein	pro-apoptotisch

Keines der untersuchten Gene mit Bedeutung für die Prävention der Alzheimer Demenz wurde im Gehirn (Cortex und Hippocampus) von Fischer 344-Ratten nach 6-monatiger Fütterung in Abhängigkeit der aufgenommenen Menge von α -Tocopherol reguliert (Abb. 14-21).

APP

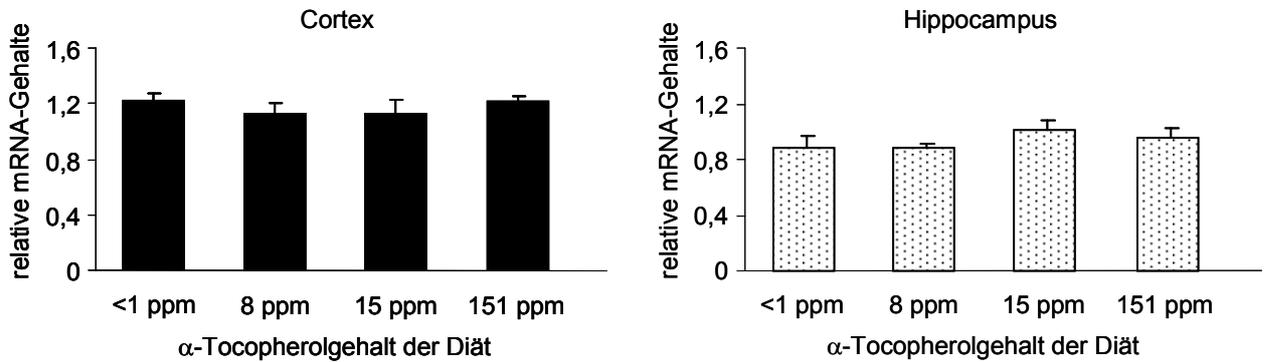


Abbildung 14: Genexpression des Amyloid Vorstufenproteins in Cortex und Hippocampus in Abhängigkeit vom α-Tocopherolgehalt der Diät. Werte sind MW ± SEM.

Aβa 1

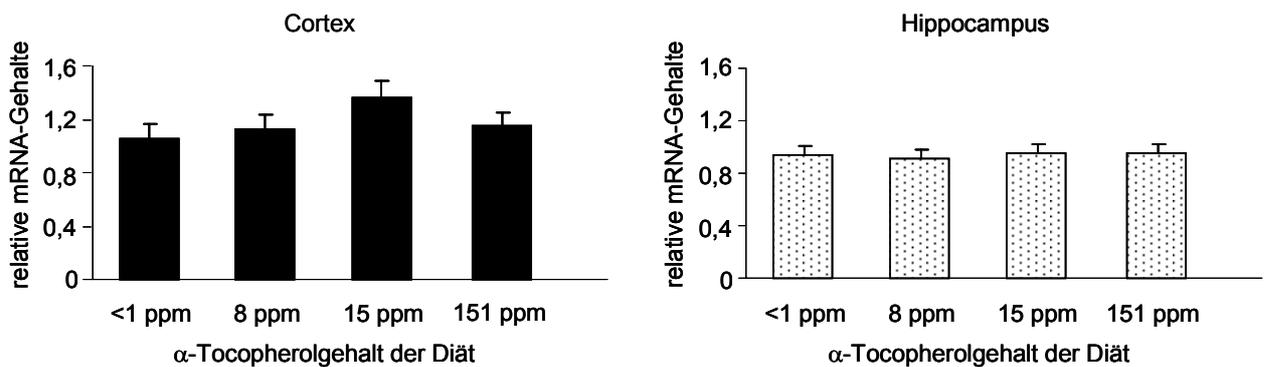


Abbildung 15: Genexpression des Amyloid beta Bindeproteins in Cortex und Hippocampus in Abhängigkeit vom α-Tocopherolgehalt der Diät. Werte sind MW ± SEM.

Adam 10

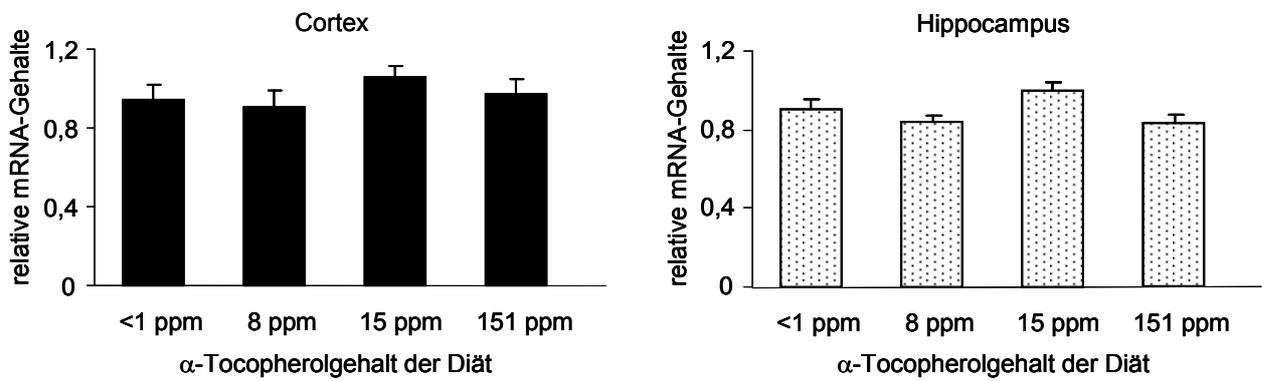


Abbildung 16: Genexpression einer α -Sekretase in Cortex und Hippocampus in Abhängigkeit vom α -Tocopherolgehalt der Diät. Werte sind MW \pm SEM.

Bace 1

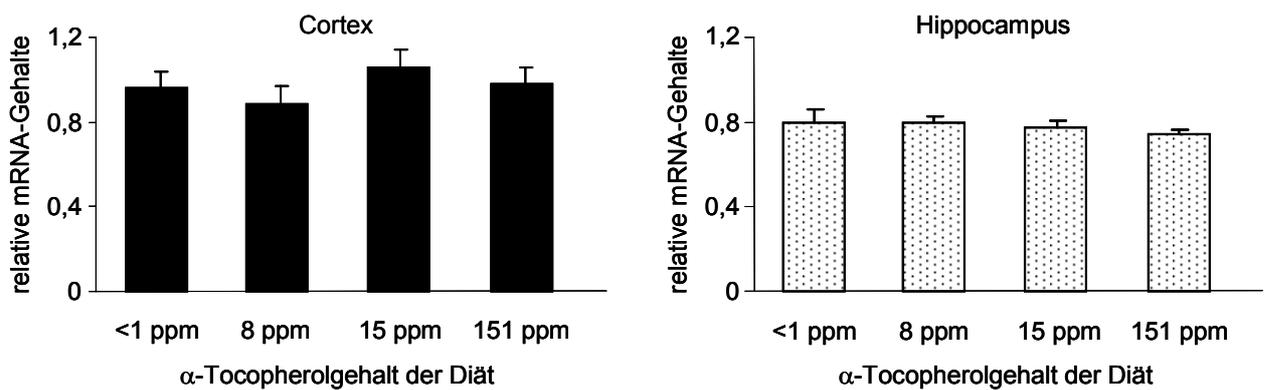


Abbildung 17: Genexpression einer β -Sekretase in Cortex und Hippocampus in Abhängigkeit vom α -Tocopherolgehalt der Diät. Werte sind MW \pm SEM.

Ache

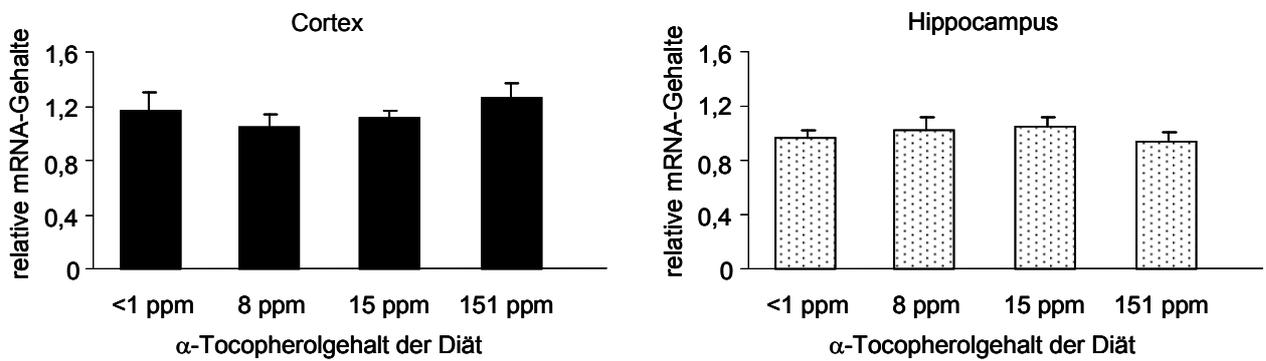


Abbildung 18: Genexpression der Acetylcholinesterase in Cortex und Hippocampus in Abhängigkeit vom α -Tocopherolgehalt der Diät. Werte sind MW \pm SEM.

Bcl 2

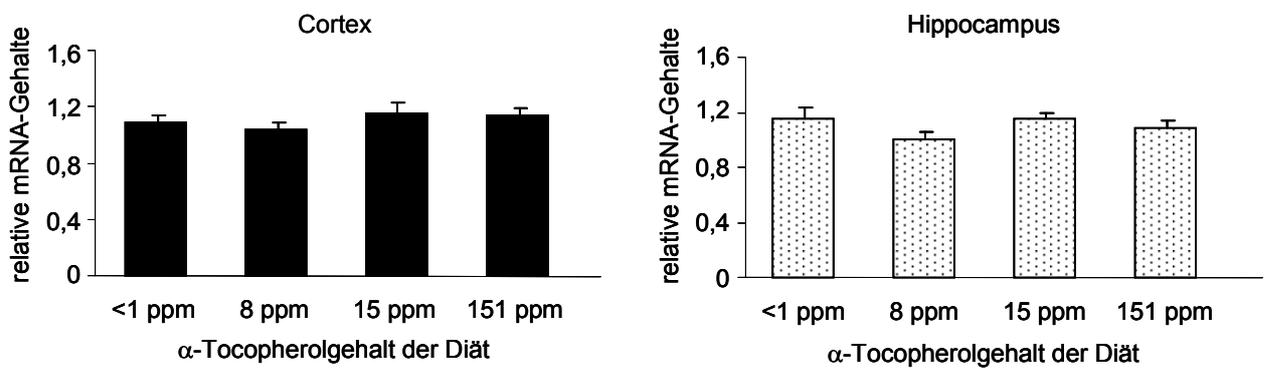


Abbildung 19: Genexpression von Bcl 2 in Cortex und Hippocampus in Abhängigkeit vom α -Tocopherolgehalt der Diät. Werte sind MW \pm SEM.

Bax

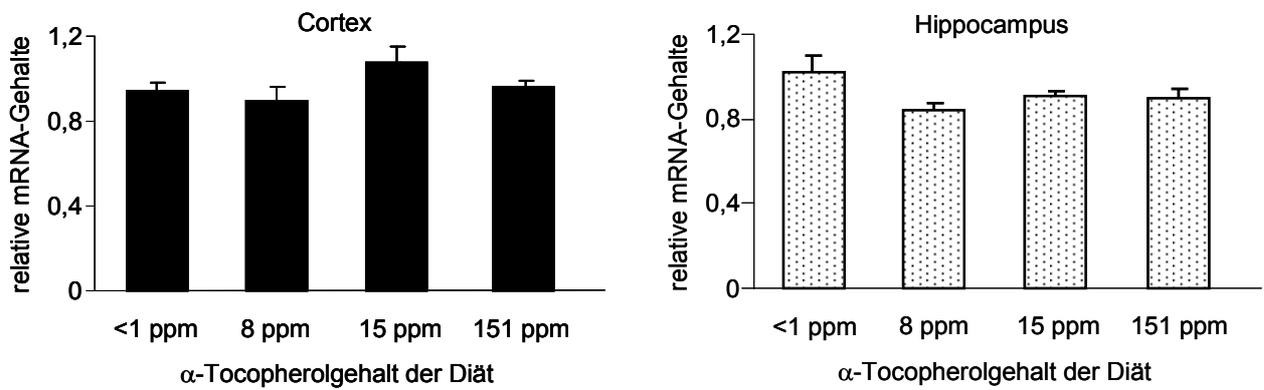


Abbildung 20: Genexpression von Bax in Cortex und Hippocampus in Abhängigkeit vom α-Tocopherolgehalt der Diät. Werte sind MW ± SEM.

Ratio Bcl 2/Bax

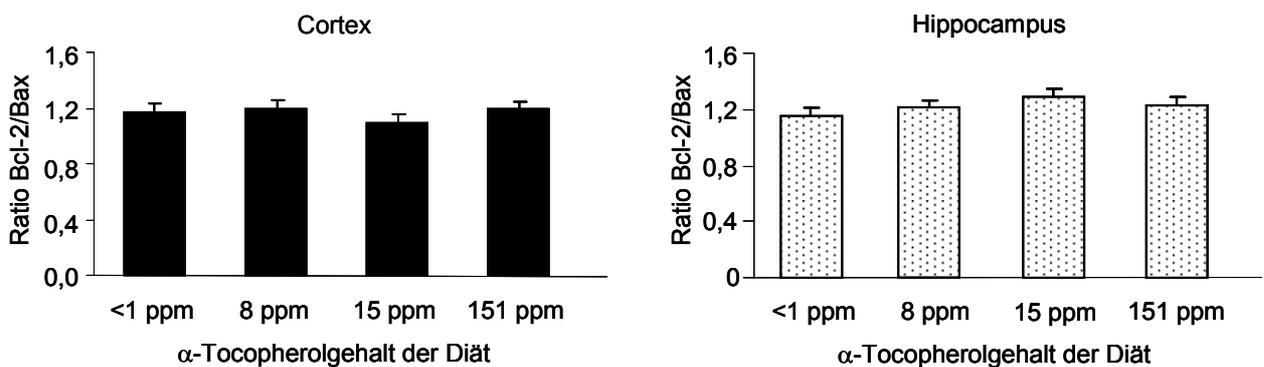


Abbildung 21: Ratio Bcl2/Bax in Cortex und Hippocampus in Abhängigkeit vom α-Tocopherolgehalt der Diät. Werte sind MW ± SEM.

4 Zusammenfassung

Die Aufnahme von halbsynthetischen Diäten mit <1, 8, 15 oder 151 ppm α -Tocopherol aus Rapsöl führte zu dosisabhängigen Konzentrationen von α -Tocopherol in Leber, Cortex, Lunge, Muskel und im Plasma.

Sehr hohe Konzentrationen von α -Tocopherol in der Diät durch zusätzliche Supplementierung (151 ppm) reduzierten signifikant die Gehalte an γ -Tocopherol in allen untersuchten Geweben und Organen.

Die Plasmakonzentrationen von 8-iso-PGF_{2 α} nahm mit steigender Aufnahme von α -Tocopherol tendenziell ab.

Die Aktivität antioxidativer Enzyme im Gehirn wird durch unterschiedliche Gehalte an α -Tocopherol in der Diät nicht beeinflusst.

α -Tocopherol in der Diät hatte weder im Cortex noch im Hippocampus einen Einfluss auf die Genexpression Alzheimer-relevanter Gene.

5 Quellenverzeichnis

- Bickel H (2001) Demenzen im höheren Lebensalter: Schätzungen des Vorkommens und der Versorgungskosten. *Z Gerontol Geriatr* **34**, 108-115.
- Blacker D (2005) Mild cognitive impairment – no benefit from vitamin E, little from donepezil. *N Engl J Med* **352**, 2439-2441.
- Boothby LA & Doering PL (2005) Vitamin C and vitamin E for Alzheimer's disease. *Ann Pharmacother* **39**, 2073-2080.
- Brigelius-Flohé R & Traber MG (1999) Vitamin E: function and metabolism. *FASEB Journal* **13**, 1145-55
- DellaPenna D & Pogson BJ (2006) Vitamin Synthesis in Plants: Tocopherols and Carotenoids. *Annu Rev Plant Biol* **57**, 711-738.
- Dringen R & Hamprecht B (1996) Glutathione Content as an Indicator for the Presence of Metabolic Pathways of Amino Acids in Astroglial Cultures. *Journal of Neurochemistry* **67**, 1375-1382.
- Engelhart MJ, Geerlings MI, Ruitenberg A, van Swieten JC, Hofman A, Witteman JC & Breteler MM (2002) Dietary intake of antioxidants and risk of Alzheimer disease. *Jama* **287**, 3223-3229.
- Fillenbaum GG, Kuchibhatla MN, Hanlon JT, Artz MB, Pieper CF, Schmader KE, Dysken MW & Gray SL (2005) Dementia and Alzheimer's disease in community-dwelling elders taking vitamin C and/or vitamin E. *Ann Pharmacother* **39**, 2009-2014.
- Gutteridge JM, Halliwell, B (2000) Free Radicals and Antioxidants in the Year 2000. A Historical Look to the Future. *Ann N Y Acad Sci* **899**, 136-147.
- Handelman GJ, Machlin LJ, Fitch K, Weiter JJ & Dratz EA (1985) Oral α -tocopherol supplements decrease plasma γ -tocopherol levels in humans. *J Nutr* **115**, 807-13.
- Joseph JA, Shukitt-Hale B, Denisova NA, Prior RL, Cao G, Martin A, Tagliamonte G & Bickford PC (1998) Long-term dietary strawberry, spinach, or vitamin E supplementation retards the onset of age-related neuronal signal-transduction and cognitive behavioural deficits. *J Neurosci* **18**, 8047-8055
- Landes N, Pfluger P, Kluth D, Birringer M, Ruhl R, Bol GF, Glatt H & Brigelius-Flohe R (2003) Vitamin E activates gene expression via the pregnane X receptor. *Biochem Pharmacol* **65**, 269-73.
- Lawrence RA & Burk RF (1976) Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **71**, 952-958.

- Leuner K, Hauptmann S, Abdel-Kader R, Scherping I, Keil U, Strosznajder JB, Eckert A, Müller WE (2007) Mitochondrial Dysfunction: The First Domino in Brain Aging and Alzheimer's Disease? *Antioxidants & Redox Signaling* **9**, 1659-1675.
- Marklund S & Marklund G (1974) Involvement of the Superoxide Anion Radical in the Autoxidation of Pyrogallol and a Convenient Assay for Superoxide Dismutase. *European Journal of Biochemistry* **47**, 469-474.
- Masella R, Di Benedetto R, Vari R, Filesi C, Giovannini C (2005) Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *J Nutr Biochem* **16**, 577-586.
- McCormick CC & Parker RS (2004) The cytotoxicity of vitamin e is both vitamer- and cell-specific and involves a selectable trait. *J Nutr* **134**, 3335-42.
- Miller ER, 3rd, Pastor-Barriuso R, Dalal D, Riemersma RA, Appel LJ & Guallar E (2005) Meta-analysis: high-dosage vitamin E supplementation may increase all-cause mortality. *Ann Intern Med* **142**, 37-46.
- Morris MC, Evans DA, Bienias JL, Tangney CC, Bennett DA, Aggarwal N, Wilson RS & Scherr PA (2002) Dietary intake of antioxidant nutrients and the risk of incident Alzheimer disease in a biracial community study. *Jama* **287**, 3230-3237.
- Munné-Bosch S, Alegre L (2002). The Function of Tocopherols and Tocotrienols in Plants. *Critical Reviews in Plant Sciences* **21**, 31-57.
- Rota C, Rimbach G, Minihane AM, Stoecklin E & Barella L (2005) Dietary vitamin E modulates differential gene expression in the rat hippocampus: Potential implications for its neuroprotective properties. *Nutritional Neuroscience* **8**, 21-29.
- Sano M, Ernesto C, Thomas RG, Klauber MR, Schafer K, Grundman M, Woodbury P, Growdon J, Cotman CW, Pfeiffer E, Schneider LS & Thal LJ (1997) A controlled trial of selegiline, alpha-tocopherol, or both as treatment for Alzheimer's disease. The Alzheimer's Disease Cooperative Study. *N Engl J Med* **336**, 1216-1222.
- Sontag TJ & Parker RS (2002) Cytochrome P450 omega-hydroxylase pathway of tocopherol catabolism. Novel mechanism of regulation of vitamin E status. *J Biol Chem* **277**, 25290-6.
- Tietze F (1969) Enzymic Method for Quantificative Determination of Nanogram Amounts of Total and Oxidized Glutathione: Applications to Mammalian Blood and Other Tissues. *Analytical Biochemistry* **27**, 502-522.
- Willner Th, Jeß U & Weber K (1997) Einfluß der Prozeßparameter auf die Tocopherolbilanz bei der Gewinnung von pflanzlichen Ölen. *Fett/Lipid* **99**, 138-147.