

Screening und Charakterisierung von Protein-modifizierenden Naturstoffen durch MALDI-Massenspektrometrie bringen starke SIRT1- und p300-Inhibitoren hervor**

Susanne Holzhauser, Anja Freiwald, Christoph Weise, Gerd Multhaup, Chung-Ting Han und Sascha Sauer*

Naturstoffe stellen eine reichhaltige Ressource für Substanzen dar, die bei der Entwicklung von chemischen Sonden, funktionellen Lebensmitteln oder Arzneimitteln Verwendung finden.^[1] Die außergewöhnliche strukturelle Vielfalt von Substanzbibliotheken, die auf Naturstoffen oder deren Derivaten basieren, spricht für deren Einsatz in verschiedenen Anwendungen,^[1b,2] z.B. in Wirkstoffscreenings.^[3]

Enzyme, die Proteine oder Nukleinsäuren posttranslational modifizieren können, stellen interessante Zielproteine für Medikamente dar und umfassen unter anderem Kinasen und Phosphatasen,^[4] Methyltransferasen^[5] oder Acetyltransferasen und Deacetylasen.^[6] Neuere Studien deuten darauf hin, dass Histon-modifizierende Enzyme, wie die Deacetylase Sirtuin 1 (SIRT1), als Zielproteine geeignet sind, um altersbedingte Erkrankungen, wie neuropathogene Erkrankungen, metabolische Erkrankungen oder Krebs, medikamentös zu behandeln.^[7] Substanzscreenings auf mögliche SIRT1-Modulatoren brachten vielversprechende Enzymaktivatoren wie den Naturstoff Resveratrol oder die synthetische Substanz SRT1720 hervor. Allerdings sind diese Ergebnisse aufgrund in den letzten Jahren beschriebener Methodenartefakte noch immer hochumstritten. Die verwendeten Screeningmethoden basierten auf dem Einsatz fluoreszenzmarkierter Peptidsubstrate und resultierten in einer angeblichen, jedoch artifiziellen enzymatischen Aktivierung von SIRT1, was zahlreiche Forscher über Jahre hinweg in die Irre führte.^[8]

Neben der Generierung von Artefakten, wie sie speziell für verschiedene SIRT1-Assays beobachtet wurde, besteht ein zweiter genereller Nachteil in der Anwendung fluores-

zenzbasierter Methoden, der im Allgemeinen unterschätzt wird: Die in Substanz- und insbesondere Naturstoffbibliotheken häufig auftretende Autofluoreszenz kann nämlich weithin eingesetzte optische Verfahren,^[9] wie den TR-FRET („time-resolved fluorescence resonance energy transfer“), beeinträchtigen.^[10]

Dagegen stellt die Massenspektrometrie (MS) eine attraktive Alternative dar, da sie eine direkte Detektion von Substraten ermöglicht. In der MS werden Peptide ionisiert und anhand ihres Masse-zu-Ladungs-Verhältnisses (m/z) detektiert.^[11] So kann etwa die Deacetylierung eines Peptidsubstrates anhand der Verschiebung des Substratpeaks um eine Masse von 42 Da direkt detektiert werden (Abbildung 1).

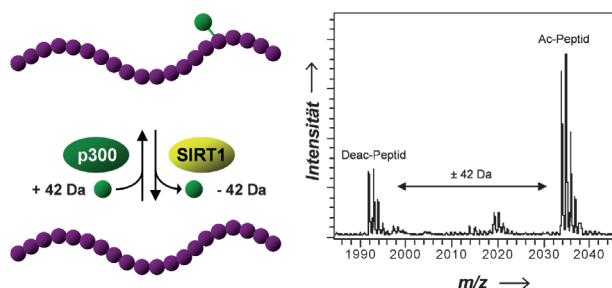


Abbildung 1. Deacetylierung und Acetylierung von Peptidsubstraten durch SIRT1 bzw. p300. Sowohl die Deacetylierung als auch die Acetylierung resultieren in einer um 42 Da veränderten Peptidmasse, die im Massenspektrum beobachtet werden kann.

[*] S. Holzhauser, A. Freiwald, Dr. C.-T. Han, Dr. S. Sauer

Otto-Warburg-Laboratorium

Max-Planck-Institut für molekulare Genetik

Ihnestraße 63–73, 14195 Berlin (Deutschland)

E-Mail: sauer@molgen.mpg.de

S. Holzhauser, Dr. C. Weise, Prof. Dr. G. Multhaup

Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie/Institut für Chemie und Biochemie, Freie Universität Berlin

Takustraße 3/Thielallee 63, 14195 Berlin (Deutschland)

[**] Wir danken B. Łukaszewska-McGreal und Dr. C. Weidner für ihre Unterstützung. Diese Arbeit ist Teil der Dissertation von S.H. Unsere Arbeiten sind finanziert vom Deutschen Ministerium für Bildung und Forschung (BMBF, AKZ 0315082), vom Nationalen Genomforschungsnetzwerk (NGFN, AKZ 01 GS 0828), der Europäischen Union ([FP7/2007-2011], AKZ n° 262055 (ESGI)), und der Max-Planck-Gesellschaft.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201207325> zu finden.

zierung von Analyten mit MALDI-MS anfänglich mit Herausforderungen verbunden war, wurden hierfür im Laufe der Zeit verschiedene Ansätze entwickelt, insbesondere für Proben von geringer Komplexität.^[14] Auf diese Weise konnten in den letzten Jahren etliche neue Quantifizierungstechniken entwickelt werden, etwa in der genetischen Diagnostik.^[15] Weiterhin ist die MALDI-MS aufgrund ihrer einfachen Instandhaltung und Handhabung auch für Nicht-Experten auf dem Gebiet der MS interessant.

Wir entwickelten und validierten in dieser Studie eine auf MALDI-MS basierende Methode zum Hochdurchsatz-Screening von Leitstrukturen und zur Charakterisierung von Substanzen, die die Deacetylaseaktivität von SIRT1 modifizieren können (siehe die Hintergrundinformationen, Abbildung S1). Weiterhin wendeten wir das Methodenprinzip für die entsprechende Umkehrreaktion an, d. h. die Acetylierung durch die Acetyltransferase p300.

Wir testeten die Aktivität der oben genannten angeblichen SIRT1-Aktivatoren Resveratrol und SRT1720 mit MALDI-MS unter Einsatz verschiedener Peptidsubstrate mit oder ohne Fluoreszenzmarkierung. In Übereinstimmung mit neueren Studien, die radioaktive Markierungen^[8a,b] oder HPLC^[8c] verwendeten, konnten wir beobachten, dass verschiedene Fluoreszenzmarkierungen divergierende Aktivierungsartefakte produzierten, während das unmarkierte natürliche Peptid keine SIRT1-Aktivierung, sondern im Gegen teil sogar eine Inhibition zeigte (Abbildung 2).

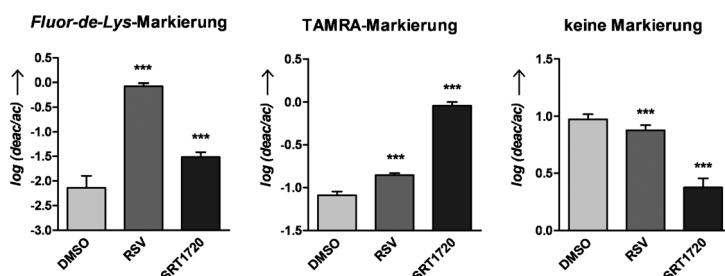


Abbildung 2. Vergleich von SIRT1-Aktivatoren unter Anwendung verschiedener Substratpeptide und der MALDI-MS-Detektion. Als Substrate wurden fluoreszenzmarkierte und unmarkierte Peptide verwendet. Die Reaktionen enthielten 1% DMSO, die Behandlungen 100 μ M Resveratrol (RSV) bzw. 100 μ M SRT1720.

Um die Methode für Screening-Anwendungen zu optimieren, verwendeten wir das unmarkierte Histon H4-Peptid, dessen Sequenz auf einem bekannten Zielprotein von SIRT1 basiert,^[16] in einer Konzentration von 0.5 μ M. Diese Konzentration liegt weit unterhalb des K_m -Wertes ((16 \pm 2) μ M; Abbildung S2) und ermöglicht die Detektion kompetitiver Inhibitoren.^[17] Die prozentuale Deacetylierung wurde auf ca. 40% festgelegt (10 nM SIRT1, 30 min; Abbildung S3a), um eine robuste Detektion der Stärke von Inhibitoren zu ermöglichen. Die Robustheit dieser Reaktionsbedingungen wurde durch einen Z' -Wert^[18] von 0.5 bestätigt (Abbildung S4). Weiterhin ermittelten wir einen IC_{50} -Wert von (0.26 \pm 0.02) μ M für Suramin, einen bekannten SIRT1-Inhibitor, der mit dem Literaturwert von (0.297 \pm 0.01) μ M weitgehend übereinstimmt.^[19] Zudem wurde für EX-527, eben-

falls ein SIRT1-Inhibitor, der IC_{50} -Wert ermittelt. Auch dieser befand sich mit (0.58 \pm 0.03) μ M in der Größenordnung bereits beschriebener Daten.^[20] Die Genauigkeit dieser mit MALDI-MS erhaltenen Werte wurde zudem mit ESI-MS validiert (Tabelle S1).

Die Ermittlung von Enzymkinetiken sowie der Wirkungsstärke von Substanzen erfordert exakte Quantifizierungstechniken. Die Quantifizierung mit MALDI-MS wurde bereits erfolgreich für komplexe Peptid- oder andere biologische Proben eingesetzt.^[21] Wir konnten acetylierte und deacetylierte Peptide durch die Erstellung von Peptid-„Kalibrierkurven“ (CCs) verlässlich quantifizieren, wie in den Hintergrundinformationen beschrieben. Dafür wurden die gemessenen gegen die berechneten Werte aufgetragen (Abbildung 3 und S5) und nachfolgend eine Korrektur der Probenwerte anhand der CC durchgeführt. Um eine einheitliche Detektion der Proben zu erzielen, optimierten wir die Präparationsbedingungen unter Anwendung einer homogenen Ultradünnschicht-Präparation (UTL).^[22] Eine weiterführende detaillierte Beschreibung und Diskussion bezüglich der Quantifizierung von Peptiden ist Teil der Hintergrundinformationen.

Unter Anwendung der beschriebenen Methode durchsuchten wir eine aus 5500 Naturstoffen bestehende Substanzbibliothek^[3a] nach SIRT1-Modulatoren. Um den Durchsatz zu erhöhen, vereinigten wir jeweils fünf Substanzen und verwendeten MALDI-Targetplatten im 384er-Format. Entsprechende Substanzgemische („Pools“), die mögliche Screeninghits enthielten, wurden sodann als Einzelsubstanzen überprüft. Während die Reaktion und die Aufreinigung der Proben jeweils etwa eine halbe Stunde in Anspruch nahmen, konnten wir in einem einfachen, automatisierten MS-Lauf von etwa zwei Stunden Dauer die Aktivität von mehr als 1000 Substanzen detektieren.

Der Durchsatz eines Screenings kann zudem gesteigert werden, indem die Poolgröße von Substanzen unter Anwendung der Gruppentestformel (1) optimiert wird.^[23]

p steht darin für die erwartete Screeninghit-Rate einer bestimmten Substanzbibliothek und n steht für

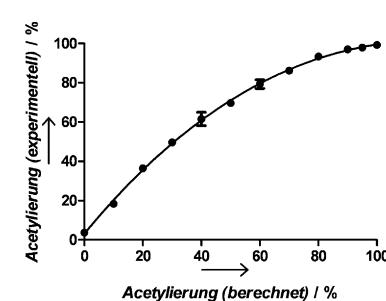


Abbildung 3. Die Peptid-„Kalibrierkurve“ stellt das Verhalten der gemessenen Peptidverhältnisse zu den berechneten Werten dar und dient der Interpolation der gemessenen Probenwerte. Pro Datenpunkt wurden 12 MALDI-Messungen durchgeführt.

die Zahl der vereinigten Substanzen. Die optimale Poolgröße ist definiert als das Maximum der aufgetragenen Kurve. Die für unsere Naturstoffbibliothek festgestellte Screeninghit-Rate lag bei 0.15 %, was in einer optimalen Poolgröße von $n = 26$ resultiert (Abbildung S6). Wir testeten Pools in Größen von bis zu 30 Substanzen, und konnten die Positivkontrolle Suramin jeweils erfolgreich identifizieren (Abbildung S7). Dieser Ansatz ermöglicht somit ein Screening von mehr als 10000 Substanzen innerhalb weniger Stunden.

Anhand unseres Screenings wurden acht SIRT1-Inhibitoren identifiziert (**1–8**; Tabelle 1; Tabelle S2), die anschließend in Zellen auf ihre cytotoxischen Eigenschaften hin untersucht wurden (Abbildung S8). Die toxischen Substanzen wurden von der weiteren Charakterisierung ausgeschlossen. Die IC_{50} -Werte der übrigen fünf Inhibitoren befanden sich zwischen 9.7 μM und 49 μM (Tabelle 1). SIRT1-Inhibitoren solcher Stärke können wertvolle biologische Effekte erzielen.^[24]

Wir testeten daher den stärksten Inhibitor **1** (Abbildung 4a) hinsichtlich seiner Fähigkeit, die p53-Acetylierung in humanen Leberzellen (HepG2) zu steigern. Dafür wurden

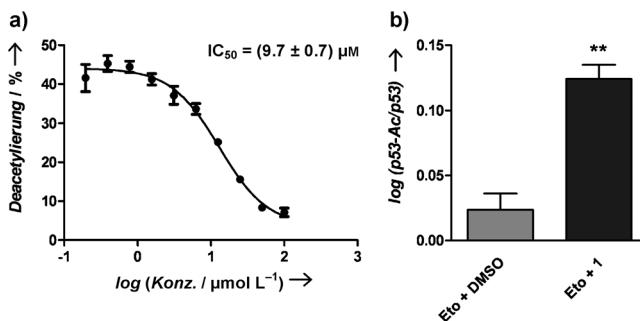


Abbildung 4. a) Mit MALDI-Quantifizierung generierte IC₅₀-Kurve für 1 und SIRT1 unter Anwendung des Histon H4-Peptides (SGRGKGGKGLGKCGA-K(Ac)-RHRK). b) Densitometrische Analyse des Western-Blots, die den Effekt einer Behandlung von HepG2-Zellen mit 30 μ M 1 über 16 h auf den Acetylierungszustand von p53 (Lys382) in der Zellkernfraktion aufzeigt (Rohdaten: Abbildung S9). Die basale p53-Acetylierung wurde durch gleichzeitige Behandlung mit 20 μ M Etoposid (Eto) induziert.

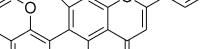
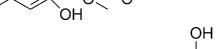
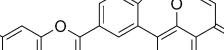
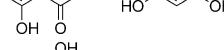
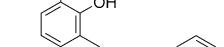
die Zellen 16 Stunden lang mit $30 \mu\text{M}$ **1** behandelt. Mit einer densitometrischen Western-Blot-Analyse konnten wir einen signifikanten Anstieg der p53-Acetylierung in der Kernfraktion feststellen (Abbildung 4b).

Wir verwendeten die beschriebene MALDI-MS-Methode zudem für die Umkehrreaktion, d.h. die Acetylierung eines Substratpeptides durch die Acetyltransferase p300. Hierfür wurden $0.5\text{ }\mu\text{m}$ eines p53-basierten Substratpeptides (HAT-Peptid: STSRHKKL) eingesetzt. Weiterhin wurde eine prozentuale Acetylierung von 35% (250 nm p300, 60 min; Abbildung S3b) gewählt, um sowohl eine Inhibierung als auch eine Aktivierung des Enzyms detektieren zu können.

Wir entdeckten einen neuen p300-Inhibitor (**9**; Abbildung 5a; Tabelle S2) und bestimmten dessen IC_{50} -Wert mit $(1.71 \pm 0.07) \mu\text{M}$ (Abbildung 5b).

Wir validierten diesen Wert unter Anwendung einer radioaktivitätsbasierten Methode ($(2.1 \pm 0.4) \mu\text{m}$). Das Quer-

Tabelle 1: SIRT1-Screeninghits.

Struktur ^[a]	IC ₅₀ [μM]
	9.7 ± 0.7
	28 ± 9
	36 ± 6
	46 ± 4
	49 ± 3
	n.b. ^[b]
	n.b. ^[b]
	n.b. ^[b]

[a] Die Strukturen wurden mit ChemDraw Ultra 9.0 erstellt. [b] n.b.: nicht bestimmt.

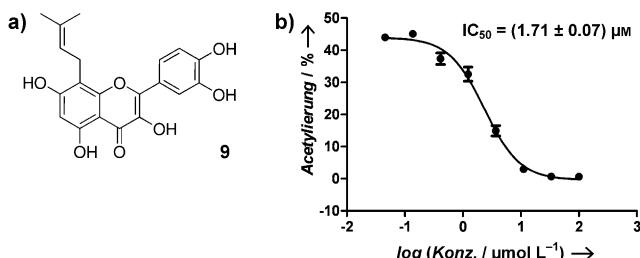


Abbildung 5: a) Struktur des neuen p300-Inhibitors 9. b) Mit MALDI-Quantifizierung generierte IC₅₀-Kurve für 9 und p300.

cetin-Derivat 9 ist somit etwa 4-mal stärker als Anacardinsäure (IC₅₀ 8.5 μM), die in der Schale der Cashewnuss vorkommt,^[25] und etwa 3.5-mal stärker als Garcinol (IC₅₀ 7 μM), das in der Fruchtschale eines immergrünen tropischen Baumes gefunden wurde.^[26] 9 ist außerdem etwa 17-mal stärker als Quercetin, das die Kernstruktur dieses Naturstoffes darstellt und ebenfalls hemmend auf p300 wirkt.^[27] In der radioaktivitätsbasierten Methode wies Quercetin lediglich einen IC₅₀-Wert um 34 μM auf. In Zellen zeigte 9 einen signifikant antiinflammatorischen Effekt, indem es die TNF α -Sekretion aus THP-1-Zellen reduzierte (Abbildung S10). Dies ist eine interessante Eigenschaft von p300-Inhibitoren, die kürzlich für den p300-Inhibitor Curcumin gezeigt wurde.^[28]

Die in dieser Studie beschriebenen Naturstoffe könnten als chemische Hilfsmittel im Bereich der Epigenetik genutzt werden. Im Speziellen könnten sie eingesetzt werden, um die Rolle von Histondeacetylasen, wie SIRT1, oder von Histonacetyltransferasen, wie p300, in diversen biologischen Prozessen zu untersuchen. Weitere Studien werden benötigt, um die pharmakologischen Profile sowie potenzielle gesundheitsfördernde Effekte der Substanzen zu sondieren.

Wir haben hier eine direkte MALDI-MS-basierte Methode vorgestellt, die ein Screening und die Charakterisierung von Substanzen, die die Aktivität von Proteinen modifizieren, in unverfälschter Weise ermöglicht. Durch Anwendung dieses Verfahrens konnten wir analytische Probleme umgehen, die aus dem Einsatz autofluoreszierender Substanzen herrühren. Unter Verwendung geeigneter Substratpeptide und Versuchsbedingungen kann auf die hier gezeigte Weise eine große Vielfalt posttranslational aktiver Enzyme, wie Deacetylasen, Acetyltransferasen, Kinasen, Phosphatasen oder Methyltransferasen untersucht werden.

Eingegangen am 11. September 2012,
veränderte Fassung am 12. Dezember 2012
Online veröffentlicht am 8. April 2013

Stichwörter: Enzyme · MALDI · Massenspektrometrie · Naturstoffe · Screeningverfahren

- [1] a) M. Müller, S. Kersten, *Nat. Rev. Genet.* **2003**, *4*, 315–322; b) K. S. Lam, *Trends Microbiol.* **2007**, *15*, 279–289; c) J. Hong, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2011**, *15*, 350–354; d) E. Zamir, P. I. Bastiaens, *Nat. Chem. Biol.* **2008**, *4*, 643–647; e) J. W. Li, J. C. Vederas, *Science* **2009**, *325*, 161–165.

- [2] S. Wetzel, R. S. Bon, K. Kumar, H. Waldmann, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 10990–11018; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 10800–10826.
- [3] a) C. Weidner, J. C. de Groot, A. Prasad, A. Freiwald, C. Quedenau, M. Kliem, A. Witzke, V. Kodelja, C. T. Han, S. Giegold, M. Baumann, B. Klebl, K. Siems, L. Muller-Kuhrt, A. Schumann, R. Schuler, A. F. Pfeiffer, F. C. Schroeder, K. Bussow, S. Sauer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, 7257–7262; b) E. Mazzio, S. Deiab, K. Park, K. Soliman, *Phytother. Res.* **2012**, DOI: 10.1002/ptr.4795; c) W. Min, W. Wang, J. Chen, A. Wang, Z. Hu, *Anal. Bioanal. Chem.* **2012**, *404*, 2397–2405.
- [4] L. K. Nguyen, D. Matallanas, D. R. Croucher, A. von Kriegsheim, B. N. Kholodenko, *FEBS J.* **2013**, *279*, 751–765.
- [5] R. Teperino, K. Schoonjans, J. Auwerx, *Cell Metab.* **2010**, *12*, 321–327.
- [6] A. Peserico, C. Simone, *J. Biomed. Biotechnol.* **2011**, 371832.
- [7] a) K. Huber, G. Superti-Furga, *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 3616–3624; b) S. Lavu, O. Boss, P. J. Elliott, P. D. Lambert, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2008**, *7*, 841–853.
- [8] a) M. Kaeberlein, T. McDonagh, B. Heltweg, J. Hixon, E. A. Westman, S. D. Caldwell, A. Napper, R. Curtis, P. S. DiStefano, S. Fields, A. Bedalov, B. K. Kennedy, *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 17038–17045; b) M. T. Borra, B. C. Smith, J. M. Denu, *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 17187–17195; c) M. Pacholec, J. E. Bleasdale, B. Chrunk, D. Cunningham, D. Flynn, R. S. Garofalo, D. Griffith, M. Griffor, P. Loulakis, B. Pabst, X. Qiu, B. Stockman, V. Thanabal, A. Varghese, J. Ward, J. Withka, K. Ahn, *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 8340–8351; d) D. Beher, J. Wu, S. Cumine, K. W. Kim, S. C. Lu, L. Atangan, M. Wang, *Chem. Biol. Drug Des.* **2009**, *74*, 619–624.
- [9] N. Thorne, D. S. Auld, J. Inglese, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2010**, *14*, 315–324.
- [10] a) C. M. Yengo, C. L. Berger, *Curr. Opin. Pharmacol.* **2010**, *10*, 731–737; b) W. A. Lea, A. Simeonov, *Expert Opin. Drug Discovery* **2011**, *6*, 17–32.
- [11] S. Sauer, M. Kliem, *Nat. Rev. Microbiol.* **2010**, *8*, 74–82.
- [12] J. B. Fenn, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 3999–4024; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 3871–3894.
- [13] M. Karas, F. Hillenkamp, *Anal. Chem.* **1988**, *60*, 2299–2301.
- [14] a) M. W. Duncan, H. Roder, S. W. Hunsucker, *Briefings Funct. Genomics Proteomics* **2008**, *7*, 355–370; b) H. Matsumoto, E. S. Kahn, N. Komori, *Anal. Biochem.* **1998**, *260*, 188–194.
- [15] a) M. Ehrich, M. R. Nelson, P. Stanssens, M. Zabeau, T. Liloglou, G. Xinarianos, C. R. Cantor, J. K. Field, D. van den Boom, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 15785–15790; b) Y. M. Lo, N. B. Tsui, R. W. Chiu, T. K. Lau, T. N. Leung, M. M. Heung, A. Gerovassili, Y. Jin, K. H. Nicolaides, C. R. Cantor, C. Ding, *Nat. Med.* **2007**, *13*, 218–223.
- [16] A. Vaquero, R. Sternglanz, D. Reinberg, *Oncogene* **2007**, *26*, 5505–5520.
- [17] G. Wu, Y. Yuan, C. N. Hodge, *J. Biomol. Screening* **2003**, *8*, 694–700.
- [18] J. H. Zhang, T. D. Chung, K. R. Oldenburg, *J. Biomol. Screening* **1999**, *4*, 67–73.
- [19] J. Trapp, R. Meier, D. Hongwiset, M. U. Kassack, W. Sippl, M. Jung, *ChemMedChem* **2007**, *2*, 1419–1431.
- [20] A. D. Napper, J. Hixon, T. McDonagh, K. Keavey, J. F. Pons, J. Barker, W. T. Yau, P. Amouzegh, A. Flegg, E. Hamelin, R. J. Thomas, M. Kates, S. Jones, M. A. Navia, J. O. Saunders, P. S. DiStefano, R. Curtis, *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 8045–8054.
- [21] a) J. Gobom, K. O. Kraeuter, R. Persson, H. Steen, P. Roepstorff, R. Ekman, *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 3320–3326; b) J. L. Hsu, S. Y. Huang, N. H. Chow, S. H. Chen, *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 6843–6852; c) S. Sauer, *Clin. Chim. Acta* **2006**, *363*, 95–105; d) A. Cullinan, C. Cantor, *Pharmacogenomics* **2008**, *9*, 1211–1215.

- [22] a) S. Sauer, *J. Biochem. Biophys. Methods* **2007**, *70*, 311–318;
b) D. Fenyö, Q. Wang, J. A. DeGrasse, J. C. Padovan, M. Cadene, B. T. Chait, *J. Visualized Exp.* **2007**, 192.
- [23] L. Sachs, *Angewandte Statistik – Anwendung statistischer Methoden*, Band 11, überarbeitete und aktualisierte Auflage, Springer, Berlin, **2004**, S. 261–262.
- [24] C. Gey, S. Kyrylenko, L. Hennig, L. H. Nguyen, A. Buttner, H. D. Pham, A. Giannis, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 5311–5314; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 5219–5222.
- [25] K. Balasubramanyam, V. Swaminathan, A. Ranganathan, T. K. Kundu, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 19134–19140.
- [26] K. Balasubramanyam, M. Altaf, R. A. Varier, V. Swaminathan, A. Ravindran, P. P. Sadhale, T. K. Kundu, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 33716–33726.
- [27] X. Xiao, D. Shi, L. Liu, J. Wang, X. Xie, T. Kang, W. Deng, *PLoS One* **2011**, *6*, e22934.
- [28] J. M. Yun, I. Jialal, S. Devaraj, *J. Nutr. Biochem.* **2011**, *22*, 450–458.