

Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover
Aus dem Zentrum für Lebensmittelwissenschaften
Institut für Lebensmitteltoxikologie und Chemische Analytik
- Lebensmitteltoxikologie -

**Metabolismus und Transport von Benzo[a]pyren in Caco-2-
Zellen:**
**Einfluss von sekundären Pflanzeninhaltsstoffen auf die
Enzyme des Biotransformationsprozesses und den ABC-
Transporter BCRP**

**Dem Fachbereich Chemie der Universität Hannover
zur Erlangung des Grades**

**Doktorin der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.**

genehmigte Dissertation

VON

**Lebensmittelchemikerin Bettina Ebert
geboren am 23.04.69 in Hannover**

2005

Wissenschaftliche Betreuung:

PD Dr. Dr. A. Lampen

Institut für Lebensmitteltoxikologie und Chemische Analytik
der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover

Referent:

Prof. Dr. W. Müller

Institut für Biochemie
Medizinische Hochschule Hannover

Korreferent:

PD Dr. Dr. A. Lampen

Institut für Lebensmitteltoxikologie und Chemische Analytik
der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover

Tag der Promotion: 08.02.2005

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VI
ZUSAMMENFASSUNG	IX
ABSTRACT	X
1. EINLEITUNG	1
1.1. EINFÜHRUNG	1
1.2. Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK)	3
1.2.1. Kanzerogenität	4
1.3. Aryl hydrocarbon Rezeptor (AhR)	8
1.4. Biotransformation	11
1.4.1. Cytochrom P450 abhängige Monooxygenasen (CYPs)	12
1.4.2. Mikrosomale Epoxidhydrolasen	13
1.4.3. Sulfotransferasen (SULTs)	14
1.4.4. UDP-Glucuronosyltransferasen (UGTs)	15
1.4.5. ABC-Transporter	16
1.4.5.1. P-Glycoprotein (P-Gp)	17
1.4.5.2. Multidrug resistance-associated Proteins (MRPs)	17
1.4.5.2.1. MRP1 (ABCC1)	18
1.4.5.2.2. MRP2 (ABCC2)	18
1.4.5.2.3. MRP3 (ABCC3)	19
1.4.5.3. Breast cancer resistance protein (BCRP/ ABCG2)	20
1.5. Die humane Colon Adenokarzinom Zelllinie Caco-2	23
1.6. Sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe	25
1.6.1. Flavonoide	25
1.6.2. Indole	27
1.6.3. Oltipraz	28

1.7. Ziele	30
2. MATERIAL UND METHODEN	31
2.1. MATERIAL	31
2.1.1. Chemikalien	31
2.1.2. Zellkultur	33
2.1.2.1. Zellkultur-Medien und -zusätze	33
2.1.2.2. Permanente Zelllinien	33
2.1.3. Materialien, Reagenzien und Antikörper für Western Blot Analysen	33
2.1.4. Materialien für die Festphasenextraktion	34
2.1.5. Reagenzien und Enzyme für die Molekularbiologie	34
2.1.6. Verwendete Puffer	35
2.1.6.1. Puffer für die Probenvorbereitung	35
2.1.6.2. Puffer für Western Blot Analysen	36
2.1.6.3. Puffer für molekularbiologische Methoden	38
2.2. METHODEN	39
2.2.1. HPLC-Analytik von Benzo[a]pyren und Benzo[a]pyren-Metaboliten	39
2.2.1.1. Probenaufarbeitung	39
2.2.1.2. HPLC-Analyse	40
2.2.1.3. Auswertung	41
2.2.2. Zellkultur	41
2.2.3. Einfluss von verschiedenen sekundären Pflanzeninhaltsstoffen auf den Metabolismus von BP	43
2.2.3.1. Modulation von Phase I-Enzymen	44
<i>a. Untersuchung zur Zeit- und/ oder Konzentrationsabhängigkeit</i>	<i>44</i>
<i>b. Effekte auf die Bildung von Glucuronid-Konjugaten des BP</i>	<i>44</i>
2.2.3.2. Effekte auf Phase II-Enzyme/ ABC-Transport-Proteine Zeitabhängigkeit/ Konzentrationsabhängigkeit	45
2.2.3.3. Transportexperimente	46

<i>a. Modulation von Phase I-Enzymen: Effekte auf den Transport von BP-1- und BP-3-sulfat</i>	46
<i>b. Chemische Hemmung von Transportproteinen: MRP2 und P-Gp</i>	46
<i>c. Chemische Hemmung von BCRP und MRP unter Ausschluss möglicher Effekte der Hemmung auf Phase I-Enzyme</i>	47
<i>d. Chemische Hemmung von BCRP: Einfluss auf den Transport von BP-3-glucuronid</i>	47
<i>e. Modulation von BCRP: Effekte auf den Transport von BP-3-sulfat</i>	47
2.2.4. Untersuchungen zu Sulfotransferasen	48
2.2.4.1. Substratspezifität verschiedener SULT-Isoformen.....	48
2.2.4.2. Einfluss der Differenzierung auf die Proteinexpression der Sulfotransferasen.....	48
2.2.5. Probenvorbereitung: Western Blot-Analysen	49
2.2.5.1. Cytosolpräparation (Sulfotransferasen).....	49
2.2.5.2. Isolierung von Zellmembranen (BCRP).....	49
2.2.5.3. Gesamt-Zelllysate (BCRP).....	50
2.2.5.4. Proteinbestimmung.....	50
2.2.6. Western Blot-Analysen	50
2.2.6.1. Western Blot BCRP.....	50
2.2.6.2. Western Blot Sulfotransferasen.....	53
2.2.7. Untersuchungen zur Genexpression	53
2.2.7.1. Untersuchungen zur Expression von BCRP.....	53
2.2.7.1.1. Untersuchung zur Ah-Rezeptor-Abhängigkeit durch Superinduktion.....	53
2.2.7.1.2. Untersuchung zur Ah-Rezeptor-Abhängigkeit durch Behandlung mit dem AhR-Antagonisten PD 98059 (2'-Amino-3'-methoxyflavon).....	54
2.2.7.2. Einfluss von B[k]F, DB[a,l]P und einem PAK-Gemisch („Tabakrauch“) auf die Expression von BCRP.....	55
2.2.7.3. RNA-Isolierung.....	55
2.2.7.4. Reverse Transcriptase (RT)-PCR.....	56
3. ERGEBNISSE	58

3.1. Untersuchungen zum Metabolismus von Benzo[a]pyren (BP)	58
3.1.1. Einfluss von verschiedenen sekundären Pflanzeninhaltsstoffen und Oltipraz auf den Metabolismus von BP durch Modulation von Phase I-Enzymen.....	58
3.1.1.1. Effekte von Indol-3-carbinol, Flavon und Oltipraz.....	58
3.1.1.2. Effekte von Oltipraz und Flavon: Untersuchung zur Zeit- und/ oder Konzentrationsabhängigkeit	65
3.1.1.3. Effekte von Indol-3-carbinol auf den Metabolismus von BP: Einfluss der Inkubationsdauer	62
3.1.1.4. Effekte von weiteren sekundären Pflanzeninhaltsstoffen auf den Metabolismus von BP durch Modulation von Phase I-Enzymen.....	64
3.1.1.5. Effekte auf die Bildung von Glucuronid-Konjugaten des BP.....	65
3.1.2. Modulation von Phase II-Enzymen/ ABC-Transport-Proteinen.....	68
3.1.2.1. Zeitabhängigkeit/ Konzentrationsabhängigkeit.....	68
3.1.2.2. Effekte auf die Bildung von BP-3-glucuronid und BP-3-sulfat.....	69
3.2. Transportexperimente	71
3.2.1. Effekte von Oltipraz, Flavon und Indol-3-carbinol auf den Transport von BP-1- und BP-3-sulfat.....	71
3.2.2. Effekte von Oltipraz und Flavon: Konzentrationsabhängigkeit und Effekte einer Vorbehandlung mit dem prototypischen AhR-Agonisten 3-MC.....	74
3.2.3. Chemische Hemmung von Transportproteinen: Hemmung von MRP2.....	77
3.2.4. Chemische Hemmung von Transportproteinen: Hemmung von P-Gp.....	78
3.2.5. Chemische Hemmung von BCRP und MRP2 unter Ausschluss möglicher Effekte der Hemmung auf Phase I.....	80
3.2.5.1. Chemische Hemmung von BCRP durch Ko 143 und die unterschiedlichen Effekte auf den Transport von BP-3-glucuronid und BP-3-sulfat.....	83
3.2.6. Modulation von BCRP: Effekte auf den Transport von BP-3-sulfat.....	86
3.2.7. Transport von BP-3-sulfat durch HCT116 NRI-Zellen.....	88
3.3. Untersuchungen zu Sulfotransferasen	90
3.3.1. Substratspezifität verschiedener SULT-Isoformen.....	90
3.3.2. Einfluss der Differenzierung auf die Proteinexpression der Sulfotransferasen.....	92

3.4. Untersuchungen zur Genexpression	93
3.4.1. Untersuchungen zur Expression von BCRP	93
3.4.1.1. Untersuchung zur Ah-Rezeptor-Abhängigkeit durch Superinduktion	93
3.4.1.2. Untersuchung zur Ah-Rezeptor-Abhängigkeit durch Behandlung mit dem AhR-Antagonisten PD 98059 (2'-Amino-3'-methoxyflavon)	95
3.4.2. Einfluss von B[k]F, DB[a,l]P und einem PAK-Gemisch („Tabakrauch“) auf die Expression von BCRP	97
3.5. Untersuchungen zur Expression von BCRP (Protein)	99
3.5.1. Effekte von AhR-Agonisten auf die BCRP-Expression	99
3.5.2. Effekte von verschiedenen sekundären Pflanzeninhaltsstoffen auf die BCRP-Expression	101
3.6. Zusammenfassung der Ergebnisse	105
4. DISKUSSION	107
4.1. Der Beitrag von Phase I-Enzymen zur Detoxifikation von BP in Caco-2-Zellen	107
4.2. Die Bildung „toxischer“ Phase I-Metabolite des BP in Caco-2-Zellen	111
4.3. Der Beitrag von Phase II-Enzymen und ABC-Transportern zum Detoxifikationsprozess von BP in Caco-2-Zellen	114
4.4. Identifizierung des am Transport von BP-3-sulfat und BP-3-glucuronid beteiligten ABC-Transporters	116
4.5. Regulation von BCRP	120
4.6. Übertragbarkeit auf die <i>in vivo</i> -Situation	127
4.7. Schlussfolgerung und Ausblick	128
5. LITERATURVERZEICHNIS	130
6. ANHANG	146
Hilfen	146
Erklärung; Publikationen	147
Danksagung	148

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ABC	ATP-binding cassette
AhR	Aryl Hydrocarbon Receptor
AhRR	Ah-Receptor Repressor protein
α -NF	α -Naphthoflavon
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ARE	Antioxidant response element
ARNT	Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator
B[k]F	Benzo[k]fluoranthen
B[b]F	Benzo[b]fluoranthen
BP	Benzo[a]pyren
BCA	Bicinchoninic acid
BCRP	Breast cancer resistance protein
β -NF	β -Naphthoflavon
bHLH	basic Helix-Loop-Helix
BPDE	(\pm) (syn/anti)-7,8-Dihydroxy-9,10-epoxy-7,8,9,10-tetrahydro-benzo[a]pyren
Caco-2	<i>Zelllinie</i> : Humane Colonadenocarcinom Zellen
CAR	Constitutive androstane receptor
CYP	Cytochrom P450-abhängige Monooxidasen
DB[a, <i>l</i>]P	Dibenzo[a, <i>l</i>]pyren
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIM	3,3'-Diindolylmethan
DRE	Dioxin response element
DTT	Dithiothreitol
ER	Estrogen receptor
FXR	Farnesoid x-activated receptor
GR	Glucocorticoid receptor
GTC	Guanidinthiocyanat
HCT116 WT	<i>Zelllinie</i> : Human Colon Carcinom Zellen; Wild-Typ
HCT116 NRI	<i>Zelllinie</i> : Human Colon Carcinom Zellen; NB-506-resistent, BCRP-überexprimierend
HDAC	Histone deacetylase
HIF-1	Hypoxia-inducible factor 1
Hsp90	Heat shock protein 90 kDa
I3C	Indol-3-carbinol

ICZ	Indolo[3,2- <i>b</i>]carbazol
INF	Indeno[1,2,3- <i>cd</i>]fluoranthen
Keap1	Kelch-like ECH-associated protein 1; ECH = chicken Nrf2
Ko 143	selektiver BCRP-Hemmer; Derivat von Fumitremorgin C, einem Toxin aus <i>Aspergillus fumigatus</i>
LRP	Lung resistance protein
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MG-132	Carbobenzoxy-L-Leucyl-L-Leucyl-L-Leucinal
MRP1	Multidrug resistance-associated protein 1
MRP2	Multidrug resistance-associated protein 2
MRP3	Multidrug resistance-associated protein 3
NB-506	6-N-Formylamino-12,13-dihydro-1,11-dihydroxy-13-(β-D-glucopyranosyl)-5H-indolo[2,3- <i>a</i>]pyrrolo[3,4- <i>c</i>]carbazol-5,7(6H)-dion
NBD	Nucleotid-binding domain
NF-κB	Nuclear Factor-kappa B
Nrf2	NE-F2-related factor 2 = Erythroid transcription factor related factor 2
ODS	Octadecylsilan
1-OH-BP	1-Hydroxy-benzo[<i>a</i>]pyren
3-OH-BP	3-Hydroxy-benzo[<i>a</i>]pyren
PAK	Polyzyklische Aromatische Kohlenwasserstoffe
PAS	PER, ARNT, SIM
PBS	Phosphate buffered saline
PCB	Polychlorierte Biphenyle
PD 98059	2'-Amino-3'-methoxyflavon
P-Gp	P-Glycoprotein
PhIP	2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5- <i>b</i>]pyridin)
pmol	picomol (10 ⁻¹² mol)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PXR	Pregnane X receptor
QR	NAD(P)H:quinone oxidoreductase
ROS	Reactive Oxygen Species
SDS	Sodiumdodecylsulfate
SN-38	7-Ethyl-10-hydroxycamptothecin (aktiver Metabolit von Irinotecan)
SULT	Sulfotransferase
TBHQ	<i>tert</i> -Butylhydrochinon
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TC7	<i>Zelllinie</i> : Subklon von Caco-2

TCDD	2,3,7,8-Tetrachlordibenzo- <i>p</i> -dioxin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UGT	Uridindiphosphat-Glucuronosyl-Transferase
V79	<i>Zelllinie</i> : Lungenfibroblasten des Chinesischen Hamsters
XAP2	X-associated protein 2
XME	Xenobiotika metabolisierende Enzyme
XRE	Xenobiotic response element

ZUSAMMENFASSUNG

Der Gastrointestinaltrakt des Menschen repräsentiert, neben der Haut und der Lunge, eine der Eintrittspforten für Xenobiotika. Dabei spielt der Dünndarm bei Entgiftungsprozessen eine wichtige Rolle, denn dieser ist mit einer Reihe von Phase I und Phase II Fremdstoff-metabolisierenden Enzymen (XMEs) (Cytochrom P450 abhängige Monooxygenasen [CYP], Sulfotransferasen [SULTs], UDP-Glucuronosyltransferasen [UGTs], etc.) sowie Transportproteinen der ABC (ATP-binding cassette)-Superfamilie ausgestattet. Die Enzymsysteme und ABC-Transportproteine sind teilweise induzierbar, was zu einer beschleunigten Metabolisierung und Ausscheidung von Fremdstoffen aus dem Körper führt. Viele sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe vermögen die XMEs zu induzieren, woraus man die sogenannten chemopräventiven Effekte dieser Verbindungen bezüglich der Entstehung von bestimmten Krebserkrankungen ableiten kann. In der vorliegenden Arbeit wurde an der humanen Colon Adenokarzinom Zelllinie Caco-2 als Modell für den humanen Dünndarm der Einfluss von verschiedenen sekundären Pflanzeninhaltsstoffen (z. B. Flavonoide, Indole, phenolische Verbindungen) auf die Metabolisierung und den Transport von Benzo[a]pyren (BP), einem bekannten pro-karzinogenen Nahrungsmittelkontaminanten, untersucht.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass der ABC-Halbtransporter, BCRP (Breast cancer resistance protein), jedoch nicht MRP2 (Multidrug resistance-associated protein 2) am Transport von BP-3-sulfat und BP-3-glucuronid in Caco-2-Zellen beteiligt ist. Die Resultate zeigen weiterhin, dass die Expression von BCRP mit größter Wahrscheinlichkeit über Aryl Hydrocarbon Rezeptor (AhR)-abhängige Signalwege verläuft. Das BCRP-Protein ist sowohl durch Fremdstoffe (bekannte AhR-Agonisten, wie z. B. 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-*p*-dioxin, Benzo[a]pyren, Benzo[k]fluoranthren) als auch durch einige sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe (z. B. Quercetin, Dibenzoylmethan, Silymarin) induzierbar und funktionell exprimiert, was aus dem vermehrten Transport von BP-3-sulfat zum apikalen Kompartiment des Transwell™-Systems abgeleitet werden konnte. Während eine Behandlung mit verschiedenen sek. Pflanzeninhaltsstoffen auf die Aktivität und Expression der Phase II-Enzyme keinen (SULTs) oder nur einen moderaten (UGTs) Einfluss hatte, so konnte durch die Induktion von Phase I-Enzymen (CYP1A1 und 1B1) ein erheblicher Anstieg von Phase II-Metaboliten des BP (BP-1- und BP-3-sulfat) im Medium von Caco-2-Zellen beobachtet werden, was auch in einem verstärkten apikalen Transport dieser Metabolite resultierte. Aus diesen Ergebnissen kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass natürliche Nahrungsbestandteile einen Einfluss auf die Komponenten der biochemischen Barriere des Darmes haben (z. B. CYP1A1, UGTs und BCRP), was zu einer verminderten Aufnahme und beschleunigten Entgiftung von potenten karzinogenen Nahrungsmittelbestandteilen wie BP führen kann.

SCHLAGWORTE: Caco-2, Fremdstoff-metabolisierende Enzyme, Flavonoide, BCRP

ABSTRACT

The human gastrointestinal tract represents, apart from skin and lung, one portal of entry for xenobiotics. The small intestine plays an important role in the body's detoxification process, since it is equipped with several phase I and phase II xenobiotics metabolizing enzymes (XMEs) (cytochrome P450 dependent monooxygenases [CYP], sulfotransferases [SULTs], UDP-glucuronosyltransferases [UGTs], etc.) as well as with transport proteins of the ABC (ATP-binding cassette) superfamily. Both enzymes and transport proteins are partly inducible, which results in an accelerated metabolism and excretion of xenobiotics from the body. The so-called chemopreventive effects of some non-nutritive constituents of plant-derived food can be related to the capability of these compounds to induce XMEs. In the present study, the human colon adenocarcinoma cell line Caco-2 was used as a model for the human small intestine to investigate the effects of non-nutritive plant-derived compounds (e. g. flavonoids, dietary indoles, polyphenolic compounds) on the metabolism and transport of the pro-carcinogenic food-contaminant benzo[a]pyrene (BP).

The results of the present study show that in Caco-2 cells the ABC half-transporter BCRP (breast cancer resistance protein), but not MRP2 (multidrug resistance-associated protein 2) is involved in the transport of both phase II metabolites of BP, BP-3-sulfate and BP-3-glucuronide. The results further show that the expression of BCRP is most likely regulated via aryl hydrocarbon receptor (AhR)-dependent pathways. BCRP-protein was inducible by some xenobiotics (established AhR-agonists, e. g. 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin, benzo[a]pyrene, benzo[k]fluoranthene) and some food-derived compounds (e. g. quercetin, dibenzoylmethane, silymarin) and functionally expressed, as could be shown by the increased transport of BP-3-sulfate to the apical compartment of the Transwell™-system.

While treatment with several food-derived compounds had no (SULTs) or only a moderate (UGTs) effect on the activity and expression of these enzymes, the induction of phase I enzymes (CYP1A1 and 1B1) resulted in a pronounced increase in the amount of phase II metabolites of BP (BP-1- and BP-3-sulfate) in the media of Caco-2 cells. There was also an increased amount of these metabolites transported to the apical compartment of the Transwell™-system observable.

It can be concluded from the results presented here that naturally occurring compounds which are present in our daily diet can modulate the components (e. g. CYP1A1, UGTs and BCRP) of the biochemical barrier of the intestine. This may restrict the absorption and accelerate the detoxification of potential food-associated carcinogens such as benzo[a]pyrene.

KEYWORDS: Caco-2, xenobiotics metabolizing enzymes, flavonoids, BCRP

1. EINFÜHRUNG

Der Gastrointestinaltrakt des Menschen kommt täglich mit einer Vielzahl von Substanzen in Berührung. Darunter befinden sich neben Nahrungsbestandteilen unter Umständen auch Arzneimittel und Schadstoffe, wie Pestizid-Rückstände, Kontaminanten (PAK, PCBs, halogenierte Kohlenwasserstoffe) und potentiell toxische Stoffe biologischen Ursprungs (Xenobiotika).

Benzo[a]pyren (BP), ein Lebensmittelkontaminant aus der Gruppe der polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe besitzt ein hohes kanzerogenes Potential, was durch eine Reihe von tierexperimentellen Daten belegt werden konnte. Als PAK entsteht Benzo[a]pyren als Nebenprodukt unvollständiger Verbrennung organischen Materials und ist daher in Abgasen (Verbrennungsmotoren, Industrie), Zigarettenrauch und Steinkohlenteer zu finden. In Lebensmitteln konnte BP insbesondere in gegrilltem Fleisch (bis zu 50 ppm), geräucherten Produkten und in geringeren Mengen auch in Ölen, Cerealien, Obst und Gemüse nachgewiesen werden (Lijinski, 1991, Kazerouni *et al.*, 2001).

Der menschliche Körper ist mit einer Reihe von Schutzmechanismen ausgerüstet, welche dazu beitragen, die Bioverfügbarkeit von Schadstoffen und damit deren mögliche Schädigung auf den Körper zu reduzieren. Zu diesen Mechanismen gehören die Enzyme der Phase I (z. B. CYP1A1, CYP1B1, mikrosomale Epoxidhydrolasen) und Phase II (Sulfotransferasen, UDP-Glucuronosyltransferasen, Glutathion-S-Transferasen) des Biotransformationsprozesses sowie Transportproteine der ABC-Superfamilie (z. B. P-Glycoprotein, MRPs, BCRP). Während die Enzyme des Biotransformationsprozesses den lipophilen Schadstoff in hydrophilere und damit nierengängige Metaboliten umwandeln, vermitteln die ABC-Transportproteine deren Ausschleusung aus der Zelle.

Obwohl die Leber als das wichtigste „Entgiftungsorgan“ des Körpers angesehen wird, beschäftigten sich in den letzten Jahren immer mehr Studien mit der Bedeutung des Dünndarms für den Detoxifikationsprozess von Xenobiotika. Seit den 70er Jahren ist bekannt, dass der Dünndarm durch seine Ausstattung mit Phase I und Phase II-Enzymen und ABC-Transportproteinen die Fähigkeit besitzt, sowohl Arzneimittel als auch Fremdstoffe wie PAK (Rifkind *et al.*, 1978) zu metabolisieren.

Lipophile Schadstoffe, wie z. B. BP, können passiv die Zellmembranen durchdringen und durch Interaktion mit dem zytosolischen Transkriptionsfaktor AhR (Aryl hydrocarbon receptor) die Transkription sowohl von Phase I (CYP1A1 und 1B1) als auch von Phase II (UGTs) Enzymen induzieren. Die ABC-Transportproteine sind durch verschiedene Verbindungen über unterschiedliche Mechanismen induzierbar, wobei der AhR zumindest bei der Regulation von P-Gp eine Rolle zu spielen scheint.

Da auch PAK wie viele andere Xenobiotika ihren eigenen Metabolismus induzieren, bedeutet dies, dass durch eine Aufnahme von AhR-Agonisten die genannten

Entgiftungsmechanismen aktiviert werden und eine nachfolgende Aufnahme von strukturell verwandten Verbindungen deren beschleunigte Entgiftung ermöglichen. Die Vielzahl von heute bekannten AhR-Agonisten umfasst nicht nur eine Reihe von Schadstoffen (2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-*p*-dioxin [TCDD], polychlorierte Biphenyle [PCBs], PAK), sondern auch zahlreiche natürlich vorkommende Stoffe, wie Polyphenole (Flavonoide, Curcumin), Indol-Derivate (Indol-3-carbinol, Indol-Essigsäure) und Kondensationsprodukte dieser Indole (Indolo[3,2-*b*]carbazol, Diindolymethan) [Denison *et al.*, 2003]. Während Flavonoide im Pflanzenreich weit verbreitet und daher in fast allen pflanzlichen Lebensmitteln zu finden sind (Obst, Gemüse, Getreide, Säfte, Wein), kommen die Indole wie Indol-3-carbinol (I3C) hauptsächlich in Brassicaceen vor. Das I3C entsteht zum Beispiel bei Verletzung des Pflanzengewebes (Zubereitung, Kauen) durch eine enzymatische Hydrolyse aus der Vorstufe Glucobrassicin. Im sauren Milieu des Magens bilden sich durch Kondensationsreaktionen Dimere und Trimere des I3C, welche z. T. eine sehr hohe AhR-Affinität aufweisen (z. B. Indolo[3,2-*b*]carbazol).

Zahlreiche Studien beschäftigen sich mit den chemopräventiven Eigenschaften von sekundären Pflanzeninhaltsstoffen hinsichtlich der Entstehung von Krebs.

Die Mechanismen, die diesen protektiven Eigenschaften zugrunde liegen, sind vielfältig. Eine wichtige Eigenschaft ist die Modulation von Xenobiotika-metabolisierenden Enzymen (XMEs). Die Induktion dieser Enzyme beschleunigt die Entgiftung von potentiell kanzerogenen Stoffen und verkürzt so deren biologische Halbwertszeit im Körper. Des Weiteren besitzen insbesondere viele Flavonoide wie Quercetin und verwandte polyphenolische Verbindungen (Ellagsäure, Curcumin, Silymarin) antioxidative Eigenschaften, die sie befähigen, reaktive Metaboliten (ROS, Epoxy-Verbindungen) zu inaktivieren, die mit der Bildung von DNA-Addukten und der Entstehung von malignen Veränderungen in Verbindung gebracht werden (Rice-Evans *et al.*, 1996, Cos *et al.*, 1998, Böhm *et al.*, 1998).

In dieser Studie wurde als Modell für die menschliche Dünndarmzelle die humane Colon Adenocarcinomzelle Caco-2 und deren Subklon TC7 verwendet. Diese Zelllinie hat sich als Modell zur Untersuchung von Biotransformation und Permeabilität etabliert (Meunier *et al.*, 1995), da sie nach vollständiger Ausdifferenzierung alle morphologischen und biochemischen Charakteristika von Dünndarm-Enterozyten aufweist. Das in dieser Arbeit eingesetzte Transwell™-System hat sich als Instrument zur Untersuchung von Transportvorgängen bewährt. Die Zellen werden auf permeablen Polycarbonatmembranen kultiviert und formen so nach der Ausdifferenzierung wohl definierte apikale (luminale) und basolaterale (serosale) Domänen (Artursson und Karlsson, 1991, Pinto *et al.*, 1983). In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, welchen Einfluss bestimmte Nahrungsbestandteile (sek. Pflanzeninhaltsstoffe) auf die biochemische Barriere des

Dünndarms hinsichtlich der Metabolisierung und Entgiftung von Benzo[a]pyren haben. Hierbei wurden insbesondere die Effekte auf die Enzyme des Biotransformationsprozesses (Phase I: CYP1A1, CYP1B1; Phase II: SULTs, UGTs) und die Transportproteine der ABC-Superfamilie (P-Gp, MRP2, BCRP) untersucht.

1.2. Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK)

Die polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe (PAK), zu denen über 200 Verbindungen gezählt werden, entstehen bei der Verbrennung von organischem Material, was die ubiquitäre Verbreitung einiger Vertreter dieser Substanzklasse erklärt. Ausgangsprodukte können sowohl reine Kohlenwasserstoffe, oder auch andere organische Verbindungen wie Lipide, Kohlenhydrate, Peptide oder z.B. Nicotin sein (Halaby *et al.*, 1971, Masuda *et al.*, 1967). Nach dem bereits seit den 60er Jahren bekannten Mechanismus von *Badger* (Badger *et al.*, 1962), verläuft die Pyrosynthese von beispielsweise Benzo[a]pyren über C2 und C4 Radikale, welche durch Zyklisierung und Dehydrogenierung die kondensierte aromatische Ringstruktur bilden. Interessanterweise sind Mikroorganismen und auch Pflanzen in der Lage, PAK biosynthetisch herzustellen, denn die Bildung von z. B. Benzo[a]pyren konnte bei der Keimung von Getreide und Linsen beobachtet werden (Graef & Diehl, 1966, Knorr & Schrenk, 1968). Schwere PAK (z. B. Coronen, Benzo[g, h, i]perylen) können auch durch Kondensation von leichteren PAK (z. B. Phenanthren, Anthracen, Pyren) entstehen (Lang *et al.*, 1963).

PAK bilden sich bevorzugt im Temperaturbereich von 650-900°C (Badger *et al.*, 1964), wobei eine unzureichende Versorgung der Flamme mit Sauerstoff deren Bildung fördert. Auf natürliche Weise, z. B. durch Waldbrände erzeugte PAK unterscheiden sich von denen aus anthropogenen Quellen (Feuerstätten, Verbrennungsmotoren, Industrie) stammenden darin, dass Letztere nur geringen Anteilen aus alkylierten PAK bestehen (Blumer *et al.*, 1975), was auf die höheren Entstehungstemperaturen zurückgeführt wird. Andererseits enthält auch der Zigarettenrauch einen gewissen Anteil an alkylierten PAK, welche ihren Ursprung in bestimmten, in Tabak enthaltenen Naturstoffen (Indene, Isopren) haben.

Es existieren zahlreiche Studien, die sich mit der menschlichen Exposition gegenüber PAK, insbesondere über Nahrungsmittel, beschäftigen (de Vos *et al.*, 1990, Lijinski, 1991, Dennis *et al.*, 1991, Kazerouni *et al.*, 2001), denn interessanterweise wird der Großteil der PAK nicht über die Luft, sondern über die Nahrung aufgenommen. Für das aus toxikologischer Sicht sehr bedeutsame Benzo[a]pyren wurde ermittelt, dass 97% der täglich aufgenommenen Gesamtmenge mit der Nahrung in den Körper gelangt (Hattemer-Frey und Travis, 1991). Dabei begünstigen einige Zubereitungsarten (Grillen über offener Flamme, Heißräuchern) aber auch die Beschaffenheit (z. B. hoher Fettgehalt oder hoher Kohlenhydratgehalt) der

Lebensmittel die Entstehung von PAK (Dennis *et al.*, 1991). Die unzeitgemäße Trocknung von Oliventrestern mit Rauchgasen führte in der Vergangenheit dazu, dass auch Öle teilweise stark mit PAK belastet waren (Mitteilung vom bgvv, 2001). Die Belastung von Obst und Gemüse mit PAK ist im Vergleich zu gegrilltem Fleisch relativ gering und sehr unterschiedlich, je nach Anbauweise (Nähe zu Industrie oder großen Verkehrswegen) und Standzeiten (z. B. lange Standzeiten für Grünkohl).

1.2.1. Kanzerogenität

Unter den PAK findet man einige Vertreter, die in der Literatur als mehr oder weniger starke Karzinogene beschrieben wurden. Dabei gehören zu den bekannten starken Karzinogenen z. B. Benzo[*a*]pyren, Benzo[*c*]phenanthren, Dibenzo[*a,h*]anthracen, Dibenzo[*a,l*]pyren und die alkylierten PAK 3-Methylcholanthren und 7,12-Dimethylbenz[*a*]anthracen. Schwache karzinogene Eigenschaften wurden für Benzo[*b*]fluoranthren, Benzo[*k*]fluoranthren und Chrysen berichtet. Als nicht kanzerogen wurden dagegen das Pyren, Benzo[*e*]pyren, Phenanthren, Anthracen und Coronen eingestuft, wobei erwähnt werden sollte, dass in einigen Quellen die mögliche Kanzerogenität von Pyren und Phenanthren diskutiert wird (*International Agency for Research on Cancer (IARC) 1987*).

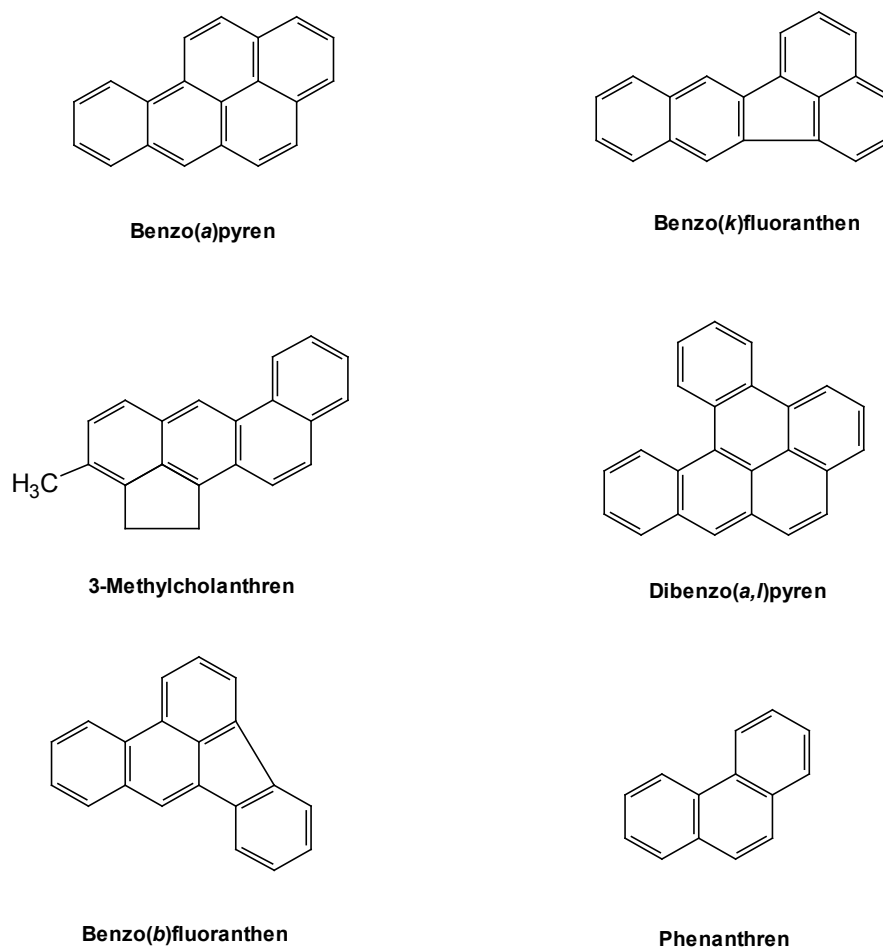


Abbildung 1: Strukturformeln einiger PAK, die in dieser Arbeit verwendet wurden

Die PAK sind jedoch in unveränderter Form keine Karzinogene, und wie viele andere Pro-Karzinogene (z. B. Aflatoxin B1) bedarf es erst einer metabolischen Aktivierung dieser Verbindungen zum eigentlichen Karzinogen. Seit Mitte der 70er Jahre wurde bereits von den beiden Gruppen Conney und Jerina (Conney *et al.*, 1982, Jerina *et al.*, 1980) die Aktivierung des prototypischen Pro-Karzinogens BP intensiv untersucht. Wie in Abbildung 2 dargestellt, entstehen bei der enzymatischen Metabolisierung von BP durch körpereigene Enzyme zahlreiche Verbindungen, wie Phenole, Diöle, Chinone und sehr reaktive Epoxy-Derivate (Aren-Oxide).

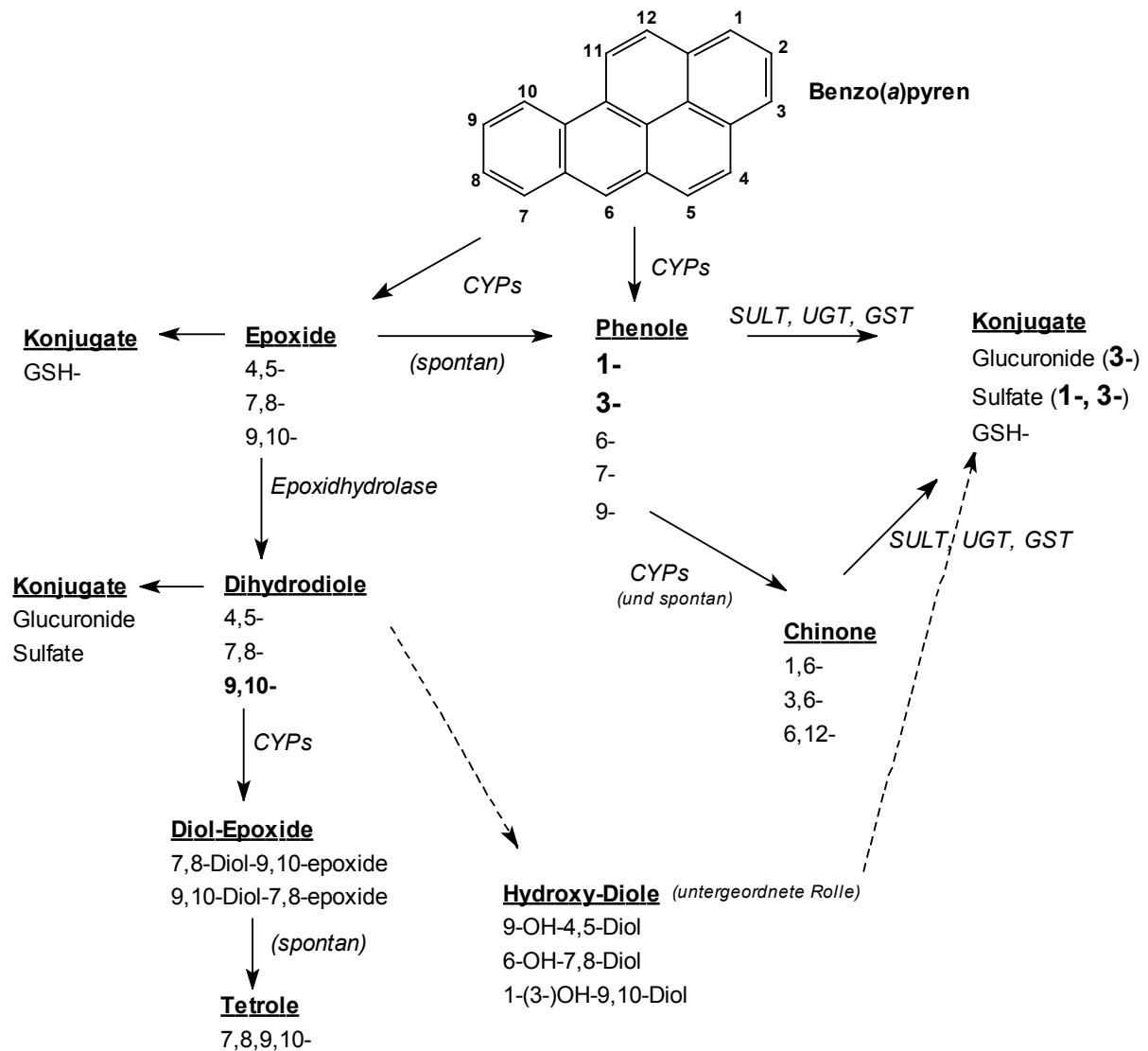


Abbildung 2: Biotransformation von Benzo[a]pyren durch Phase I (CYPs, mikrosomale Epoxidhydrrolasen) und Phase II (SULT, UGT, GST) Enzyme. (Die fett gedruckte Metabolite werden als Hauptabbauprodukte von Caco-2-Zellen produziert [1-,3-Sulfate, 3-Glucuronide und in geringerem Umfang auch 9,10-Diöle]). (Quelle: IARC Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans, part 1, Vol.32, December 1983, Seite 58; verändert)

Bei bestimmten PAK werden co-karzinogene Eigenschaften diskutiert, da z. B. im Tierversuch die Verabreichung eines als nicht karzinogen eingestuften PAK die Tumorbildenden Eigenschaften eines bekannten Karzinogens förderten. Die Induktion von Phase I-Enzymen (z. B. CYP1A1, CYP1B1) durch den nicht kanzerogenen Stoff und die dadurch vermehrte Umsetzung des verabreichten Pro-Karzinogens zu reaktiven Metaboliten könnte eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen sein.

Zunächst wurde das sogenannte *K-Region*-Epoxid, das 4,5-Epoxy-BP, als das eigentliche Karzinogen angesehen, da es sich auch im *Ames-Test* mit bestimmten Salmonella-Stämmen als mutagen erwiesen hatte (Gelboin *et al.*, 1980). Es wurde jedoch beobachtet, dass das reaktive Epoxid umgehend zum inaktiven 4,5-Diol hydrolysiert wurde und damit als Karzinogen ausschied (Conney *et al.*, 1982). Das sogenannte *Bay-Region* Epoxid (7,8-Dihydroxy-9,10-epoxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo[*a*]pyren, „BPDE“) von dem vier Stereoisomere existieren, hat sich letztendlich als das eigentliche Karzinogen herausgestellt (Conney *et al.*, 1982, Gelboin *et al.*, 1980).

Da in der Literatur einige verwirrende Bezeichnungen existieren, soll hier kurz auf die Nomenklatur und die Entstehung der Bay-Region-Epoxide eingegangen werden (vgl. Abb. 3). Die Einfügung einer Epoxy-Funktion durch Cytochrom P450 abhängige Monooxygenasen lässt den ersten Vorläufer des BPDE entstehen, das 7,8-Epoxy-7,8-dihydro-BP („BP-7,8-epoxid“). Da die Epoxy-Gruppe von der Ringebene des BP entweder nach oben oder nach unten zeigen kann, entstehen zwei *Enantiomere* („Spiegelbildisomere“), deren unterschiedliche optische Aktivität durch den Zusatz (+) oder (-) gekennzeichnet wird. Die absolute Konfiguration der chiralen C-Atome nach IUPAC wird für die jeweilige Position mit *R* (*rectus*, rechts herum) oder *S* (*sinister*, links herum) angegeben (z. B. (+) (7*R*, 8*S*)-7,8-Epoxy-7,8-dihydro-BP).

Während bei normalen chemischen Reaktionen die Enantiomere im gleichen Verhältnis gebildet werden (*Racemat*), so entsteht bei enzymatischen Reaktionen ein Enantiomer bevorzugt (stereoselektive Reaktionen). Im Fall des oben genannten 7,8-Epoxids wurde die bevorzugte Umsetzung zum (+)-Enantiomer beobachtet (in Abb. 3 durch den Pfeil mit durchgezogener Linie verdeutlicht). Bei der folgenden Hydrolyse der Epoxy-Funktion durch die microsomale Epoxidhydrolase und der anschließenden erneuten Oxidation durch Cytochrom P450 Enzyme (z. B. CYP1A1 und CYP1B1), können jeweils wiederum zwei Enantiomere entstehen, je nachdem, ob sich die Substituenten an der Position 7 (-hydroxy) und Position 10 (epoxy-) auf der gleichen Seite der Ringebene (*syn*) oder auf unterschiedlichen Seiten (*anti*) befinden. Alle vier entstehenden (\pm) (*syn/anti*) 7,8-Dihydroxy-9,10-epoxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo[*a*]pyren-Isomere sind toxisch für Säugetierzellen, jedoch zeigt insbesondere das (+)-anti-BPDE die stärkste Bindung an DNA und auch die

stärkste Kanzerogenität in Säugetier-Systemen (Buening *et al.*, 1978), wobei das (-)-anti-Isomer wiederum in Mikroorganismen die stärkste Mutagenität zeigt.

Die Aktivierung von PAK nach der oben erläuterten Bay-Region-Theorie wurde auch als Erklärung für die besondere Kanzerogenität von anderen PAK (Dibenzo[*a*,*f*]pyren, 7,12-Dimethylbenz[*a*]anthracen [Luch *et al.*, 1999] und Benzo[*b*]fluoranthren [Yang *et al.*, 1988]) herangezogen. Mit dem Fehlen einer Bay-Region im Molekül könnte auch die bisher nicht beobachtete (oder nicht eindeutig erwiesene) Kanzerogenität von Pyren, Phenanthren oder Anthracen erklärt werden. Andererseits sei darauf hingewiesen, dass das bloße Fehlen einer formalen Bay-Region nicht bedeutet, dass diese Verbindung nicht kanzerogen ist.

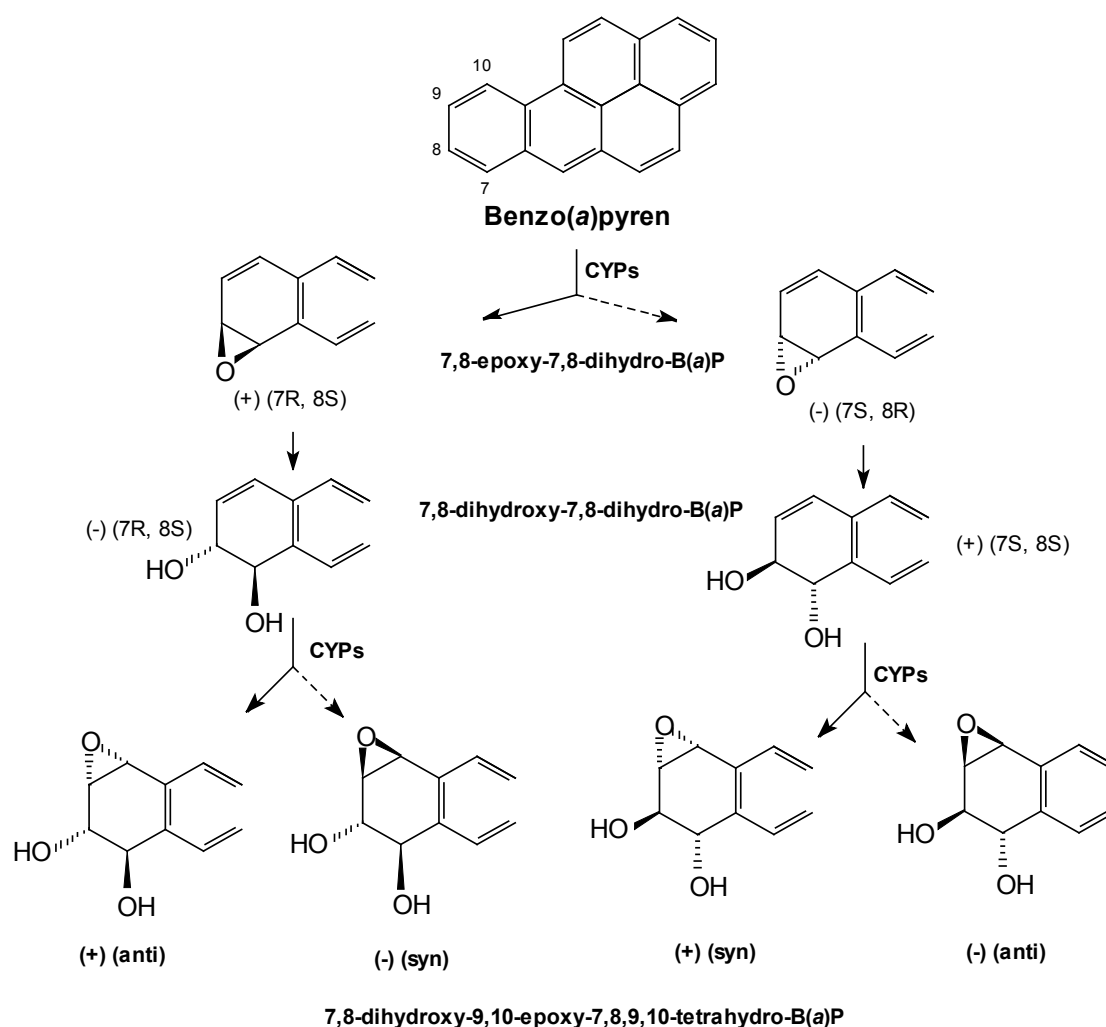


Abbildung 3: Entstehung der Bay-Region-Epoxide (BPDEs) des Benzo[*a*]pyrens (nach Dipple *et al.*, 1984; verändert).

Die besondere Reaktivität der Bay-Region-Epoxide (oder Fähigkeit, sich schädigend in Zellsystemen auszuwirken), wird folgendermaßen erklärt. Bei der Bildung von Bay-Region-Epoxiden entstehen sehr reaktive Intermediate (Carbokationen), die normalerweise extrem

instabil sind. Durch die besondere Elektronendichteverteilung in bestimmten PAK, die sich aus der Molekülorbital-Theorie ableiten lässt, sind die Carbokationen der Bay-Region-Epoxide besonders stabilisiert. Durch deren längere Lebensdauer steigt daher auch die Wahrscheinlichkeit, mit sensitiven Makromolekülen der Zelle, wie z. B. der DNA, zu kovalenten Addukten zu reagieren. Des Weiteren haben sich die Bay-Region-Epoxide als sehr resistent gegenüber enzymatischen Detoxifikationsprozessen (Konjugationsreaktionen) herausgestellt, was vermutlich auf die sterische Hinderung des angreifenden Enzyms zurückzuführen ist (Hernandez *et al.*, 1980).

1.3. Aryl hydrocarbon Rezeptor (AhR)

Der Ah-Rezeptor ist ein Ligand-aktivierter nukleärer Transkriptionsfaktor, der aufgrund seiner molekularen Struktur zur sogenannten „PAS-Superfamilie“ gezählt wird. Dabei leitet sich die Bezeichnung „PAS“ von den Anfangsbuchstaben der weiteren Mitglieder ab: **PER** (*Period (per)* Gen, welches in der Fruchtfliege *Drosophila* für ein Protein kodiert, das in der Regulation des circadianen Rhythmus' involviert ist), **ARNT**, (*Aryl hydrocarbon nuclear translocator*, der Heterodimerisationspartner des AhR) und **SIM** (das *Drosophila Single-minded* Gen). Die PAS-Proteine wurden nicht nur in Tieren, sondern auch in Prokaryonten und Pflanzen gefunden, wo sie unter anderem als Licht- und Sauerstoff-Sensoren fungieren, weshalb sie vielfach auch als „Umweltsensoren“ („*environmental sensors*“) bezeichnet werden (Carlson und Perdew, 2002, Gu *et al.*, 2000). Im Fall des AhR würde die Detektion einer chemischen Veränderung der direkten Umwelt des Organismus durch z. B. Kontamination mit PAK oder chlororganischen Verbindungen eine Adaption im biochemischen Sinne zur Folge haben.

In höheren Eukaryonten bietet die PAS-Domäne eine Oberfläche für die Homodimerisation mit anderen PAS-Proteinen einerseits und für die heterotypische Interaktion mit zellulären Chaperonen (z. B. mit dem 90 kDa Hitze-Schock-Protein *Hsp 90*) andererseits (Perdew *et al.*, 1988). Im AhR stellt die PAS-Domäne auch eine Oberfläche für die Bindung des relativ kleinen Liganden 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-*p*-dioxin (TCDD) dar (Dolwick *et al.*, 1993). AhR und ARNT besitzen N-terminal zur PAS-Domäne eine weitere strukturelle Ähnlichkeit, die *basic-helix-loop-helix-(bHLH)*-Domäne, welche bei der Dimerisation mit anderen bHLH-PAS-Proteinen eine Rolle spielt.

Im Ligand-freien Zustand liegt der AhR als Multiprotein-Komplex im Zytosol vor. Es gibt jedoch auch Zelltypen, in denen der AhR überwiegend im Kern zu finden ist, gewöhnlich ist der AhR jedoch ein zytosolisches Protein. Die beiden zellulären Chaperone Hsp90, die sich in diesem Multiprotein-Komplex befinden, haben die Aufgabe, die C-terminale Hälfte der

PAS-Domäne in einer für die Liganden-Bindung günstigen räumlichen Konformation zu halten (Antonsson *et al.*, 1995, Whitelaw *et al.*, 1995). An dem Multiprotein-Komplex sind außerdem noch zwei weitere Chaperone, das p23 (23 kDa Co-Chaperon) und das XAP2 („X-associated protein 2“, auch ARA9 oder AIP genannt) beteiligt, wobei das XAP2 diesen Komplex durch Bindung an das Zytoskelett im Zytosol fixiert. Die Bindung eines Liganden bewirkt eine Konformationsänderung in diesem Proteinkomplex, so dass eine für die Wanderung in den Zellkern wichtige Domäne (*nuclear localization sequence, NLS*) frei zugänglich wird und der Komplex in den Zellkern befördert werden kann (Pollenz *et al.*, 1994).

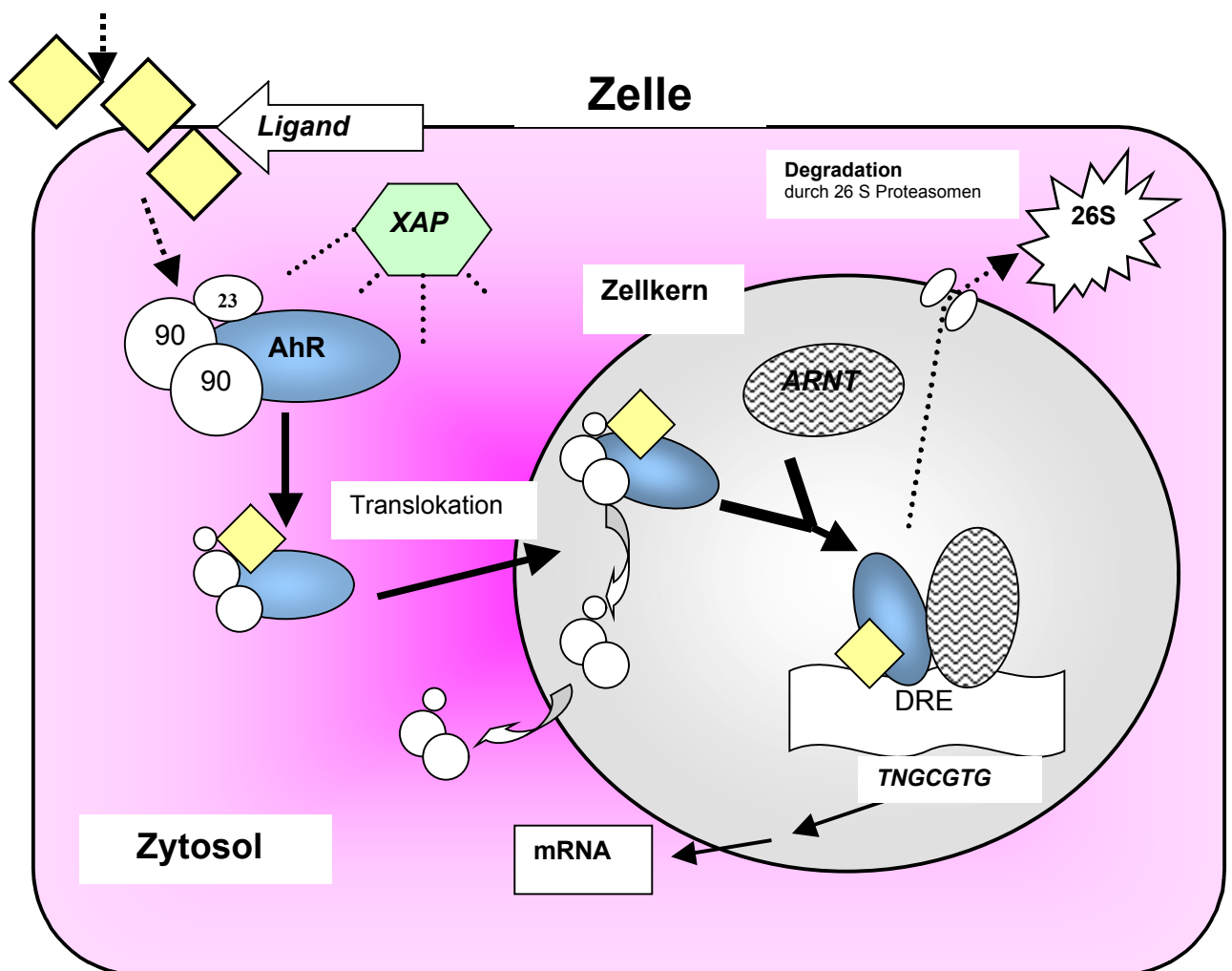


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Ligand-aktivierten Genexpression durch den Ah-Rezeptor (90= Hsp90, 23= Co-Chaperon p23, XAP= X-associated protein 2, bindet den ligand-freien Rezeptor-Komplex an das Zytoskelett; ARNT= AhR nuclear translocator, DRE= dioxin response element im Promoter des Target Gens, 26S= 26S-Proteasomen)

[Nach Denison und Nagy, 2003; verändert]

Im Zellkern kommt es nach Abspaltung der Hitzeschock-Proteine zur Heterodimerisation mit dem ARNT, wodurch dieser Ligand:AhR:ARNT-Komplex eine hohe Bindungsaffinität zu

bestimmten DNA-Sequenzen, den *dioxin response elements* (DRE oder XRE, xenobiotic response element) erhält. Diese Sequenzen befinden sich in der regulatorischen (Promoter) Region von AhR-regulierten Genen wie z. B. CYP1A1, das bekannteste Target-Gen des AhR. Ein Ligand-aktivierter Ah-Rezeptor, welcher nicht an ARNT und/ oder DNA gebunden werden konnte, wird aktiv aus dem Zellkern herausbefördert und durch enzymatische „Markierung“ im Zytosol mit Ubiquitin wird dieses Protein von bestimmten Proteasomen (26 S Proteasomen) erkannt und abgebaut.

Durch die Induktion vieler AhR-regulierter Gene, wie z. B. CYP1A1, wird gleichzeitig die Expression des AhR-Repressor-Proteins (AhRR) induziert, welches mit dem ARNT um die Bindung an den AhR konkurriert. Dies stellt eine autoregulatorische Schleife dar, welche eine Überstimulation der Expression verhindert (Gu *et al.*, 2000). Der AhR selbst wird autoregulatorisch exprimiert, denn in seiner Promoter-Region konnten DREs identifiziert werden, an die der aktivierte AhR:ARNT-Komplex binden kann (Morel und Barouki, 1999).

Es existieren in der Literatur zahlreiche Hinweise auf eine physiologische Rolle des AhR, neben seiner etablierten Funktion in der Regulation von Xenobiotika-metabolisierenden Enzymen. So zeigen AhR (-/-)-Mäuse eine Störung in der Entwicklung der Leber, des kardiovaskulären Systems und des Immunsystems (Schmidt *et al.*, 1996, Lahvis *et al.*, 2000). Darüber hinaus konnte eine direkte Interaktion des AhR mit der Kontrolle des Zellzyklus und der Differenzierung von Zellen beobachtet werden (Weiss *et al.*, 1996, Nebert *et al.*, 2000). Da viele der am Multiprotein-Komplex beteiligten Proteine Phosphoproteine sind, hat der Phosphorylierungsstatus von AhR, Hsp90, XAP2 und ARNT vermutlich einen entscheidenden Einfluss auf die Transaktivierung des AhR. Es wurde bereits gezeigt, dass z. B. die Aktivität von Tyrosin-Kinasen einen Einfluß auf die Signal-Übertragung durch den AhR hat (Gradin *et al.*, 1994). Durch die Rekrutierung von gleichen Co-Faktoren bzw. Dimerisationspartnern (z. B. p300, HIF1 β = ARNT) kann die AhR-vermittelte Signaltransduktion mit einer Reihe von anderen Rezeptor-vermittelten Zellantworten interagieren (*Cross-talk*; z. B. mit Estrogen-Rezeptor *ER* [Sheppard *et al.*, 1998] und Glucocorticoid-Rezeptor *GR* [Harnish *et al.*, 2000] unter bestimmten Bedingungen auch mit HIF-1 α , Hypoxia-inducible factor-1 α [Gu *et al.*, 2000, Chan *et al.*, 1999]).

Der AhR besitzt eine relativ kleine „Liganden-Tasche“ (14 Å x 12 Å x 5 Å), die insbesondere planare und lipophile Liganden aufnimmt, welche eine laterale elektronenreiche Gruppe (z. B. -Cl) besitzen. Als prototypischer Ligand ist daher TCDD bekannt, welcher die höchste Affinität zum AhR besitzt (ca. 1×10^{-12} Mol, im *picomol*-Bereich). Weitere starke Liganden findet man in der Gruppe der halogenierten aromatischen Kohlenwasserstoffe (z. B. PCBs) und der PAK. In den letzten Jahren wurde jedoch auch eine Reihe von natürlich in pflanzlichen Lebensmitteln vorkommenden AhR-Liganden (Flavonoide, Indole, Polyphenole, etc. [Denison und Nagy, 2003]) identifiziert und darüber hinaus existieren auch schwache

endogene Liganden wie z. B. Abbauprodukte der Aminosäure Tryptophan (Waliser *et al.*, 2002).

1.4. Biotransformation

Der Prozess der Biotransformation ermöglicht dem Körper sowohl den Aufbau von körpereigenen (z.B. Steroidhormone, Cholesterin, Serotonin) als auch den Abbau von körpereigenen (Endobiotika; z. B. Bilirubin, Steroidhormone) und körperfremden (Xenobiotika; z. B. Pharmaka, Kontaminanten, Pestizide) Stoffen. Nachfolgend soll nur der Abbau von Stoffen betrachtet werden: dieser Prozess wird oft auch als Detoxifikation bezeichnet.

Der Biotransformationsprozess wird im allgemeinen in Phase I und Phase II unterteilt. Da die Lipophilie von Stoffen oft auch mit biologischer Aktivität und Toxizität einhergehen kann, hat der Körper mit der Biotransformation einen Weg gefunden, Stoffe durch Umwandlung in hydrophile Metaboliten besser und schneller über Galle und Urin ausscheiden zu können und damit zu entgiften.

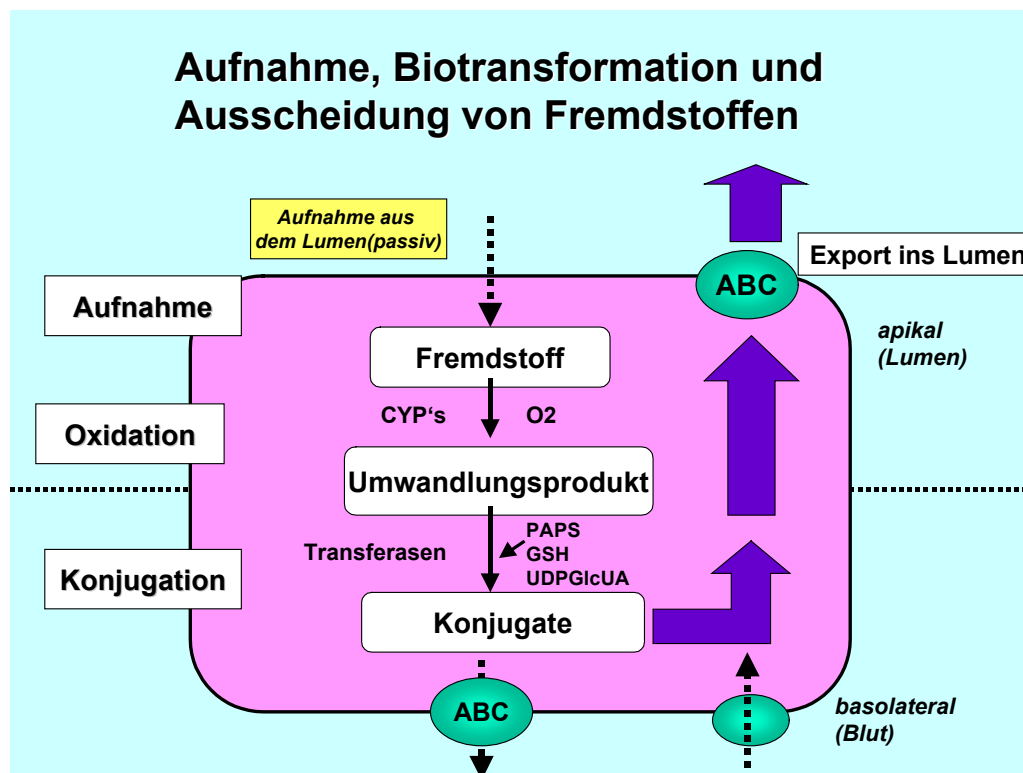


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Schritte der Biotransformation in einer polarisierten Zelle (z. B. in Enterozyten des Bürstensaumepithels) bestehend aus passiver Aufnahme eines lipophilen Schadstoffs (z. B. Benzo[a]pyren) durch die apikale Membran und nachfolgender Oxidation durch CYPs, Konjugation durch Phase II-Enzyme (Transferasen) und aktiven Export durch apikale ABC-Transporter zur luminalen Seite des Organs. In Caco-2-Zellen wird immer auch ein gewisser Anteil der polaren Konjugate des BP zur basolateralen Seite der Zelle transportiert (gestrichelte Linie). (Nach König *et al.*, 1999b; verändert).

Im ersten Schritt (Phase I) der Biotransformation erfolgt die Einführung oder Freisetzung einer funktionellen Gruppe (meist –OH, aber auch –SH oder –NH₂) in das Molekül. Nach dieser „*Funktionalisierungsreaktion*“ bietet die eingefügte nukleophile Gruppe einen Angriffspunkt für die nachfolgende *Konjugation* (Phase II) an einen hydrophilen Rest, wie z. B. Glucuronsäure und Sulfonsäure. Elektrophile Verbindungen (wie z. B. die Carbokationen, die bei der Umlagerung von Aren-Oxiden entstehen) können dagegen spontan oder auch enzymatisch katalysiert durch Glutathion-S-Transferasen (GSTs) an das Peptid Glutathion (GSH) konjugiert werden. Die größere Hydrophilie des entstandenen Fremdstoff-Metaboliten bedingt jedoch, dass dieser die Zellmembranen nicht mehr passiv durchdringen kann; das Konjugat muss also durch ein Transportprotein (z. B. ABC-Transportprotein) aktiv aus der Zelle herausbefördert werden. Dieser 3. Schritt wird von einigen Autoren auch als „*Phase III*“ bezeichnet. Durch die Phase III wird das Molekül zwar nicht mehr weiter transformiert, jedoch könnte man einen ABC-Transporter als eine Art Enzym betrachten, das statt einer chemischen Umwandlung einen vektoriellen Transport katalysiert.

Zu den Enzymen der Phase I gehören in erster Linie die Cytochrom P450 abhängigen Monooxygenasen (CYPs), die mikrosomalen Epoxidhydrolasen und ferner die Flavino-Monooxygenase (letztere spielt jedoch eine eher untergeordnete Rolle und katalysiert in erster Linie die Umsetzung von tertiären Aminen zu N-Oxiden). Phase II Reaktionen werden durch Transferasen wie die Sulfotransferasen (SULT), Uridindiphosphat-Glucuronosyltransferasen (UGTs) und die Glutathion-S-Transferasen (GSTs) katalysiert. Im folgenden Abschnitt soll auf die für die vorliegende Arbeit besonders relevanten Enzyme der Phase I (CYPs) und Phase II (SULTs und UGTs) eingegangen werden.

1.4.1. Cytochrom P450

Cytochrom P450 abhängige Monooxygenasen (CYPs) sind mit Ausnahme einiger löslichen bakteriellen Formen, membrangebundene Enzyme des Endoplasmatischen Retikulums (ER). Die große Anzahl von bislang identifizierten Formen (über 300) verdeutlicht deren wichtige Rolle im Zellstoffwechsel sowohl von Eukaryonten als auch von Prokaryonten. Die Nomenklatur der CYPs basiert auf dem Grad der Aminosäure-Identität, wobei Enzyme mit einer Identität von > 40% zur gleichen Familie (z. B. 1, 2, 3) und mit einer Identität von > 55% zur gleichen Subfamilie (z. B. A, B, C) gezählt werden. Die Familien-Nummern unter 100 kennzeichnen eukaryotische, diejenigen über 100, prokaryotische Formen.

Wie aus der Bezeichnung „*Monooxygenase*“ schon hervorgeht, katalysieren die CYPs die Einführung eines Sauerstoffatoms in das Substratmolekül, wobei das zweite O-Atom des Sauerstoffdonors O₂ zu Wasser reduziert wird. Die CYPs besitzen eine erstaunlich breite und teilweise überlappende Substratspezifität, wodurch es auch nicht verwunderlich ist, dass sie durch eine ebenso große Anzahl von Substraten induzierbar sind, wobei die Induktoren

häufig strukturelle Ähnlichkeiten aufweisen. So sind z. B. CYP1A1, 1A2 und 1B1 durch planare, lipophile Verbindungen (TCDD, PAK, β -Naphthoflavon) über AhR-abhängige Mechanismen induzierbar, CYP3A4 über den Pregnan-X-Rezeptor (PXR) durch steroidale Verbindungen wie Dexamethason. Da z. B. CYP1A2 viele in Pflanzen vorkommende toxische Substanzen (z. B. Purine wie Coffein) metabolisieren kann, Fische diese Isoform jedoch nicht exprimieren, nimmt man an, dass CYP1A2 von Landlebewesen als zusätzlichen Schutz gegen Pflanzentoxine entwickelt wurde.

Die Expression von humanen CYPs erstreckt sich von den bekannten „Eintrittspforten“ für Xenobiotika und Pharmaka, Gastrointestinaltrakt (Ösophagus, Magen, Duodenum bis zum Colon), Respirationstrakt (Nasal Mukosa, Lunge) über das wichtigste Entgiftungsorgan (Leber) bis zu biosynthetisch aktiven Geweben wie den Nebennieren, Ovarien und Plazenta. Die höchsten CYP-Gehalte sind in der Leber zu finden (Lin *et al.*, 1999), was die herausragende Rolle dieses Organs im First-Pass Metabolismus von aufgenommenen Substanzen unterstreicht. Der Beitrag anderer Organe (z. B. Dünndarm) an der Reduzierung der Bioverfügbarkeit potentiell toxischer Nahrungsbestandteile wurde jedoch auch in den letzten Jahren erkannt und daher zum Gegenstand intensiver Forschungen (Lin *et al.* 1999). Paradoxe Weise hat die katalytische Aktivität der CYPs nicht nur die Detoxifikation von Substanzen zur Folge, sondern viele an sich inerte chemische Verbindungen, wie PAK, werden erst durch die CYPs zum eigentlichen Karzinogen metabolisch aktiviert. Für die Aktivierung von PAK sind in erster Linie CYP1A1 und 1B1 verantwortlich, während andere Pro-Karzinogene wie z. B. das Aflatoxin B1 durch CYP3A4 und CYP1B1 zum reaktiven Epoxy-Derivat umgesetzt werden (Kelly *et al.*, 1997). Die Isoform CYP1B1 spielt bei der Kanzerogenese durch PAK eine besondere Rolle, da dieses Enzym mit hoher Regiospezifität das Bay-Region-Epoxid produziert (Shimada *et al.*, 1999). Eine Überexpression von CYP 1B1 wurde in vielen maligne veränderten Geweben des Menschen beobachtet (z. B. Colon, Lunge, Brust [Murray *et al.* 1997, Gibson *et al.*, 2003]) und das reduzierte Auftreten von PAK-induzierten Tumoren in *Cyp1b1*-defizienten Mäusen unterstreicht die Bedeutung von CYP1B1 bei der Entstehung von Krebs (Buters *et al.*, 2002). Interessanterweise wird CYP1A2 in einer Vielzahl von Organen exprimiert, darunter Leber, Lunge, Ösophagus, Magen und Colon, im Dünndarm ist es jedoch nicht detektierbar (Ding und Kaminsky, 2003).

1.4.2. Mikrosomale Epoxidhydrolase

Die Mikrosomale Epoxidhydrolase befindet sich wie die CYPs in den Membranen des Endoplasmatischen Retikulums, wo sie die hydrolytische Spaltung von Epoxy-Derivaten der PAK katalysiert. Dabei setzt die Epoxidhydrolase ein racemisches Gemisch von 7,8-Epoxy-BP stereoselektiv zum (-)-trans-7,8-Diol um, indem sie bevorzugt die Ringöffnungsreaktion

an der Bindung zwischen C₈ und dem Sauerstoffatom katalysiert. Eine Hydroxylgruppe wird dabei vorwiegend an Position C₈ eingefügt, was durch die Verwendung von ¹⁸O-markiertem Wasser als Co-Substrat bestätigt werden konnte (Yang *et al.*, 1978). Die mikrosomale Epoxidhydrolase ist also als ein wichtiges Enzym an der Bildung des Vorläufers des Bay-Region BP-Diol-epoxids (BPDE) beteiligt.

1.4.3. Sulfotransferasen (SULTs)

Die cytosolischen SULTs werden in verschiedenen menschlichen Geweben (Leber, Darm, Gehirn, Niere, Lunge) exprimiert und dort katalysieren sie den Transfer einer Sulfonat-Gruppe vom Cofaktor 3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat (PAPS) auf eine Hydroxygruppe des Akzeptormoleküls, welches zu einem organischen Sulfat metabolisiert wird. Zur Regenerierung des Co-Faktors PAPS benötigt das Enzym *PAPS-Synthetase* (PAPSS) ATP und anorganisches Sulfat. Bei hohen Substratkonzentrationen ist vermutlich das Co-Substrat PAPS der limitierende Faktor der Reaktion. Sonoda *et al.* (2002) konnten zeigen, dass die PAPS-Synthetase durch Substrate der DHEA-Sulfotransferase PXR-abhängig induziert werden kann. Obwohl es sich bei Konjugationsreaktion durch Sulfotransferasen um eine O-Sulfonierung handelt (es wird eine –SO₃-Gruppe, keine –SO₄-Gruppe eingefügt), wird in der Literatur häufig die Bezeichnung „Sulfatierung“ verwendet, da aus dieser Reaktion ein Sulfat resultiert.

Die Sulfatierung wird zwar im allgemeinen als Detoxifikationsreaktion eingeordnet, in bestimmten Fällen führt jedoch diese Reaktion auch zu einer Aktivierung von mutagenen Verbindungen (Glatt, 1997, Glatt, 2000). Zu einer Bioaktivierung kommt es immer dann, wenn eine Sulfatierung instabile Sulfatester generiert, die dann zu reaktiven elektrophilen Verbindungen zerfallen.

Bisher wurden wenigstens 44 verschiedene cytosolische Sulfotransferasen in Säugetieren identifiziert, welche aufgrund ihrer Aminosäure-Identitäten in 5 verschiedene (ST) Familien (oder 2 verschiedene SULT-Familien) eingeteilt wurden. Im Menschen konnten 10 verschiedene Gene für SULTs charakterisiert werden, dessen Proteinprodukte sich beträchtlich in Substratspezifität und Expressionsraten in verschiedenen Geweben unterscheiden (Nagata und Yamazoe, 2000). Drei Isoformen der Phenol-Sulfatierungen katalysierenden humanen SULT1A Familie sind bisher bekannt. Nach ihrer unterschiedlichen thermischen Stabilität werden sie in die thermostabile TS/ Phenol-preferring (P) PST (*ST1A2* oder *SULT1A2* und *ST1A3* oder *SULT1A1*) und in die thermolabile (TL)/Monoamine-preferring (M) PST (*ST1A5* oder *SULT1A3*) unterteilt (Nagata und Yamazoe, 2000).

In dieser Arbeit wird nachfolgend die aktuellere Bezeichnung für Sulfotransferasen, SULT, verwendet.

1.4.4. UDP-Glucuronosyltransferasen (UGTs)

Die Konjugation von verschiedensten endogenen und exogenen Substraten an Glucuronsäure (wie z. B. wie Bilirubin, Gallensäuren, Steroiden, beziehungsweise Nahrungsinhaltsstoffen, Pharmaka und Xenobiotika) hat sich als eine hoch spezialisierte Funktion in höheren Wirbeltieren entwickelt. Sie dient überwiegend der Detoxifikation von Substanzen, obwohl die Glucuronidierung für einige Verbindungen auch eine biologische Aktivierung darstellen kann (z. B. Morphin-6-Glucuronid besitzt analgetische Wirkung). Die UDP-Glucuronosyltransferasen (UGTs; [E.C. 2.4.1.17]) verwenden die an das Nucleotid Uridin-diphosphat (UDP) gebundene Glucuronsäure (UDPGlcUA; „aktivierte Glucuronsäure“) als Co-Substrat und übertragen Glucuronsäure auf ein Akzeptormolekül. Die entstehenden β -Glucuronidase-sensitiven β -D-Glucuronide („Glucuronide“) können nicht nur durch die Bindung an Hydroxyl-Gruppen („phenolische“ oder „alkoholische“), sondern auch durch eine glycosidische Bindung an Carboxyl-, Carbonyl-, SH- oder Amino-Gruppen entstehen.

Die große Bedeutung der Detoxifikation von endogenen Verbindungen wie Bilirubin durch die UGTs zeigt das Auftreten eines erblich bedingten Defekts in der regulatorischen Region der Bilirubin UGT (UGT1A), wodurch eine verminderte (oder abwesende) UGT-Aktivität entstehen kann. Diese beim Menschen als *Crigler-Najjar I* und *II*, bzw. *Gilbert-Syndrom* bekannte Erbkrankheit führt im frühen Säuglingsalter zu unkonjugierter Hyperbilirubinämie und kann z. B. im Fall der schwereren Crigler-Najjar I Form zur Akkumulation von Bilirubin in Nervenzellen und unbehandelt zum Tod innerhalb von Tagen führen (Tukey und Strassburg, 2000).

UGTs sind wie die CYPs membrangebundene Enzyme und sie befinden sich im Endoplasmatischen Retikulum von Zellen. Bisher konnten 15 humane UGT cDNAs identifiziert werden, wobei 8 Formen dem Gen *UGT1A* zugeordnet werden und *UGT2* für 7 verschiedene Proteine kodiert. Die Familie UGT1A besteht aus 9 Mitgliedern (UGT1A1, 1A3, 1A4, 1A5, 1A6, 1A7, 1A8, 1A9 und 1A10), welche teilweise überlappende Substratspezifität aufweisen und in verschiedensten Organen (Speiseröhre, Magen, Dünndarm, Colon, Leber, Hirn) des menschlichen Organismus exprimiert werden (Tukey und Strassburg, 2000). Beispielweise besitzt UGT1A10 die geringste Substratspezifität und sie konnte in fast allen Organen, mit Ausnahme der Leber nachgewiesen werden. Im humanen Gastrointestinaltrakt konnten im Ösophagus nur die Formen UGT1A7 bis 10 und im Colon fast alle 1A Isoformen (außer UGT1A5) nachgewiesen werden. Interessanterweise exprimiert der Dünndarm nur sehr wenige Formen (UGT1A1, 1A4 und 1A8). Komplexe Phenole, wie z. B. das 3-Hydroxybenzo[a]pyren, werden bevorzugt von UGT1A6 umgesetzt, wobei Flavonoide und

Anthrachinone vorwiegend von UGT1A9, 1A1, 1A3 und 1A8 glucuronidiert werden, von UGT1A6 jedoch nicht (Tukey und Strassburg, 2000).

1.4.5. ABC-Transporter

Die Superfamilie der ATP-binding cassette (ABC) Proteine umfasst 51 verschiedene Gene und 7 Familien (von A bis G) [www.gene.ucl.ac.uk/nomenclature/genefamily/abc.htm, <http://nutrigene.4t.com/humanabc.htm>], dessen Protein-Produkte den Transport einer Vielzahl von Substraten, wie z. B. Aminosäuren, Peptiden, Lipiden, Zuckern, Salzen und Xenobiotika vermittelt (Higgins, 1992). ABC-Transporter findet man nicht nur in Eukaryonten und höheren Lebewesen wie Säugetieren und dem Menschen, sondern auch in Prokaryonten, wo sie unter ATP-Hydrolyse den aktiven, unidirektionalen Transport ihrer Substrate durch Zellmembranen vermitteln (Klein *et al.*, 1999).

Die größte Zahl der bekannten ABC-Transport Proteine wird in der Plasmamembran von Zellen exprimiert (P-Gp, MRPs und BCRP), und in vielen polarisierten Zellen von Epithelien z. B. der Nieren, Leber, Dünndarm und Colon sind einige Vertreter dieser Familie vornehmlich in der apikalen (P-Gp, MRP2, BCRP) oder nur in der basolateralen (MRP1, MRP3, MRP4-6) Domäne dieser Zellen zu finden (Haimeur *et al.*, 2004). Dies bedeutet, dass der Export ihrer Substrate einerseits zur Aufnahme dieser Substanzen ins Blut oder die Lymphe (basolaterale Transporter) oder zur Ausscheidung aus dem Körper durch die Abgabe an Urin oder Faeces (apikale Formen) führen kann.

Einige ABC-Transporter sind jedoch auch in intrazellulären Membranen, wie z. B. der Kernmembran (LRP; *lung resistance associated protein*) oder den Membranen von Peroxisomen (ABCD1) exprimiert. ABCD1 repräsentiert in diesem Fall einen uptake-Transporter, welcher die Aufnahme von langkettigen Fettsäuren in die Peroxisomen vermittelt (Mosser *et al.*, 1993).

Der Großteil der ABC Proteine verfügt über eine ähnliche Organisationsstruktur, welche aus zwei auf der cytosolischen Seite befindlichen ATP-binding cassettes (ABC-Elementen oder „nucleotid binding domain“, *NBD*) und zwei transmembranen Domänen, welche entweder als eine fortlaufende Einheit oder als zwei separate Polypeptide, wie im Fall der Halb-Transporter, bestehen. Von den meisten Transmembran-Domänen (TMD) wird angenommen, dass sie sich aus je 6 α -Helices zusammensetzen, es sind in der Literatur jedoch auch Beispiele von ABC Transportern mit nur 5 TMD bekannt. Es wird angenommen, dass die TMDs inklusive der dazugehörigen Schleifen („Loops“), welche die einzelnen Helices verbinden, einen großen Einfluss auf die Substratspezifität der Transporter haben (Higgins, 1992). Die Loops vieler ABC-Transporter tragen auf der exoplasmatischen Seite Ketten von Monosaccharid-Bausteinen, welche über N-glycosidische Bindungen mit dem Proteinanteil verküpft sind. Diese Glycosylierung der ABC Proteine wird als wichtige

Voraussetzung für den Transport des Proteins innerhalb der Zelle zur Zellmembran und auch für den richtigen Einbau des Proteins in die Membran angesehen. Bei nicht-Säugetier Expressionssystemen (z. B. ovarielle Zellen von *Sodoptera frugiperda*, „Sf9“-Zellen) bleibt diese Glycosylierung aus, weshalb das ABC-Protein dann eine etwas geringere Größe aufweist. Im folgenden Abschnitt soll auf einige wichtige Vertreter der ABC-Transport Proteine eingegangen werden.

1.4.5.1. P-Glycoprotein (ABCB1)

Die Familie der MDR Gene besteht aus zwei humanen Mitgliedern, *MDR1* und *MDR2* und drei Mitgliedern bei Nagetieren (*mdr1*, *mdr2*, *mdr3*) (Borst und Schinkel, 1997). Das Produkt des humanen *MDR1* Gens, P-Glycoprotein (ABCB1), wurde als erstes *multidrug resistance* (MDR)-vermittelnde ATP-abhängige System von Juliano und Ling (1976) entdeckt.

Die Überexpression von P-Gp nach chemotherapeutischer Behandlung verschiedener Krebsarten, welche bei fast 90% aller metastasierenden Tumoren (z. B. Brustkrebs) auftritt, (Gottesman und Pastan, 1993) unterstreicht dessen Bedeutung für das Phänomen des MDR-Phänotyps.

Als 150-170 kDa Protein wird es jedoch auch in vielen normalen humanen Geweben (Leber, Niere, Darm, Nebennieren) exprimiert und seine physiologische Rolle wurde daher vielfach diskutiert (Gottesman und Pastan, 1993, Ambudkar *et al.*, 1999). Die Expression von P-Gp in Endothelzellen von Blutkapillaren des Hirns, der Placenta und der Nieren impliziert eine Beteiligung dieses Transporters an der Blut-Gewebe-Schranke dieser Gewebe. Durch den Einsatz von *mdr1a* knock-out Mäusen konnten Schinkel *et al.* (1995) die Bedeutung von P-Gp für den Transport von Pharmaka zwischen der Blut-Hirn Schranke belegen.

Die sehr breite Substratspezifität von P-Gp umfasst in erster Linie hydrophobe Verbindungen mit einer molekularen Masse von 300-2000 kDa (Ford und Hait, 1990, Germann, 1996) wie z. B. Vinca Alkaloide (*Vinblastin*, *Vincristin*), Anthracycline (*Daunorubicin*, *Doxorubicin*), Epipodophyllotoxine (*Etoposid*), Antihypertensiva (*Reserpin*, *Yohimbin*), Antibiotica, (*Actinomycin D*), Immunsuppressiva (*Cyclosporin A*, *FK 506*) und Calcium Channel Blocker (*Verapamil*). Als apikal exprimierte Export-Pumpe (Thiebaut *et al.*, 1987) schleust P-Gp diese Substanzen aus der Zelle heraus und hält somit die intrazelluläre Konzentration unter dem Level der Zytotoxizität.

1.4.5.2. Multidrug resistance-associated proteins (MRPs)

Die im folgenden Abschnitt behandelten ABC-Transporter MRP1, MRP2 und MRP3 setzen sich alle abweichend von P-Gp aus 3 Transmembran Domänen zusammen, bestehend aus je 5 oder 6 α -Helices, sie enthalten jedoch ebenfalls zwei ABC-Elemente (NBDs).

1.4.5.2.1. MRP1 (ABCC1)

Das *ABCC1* Gen Produkt MRP1 ist wie P-Gp auch an dem Phänomen der *Multidrug Resistance* beteiligt. Die Isolierung seiner cDNA gelang erstmals aus der multidrogenresistenten Lungenkrebs-Zelllinie, H69 AR, selektiert mit dem Topoisomerase II Hemmer Doxorubicin. Das vollständig glycosylierte Protein besitzt eine Masse von 190 kDa und wird fast ubiquitär in vielen menschlichen Geweben exprimiert, mit relativ hohen Expressionsraten in Niere, Lunge, Hirn und Testes. Die Expression in bestimmten Zelltypen (Bronchiales Epithel, im Choroid Plexus des Hirns und in bestimmten proliferierenden Zellschichten des Darms) deutet wiederum auf die mögliche Schutzfunktion von MRP1 gegen zytotoxische Substanzen hin. Im Gegensatz zu P-Gp ist MRP1 nur in der basolateralen Membran von polarisierten Zellen zu finden.

Zu den Substraten von MRP1 gehören eine Vielzahl von Pharmaka (Irinotecan, Methotrexat, Vincristin, Daunorubicin), amphiphile Anionen, insbesondere Konjugate von lipophilen Verbindungen mit Glutathion, Glucuronsäure und Sulfat. Eines der ersten entdeckten MRP1-Substrate war das Glutathionkonjugat des Cytokins Leukotrien C₄ (Jedlitschky *et al.*, 1994), und der Transport vieler Substrate (z. B. Vincristin) durch MRP1 erfordert die Anwesenheit von physiologischen Konzentrationen an freiem Glutathion (GSH), welches zusammen mit dem Substrat in einem Co-Transport aus der Zelle heraus befördert wird (Haimeur *et al.*, 2004). MRP1 wurde auch als Transporter für konjugierte Karzinogene wie z. B. Aflatoxin B₁ (transportiert als GSH Konjugat) (Loe *et al.*, 1997) und das in Tabakrauch vorkommende Nitrosamin 4-(methylnitrosoamino)-1-(3-pyridyl)-1-Butanon (NNK) (transportiert als O-Glucuronid), identifiziert (Leslie *et al.*, 2001).

1.4.5.2.2. MRP2 (ABCC2)

Ein weiterer bedeutender apikal exprimierter ABC-Transporter, MRP2, zeigt eine Substratspezifität, die stark mit MRP1 überlappt, wobei die Affinitäten beider Transporter zu bestimmten Verbindungen erhebliche Unterschiede aufweisen (König *et al.*, 1999b, Haimeur *et al.*, 2004).

Die cDNA der homologen Form der Ratte *Mrp2*, konnte bereits 1996 kloniert werden (Paulusma *et al.*, 1997) und wurde zunächst unter der Bezeichnung „*canalicular Multispecific*

Organic Anion Transporter“ (cMOAT) charakterisiert. Aus dieser Bezeichnung geht schon hervor, dass MRP2 vornehmlich amphiphile organische Anionen wie z. B. Sulfat-Konjugate transportiert; zu seinen Substraten gehören jedoch auch Konjugate lipophiler Endo- und Xenobiotika mit Glucuronsäure und Glutathion.

Eine wichtige Rolle spielt MRP2 bei der Ausscheidung von Metaboliten des roten Blutfarbstoffs (Bilirubin) durch die Gallenflüssigkeit. Eine autosomal rezessiv vererbte MRP2-Defizienz in den Hepatozyten, bekannt als *Dubin-Johnson Syndrom*, ist gekennzeichnet durch unkonjugierte Hyperbilirubinämie, und diese wird verursacht durch den unzulänglichen Abtransport von Glucuronid-Konjugaten des Bilirubins und anderen anionischen Konjugaten durch MRP2 in die Galle (Renes *et al.*, 1999, Tsujii *et al.*, 1999).

Die Expression von MRP2 in den apikalen Domänen von polarisierten Zellen wie Leber, Niere, Lunge, Hirn, Darm und Placenta impliziert wiederum (wie bei MRP1 und P-Gp) eine Beteiligung von MRP2 an der Barriere-Funktion dieser Gewebe. Interessanterweise ist die Expression von MRP2 in einigen Geweben nicht gleichförmig in diesen Zellen, denn bei der Untersuchung von Ratten-Dünndarm wurde z. B. festgestellt, dass die Gehalte an MRP2 am höchsten in den voll ausdifferenzierten Epithelzellen der Villus-Spitze sind, wohingegen in den Krypten kaum MRP2 detektiert werden konnte (Haimeur *et al.*, 2004). Zahlreiche Studien unterstreichen die Bedeutung von MRP2 für die Reduzierung von Procarcinogenen im Gewebe von Organen, denn es wurden z. B. das heterozyklische aromatische Amin 2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridin (PhIP) (Dietrich *et al.*, 1999), das Schimmelpilzgift Ochratoxin A (Leier *et al.*, 2000) und das GSH-Konjugat des potenten Karzinogens (+)-anti-7,8-dihydroxy-9,10-epoxy-7,8,9,10-tetrahydro-Benzo[a]pyren als MRP2-Substrate identifiziert (Haimeur *et al.*, 2004). Durch welchen ABC-Transporter die Sulfat- und Glucuronid-Konjugate des Benzo[a]pyren transportiert werden, war bisher unbekannt.

1.4.5.2.3. MRP3 (ABCC3)

MRP3 wird vor allem in Dünndarm, Placenta, Colon und Nebenniere exprimiert, in geringerem Umfang wurde dieser basolaterale ABC-Transporter auch in Leber und Niere detektiert. Trotz der relativ hohen Aminosäure-Identität von 58% und 48% mit MRP1, beziehungsweise MRP2, scheint das Spektrum der von MRP3 transportierten Substrate begrenzter zu sein, obwohl es einige Überschneidungen gibt (z. B. Methotrexat). MRP3 transportiert wie MRP1 und MRP2 endogene organische Anionen, jedoch scheinen Glucuronid-Konjugate aber auch Sulfat-Konjugate bevorzugt transportiert zu werden (Haimeur *et al.*, 2004). Eine Überexpression von MRP3 konnte bei MRP2-defizienten Hepatozyten von Dubin-Johnson Patienten beobachtet werden (König *et al.*, 1999b).

1.4.5.3. BCRP (ABCG2)

Eine mit Doxorubicin (*Adriamycin*) und Verapamil co-selektierte Brustkrebs-Zelllinie (*MCF-7/AdrVp*) war der Ausgangspunkt für die erste Klonierung des *BCRP* Gens durch Doyle *et al.* im Jahre 1998, daher entstand die Bezeichnung „Breast cancer resistance Protein“ (Doyle *et al.*, 1998).

Die Expression dieses 655 Aminosäuren umfassende und 70 kDa schweren Proteins beschränkt sich jedoch keinesfalls nur auf Brustkrebsgewebe.

Hohe Expressionsraten von BCRP in humanem gesunden Gewebe finden sich insbesondere in der Plazenta, Niere, Colon, Leber und Hirn, wobei die hohen Gehalte in Hirn und Nieren anscheinend auf die darin vorkommenden Endothelzellen der zahlreichen Blutgefäße in diesen Organen zurückzuführen sind (Doyle *et al.*, 1998, Maliepaard *et al.*, 1999).

Für zahlreiche Zelllinien konnte bisher die Entwicklung eines Multidrug Resistance Phänotyps nach der Behandlung mit verschiedenen anti-Krebs Chemotherapeutika (Doxorubicin [Doyle *et al.*, 1998], Topotecan [Maliepaard *et al.*, 1999]) berichtet werden. Diese Zellen zeigten jedoch keine Überexpression von MRP1 oder P-Gp, welche üblicherweise am MDR-Phänomen beteiligt sind. Wie MRP2, so wurde auch BCRP in den apikalen Domänen der polarisierten Zellen von Darm, Leber und Nieren lokalisiert, wo seine Aufgabe vermutlich ebenfalls im Export von potentiell toxischen endogen geformten oder exogen aufgenommenen Substanzen besteht.

Die Bedeutung von BCRP im Schutz des Körpers gegen mit der Nahrung aufgenommene Toxine konnte erst kürzlich von Van Herwaarden und Mitarbeitern gezeigt werden. Wie auch schon von Dietrich *et al.* (2001) für MRP2 gezeigt, konnte diese Gruppe *in vitro* und *in vivo* eine erhebliche Beteiligung der murinen Form von BCRP (*Bcrp1*) am Transport von PhIP, einem starken, in erhitzten Fleischwaren vorkommenden Karzinogen, beobachten (Van Herwaarden *et al.*, 2003).

BCRP konnte auch in anderen Spezies (z. B. im Schwein) als Bestandteil der Blut-Hirn-Schranke detektiert werden (Eisenblätter *et al.*, 2002).

Die Liste der bis heute bekannten BCRP-Substrate umfasst nicht nur Krebs-Chemotherapeutika (Anthracycline, Camptothecin-Derivate, Indolocarbazole [Nakagawa *et al.*, 2002, Komatani *et al.*, 2001]), sondern auch strukturell sehr unterschiedliche Verbindungen wie Lipide (Cholesterin, Phosphatidylserin [Janvilisri *et al.*, 2003, Woehlecke *et al.*, 2002]), Anti-Östrogene (Tamoxifen, Genistein, Daidzein) und natürliche Flavonoide (Quercetin, Silymarin, Genistein, Daidzein [Zhang *et al.*, 2004, Cooray *et al.*, 2004, Imai *et al.*, 2004]) oder synthetische Flavonoide (Flavopiridol [Robey *et al.*, 2001]). In Tabelle 1 sind einige bekannte BCRP-Substrate beispielhaft aufgeführt, um deren strukturelle Vielfalt (bzw. auch Ähnlichkeiten) darzustellen.

Tabelle 1: Strukturen einiger ausgewählter BCRP-Substrate

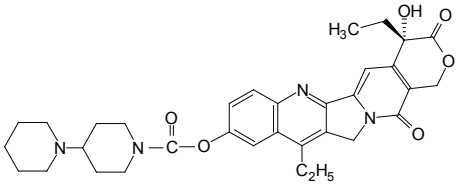
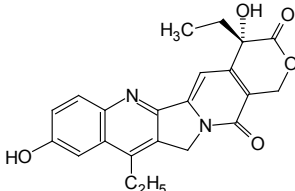
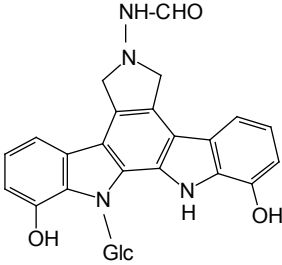
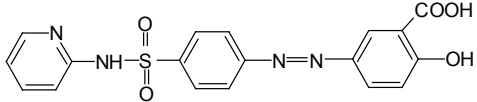
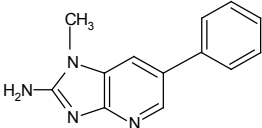
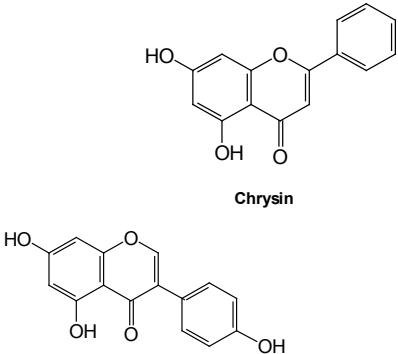
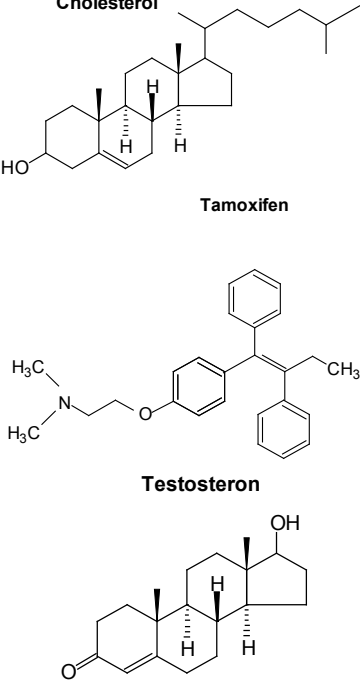
Substrat	Formel	Referenz
<p>Camptothecin-Derivate</p> <p>Irinotecan, SN-38, der aktive Metabolit von Irinotecan (7-Ethyl-10-hydroxycamptothecin) und SN-38-Glucuronid (Topoisomerase I Hemmer)</p>	<p>Irinotecan</p>  <p>SN-38</p> 	<p>Nakatomi <i>et al.</i>, 2001</p>
<p>Indolocarbazole</p> <p>NB-506, (ein Topoisomerase II Hemmer)</p>	<p>NH-CHO</p>  <p>NB-506</p>	<p>Nakagawa <i>et al.</i>, 2002</p>
<p>Sulfasalazin (SSZ)</p> <p>(Antirheumatikum)</p>	<p>Sulfasalazin</p> <p>5-(4-(2-Pyridylsulfamoyl)phenylazo)salicylic acid</p> 	<p>van der Heijden <i>et al.</i>, 2004</p>

Tabelle 1: (Fortsetzung) Strukturen einiger ausgewählter BCRP-Substrate

Substrat	Formel	Referenz
<p style="text-align: center;">PhIP</p> <p>2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridin</p> <p><i>(heterozyklisches aromatisches Amin, starkes Karzinogen vorkommend in erhitzten Fleischwaren)</i></p>	<p style="text-align: center;">PhIP</p>  <p style="text-align: center;">2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo(4,5-b) pyridine</p>	<p>Van Herwaarden et al. 2003</p>
<p style="text-align: center;">Flavonoide</p> <p>z. B. Genistein, Quercetin, Daidzein, Biochanin A, Silymarin, Chrysin</p>	 <p style="text-align: center;">Chrysin</p> <p style="text-align: center;">Genistein</p>	<p>Zhang et al., 2004 Cooray et al., 2004 Imai et al., 2004</p>
<p style="text-align: center;">Sterole/ Steroide</p> <p>(Cholesterol, Estradiol, Progesteron, Testosteron) und Tamoxifen (<i>Antiöstrogen</i>)</p>	<p style="text-align: center;">Cholesterol</p>  <p style="text-align: center;">Tamoxifen</p> <p style="text-align: center;">Testosteron</p>	<p>Janvilisri et al., 2003</p>

Die Bedeutung von BCRP in der chemotherapeutischen Behandlung von bösartigen Tumoren wird aus der Vielzahl der Pharmaka deutlich, die von BCRP aus der Zelle

heraus transportiert werden können. Es wurden daher große Anstrengungen unternommen, Substanzen zu identifizieren, die BCRP effektiv hemmen können, um das Phänomen der Multidrug Resistance zu umgehen.

In dieser Arbeit wurde zur Hemmung von BCRP „Ko 143“ (Allen *et al.*, 2002b und 2002c) verwendet, ein halbsynthetisches Derivat des Toxins *Fumitremorgin C* (FTC) aus dem Pilz *Aspergillus fumigatus*. Dieser Hemmer verbindet hohe Selektivität und hohe Affinität (EC_{90} für Mitoxantron: ~ 25 nM; Allen *et al.*, 2002c) und ist bis zu einer Konzentration von ca. $9 \mu\text{M}$ nicht cytotoxisch.

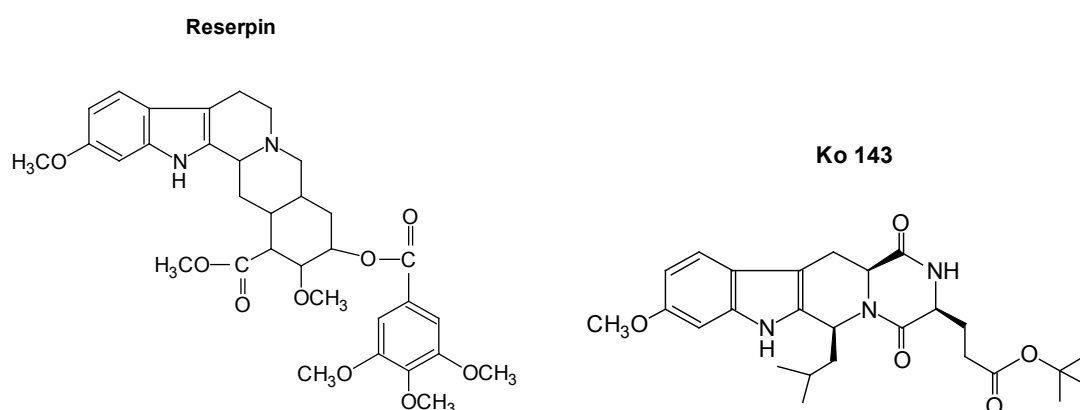


Abbildung 6: BCRP-Hemmer, die in dieser Arbeit verwendet wurden: Reserpin (natürliches Alkaloid aus der Pflanze *Rauwolfia serpentina*) und das synthetische Derivat von *Fumitremorgin C*, Ko143

BCRP wird vielfach auch als Halb-Transporter bezeichnet, da es nur eine Transmembran-Domäne und auch nur eine ATP-binding-cassette besitzt. Anders als bei den Transportern der MRP-Familie, folgt das ABC-Element dem N-terminalen Ende und daran schliessen sich die 6 membrandurchspannenden α -Helices an. Die exoplasmatische Schleife vor der letzten α -Helix wurde als stark N-glycosyliert beschrieben (Allen *et al.*, 2002c). Die funktionelle Einheit von BCRP ist ein Homodimer, wobei beide Monomere vermutlich über eine Disulfid-Bücke miteinander verknüpft sind (Kage *et al.*, 2002).

1.5. Die humane Colon-Adenokarzinom-Zelllinie Caco-2

In dieser Arbeit wurde als Modell für das Epithel des Dünndarms die aus einem humanen Adenokarzinom des Colons stammende Zelllinie Caco-2 verwendet. Diese Zellen wachsen als epithelialer Monolayer und sie exprimieren nach vollständiger Ausdifferenzierung (18-21 Tage) eine Reihe von Phase I- (CYP1A1, 1A2, 1B1 und auch in geringem Umfang CYP3A4) und Phase II- (SULTs, UGT1A6, 1A1, 1A9) Enzymen, sowie ABC-Transportproteine (MRP2, MRP3, MRP1, BCRP) [Referenzen s. Abb. 7]. Werden diese Zellen auf permeablen

Einsätzen (Transwell™-System) kultiviert, so bilden sie wohl definierte apikale und basolaterale Bereiche aus (Artursson und Karlsson, 1991, Pinto *et al.*, 1983), und sie verfügen über alle besonderen morphologischen (tight junctions, Desmosomen, Microvilli) und biochemischen Charakteristika (Brush-border Enzyme, wie die alkalische Phosphatase, Sucrase-Isomaltase) einer Dünndarmzelle.

In Abbildung 7 ist der Aufbau einer Caco-2-Zelle schematisch dargestellt.

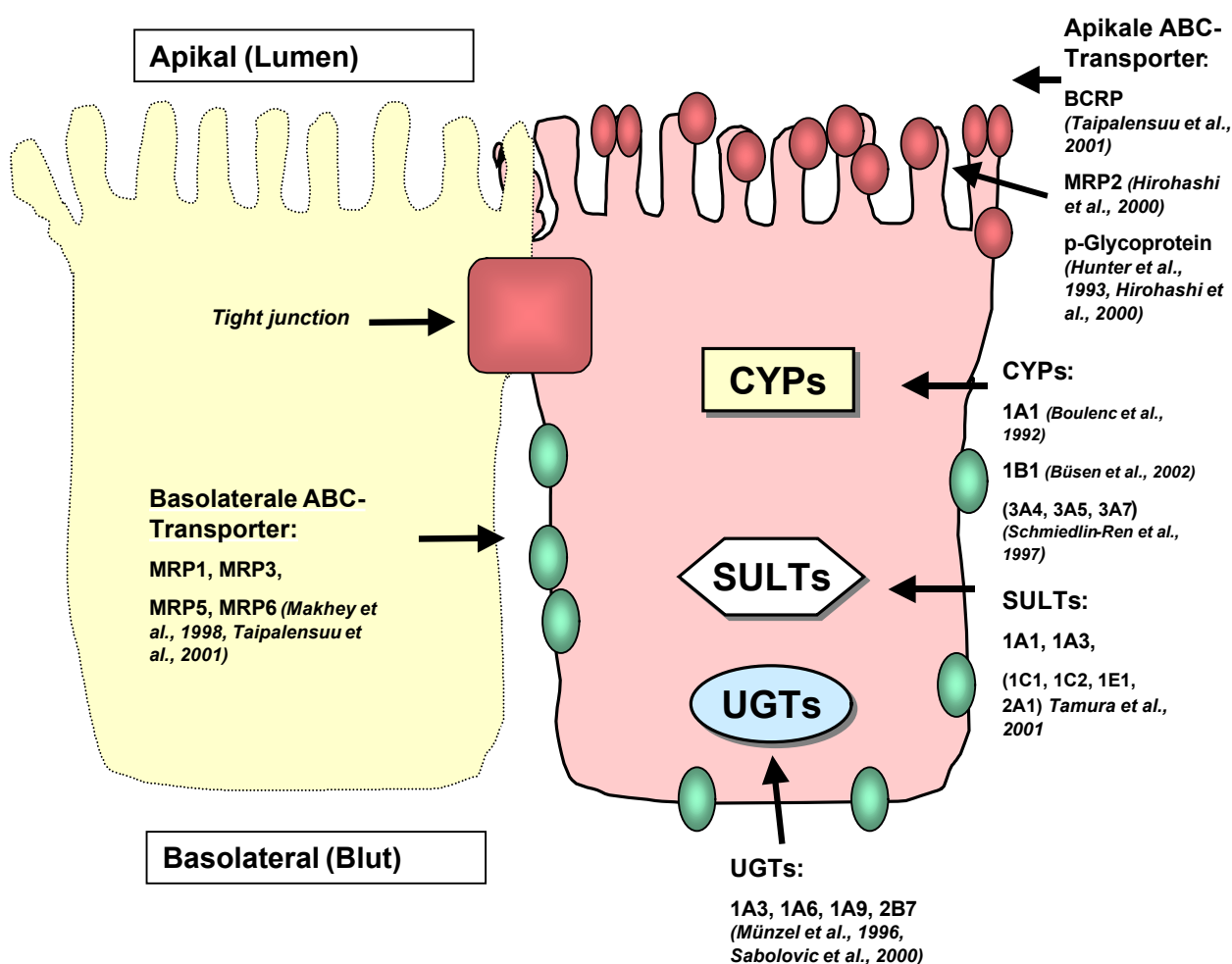


Abbildung 7: Schematische Darstellung einer Caco-2-Zelle und deren exprimierte Phase I und Phase II-Enzyme (Auswahl) sowie apikal und basolateral lokalisierter ABC-Transporter

Der Caco-2 Subklon TC7 wurde durch eine wiederholte Passagierung von Caco-2-Zellen (Passage >198) generiert, wodurch aus der inhomogenen Caco-2 Population die schneller wachsenden Zellen selektiert wurden. Die TC7-Zellen zeichnen sich durch ein schnelleres Wachstum (die Verdopplungszeit beträgt nur ca. 20-14 Stunden; Caco-2-Zellen benötigen zur Verdoppelung 34-36 Stunden) eine schnellere Differenzierung (14 Tage statt 21 Tage) und einen höheren Glucose-Konsum aus (*Chantret et al., 1994*). Im Gegensatz zu Caco-2-

Zellen besitzen TC7-Zellen eine größere UGT-Aktivität (Münzel *et al.*, 1996) und eine stärkere Expression des Brush-border Markerenzym Sucrase-Isomaltase, sowie eine stärkere konstitutive Expression von CYP3A (Carrière *et al.*, 1994).

1.6. Sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe

Der Primärstoffwechsel der Zelle umfasst alle Reaktionen, welche die Versorgung der Zelle mit Energie gewährleisten. Im sekundären Zellstoffwechsel werden Verbindungen, die auch als „Abfallprodukte“ des Primärstoffwechsels angesehen werden können, metabolisiert. Bei diesen Reaktionen werden z. B. wasser- und fettlösliche Pigmente (Carotinoide, Betalaine, Anthocyane und andere Flavonoide) als Schutz vor ultravioletter Strahlung oder zum Anlocken von nützlichen Insekten (Anthocyane, verbreitet als Blütenfarbstoffe) hergestellt. Des Weiteren entstehen auf diesem Wege z. B. die ätherischen Öle der als Gewürzpflanzen bekannten Lamiaceen (Lippenblütler; wie Rosmarin, Oregano, Pfefferminze), welche in speziellen Zellen (Drüschuppen) gelagert werden und die Pflanze vor Fraßfeinden schützen sollen. Viele andere bitter schmeckende Substanzen, wie z. B. Alkaloide, Sesquiterpenlactone und die Glucosinolate erfüllen ebenso diesen Zweck, wobei beispielsweise das *Tomatidin* aus der Tomate ein Alkaloid mit zusätzlicher fungizider Wirkung darstellt.

Die positiven Effekte einer Ernährungsweise, die den Verzehr von viel Obst und Gemüse beinhaltet, sind seit langem bekannt. Seit der Entdeckung der vielfältigen positiven Effekte bezüglich der Entstehung vieler Krankheiten wie Herz-Kreislauferkrankungen, Diabetes und Krebs (Hertog *et al.*, 1993, Knekt *et al.*, 1997), sind die nicht-nutritiven Komponenten der pflanzlichen Lebensmittel in den Mittelpunkt wissenschaftlichen Interesses gerückt. Die Lebensmittelindustrie reagierte darauf prompt mit der Entwicklung zahlreicher neuer Produkte und Nahrungsergänzungsmittel (Produkte mit „Bioflavonoiden“, Isoflavonoiden, Bonbons mit Echinacea- und Aronia-Extrakten).

Im folgenden Abschnitt soll näher auf die von dieser Arbeit berührten Gruppen (Flavonoide, Indole und *Oltipraz* als bekanntes Chemoprotektivum) eingegangen werden.

1.6.1. Flavonoide

Die über 4000 verschiedene Verbindungen umfassende Stoffklasse der Flavonoide lässt sich in die Flavone, Flavanone, Flavanole, Flavonole und die Anthocyane einteilen. Alle Verbindungen besitzen eine gemeinsame Grundstruktur, bestehend aus 3 Ringsystemen. Die Ringe A und B sind in allen Fällen aromatisch und der Ring C stellt ein O-

heterozyklisches System dar. Die Gruppe der Isoflavonoide (Genistein, Daidzein) trägt an C₃ (anstelle von C₂) den B-Ring.

Die Flavonoide werden im sekundären Zellstoffwechsel aus aktivierter Hydroxyzimtsäure aufgebaut und die unterschiedlichen Glycosylierungsmuster (jedoch vorwiegend mit Glucose an den Positionen 3, 5 und 7) erzeugt die große Anzahl verschiedener Derivate (Böhm *et al.*, 1998).

Flavonoide kommen in fast allen Teilen von Pflanzen vor, insbesondere jedoch in pigmentierten Früchten, Blüten sowie Blättern und anderen grünen Teilen der Pflanze, jedoch auch in Samen. Interessanterweise haben die klimatischen Bedingungen, unter denen die Pflanze heranreift, einen besonderen Einfluss auf die Gehalte an Flavonoiden, was z. B. bei dem Vergleich der Gehalte an Quercetin in Gewächshaus-Salat und Salat, welcher im Freilandbau kultiviert wurde, erkannt werden konnte (Böhm *et al.*, 1998, Watzl und Rechkemmer, 2001). Dies lässt sich sicher mit der Funktion der Flavonoide als natürlicher UV-Filter erklären und auch durch die höhere assimilatorische Aktivität der Pflanze bei stärkerer Sonneneinstrahlung.

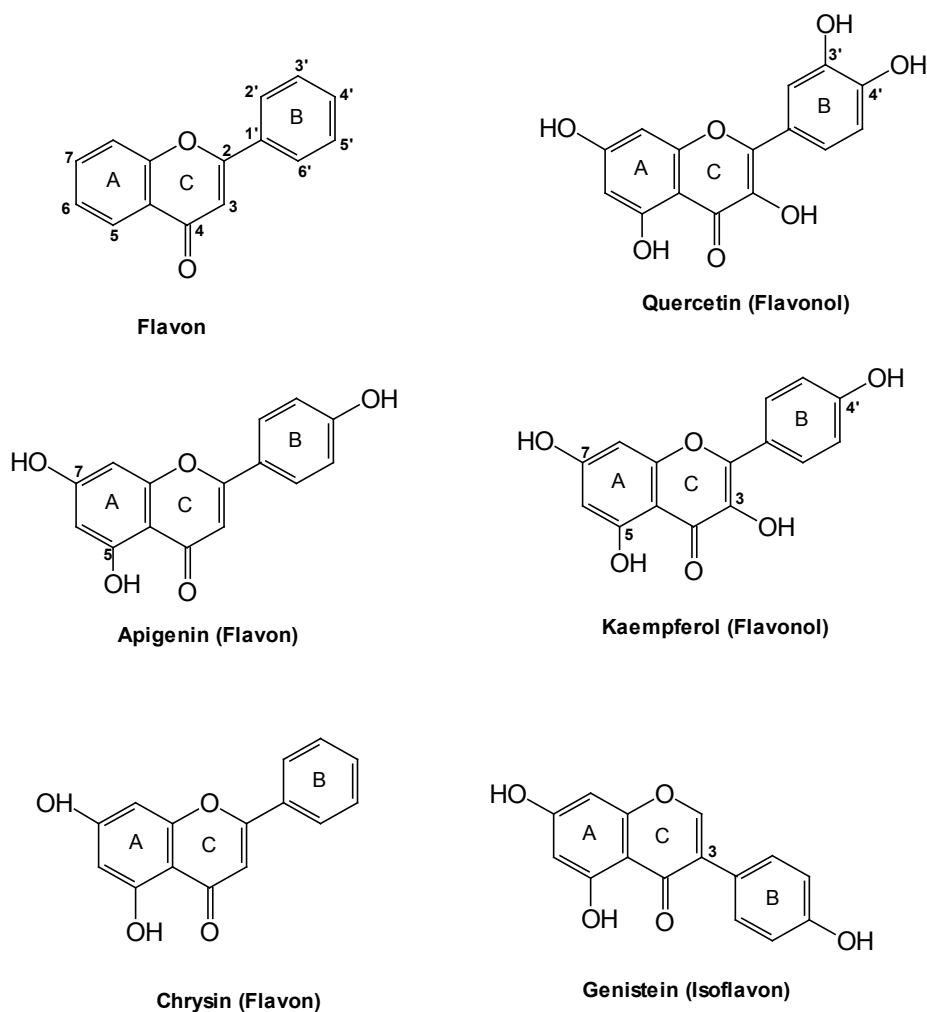


Abbildung 8: Strukturen einiger Flavonoide, die in dieser Arbeit verwendet wurden.

Flavonole (Quercetin, Kaempferol, Myricetin) sind die mengenmäßig am häufigsten in europäischen Nahrungspflanzen vorkommenden Flavonoide, wobei Flavone (Apigenin, Luteolin, Diosmetin) speziell in Apiaceen (Fenchel, Petersilie, Sellerie, Pastinak) zu finden sind (Böhm *et al.*, 1998). Eine reiche Quelle von Isoflavonoiden (Genistein, Daidzein) ist vor allem die Sojabohne und deren Produkte (Tofu, Miso, Natto), aber auch andere Hülsenfrüchte, wie Linsen und Kichererbsen enthalten nennenswerte Mengen an Isoflavonoiden. Genistein und Daidzein sind insbesondere durch ihre Eigenschaften bekannt, mit den Östrogen-Rezeptoren (ER- α / ER- β) in Wechselwirkung treten zu können (Cotoneo *et al.*, 2002) und dadurch, je nach Vorhandensein von natürlichen ER-Liganden (Östradiol), entweder östrogen („Phytoestrogen“) oder anti-östrogen zu wirken, was bei der Entwicklung von Brustkrebs eine Rolle spielt.

Genistein hat darüber hinaus durch seine Eigenschaft als Tyrosin Kinase-Inhibitor (Kim *et al.*, 1998a) Einfluss auf Signalleitungsketten, welche z. B. bei der Regulierung der Zellproliferation und Apoptose eine große Rolle spielen.

Chrysin ist eines der seltensten Flavone; sein Vorkommen beschränkt sich praktisch auf Honig.

Viele Flavonoide sind bekannt für ihre modulatorischen Eigenschaften bezüglich Phase I- und Phase II-Enzymen und darüber hinaus können diese Verbindungen durch die Interaktion mit den Nucleotid-bindenden Domänen von z. B. P-Glycoprotein auch die aktiven Transportvorgänge in der Zelle beeinflussen (Di Pietro *et al.*, 2002).

Unter den vielen heute bekannten positiven Auswirkungen von Flavonoiden auf die Gesundheit, die sich auf eine Vielzahl von biochemischen Effekten (z. B. antioxidative Eigenschaften) begründen, soll die vorliegende Arbeit insbesondere die modulatorischen Eigenschaften dieser Substanzen hinsichtlich der Komponenten der biochemischen Barriere (Phase I, Phase II-Enzyme und ABC-Transporter) beleuchten.

1.6.2. Indole

Die überwiegend in Brassicaceen (Kohlgemüse wie Broccoli, Blumenkohl und auch Radieschen und Rettich) vorkommenden Glucosinolate werden bei der Verletzung der Pflanze (Kauen, Verarbeitung) durch Thioglucosidasen (Myrosinase) zu labilen Intermediaten umgesetzt, die dann wiederum zu Isothiocyanaten reagieren. Indole entstehen in diesem Prozess aus Indolyl-Glucosinolaten. Das Indol-3-carbinol ist ein solches Abbauprodukt und dessen Vorstufe, Glucobrassicin, kommt in Rosenkohl, Broccoli und anderen Kohlsorten vor.

Indol-3-carbinol ist selbst ein schwacher Ah-Rezeptor Agonist (Miller 3rd, 1997) und es reagiert im sauren Milieu des Magens zu diversen dimeren (3,3'-Diindolylmethan, DIM; Indolo[3,2-*b*]carbazol, ICZ) und trimeren Kondensationsprodukten, welche z. T. eine enorme

Affinität zum AhR aufweisen (Bjeldanes *et al.*, 1991, Chen *et al.*, 1996). Hierbei ist insbesondere das Indolo[3,2-*b*]carbazol hervorzuheben, welches neben dem Tryptophan-Abbauprodukt 6-Formylindolo[3,2-*b*]carbazol (FICZ) zur Zeit als der stärkste natürliche Ah Rezeptor Ligand angesehen wird (Bergander *et al.*, 2003).

Nachfolgend in Abbildung 9 sind die in dieser Studie verwendeten natürlichen Indol-Derivate dargestellt.

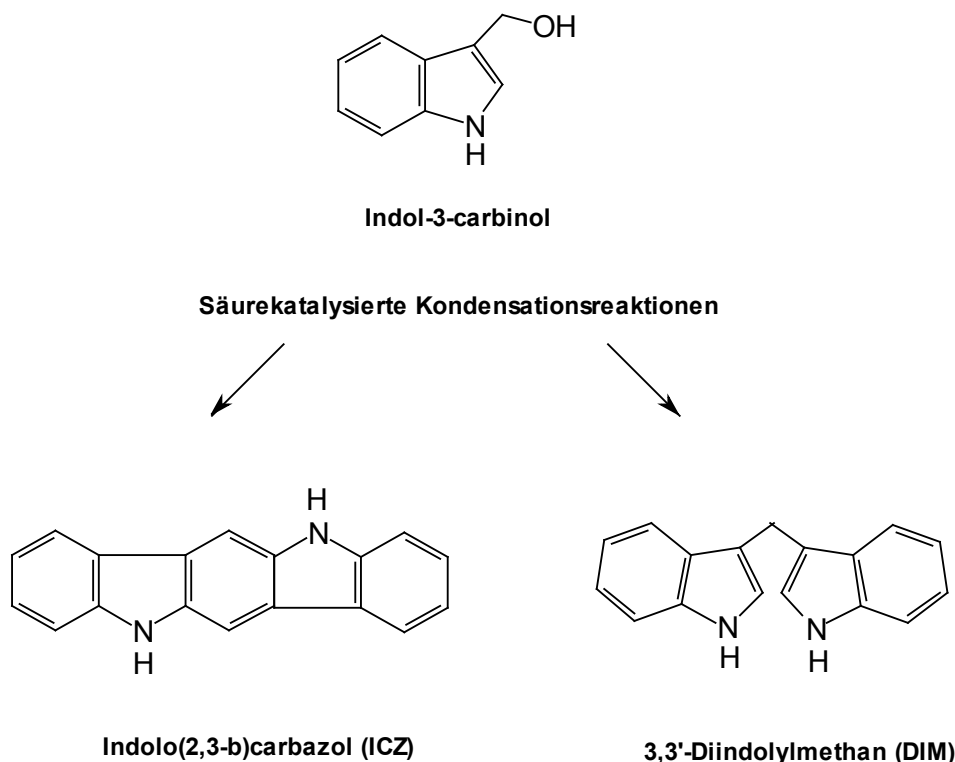
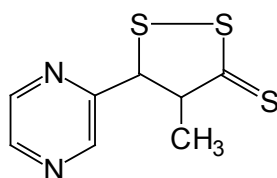


Abbildung 9: Strukturen von I3C und der Kondensationsprodukte von I3C: ICZ und DIM.

1.6.3. Oltipraz (4-Methyl-5-[2-pyrazinyl]-1,2-dithiol-3-thion)

Oltipraz wurde ursprünglich gegen den Bilharziose-Erreger *Schistosoma haematobium* entwickelt (Gentilini *et al.*, 1980). Strukturell ähnelt (4-Methyl-5-[2-pyrazinyl]-1,2-dithiol-3-thion) den natürlich in Brassicaceen vorkommenden 1,2-Dithiol-3-thionen.

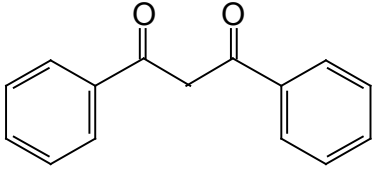
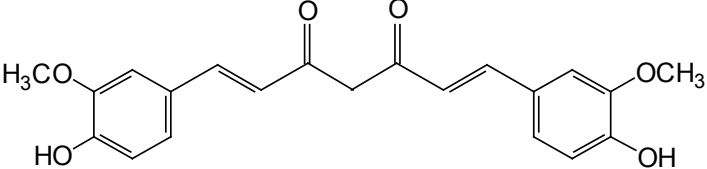
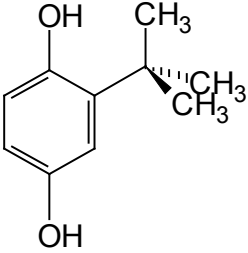


Oltipraz

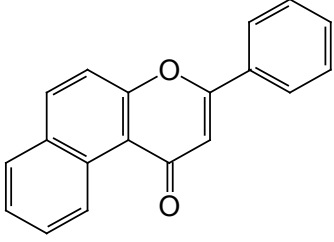
Oltipraz wird als eines der vielversprechendsten chemoprotektiven Verbindungen betrachtet, denn es existieren zahlreiche tierexperimentelle Studien, welche die hemmende Wirkung von

Oltipraz gegenüber chemisch induzierten (Azoxymethan, Nitrosamine, PAK) Tumoren in diversen Organen der Tiere belegen (Wattenberg *et al.*, 1986, Rao *et al.*, 1991, Benson *et al.*, 1993). Oltipraz erwies sich bei Ratten als effektiver Inhibitor von Aflatoxin B1-vermittelter Karzinogenese der Leber. Die Hauptursache für diese protektive Wirkung ist offensichtlich die Induktion von Phase II-Enzymen, wie z. B. die Glutathion-S-Transferase (Kensler *et al.*, 1987, Davidson *et al.*, 1990, Benson *et al.*, 1993) und die UDP-Glucuronosyltransferase (Auyeung *et al.*, 2003). Während die Induktion der Phase II-Enzyme UGT und GST hauptsächlich sowohl über den AhR, als auch über der Transkriptionsfaktor Nrf2 verläuft (Nguyen *et al.*, 2003), welcher an ein ARE (Antioxidative Response Element) in der regulatorischen Region des jeweiligen Target Gens bindet, so kann Oltipraz auch über die Interaktion mit dem AhR die Transkription von Phase I-Enzymen (CYP1A1) induzieren (Le Ferrec *et al.*, 2002).

Nachfolgend sind die Strukturen einiger (z. T. aus Lebensmitteln stammenden) Verbindungen dargestellt, welche in dieser Arbeit als Modulatoren verwendet wurden.

Verbindung	Stoffklasse, Vorkommen
 <p style="text-align: center;">Dibenzoylmethan</p>	Benzophenon; natürlicher Inhaltsstoff der Süßholzpflanze (<i>Glycyrrhiza glabra</i>); in der Kosmetikindustrie auch als UV-Schutz für z. B. Parfüms verwendet; AhR-Agonist (MacDonald <i>et al.</i> , 2001)
 <p style="text-align: center;">Curcumin</p>	Polyphenolische Verbindung aus Gelbwurz (<i>Curcuma longa</i>), einem Bestandteil des Curry-Gewürzes; besitzt antioxidative Eigenschaften und ist ein AhR-Agonist (Rinaldi <i>et al.</i> , 2002)
 <p style="text-align: center;">tert-Butylhydrochinon (TBHQ)</p>	Metabolit des synthetischen, phenolischen Antioxidants BHA; Modell-Induktor für ARE-abhängige Genregulation (Nguyen <i>et al.</i> , 2003)

(Fortsetzung)

Verbindung	Stoffklasse, Vorkommen
 <p data-bbox="363 591 753 618">β-Naphthoflavon (5,6-Benzoflavon)</p>	<p data-bbox="943 311 1378 432">Synthetisches Flavonoid; Modell-Induktor für AhR-vermittelte Genregulation (<i>Boulenc et al., 1992</i>)</p>

1.7. Ziele der vorliegenden Arbeit:

1. Untersuchung zu ABC-Transportern: Identifizierung des am Transport von BP-Konjugaten (Sulfat- und Glucuronid-Konjugate) beteiligten Transportproteins

Chemische Hemmung von ABC-Transportern: P-Gp und MRPs und BCRP und die Auswirkung auf den Transport von BP-sulfatkonjugaten (und BP-3-glucuronid)

1. 1. Weitere Untersuchungen zu BCRP

Auswirkung von sek. Pflanzeninhaltsstoffen und bekannten AhR-Agonisten auf die Expression von BCRP

Untersuchung der AhR-Abhängigkeit der BCRP-Expression.

2. Auswirkung auf den Metabolismus und Transport von BP-Sulfatkonjugaten, BP-1- und BP-3-sulfat durch die **Modulation von Phase I-Enzymen** durch sek. Pflanzeninhaltsstoffe (Flavon, Indol-3-carbinol und weitere Flavonoide); Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit der Effekte für einige ausgewählte Verbindungen

3. Auswirkung auf den Metabolismus von BP-3-sulfat durch **Modulation von Phase II-Enzymen** durch sek. Pflanzeninhaltsstoffe und AhR-Agonisten (Oltipraz, I3C, Flavon)

3.1. Untersuchungen zu Sulfotransferasen (SULTs):

Untersuchungen zur Substratspezifität von verschiedenen SULT-Isoformen an der Umsetzung von 1-Hydroxy- und 3-Hydroxy-BP zu BP-1- und BP-3-sulfat

Einfluss der Differenzierung von Caco-2 und TC7-Zellen auf die Expression der verschiedenen Sulfotransferasen

3.2. Untersuchungen zu UGTs:

Einfluss von sek. Pflanzeninhaltsstoffen (z. B. 5,7-Dihydroxyflavonen) auf die Bildung von BP-3-glucuronid in TC7-Zellen

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Material

2.1.1. Chemikalien

Die PAK Indeno[1,2,3-c,d]fluoranthren (INF), Benzo[k]fluoranthren, Dibenzo[a,l]pyren, das Gemisch verschiedener PAK (entsprechend der Zusammensetzung in Tabakrauch), sowie die Phase I-Metaboliten von BP, 1-Hydroxy- und 3-Hydroxy-BP wurden freundlicherweise vom *Biochemischen Institut für Umweltcarcinogene, Prof. Dr. Gernot Grimmer Stiftung, Grosshansdorf* zur Verfügung gestellt.

Produkt	Bezugsquelle
Acacetin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Aceton	Sigma-Aldrich, Steinheim
Acrylamid 30 ("Rotiphorese Gel 30")	Roth, Karlsruhe
α -Naphthoflavon	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Merck, Darmstadt
Apigenin	Sigma-Aldrich, Steinheim
BP (Benzo[a]pyren)	Sigma-Aldrich, Steinheim
β -Naphthoflavon	Sigma-Aldrich, Steinheim
Bicinchoninsäure-Lösung (BCA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Bromphenolblau	Applichem, über Omnilab
Chloroform	Sigma-Aldrich, Steinheim
Chrysin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Coomassie Brilliant Blue R-250	Sigma-Aldrich, Steinheim
Curcumin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Cyclosporin A	Sigma-Aldrich, Steinheim
Daidzein	Sigma-Aldrich, Steinheim
DBM (Dibenzoylmethan)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Roth, Karlsruhe
DIM (3,3'-Diindolylmethan)	Calbiochem, Darmstadt
di-Natriumhydrogenphosphat-dihydrat (Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O)	Merck, Darmstadt
Diosmetin	Sigma-Aldrich, Steinheim
DMSO	Sigma-Aldrich, Steinheim
DTT (Dithiothreitol)	Applichem, über Omnilab
EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure)	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Flavon	Sigma-Aldrich, Steinheim
Galangin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Genistein	Sigma-Aldrich, Steinheim
Glycin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Guanidinthiocyanat (GTC)	Roth, Karlsruhe
ICZ (Indolo[3,2-b]carbazol)	<i>Prof. Jan Bergmann, Karolinska Institut, Schweden</i>
Indol-3-carbinol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Isopimpinellin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Isopropanol	Fluka, Steinheim
Juglon (5-Hydroxy-1,4-naphthochinon)	Sigma-Aldrich, Steinheim

Produkt	Bezugsquelle
Kaempferol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck, Darmstadt
Ko 143 (BCRP-Hemmer)	Prof. A. H. Schinkel, <i>Krebsforschungsinstitut der Niederlande, Amsterdam</i>
Kupfer-(II)-sulfat	Merck, Darmstadt
Luteolin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Magermilchpulver (<i>Skim milk powder</i>)	Fluka, Steinheim
Mannitol	Sigma-Aldrich, Steinheim
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Methanol	J.T. Baker, über Omnilab
MG-132 (Carbobenzoxy-L-Leucyl-L-Leucyl-L-Leucinal)	Calbiochem, Darmstadt
Myricetin	Sigma-Aldrich, Steinheim
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumacetat	Riedel-de-Haën, Seelze
Natriumchlorid (NaCl)	Applichem, über Omnilab
Natriumlaurylsarcosin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Oltipraz	McKesson Bioservices, San Francisco, CA, USA
PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)	Sigma-Aldrich, Steinheim
PD 98059 (2'-Amino-3'-methoxyflavon)	Calbiochem, Darmstadt
Quercetin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Reserpin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Resveratrol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Silibinin (=“Silymarin-Komplex“)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Silymarin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Sodiumdodecylsulfate (SDS)	Roth, Karlsruhe
TBHQ (<i>tert</i> -Butylhydrochinon)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Toluol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Triethylamin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tri-Natriumcitrat-2-hydrat	Merck, Darmstadt
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Roth, Karlsruhe
Tween 20	Sigma-Aldrich, Steinheim

2.1.2. Zellkultur

2.1.2.1. Zellkultur-Medien und -Zusätze

Produkt	Bezugsquelle
Dulbecco's Modified Eagles Medium	Gibco™/ Invitrogen, Eggenstein
Fötales Rinderserum (FCS)	PAA, Cölbe
HEPES-Pufferlösung, 1M	Gibco™/ Invitrogen, Eggenstein
MEM Non essential amino acids (100 x)	Gibco™/ Invitrogen, Eggenstein
L-Glutamin (200 mM)	Gibco™/ Invitrogen, Eggenstein
Penicillin-Streptomycin-Lösung	Gibco™/ Invitrogen, Eggenstein
Trypsin-EDTA Lösung (10 x)	Gibco™/ Invitrogen, Eggenstein

2.1.2.2. Permanente Zelllinien

Zelllinie	Bezugsquelle
Caco-2 ; humane Colon Adenokarzinomzelllinie	European Collection of Cell Cultures (E.A.C.C., Porton, Down, UK)
TC7 , Subklon von Caco-2	European Collection of Cell Cultures (E.A.C.C., Porton, Down, UK)
V79 (WT und SULT-transfizierte Formen); Lungenfibroblasten des Chinesischen Hamsters	Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. H. Glatt, <i>Deutsches Institut für Ernährungsforschung, Postdam (DIfE)</i>
HCT 116 (WT) humane Colon Karzinom Zelllinie	European Collection of Cell Cultures (E.A.C.C., Porton, Down, UK)
HTC116-NRI (NB-506-resistenter Klon; BCRP-überexprimierend)	Freudlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. H. Komatani, <i>Merck Research Laboratories, Ibaraki, Japan</i>

2.1.3. Materialien, Reagenzien und Antikörper für Western Blot Analysen

Produkt	Bezugsquelle
BXP-21, monoklonaler Antikörper, Maus IgG _{2a} ; 250µg/ml	Calbiochem, Darmstadt
ECL <i>advance</i> ™ Western Blotting detection kit	Amersham Biosciences, Freiburg
ECL™ detection kit	Amersham Biosciences, Freiburg
Horseradish-peroxidase (HRP) konjugierter anti-Maus Antikörper	Amersham Biosciences, Freiburg
Hyperfilm™ ECL™ (18 x 24 cm)	Amersham Biosciences, Freiburg
Kodak x-ray Entwickler LX 24	Kodak, über BW Plus Röntgen GmbH, Kamp-Lintfort
Kodak x-ray Fixierer AL 4	Kodak, über BW Plus Röntgen GmbH, Kamp-Lintfort
Nitrocellulose Membran Hybond™ - ECL™ (70 mm x 80 mm)	Amersham Biosciences, Freiburg
Ponceau S (Konzentrat)	Sigma-Aldrich, Steinheim

2.1.4. Materialien für Festphasenextraktion und HPLC-Analysen

Produkt	Bezugsquelle
Bakerbond [®] Octadecyl C18 (40 µm)	J.T. Baker, über Omnilab
HPLC-vials	Agilent Technologies, über Omnilab
LiChrolut [®] Glassäulen, 8 ml	Merck, Darmstadt
Mikroeinatz (250 µl) für HPLC-vials	CS-Chromatographieservice, Langerwehe
PTFE-Fritten (für 8 ml Säulen)	J.T. Baker, über Omnilab

2.1.5. Reagenzien und Enzyme für die Molekularbiologie

Produkt	Bezugsquelle
Agarose Ultra-Pure [™]	Gibco [™] / Invitrogen, Eggenstein
Desoxy-(Nukleotid)-Triphosphat-lösungen (A, C, G, T) 100 mM (dNTP)	Gibco [™] / Invitrogen, Eggenstein
Dithiothreitol (DTT) 0,1 M	Gibco [™] / Invitrogen, Eggenstein
DNA-Längenstandard 100 BP	Gibco [™] / Invitrogen, Eggenstein
Ethidiumbromid-Lösung (10 mg/ml)	Sigma-Aldrich, Steinheim
PCR-Puffer, 10 x	Qiagen GmbH, Hilden
Reverse-Transcriptase Puffer (5x)	Gibco [™] / Invitrogen, Eggenstein
SuperScript [™] II RNase H Reverse Transcriptase	Gibco [™] / Invitrogen, Eggenstein
Taq DNA Polymerase	Qiagen GmbH, Hilden

2.1.6 Verwendete Puffer**2.1.6.1. Probenvorbereitung:****Zellernte*****PBS (Phosphate buffered saline), pH 6,8***

Stoff	Menge/Liter
NaCl	8,0 g
KCl	0,2 g
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	1,43 g
KH ₂ PO ₄	0,2 g

Cytosolpräparation (Western Blot Analyse der Sulfotransferasen)***Cytosolpuffer, pH 7,4***

Stoff	Molarität
KH ₂ PO ₄	0,1 M
K ₂ HPO ₄ x 3H ₂ O	0,1 M
KCl	0,1 M
EGTA	1 µM

DTT (0,1 µM) und PMSF (10 µM) frisch zufügen

Präparation von Zelllysat und Membranpräparation (BCRP-Western Blot)***Tris-Mannitol-Puffer, pH 7,0***

Stoff	Molarität
Tris	2 mM
Mannitol	50 mM

10 µM PMSF frisch zufügen

Probenpuffer (2-fach), pH 6,8

Stoff	Konzentration
Tris-HCl	100 mM
SDS	4 % (w/v)
Glycerin	20 % (v/v)
Bromphenolblau	0,2 % (w/v)

DTT (1 mM) frisch zufügen

2.1.6.2. Western Blot**Gel-Herstellung*****Trenngel: 10 % Acrylamid***

4,0 ml Acrylamid 30
 3,0 ml Trenngelpuffer (1,5 M Tris-HCl, pH 8,8)
 4,8 ml H₂O
 120 µl SDS (10% (w/v))
 15 µl TEMED
 50 µl APS (10% (w/v))

Sammelgel: 5% Acrylamid

0,5 ml Acrylamid 30
 1,5 ml Sammelgelpuffer (0,5 M Tris-HCl, pH 6,8)
 3,38 ml H₂O
 60 µl SDS (10 % (w/v))
 12 µl TEMED
 48 µl APS (10 % (w/v))

Elektrophorese***Elektrophorese-Puffer, pH 8,3***

Stoff	Konzentration
Tris	25 mM
SDS	0,1 % (w/v)
EDTA	1 mM
Glycin	192 mM

Puffer für Membranbehandlungen***Blotpuffer (Transferpuffer), pH 8,3***

Stoff	Konzentration
Tris	25 mM
Glycin	192 mM
Methanol	20 % (v/v)

Tris und Glycin in 800 ml Wasser lösen und 200 ml MeOH zufügen

Waschpuffer („PBS-T“)

Stoff	Konzentration
Tween 20	0,07% (v/v) in PBS

Blockpuffer

Stoff	Konzentration
Milchpulver	3 % (w/v) in PBS-T

Puffer für Gelbehandlung***Gel-Färbung (Coomassie)***

Substanz	Konzentration
Coomassie-Blue	0,05 % (w/v)
Eisessig	10 % (v/v)
Isopropanol	25 % (v/v)

Entfärber I

Substanz	Konzentration
Methanol	50 % (v/v)
Essigsäure	10 % (v/v)
Wasser	40% (v/v)

Entfärber II

Substanz	Konzentration
Methanol	10 % (v/v)
Essigsäure	5 % (v/v)
Wasser	85% (v/v)

Membranfärbung***Ponceau S Stocklösung (10-fach)***

Stoff	Konzentration
Ponceau S	2 % (w/v)
Trichloressigsäure	30 % (w/v)
Sulfosalicylsäure	30 % (w/v)

Vor Gebrauch 1:10 mit dest. Wasser verdünnen

2.1.6.3. Puffer für molekularbiologische Methoden**MOPS-Puffer, pH 7,0**

Stoff	Konzentration
3-(N-morpholino-)Propansulfonsäure	20 mM
Natriumacetat	5 mM
EDTA	1 mM

RNA-Probenpuffer

Stoff	Konzentration
Formamid (deionisiert)	52 % (v/v)
Formaldehyd (37%)	17 % (v/v)
MOPS-Puffer 10 x	10 % (v/v)
Bidest. Wasser	7 % (v/v)
Glycerol	7 % (v/v)
Bromphenolblau-Lösung (10% w/v)	6 % (v/v)
Ethidiumbromid-Lösung (25 mg/ml)	1 % (v/v)

Der Puffer wurde vor Gebrauch durch einen Membranfilter (0,2 µm) sterilfiltriert

GTC-Puffer (4M) nach CHOMCZYNSKI u. SACCHI (1987)

Stoff	Konzentration
Guanidithiocyanat (GTC)	4 M
Natriumcitrat	25 mM
2-Mercaptoethanol	0,1 M
Natrium-Laurylsarcosin	5% (v/v)

Der Puffer wurde vor Gebrauch durch einen Membranfilter (0,2 µm) sterilfiltriert

2.2. Methoden

2.2.1. HPLC-Analytik von Benzo[a]pyren und Benzo[a]pyren-Metaboliten

Die Bestimmung von BP und seinen Metaboliten in den Medium-Proben erfolgte nach einem Aufreinigungsschritt (Festphasen-Extraktion) mittels reversed-phase HPLC/DAD. Die HPLC-Methode wurde in Zusammenarbeit mit dem Biochemischen Institut für Umweltcarcinogene, Prof. Dr. Gernot Grimmer Stiftung (Grosshansdorf) entwickelt (Büsen *et al.*, 2002). Die quantitative Bestimmung von BP und BP-Metaboliten erfolgte über den internen Standard Indeno[1,2,3-*cd*]fluoranthen (INF), welcher vor der Probenaufarbeitung in der absoluten Menge von 0,6 µg zu jeder Probe zugegeben wurde.

2.2.1.1. Probenaufarbeitung

Die Festphasen-Extraktion der Mediumproben wurde unter der Verwendung von Glassäulen durchgeführt, die mit je 0,5 g stationärer Phase (Bakerbond ODS C18, J.T. Baker) gefüllt wurden. Zur Aktivierung der stationären Phase wurden mit Hilfe einer Spritze 2 x 5 ml Extraktionsmethanol (Methanol, 0,05% (v/v) Triethylamin) durch die Säule gepresst, danach erfolgte die Konditionierung mit 2 x 5 ml Wasser/ Methanol (80 : 20 (v/v)).

Nach der Konditionierung wurden die Proben aufgegeben und die wasserlöslichen Matrix-Bestandteile durch Waschen mit 5 ml des Wasser-Methanol-Gemisches (80:20 (v/v)) entfernt. Die lipophileren Analyten wurden daraufhin mit 30 ml Extraktionsmethanol eluiert, das Eluat in einem 100 ml Spitzkolben aufgefangen und mit 0,6 µg internem Standard (INF, 6 µg/ml in Toluol gelöst) versetzt. Der Methanolextrakt wurde dann am Rotationsverdampfer (40°C Wasserbadtemperatur) bis zur Trockene eingengt, der Rückstand mit 3 x 2 ml Methanol im Ultraschallbad von der Kolbenwandung gelöst und in einem 10 ml-Spitzkolben aufgenommen. Der Extrakt wurde wiederum am Rotationsverdampfer bis zur Trockene eingengt und mit 200 µl Methanol in ein HPLC-insert (250 µl) überführt. Die Proben wurden zur Entfernung des Lösungsmittels über Nacht lichtgeschützt bei Raumtemperatur gelagert und in einem Endvolumen von 60 µl Methanol aufgenommen. Nach einer kurzen Behandlung mit Ultraschall (ca. 45 sec) wurden die aufgereinigten Proben zur Sedimentierung von ungelösten Partikeln 5 min in eine Eppendorf-Tischzentrifuge zentrifugiert (5724 x g/ 4°C) und dann der HPLC-Analyse zugeführt.

2.2.1.2. HPLC-Analyse**Chromatographische Bedingungen:**

Fließmittel A	Methanol
Fließmittel B	Wasser
Flussrate	0,4 ml/ min
Injektionsvolumen	30 µl
Säulentemperatur	25 °C
Analysendauer	110 min
Equilibrierung	20 min
Trennsäule	RP 18-Phase

Gradient:

Zeit [min]	Fließmittel A ; Methanol [%]	Fließmittel B; Wasser [%]
0	20	80
1	20	20
10	40	60
40	60	40
70	100	0
100	100	0
110	20	80
130	20	80

Detektion

Messwellenlänge A: 275 nm (Bandbreite 50 nm)

Messwellenlänge B: 290 nm (Bandbreite 15 nm)

Referenzwellenlänge: 550 nm (Bandbreite 100 nm)

Komponenten des HPLC-Systems:

Modul	Hersteller
Binäre Pumpe G 1312 A	Agilent Technologies, Waldbronn
Entgaser G 1322 A	Agilent Technologies, Waldbronn
Dioden Array Detektor G 1315A	Agilent Technologies, Waldbronn
Säulenofen G 1316 A	Agilent Technologies, Waldbronn
Autosampler G 1313 A	Agilent Technologies, Waldbronn
Trennsäule: Bakerbond PAH 16 plus; Partikelgröße 5 µm, 250 mm Länge, 3 mm i.D.)	J. T. Baker, Griessheim

2.2.1.3. Auswertung

Die Identifizierung der verschiedenen BP-Metaboliten erfolgte über den Vergleich von Retentionszeiten und UV-Spektren mit den in der Spektrenbibliothek dokumentierten Standardsubstanzen.

Zur quantitativen Bestimmung der einzelnen BP-Metaboliten wurde die Peakfläche des internen Standards INF zugrunde gelegt. Dabei wurde mit einem substanzspezifischen Umrechnungsfaktor der unterschiedlichen Signalintensitäten zwischen INF und dem jeweiligen Metaboliten Rechnung getragen.

Die Berechnung wurde mit Hilfe der folgenden Formel durchgeführt:

$$\text{Substanzmenge } [\mu\text{g}] = \frac{\text{Peakfläche x substanzspez. Umrechnungsfaktor}}{\text{Peakfläche INF/ zugegebene Menge INF } [\mu\text{g}]}$$

Umrechnungsfaktoren einiger BP-Metaboliten

Metabolit	Umrechnungsfaktor
BP-3-glucuronid	1,47
BP-1-sulfate	1,13
BP-3-sulfat	1,20
BP-9,10-diol	0,80
3-hydroxy-BP	0,94
BP-3,6-chinon	3,15

2.2.2. Zellkultur

Allgemeine Vorbemerkung: zur Kultivierung aller Zelllinien wurde inaktiviertes (20 min Erhitzung bei 56°C) FCS verwendet.

Die folgende Tabelle fasst die Aussaatdichte für verschiedene Formate (jeweils für Caco-2 und TC7-Zellen) zusammen:

Ausgangsformat	Zur Aussaat von:	Wachstumsfläche pro Einheit (Well oder Flasche)
1 gr. (75 cm ²) Kulturflasche (95% konfluent)	12 wells (Transwell™-System)	4,71 cm ²
	12 wells (6-well-Platte)	9 cm ²
	12 wells (12-well-Platte)	3.9 cm ²
	10 kleinen Kulturflaschen	25 cm ²

Caco-2

Die humane Colon Adenokarzinomzelle Caco-2 wurde in Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM; high glucose), supplementiert mit 10% (v/v) FCS und Penicillin/Streptomycin (100 IU/ml bzw. 100 µg/ml) in einer Atmosphäre von 5% CO₂ in Luft und einer Temperatur von 37°C kultiviert. Die Zellen wurden alle 3-4 Tage in subkonfluentem Stadium (90-95%) gesplittet. Die Zellen wurden hierzu mit 10 ml PBS gewaschen und dann mit 2 ml einer Trypsin-EDTA-Lösung (0,2 % Trypsin) für 3-4 min bei 37°C inkubiert. Daraufhin wurden die Zellen mit 10 ml Kulturmedium vom Flaschenboden gespült, resuspendiert und bei 150 x g für 5 min zentrifugiert. Das erhaltene Zellpellet wurde resuspendiert und im Verhältnis 1 : 5 neu ausgesät. Das Kulturmedium wurde alle 2-3 Tage erneuert (bei Kultivierung im Transwell™-System: alle 2 Tage).

TC7

Der Caco-2 Subklon TC7 wurde in DMEM, supplementiert mit 20 % (v/v) FCS, 1 % (v/v) MEM Nonessential amino acids (100 x), 3 % (v/v) HEPES-Pufferlösung (1 M) und Penicillin/Streptomycin (100 IU/ml bzw. 100 µg/ml) in einer Atmosphäre von 5% CO₂ in Luft und einer Temperatur von 37°C kultiviert. Die Zellen wurden alle 2-3 Tage in subkonfluentem Stadium (90-95 %) gesplittet (1 : 5) und während der Kultivierung alle 2 Tage mit frischem Medium versorgt. Bei der Kultivierung der Zellen in Transwell™-Platten wurde das Medium täglich gewechselt.

V79 und HCT116

Diese Zelllinien wurden im gleichen Medium kultiviert, wie die Caco-2-Zellen. Gesplittet wurden diese Zelllinien im Verhältnis 1:5 und das Medium wurde bei HCT116 Zellen im subkonfluenten Zustand alle 2-3 Tage, im konfluenten Zustand jeden Tag erneuert. Das Medium der V79-Zellen wurde alle 2 Tage durch frisches Medium ersetzt.

Cryokonservierung

Zur Cryokonservierung wurden die Zellen im subkonfluenten Stadium gesplittet und das Zellpellet in gekühltem (4°C) Cryomedium (70% DMEM, 20 % FCS, 10 % DMSO)* resuspendiert. Die Zellen einer subkonfluenten Flasche Caco-2 wurden beispielsweise in 5 ml Cryomedium aufgenommen und je 1 ml der Zellsuspension in ein Cryo-vial gefüllt. Die Zellen wurden dann schonend in einem Einfriercontainer (Nalgene) auf -80°C gekühlt und zur längerfristigen Lagerung bei -196°C unter flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

* z. B. 14 ml DMEM, 4 ml FCS, 2 ml DMSO

2.2.3. Einfluss von verschiedenen sekundären Pflanzeninhaltsstoffen und Oltipraz auf den Metabolismus von Benzo[a]pyren

Allgemeine Vorbemerkung: die „Entnahme der Mediumproben“ während der Inkubationsversuche bezeichnete jeweils die Entnahme des gesamten Mediums der jeweiligen Inkubationseinheit. Die Proben wurden in Gefäßen aus Glas (Reagenzgläser entsprechender Größe) aufgenommen und umgehend bei -20 °C eingefroren und nicht länger als 2 Monate gelagert.

2.2.3.1. Modulation von Phase I-Enzymen

Caco-2-Zellen wurden in gelatinebeschichteten (1 % (w/v) in dest. Wasser) Glaspetrischalen (28 cm²) oder 6-well Platten nach Erreichen der Konfluenz 17-19 Tage lang kultiviert und anschließend für 48h mit verschiedenen Substanzen behandelt, welche aus der Literatur teilweise als AhR-Agonisten und/ oder CYP1A1-Induktoren bekannt sind. Darunter befanden sich z. B. Oltipraz, ein Derivat natürlich vorkommender 1,2-Dithiol-3-thione, des weiteren sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe aus der Gruppe der Flavonoide, Indole, Furocumarine und einige Polyphenol-Derivate. Als Positivkontrolle wurden prototypische CYP1A1-Induktoren, wie β -Naphthoflavon und 3-Methylcholanthren eingesetzt. Als Kontrolle dienten Zellen, die nur mit dem Lösungsmittel (0,1 % DMSO (v/v)) behandelt wurden. Der Inkubationsversuch wurde gestartet, indem jeweils 4 ml (6-well Format) oder 5 ml (Petrischalen) Medium mit dem Substrat BP (10 μM) aufgegeben wurden. Nach 12h Inkubationsdauer wurde das Medium entnommen und bis zur weiteren Aufreinigung und HPLC-Analyse bei -20 °C gelagert.

In einem ersten Versuchsansatz wurden folgende Substanzen zur Behandlung eingesetzt:

Substanz	Konzentration	Stoffklasse/ Bemerkung
Oltipraz	50 μM	Substituiertes 1,2-Dithiol-3-thion, AhR-Agonist, (<i>Le Ferrec et al., 2002</i>); entwickelt gegen Bilharziose (<i>Gentilini et al., 1980</i>)
Flavon	50 μM	Unsubstituiertes Flavon ("parent compound" der Flavone); AhR-Agonist (<i>Ashida et al., 2000</i>)
Indol-3-carbinol	50 μM	Indol-Derivat; Abbauprodukt von Glucobrassicin; schwacher AhR-Agonist (<i>Denison und Nagy, 2003</i>)
β -Naphthoflavon	50 μM	Synthetisches Flavon; etablierter AhR-Agonist (<i>Boulenc et al., 1992</i>)

In einem zweiten Versuchsansatz wurden folgende Substanzen getestet:

Substanz	Konzentration	Stoffklasse/ Bemerkung [Vorkommen]
3-MC	10 μ M	PAK, prototypischer CYP1A1-Induktor
β -NF	50 μ M	s. o.
Silymarin	25 μ g/ml	Isomergemisch aus verschiedenen Flavonoiden (Silibinin, Silidianin und Silichristin), [aus den Früchten von <i>Silybum marianum</i> , Mariendistel]; wirkt hepatoprotektiv
Silibinin	20 μ M	Bestandteil von Silymarin (s. o.)
Diosmetin	50 μ M	Flavon (3',5,7-trihydroxy-5'-methoxy-)
Apigenin	50 μ M	Flavon (4',5,7-trihydroxy-) [Apiaceen]
Acacetin	50 μ M	Flavon (5,7-dihydroxy-4'-methoxy-) [Apiaceen]
Naringenin	50 μ M	Flavanon (4',5,7-trihydroxy-) [Zitrusfrüchte]
Daidzein	50 μ M	Isoflavonoid (7,4'-dihydroxy-) [Hülsenfrüchte]
Genistein	50 μ M	Isoflavonoid (5,7,4'-trihydroxy-) [Hülsenfrüchte]
Galangin	50 μ M	Flavon (3,5,7-trihydroxy-)
Isopimpinellin	50 μ M	Furocumarin [Apiaceen, Zitrusfrüchte]
Dibenzoylmethan	50 μ M	Benzophenon; AhR-Agonist (MacDonald <i>et al.</i> , 2001) [Lakritz]

Modulation von Phase I-Enzymen

a. Untersuchung zur Zeit- und/ oder Konzentrationsabhängigkeit

Für drei ausgewählte Modellsubstanzen (Flavon, I3C) als Vertreter der Gruppe der Flavonoide, beziehungsweise der Indol-Derivate und Oltipraz als bekanntes anti-Krebs Chemoprotektivum, wurde die Konzentrations- und/ oder Zeitabhängigkeit hinsichtlich der beobachteten Effekte untersucht. Die Vorbehandlung der Zellen erfolgte mit Flavon (25 μ M, 50 μ M und 100 μ M) und Oltipraz (25 μ M, 50 μ M und 80 μ M) für 48h, daraufhin schloss sich die Inkubation mit BP (10 μ M) für 8, 12 und 24 Stunden an.

In einem weiteren Versuchsansatz wurde getestet, inwiefern sich die Effekte der Vorbehandlung der Zellen mit I3C (80 μ M; 48h) auf eine längere Inkubationszeit mit BP auswirkt. Dazu wurden die Caco-2-Zellen für 8, 12, 24 und 48 Stunden mit dem Substrat BP (10 μ M) inkubiert.

Modulation von Phase I-Enzymen

b. Effekte auf die Bildung von Glucuronid-Konjugaten des BP

Da die Bildung von Glucuronid-Konjugaten im menschlichen Darm ebenfalls ein wichtiger Weg der Detoxifikation ist, wurde der Einfluss von verschiedenen sek. Pflanzeninhaltsstoffen auf die Bildung von Glucuronsäure-konjugierten BP-Metaboliten untersucht. Hierfür wurden TC7-Zellen verwendet, da dieser Subclon der Zelllinie Caco-2 eine größere Aktivität der UGTs aufweist (Münzel *et al.*, 1996). Die TC7-Zellen wurden in gelatinebeschichteten

Glaspetrischalen (28 cm²) für 14 Tage nach Erreichen der Konfluenz kultiviert und nachfolgend mit verschiedenen Substanzen (siehe folgende Tabelle) für 48h behandelt. Der Versuch wurde gestartet mit der Aufgabe von je 5 ml Medium mit 10 µM BP.

Es wurden in diesem Versuch folgende Substanzen getestet:

Substanz	Konzentration	Stoffklasse/ Bemerkung [Vorkommen]
Luteolin	25 µM	Flavon (3',5,7-trihydroxy-), [Apiaceen]
Apigenin	25 µM	Flavon (5,7-dihydroxy-4'-methoxy-)
Acacetin	25 µM	Flavon (5,7-dihydroxy-4'-methoxy-)
Kaempferol	25 µM	Flavonol (4',5,7-trihydroxy-); [Kohlgemüse]
Naringenin	25 µM	Flavanon (4',5,7 -trihydroxy-) [Zitrusfrüchte]
Flavon	50 µM	Unsubstituiertes Flavon ("parent compound" der Flavone); AhR-Agonist (<i>Ashida et al., 2000</i>)
Resveratrol	20 µM	Stilben [Wein, Maulbeeren], AhR-Antagonist (<i>Ciolino et al., 1998a und 1999</i>)
Indol-3-carbinol	50 µM	Indol-Derivat; Abbauprodukt von Glucobrassicin; schwacher AhR Agonist (<i>Denison und Nagy, 2003</i>)
Oltipraz	50 µM	Substituiertes 1,2-Dithiol-3-thion, AhR-Agonist (<i>Le Ferrec et al., 2002</i>)
Quercetin	20 µM	Flavonol (3',4',5,7-tetrahydroxy-) [Zwiebeln, Gemüse, Salat, Wein]
Chrysin	50 µM	Flavon (5,7-dihydroxy-)
TBHQ	80 µM	Abbauprodukt von BHA (<i>tert</i> -Butylhydroxyanisol) einem phenolischen Konservierungsstoff
β-NF	50 µM	Synthetisches Flavon; etablierter AhR-Agonist (<i>Boulenc et al., 1992</i>)

2.2.3.2. Effekte auf Phase II-Enzyme/ ABC-Transport-Proteine

Um zu untersuchen, zu welchen Anteilen die beobachteten Effekte einer Modulation der Phase II des Biotransformationsprozesses beziehungsweise der Phase III (der beteiligten ABC-Transportproteine) zuzuschreiben sind, wurden Caco-2-Zellen zunächst 60h mit verschiedenen Substanzen vorbehandelt (β-NF (25 µM), 3-MC (10 µM), Oltipraz (50 µM), TBHQ (50 µM), Quercetin (25 µM), B[k]F (10 µM) und Dibenzoylmethan (50 µM)). Daraufhin erfolgte eine Inkubation mit dem Phase I-Metaboliten des BP, 3-hydroxy-BP (5 µM) für 4h.

Die relativ lange Behandlungszeit von 60 h wurde gewählt, um bei einer eventuellen Induktion von Transportproteinen diesen genug Zeit zu geben, um in die Plasma-Membran eingebaut werden zu können.

2.2.3.2. Effekte auf Phase II-Enzyme/ ABC-Transport-Proteine

Zeitabhängigkeit/ Konzentrationsabhängigkeit

Zwei ausgewählte Substanzen (Flavon: 25 µM, 50 µM, 100 µM und Oltipraz: 25 µM, 50 µM und 80 µM) wurden zur Vorbehandlung der Caco-2-Zellen verwendet. Nach dieser

Vorbehandlung für 48h wurden die Zellen zunächst für eine Stunde mit frischem Kulturmedium inkubiert, um eventuelle Reste der Behandlungssubstanzen zu entfernen, da diese ebenfalls von Phase II-Enzymen umgesetzt werden können. Anschließend erfolgte die Inkubation mit 3-hydroxy-BP (5 µM) für 4h und 8h.

2.2.3.3. Transportexperimente

Zur Untersuchung, ob der durch die Behandlungen induzierte Metabolismus von BP zu einem gerichteten Transport führt, wurden Caco-2-Zellen auf Transwell™-Platten kultiviert (Polycarbonatmembran, 0,4 µm Porengröße, 4,71 cm² Wachstumsfläche; *Corning Costar, Cambridge, MA, USA*). Nach Ausdifferenzierung bilden die Caco-2-Zellen auf dieser permeablen Membran wohl definierte apikale (luminale) und basolaterale (serosale) Domänen aus, wobei das Zweikammer-System dieser Kultivierungsart die Probeentnahme aus jeder Kammer zulässt und daher die Untersuchung eines Stofftransports ermöglicht.

a. Modulation von Phase I-Enzymen: Effekte auf den Transport von BP-1- und BP-3-sulfat

Nach der Einsaat wurden die Caco-2-Zellen für 20 Tage kultiviert und nachfolgend für 48h mit folgenden Substanzen behandelt: Flavon (50 µM), Oltipraz (50 µM) und I3C (50 µM). Als Kontrolle dienten Zellen, die mit dem Lösungsmittel in der gleichen Konzentration (0,1% DMSO (v/v)) behandelt wurden. Nach dieser Vorbehandlung erfolgte die Inkubation mit dem Substrat BP (10 µM), welches beidseitig (je 2 ml) aufgegeben wurde. Nach 4, 8, 18 und 24 Stunden Inkubationsdauer wurden die Mediumproben aus beiden Kammern entnommen und bis zur weiteren Analyse bei -20°C gelagert.

Um zu testen, welche Effekte eine Vorbehandlung mit Oltipraz (50 µM) auf die Bildung von Glucuronid-Konjugaten des BP hat und ob eine verkürzte Vorbehandlung von nur 24h ähnliche Effekte hervorbringen kann, wurden TC7-Zellen für 15 Tage nach Aussaat auf Transwell™-Platten kultiviert. Nach der Vorbehandlung schloss sich die Inkubation mit BP (10 µM) für 12, 16, 24 und 36 Stunden an.

b. Chemische Hemmung von Transportproteinen: MRP2 und P-Gp

Zur Untersuchung, ob der ABC-Transporter MRP2 am Transport der Hauptmetaboliten des BP, BP-1- und BP-3-sulfat, beteiligt ist, wurden Caco-2-Zellen auf Transwell™-Platten kultiviert und zur Induktion des BP-Metabolismus mit dem CYP1A1/ CYP1B1 Induktor β-Naphthoflavon (50 µM; 48h) behandelt. Der Versuch wurde gestartet, indem die Zellen für eine Stunde mit dem MRP2-Hemmer Genistein (25 µM) vorinkubiert wurden. Zellen, welche nur mit DMSO (0,1% (v/v)) behandelt wurden, dienten als Kontrolle. Nach der Vorinkubation

wurde das Substrat BP (10 μM) und der Hemmer zusammen beidseitig appliziert. Die Entnahme der Mediumproben erfolgte nach einer Inkubationsdauer von 4, 6, 8 und 24 Stunden.

In einem weiteren Versuchsansatz wurde mit der Anwendung des P-Gp-Hemmers Cyclosporin A (CsA; 10 μM) die mögliche Beteiligung von P-Gp am Transport der BP-Metabolite untersucht. Die Durchführung erfolgte analog zur oben beschriebenen Vorgehensweise. Für diesen Versuch wurden TC7-Zellen eingesetzt und die Probenentnahme erfolgte nach 18, 24, 36 und 48h.

c. Chemische Hemmung von BCRP und MRP2 unter Ausschluss möglicher Effekte der Hemmung auf Phase I-Enzyme

Um einen möglichen Einfluß des verwendeten chemischen Hemmers auf die endogene Bildung des transportierten BP-Metaboliten auszuschließen, wurde für diesen Versuchsansatz als Substrat der Phase I-Metabolit des BP, 3-Hydroxy-BP, eingesetzt. Da BP-3-sulfat der von den Caco-2-Zellen gebildete Hauptmetabolit des BP ist, wurde der chemische Vorläufer 3-Hydroxy-BP als Substrat gewählt.

Für diesen Versuchsansatz wurden Caco-2-Zellen für 18 Tage auf Transwell™-Platten kultiviert und zu Beginn des Versuchs die Zellen mit dem MRP2-Hemmer S 3025 (50 μM) und den BCRP-Hemmern Reserpin (25 μM) und Ko 143 (5 μM) für eine Stunde vorbehandelt. Als Kontrolle dienten Zellen, die mit DMSO (0,1% (v/v)) behandelt wurden. An die Vorbehandlung schloss sich die Inkubation mit dem Substrat 3-Hydroxy-BP (5 μM) und dem entsprechenden Hemmer in der gleichen Konzentration wie bei der Vorbehandlung an. Die Mediumproben wurden nach 3, 6 und 9 Stunden entnommen.

d. Chemische Hemmung von BCRP: Einfluss auf den Transport von BP-3-glucuronid

Um zu untersuchen, inwieweit BCRP auch den Transport von Glucuronid-Konjugaten des BP vermittelt, wurden TC7-Zellen für 12 Tage auf Transwell™-Platten kultiviert und die Hemmung des BCRP mit dem selektiven BCRP-Hemmer Ko 143 (5 μM) entsprechend der oben beschriebenen Weise durchgeführt.

e. Modulation von BCRP

Effekte auf den Transport von BP-3-sulfat

Zur Induktion von BCRP wurden auf Transwell™-Platten kultivierte TC7-Zellen (7 Tage alt) für 3 Tage mit verschiedenen AhR-Agonisten (ICZ [2,5 μM], B[k]F [5 μM] und Oltipraz [50 μM]) behandelt. Das Medium mit den Induktoren wurde in dieser Zeit täglich erneuert. Da die

Behandlung auch eine Induktion von CYP1A1/ 1B1 nach sich zieht und die Aktivität dieser Enzyme eine Umsetzung des Substrats zu einem Diol (oder Chinon) bewirkt, war die Hemmung von CYP1A1/1B1 notwendig. Die Zellen wurden daher zunächst mit α -Naphthoflavon (150 μ M) für eine Stunde vorbehandelt. Der Inkubationsversuch wurde gestartet mit der beidseitigen Aufgabe des Substrats 3-Hydroxy-BP (5 μ M) zusammen mit α -Naphthoflavon (50 μ M). Die Mediumproben wurden nach einer Inkubationsdauer von 3, 6 und 9h entnommen.

2.2.4. Untersuchungen zu Sulfotransferasen

2.2.4.1. Substratspezifität verschiedener SULT-Isoformen

Um zu ermitteln, welche der verschiedenen SULT-Isoformen am stärksten an der Umsetzung von BP zu den Sulfat-Konjugaten BP-1- und BP-3-sulfat beteiligt ist, wurden genetisch veränderte V79-Zellen eingesetzt. Diese Zellen waren stabil transfiziert mit den Genen für *hSULT 1A1*Arg*, *hSULT 1A3*, *hSULT 1A2*1* und *hSULT 1B1*. Als Kontrolle diente die nicht transfizierte Zelllinie V79-MZ. Die V79-Zellen exprimieren keine endogenen SULTs und auch keine UGTs, eine Konkurrenz zwischen den beiden Phase II-Enzymen um das Substrat ist damit ausgeschlossen. Das Fehlen von Cytochrom P₄₅₀-abhängigen Monooxygenasen erforderte den Einsatz der beiden Phase I-Metabolite von BP (1-OH-BP und 3-OH-BP) als Substrat. Die verschiedenen V79-Klone wurden nach Erreichen des konfluenten Zustandes einen weiteren Tag lang in 6-well Platten kultiviert und nachfolgend mit verschiedenen Konzentrationen der beiden Substrate 1-OH-BP und 3-OH-BP (jeweils 1 μ M, 10 μ M und 50 μ M) inkubiert. Nach einer Inkubationsdauer von 8 Stunden wurden die Mediumproben entnommen.

2.2.4.2. Einfluss der Differenzierung auf die Proteinexpression der Sulfotransferasen

Um zu untersuchen, wie die Expression der Sulfotransferasen vom Differenzierungsgrad der Caco-2 und TC7-Zellen abhängt, wurden beide Zelllinien in großen Kulturflaschen gezüchtet und in verschiedenen Stadien der Differenzierung geerntet. Je 4 große Kulturflaschen wurden pro Gruppe verwendet. Caco-2-Zellen wurden nach 0, 8, 19 und 25 Tagen und TC7-Zellen nach 0, 4, 14 und 21 Tagen geerntet. Tag 0 war hierbei der Tag an dem der konfluente Zustand erreicht wurde.

2.2.5. Probenvorbereitung: Western Blot-Analysen

2.2.5.1. Cytosolpräparation (Sulfotransferasen)

Zur Zellernte wurde der Monolayer 2-3 x mit eiskaltem PBS gewaschen und die Zellen dann mit 400 µl eisgekühltem Cytosolpuffer (0,1 M KH₂PO₄, 0,1 M K₂HPO₄ x 3 H₂O, 0,1 M KCl, 1 µM EGTA, 0,1 µM DTT, 10 µM PMSF, pH 7,4) pro großer Kulturflasche mit Hilfe eines Zell-Gummischabers vom Flaschenboden gelöst. Das Zell-Puffer-Gemisch wurde in einen Glas-Teflon-Homogenisator gegeben und manuell homogenisiert (ca. 20-30 x). Der Homogenisator wurde dabei in einem Eisbad gekühlt. Zum vollständigen Aufbrechen der Zellen wurde ein weiterer Homogenisierungsschritt durch einen Ultraschallfinger (*Bandelin Sonoplus mit Sonotrode UW 2070*) angeschlossen (2 min/ 50% power, Eiskühlung). Verbliebene Zelltrümmer wurden daraufhin durch Zentrifugation für 15 min bei 3000 x g und 4°C (*Avanti[®]J-25 I, Beckmann*) entfernt. Der milchige Überstand wurde dann in Ultrazentrifugenröhrchen (10,4 ml Volumen, *Beckmann*) überführt und zur weiteren Entfernung noch verbliebener Membranfragmente für 60 min bei 105 000 x g und 4°C zentrifugiert. Der resultierende klare Überstand (Cytosol) wurde entnommen und nach der Bestimmung des Proteingehaltes nach SMITH (Smith *et al.*, 1985) zur Western Blot Analyse eingesetzt.

2.2.5.2. Isolierung von Zellmembranen (BCRP)

Um eine Anreicherung der Proben mit dem ABC-Transportprotein BCRP zu erzielen, wurden die Membranen der Zellen isoliert. Dazu wurden je 5 große Kulturflaschen pro Behandlungsgruppe eingesetzt, um eine ausreichende Ausbeute zu erzielen.

Zur Ernte wurde der Zellmonolayer 3-5 x mit kaltem (4°C) PBS gewaschen, die Zellen mit einem Zell-Gummischaber vom Flaschenboden gelöst und mit ca. 1 ml kaltem PBS in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Die Zellen wurden pelletiert (5 min/ 10 000 x g/ 4°C; *Avanti[®]J-25 I, Beckmann*) und anschließend mit 4 ml kaltem Tris-Mannitol Puffer (2 mM Tris, 50 mM Mannitol, pH 7,0; 10 µM PMSF frisch zugefügt) in einem Teflon-Glas-Homogenisator (20-30 strokes/ 1000 rpm) homogenisiert. Nach der Entfernung von Zelltrümmern durch Zentrifugation für 10 min (500 x g /4°C) wurde der Überstand abgenommen und dieser zur Pelletierung der enthaltenen Membranen erneut zentrifugiert (45 min/ 33500 x g/ 4°C). Das resultierende Pellet wurde daraufhin in 1000 µl PBS resuspendiert und 100 µl dieser Membransuspension wurden zur Proteinbestimmung 1: 100 und 1:200 verdünnt.

Der Proteingehalt dieser Membranproben wurde anschließend mit 2 x SDS-Probenpuffer auf eine Konzentration von 8 µg/ µl eingestellt.

2.2.5.3. Gesamt-Zelllysate (BCRP)

Pro Behandlungsgruppe wurde 1 große Kulturflasche eingesetzt. Die Zellernte erfolgte wie unter „2.2.5.2. Isolierung von Zellmembranen“ beschrieben. Nach Pelletierung der Zellen wurden diese mit 200 µl Tris-Mannitol Puffer versetzt und zur Homogenisierung zunächst durch eine 25 G Kanüle mehrmals aufgezogen. Eine weitere Homogenisierung erfolgte mit dem Ultraschallfinger für 30 Sekunden (20% power/ unter Eiskühlung). Ein 10 µl-Aliquot dieses Homogenats wurde 1 : 400 verdünnt und zur Proteinbestimmung eingesetzt.

Der Proteingehalt dieser Proben wurde anschließend mit 2 x SDS-Probenpuffer auf eine Konzentration von 10 µg/ µl eingestellt.

2.2.5.4. Proteinbestimmung

Die Bestimmung des Gesamtproteingehaltes der für die Western Blot Analyse eingesetzten Proben (Cytosol- und Zelllysate-Proben und Membransuspensionen) erfolgte nach der Methode von SMITH (Smith *et al.*, 1985) mit Bicinchoninsäure/Kupfer-(II)-sulfat.

Die reduzierende Wirkung von Peptidbindungen sowie bestimmten Aminosäureresten (Tryptophan, Tyrosin, Cystein) führt zur Umsetzung von Cu^{2+} Ionen zu einwertigem Kupfer, welches mit der Bicinchoninsäure einen violetten Farbkomplex bildet. Die Tiefe der Färbung, die bei einer Wellenlänge von 550 nm fotometrisch bestimmt werden kann, ist dem Gehalt an Gesamtprotein direkt proportional.

Als Proteinstandard dienten verschiedene Verdünnungen (von 100 bis 20 µg/ml) von BSA (*Sigma-Aldrich, Steinheim*) in PBS. Der Leerwert enthielt 100 µl PBS anstelle der Probe. Zunächst wurden je 100 µl der Standardlösungen, bzw. der Proben jeweils als Doppelbestimmung in eine 96-well Platte pipettiert. Als Farbreagenz diente die frisch angesetzte BCA/ Kupfer (II) sulfat-Lösung (Verhältnis 50:1; Kupfersulfat 4% (w/v)), die je 100 µl pro well dazu pipettiert wurde. Zur Beschleunigung der Farbentwicklung wurde die verschlossene 96-well Platte für 45 min bei 60°C erwärmt. Die Messung der Extinktion erfolgte bei 550 nm in einem Anthos LUCY 2 Lumino-/ Fotometer (Software: MicroWin 3.0., *Microthek Laborsysteme GmbH, Overath*) und die Auswertung über Excel™.

2.2.6. Western Blot-Analysen

2.2.6.1. Western Blot BCRP

Die Western Blot Analyse von BCRP wurde als denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese durchgeführt (SDS-PAGE). Dabei wurde ein Sammelgel mit 5% Acrylamid- und ein Trenngel mit 10% Acrylamid-Anteil verwendet. Die mit 2 x Probenpuffer (1 mM DTT frisch zugesetzt) verdünnten Proben wurden zur Denaturierung der Proteine für

5 min auf 95°C (Thermoblock) erhitzt. Von diesen Proben wurde jeweils soviel eingesetzt, dass maximal 100 µg Protein, und nicht mehr als ein Volumen von 15 µl Probe in eine Geltasche geladen wurde, um eine Überladung, bzw. ein Ineinanderlaufen der Proben zu vermeiden.

Zunächst wurden die Glasplatten für das Elektrophoresegel sorgfältig mit Ethanol gereinigt und auf der Höhe von 6 cm die Füllhöhen-Markierung für das Trenngel angebracht. Die Komponenten für das Trenngel wurden in der unter Abschnitt „verwendete Puffer“, *Punkt 2.1.6.2. Western Blot* angegebenen Reihenfolge zusammen pipettiert, kurz gemischt und die Polymerisation durch die Zugabe von Ammoniumperoxodisulfat (APS, 10% (w/v)) gestartet. Die Mischung wurde dann zügig und blasenfrei bis zur 6 cm-Markierung zwischen die Glasplatten gegossen.

Um das Eindringen von Sauerstoff zu vermeiden, wurde das flüssige Gel gleich darauf mit 200 µl Ethanol überschichtet. Nach 30 min war der Polymerisationsvorgang abgeschlossen und der Ethanol sowie Reste von nicht polymerisiertem Acrylamid konnten abgegossen werden. Anschließend wurde das Sammelgel in der ebenfalls unter *Punkt 2.1.6.2. Western Blot* angegebenen Reihenfolge zusammen pipettiert und auf das erstarrte Trenngel gegossen. Gleich darauf wurde der gut gereinigte, fettfreie Teflonkamm zur Ausformung der Geltaschen in das flüssige Gel gesteckt. Nach 30 min konnte das ausgehärtete Gel an die Elektrophorese-Kammer angebracht werden. Es folgte das Einfüllen des Elektrophorese-Puffers in die Reservoirs, daraufhin konnten die Teflonkämme entfernt werden. Um zu vermeiden, dass Gelreste in die Taschen fallen und evtl. die Trennung stören, wurde zunächst überschüssiges Gel über den Taschen mit Hilfe einer Kanüle abgesaugt und zum Schluss jede Tasche mit etwas Elektrophorese-Puffer ausgespült, um unpolymerisiertes Acrylamid zu entfernen.

Nach der Aufgabe der Proben mit einer Hamilton-Spritze wurde die Elektrophorese gestartet. Um die Proteine zunächst im Gel zu „stapeln“, wurde eine konstante Spannung von 80 V angelegt. Diese Spannung wurde auf 110 V erhöht, nachdem die Lauffront der Proben die Grenze zum Trenngel erreicht hatte. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Sammelgel abgetrennt und verworfen.

Das Trenngel wurde kurz mit PBS-T (0,07% Tween 20 (v/v) in PBS) gespült und dann für ca. 10 min in Transferpuffer eingelegt. Zur Immobilisierung der aufgetrennten Proteine erfolgte ein Elektrotransfer (Blotting) auf eine Nitrocellulose-Membran (*Hybond™ ECL™*, *Amersham Biosciences, Freiburg*) im Semi-dry Verfahren. Dazu wurde zunächst eine Schicht von Whatman-Filterpapier (2 mm; 6 Stück) von der Größe der Membran (7 x 8 cm), welches zuvor mindestens 20 min in Transferpuffer eingelegt wurde, auf die untere Elektrode (Kathode) gelegt. Darauf wurde die ebenfalls vorher in Transferpuffer eingelegte Nitrocellulose-Membran gelegt, es folgte als nächstes das Gel und abschließend wieder eine

Lage Whatman-Filterpapier (6 Stück). Um eingeschlossene Luftblasen aus dem Sandwich zu entfernen, wurde mit einem Falcon-Röhrchen darüber gerollt, überschüssiger Transferpuffer entfernt und daraufhin die Apparatur verschlossen. Das Blotting wurde bei einer konstanten Stromstärke von 0,08 A und einer Dauer von 50 min durchgeführt. Nach Beendigung des Elektrotransfers wurde das Gel zur Anfärbung der verbliebenen Proteine über Nacht in Coomassie-Blue-Färbelösung eingelegt. Am darauffolgenden Tag wurde das Gel durch Waschen mit Entfärber I (3 x 15 min) und Entfärber II (3-4 x 15 min) von unspezifischer Färbung befreit und zur Konservierung in eine PE-Folie eingeschweißt.

Die Membran wurde zunächst kurz mit PBS-T gespült und dann zur Kontrolle des Elektrotransfers eine Ponceau S-Färbung durchgeführt. Zur Entfernung der unspezifischen Färbung des Hintergrundes wurde die Membran 3-4 x mit dest. Wasser gespült. Nach der Entfernung der Ponceau S-Färbung durch Waschen der Membran mit 5% Essigsäure (v/v) und PBS-T wurde die Membran zur Absättigung freier Bindungsstellen für 1 Stunde bei Raumtemperatur in Block-Puffer (5% (w/v) Magermilchpulver in PBS-T) unter sanftem Schütteln inkubiert. Anschliessend wurde die Membran über Nacht bei 4°C mit dem primären Antikörper inkubiert (BXP-21, Verdünnung 1: 2000 in PBS-T mit 3% (w/v) Magermilchpulver). Am nächsten Morgen wurde die Antikörper-Lösung verworfen und die Membran 2-3 x kurz mit PBS-T gespült und dann 1 x für 15 min und danach 3 x für 10 min in je ca. 100 ml PBS-T gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde der sekundäre Antikörper (HRP-konjugierter anti-Maus IgG_{2a}, *Amersham Biosciences*) in einer Verdünnung von 1: 10 000 für 1,5 h bei Raumtemperatur appliziert. Es folgte die gleiche Waschprozedur wie nach der Inkubation mit dem primären Antikörper, um nicht gebundenen sekundären Antikörper zu entfernen. Nach dem letzten Waschschrift erfolgte die Detektion mittels *enhanced chemoluminescence*.

Das Prinzip dieser Detektionsmethode ist die enzymatische Oxidation von Luminol, einem zyklischen Diacylhydrazid. Das Enzym *Horseradish-Peroxidase*, welches an den sekundären Antikörper gebunden ist, bewirkt diese Oxidation von Luminol bei der Anwesenheit von H₂O₂. Durch die Oxidation wird Stickstoff abgespalten und das Molekül gleichzeitig in einen angeregten Zustand überführt. Unter Abgabe dieser Anregungsenergie in Form von Licht (492 nm) fällt das Molekül wieder in den Grundzustand zurück. Durch chemische *enhancer* wie Phenole kann diese Lichtemission bis zu 1000-fach verstärkt werden.

Alle folgenden Schritte zur Detektion wurden in der Dunkelkammer unter rotem Sicherheitslicht durchgeführt. Das Detektionsreagenz besteht zu je 1 ml der Lösungen 1 und 2 des ECL™-detections kits (*Amersham Biosciences*). Zusätzlich zur Verstärkung der Reaktion wurden je 500 µl der Lösungen 1 und 2 des ECL *advance*™ detection kits (*Amersham Biosciences*) dazugemischt. Die Membran wurde aus dem mit Waschpuffer gefüllten Gefäß genommen, der überschüssige Puffer durch Abtropfen entfernt und die

Membran auf der gereinigten Glasplatte der Fotokassette plaziert. Je ca. 1 ml dieser Detektionslösung wurde direkt auf die Membran pipettiert, so dass die Flüssigkeit durch die Oberflächenspannung gehalten wurde. Nach ca. 1-2 min wurde das überschüssige Detektionsreagenz mit Zellstoff abgetupft, eine gereinigte PE-Folie auf die Membran gelegt und nach dem Auflegen des Films die Fotokassette verschlossen. Die Expositionszeit lag zwischen 30 sec. und 5 min je nach Stärke der Signale. Die Auswertung erfolgte nach dem Einscannen mit Unterstützung der Software Scion-image™.

2.2.6.2. Western Blot-Analyse (Sulfotransferasen)

Aus den (wie unter *Punkt 2.2.4.2.* beschrieben) behandelten Zellen wurde die Zytosolfraktion isoliert und diese einer gelelektrophoretischen Trennung (SDS-PAGE; 11% Acrylamid; je 100 µg Protein) unterworfen. Nach Elektrotransfer auf eine Nitrocellulose Membran (Hybond™ ECL™, *Amersham Biosciences, Freiburg*) erfolgte die Inkubation mit verschiedenen SULT-Antikörpern (AB1 und AB2, durch Immunisierung von Schafen gegen SULT1A3 erzeugt; reagiert mit allen 1A Isoformen und 1C1), des weiteren AB3, AB4, AB5 und AB6 (Immunisierung von Kaninchen; erkennt die Formen SULT 1B1, 1E1 2A1 und 2B1a)

Die Visualisierung der Proteinbanden wurde mit Hilfe der enhanced chemoluminescence (ECL)-Technik (*Amersham Biosciences, Freiburg*) durchgeführt und über eine CDC-Kamera aufgenommen und als Bilddatei gespeichert.

Nach der Detektion wurden die Antikörper durch „*stripping*“ entfernt und erneut mit einem Antikörper gegen eine andere SULT-Isoform inkubiert. Das Stripping wurde nach der Anleitung des ECL™ detection kits von Amersham durchgeführt. Dazu wurde der Blot für 45 min bei 50°C mit 100 mM β-Mercaptoethanol, 2% (w/v) SDS in 62,5 mM Tris/HCl, pH 6,7 inkubiert und nach einem Waschschrift mit dem ersten Antikörper inkubiert.

2.2.7. Untersuchungen zur Genexpression

2.2.7.1. Untersuchungen zur Expression von BCRP

2.2.7.1.1. Untersuchung zur Ah-Rezeptor-Abhängigkeit durch Superinduktion

Der aktivierte Ah-Rezeptor wird nach der Ausschleusung aus dem Kern durch 26S-Proteasomen (vgl. Kapitel 1, *Punkt 1.3. Aryl hydrocarbon Rezeptor*) abgebaut. Werden diese Proteasomen durch MG-132 (Carbobenzoxy-L-Leucyl-L-Leucyl-L-Leucinal) gehemmt, so kommt es in Bezug auf AhR-regulierte Gene, wie z. B. CYP 1A1, zu einer „Superinduktion“

(Ma and Baldwin, 1999). Dieser experimentelle Ansatz wurde hier verwendet, um zu untersuchen, ob die Expression von BCRP AhR-abhängig ist. Dazu wurden Caco-2-Zellen für 17 Tage nach Erreichen der Konfluenz in 6-Well-Platten kultiviert und zu Beginn des Experiments mit ICZ (2,5 µM) oder zusammen mit ICZ (2,5 µM) und MG-132 (20 µM) für 8h und 24h inkubiert. Als Kontrolle dienten Zellen, die mit dem Lösungsmittel in der gleichen Konzentration (0,1 % (v/v) DMSO) behandelt wurden. Nach Beendigung der Inkubationsdauer wurden die Zellen zur Isolierung der RNA geerntet (s. *Punkt 2.2.7.3.*) und umgehend bei -80 °C eingefroren.

2.2.7.1.2. Untersuchung zur Ah-Rezeptor-Abhängigkeit durch Behandlung mit dem AhR-Antagonisten PD 98059 (2'-Amino-3'-methoxyflavon)

Dieses Experiment sollte Aufschluss darüber geben, ob durch eine Blockierung des Ah-Rezeptors durch den AhR-Antagonisten und MEK-Hemmer PD 98059 (Reiners *et al.*, 1998) die Induktion von BCRP durch ICZ inhibiert werden konnte. Dazu wurden Caco-2-Zellen für 14 Tage nach Erreichen der Konfluenz in kleinen (25 cm²) Kulturflaschen kultiviert und zu Beginn des Experimentes für 1h mit dem Hemmer (PD 98059, 10 µM) vorinkubiert und anschließend mit Hemmer (PD 98059, 10 µM) und Induktor (ICZ, 5 µM) zusammen inkubiert. DMSO (0,2 % (v(v))) behandelte Zellen dienten als Kontrolle. Nach einer Inkubationsdauer von 8h und 24h wurden die Zellen zur Isolierung der RNA geerntet.

2.2.7.2. Einfluss von B[k]F, DB[a,l]P und einem PAK-Gemisch („Tabakrauch“) auf die Expression von BCRP

Caco-2-Zellen wurden 16 Tage nach Erreichen der Konfluenz in kleinen Kulturflaschen (25 cm²) kultiviert und nachfolgend für 48 h mit verschiedenen Substanzen behandelt (B[k]F: 5 µM, 10 µM und 20 µM; DB[a,l]P: 5 µM, 10 µM und 20 µM und PAK-Gemisch: 10, 5 und 2,5 µg/ml). Die Gehalte der einzelnen PAK der PAK-Mischung in der jeweiligen, zur Behandlung der Zellen eingesetzten Verdünnungsstufe sind in der nachfolgenden Tabelle angegeben.

Konzentrationen		10 µg/ml		5 µg/ml		2,5 µg/ml	
Stoff	Anteil [%]	Massen- gehalt [µg/ml]	[µM]	Massen- gehalt [µg/ml]	[µM]	Massen- gehalt [µg/ml]	[µM]
Phenanthren	67,7	6,7774	38,03	3,3887	19,02	1,6943	9,51
Pyren	25,3	2,5328	13,32	1,2664	6,66	0,6332	3,33
B[a]P	3,2	0,3204	1,27	0,1602	0,63	0,0801	0,32
B[k]F	1,1	0,1102	0,44	0,0551	0,22	0,0275	0,11
DB[a,l]P	0,05	0,005	0,02	0,0025	0,01	0,0013	0,00
B[b]F	2,6	0,2602	1,03	0,1301	0,52	0,0651	0,26

2.2.7.3. RNA-Isolierung

Die Isolierung der RNA wurde nach der Phenol-Chloroform-Extraktionsmethode nach CHOMCZYNSKI und SACCHI (1987) durchgeführt. Nach der Zugabe von 3 ml GTC-Puffer zum Zellpellet wurde dieses durch mehrmaliges Aufziehen durch eine 25G (0,9 x 40 mm) Kanüle homogenisiert und gleichzeitig die genomische DNA geschert. Nach dem Ansäuern mit 0,3 ml Natriumacetat-Puffer (2 M, pH 4,0) wurde die Suspension mit 3 ml wassergesättigtem Phenol und 0,6 ml Chloroform/Isoamylalkohol versetzt und für 15 min auf Eis inkubiert. Die Mischung wurde dann zur Abtrennung von Zelltrümmern für 20 min zentrifugiert (10 000 x g/ 4°C; *Avanti-J25I, Beckmann*). Der RNA-haltige Überstand wurde daraufhin mit dem gleichen Volumen an Isopropanol versetzt und zur Fällung der RNA für 24h bei -20°C gelagert. Nach Zentrifugation für 20 min (10 000 x g/ 4°C; *Avanti-J25I, Beckmann*) wurden zum RNA-haltigen Pellet 1,5 ml GTC-Puffer und 1,5 ml Isopropanol gegeben und die RNA erneut präzipitiert (3h, -20°C). Dieser Schritt wurde noch einmal wiederholt und das resultierende Pellet 2 x mit je 100 µl Ethanol (70% v/v) gewaschen und dann in einer Vakuumzentrifuge (*Eppendorf Concentrator 5301[®], Eppendorf, Hamburg*) für 10 min getrocknet. Das getrocknete Pellet wurde dann in 150 µl Wasser gelöst und zur Bestimmung der Reinheit und des Gehaltes an RNA ein Aliquot 1:1000 (DEPC-Wasser)

verdünnt. Die fotometrische Bestimmung des RNA-Gehaltes wurde bei einer Wellenlänge von 260 nm (*UV-VIS-Spectrometer Lambda Bio 20[®], Perkin-Elmer, Wellesley, MA, USA*) durchgeführt. Die gemessene Extinktion₂₆₀ multipliziert mit dem Faktor 40 ergab die Konzentration an RNA in µg/ml. Zur Überprüfung der Reinheit der isolierten RNA wurde die Ratio 260/280 nm bestimmt. Ein Wert von 1,8-2,0 zeigte an, dass keine Kontaminationen durch Salze oder Proteine vorlagen.

2.2.7.4. Reverse Transcriptase (RT)-PCR

Synthese der cDNA

Die Isolierte RNA wurde mit Hilfe des Enzyms Reverse Transcriptase (Superscript™ II RNase H-Reverse Transcriptase, *Gibco™/Invitrogen, Karlsruhe*) in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Zunächst wurde die RNA 10 min bei 70 °C denaturiert. Dazu wurde die RNA (1µg) mit 17 µl Wasser, 3 µl Oligo (dT) Primer (0,5 µg/µl, *Boehringer, Ingelheim*) und einem Ribonuclease-Inhibitor (10 U RNasin[®], *Promega, Mannheim*) versetzt und in einem Heizblock erhitzt. Nach der Abkühlung auf Eis erfolgte die Zugabe eines Puffers (6 µl Reverse Transcriptase-Puffer, *Gibco™/Invitrogen, Karlsruhe*), der Nucleotide (je 2,5 µl (10 mM) der dNTPs von Adenin, Cytosin, Guanin und Thymin) und des Enzyms (1 µl Superscript Reverse Transcriptase (200 U/µl). Die Mischung wurde zur Synthese der cDNA für 2h bei 42°C auf einem Heizblock inkubiert.

Polymerase chain reaction (PCR)

Zur Amplifizierung der für das Gen charakteristischen Abschnitte wurde die cDNA (1µg) mit den entsprechenden Sense- und Antisense-Primern sowie den Nucleotiden zusammen pipettiert und in einer PCR-Maschine inkubiert. Die Zusammensetzung eines Reaktionsgemisches ist nachfolgend aufgeführt:

Volumen	Substanz
36,25 µl	H ₂ O
5 µl	10 x PCR-Puffer
5 µl	dNTP`s (je 2 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
1,25 µl	Sense-Primer
1,25 µl	Antisense-Primer
1 µl	cDNA
1 µl	<i>Taq</i> -DNA-Polymerase

Aus der folgenden Tabelle sind die verwendeten Primer sowie die PCR-Bedingungen zu entnehmen:

Gen	Sense-Primer	Antisense-Primer	Genbank Acc. Nr.	Temperatur	Zyklen
CYP1A1	Nt 5762-5788	Nt 6689 - 6709	X02612	59°C	28
BCRP*	Nt 1563-1583	Nt 2004 - 2024	AY289766	53°C	35
β -Actin	Nt 371-391	Nt 800 - 820	X00351	57°C	28

(* Literatur: Taipalensuu *et al.*, 2002)

Die PCR-Reaktion setzt sich aus vier verschiedenen Schritten zusammen. Nach einer ersten Denaturierung (5 min bei 94°C) folgen 3 verschiedene Reaktionsschritte, welche in der folgenden Tabelle aufgeführt sind:

Schritt	Reaktion	Temperatur	Dauer
Denaturierung	Aufhebung der Helixstruktur, die cDNA liegt dann als Einzelstrang vor	94°C	30 sec
Annealingphase	Anlagerung der Primer	57-60 °C	30 sec
Elongation (Polymerisation)	Einbau der Nucleotide in 3`-Richtung durch das Enzym <i>Taq</i> -Polymerase	72°C	30 sec

Elektrophorese und Detektion

Zur Analyse der entstandenen PCR-Produkte wurden diese auf einem Ethidiumbromid-gefärbten Agarosegel (1% (w/v) in 95% (v/v) MOPS und 5% (v/v) Formaldehyd) in einer Flachbettelektrophorese-Apparatur (*Horizon 11.14*[®], *GibcoBRL*, Karlsruhe) bei einer Spannung von 100 V über einen Zeitraum von 1,5 h getrennt. Die durch die Einlagerung von Ethidiumbromid fluoreszierenden DNA-Fragmente konnten unter Einstrahlung von UV-Licht sichtbar gemacht werden. Die Gele wurden mit einer CDC-Kamera (*Gel Doc 1000*[®], *Biorad*, München) aufgenommen und als Bild-Dateien archiviert. Die densitometrische Auswertung wurde durch das Programm *Molecular Analyst*[®] (*Biorad*, München) unterstützt.

3. ERGEBNISSE

3.1. Untersuchungen zum Metabolismus von Benzo[a]pyren (BP)

Die Experimente, dessen Ergebnisse im ersten Teil dieses Kapitels präsentiert werden, sollten Aufschluss darüber geben, inwiefern der Metabolismus von BP durch die Vorbehandlung von Caco-2- (bzw. TC7-) Zellen mit verschiedenen sekundären Pflanzeninhaltsstoffen, sowie dem bekannten Chemoprotektivum Oltipraz, beeinflusst werden kann. Dabei sollen hier nur die beiden Hauptmetaboliten des BP, BP-1- und BP-3-sulfat, (bzw. zusätzlich BP-3-glucuronid in TC7-Zellen) betrachtet werden.

3.1.1. Einfluss von verschiedenen sekundären Pflanzeninhaltsstoffen und Oltipraz auf den Metabolismus von BP durch Modulation von Phase I

3.1.1.1. Effekte von Indol-3-carbinol, Flavon und Oltipraz

In einem ersten Versuchansatz wurden, wie im Kapitel *Material und Methoden* unter Punkt 2.2.3.1. beschrieben, Caco-2-Zellen mit Oltipraz (50 µM), Flavon (50 µM), Indol-3-carbinol (50 µM) und β-Naphthoflavon (50 µM) für 48 h vorbehandelt und dann 12 Stunden lang mit dem Substrat BP (10 µM) inkubiert. In der folgenden Grafik (Abb. 10) sind die Gehalte an BP-1- und BP-3-sulfat im Medium der Zellen als Prozent der Kontrolle dargestellt.

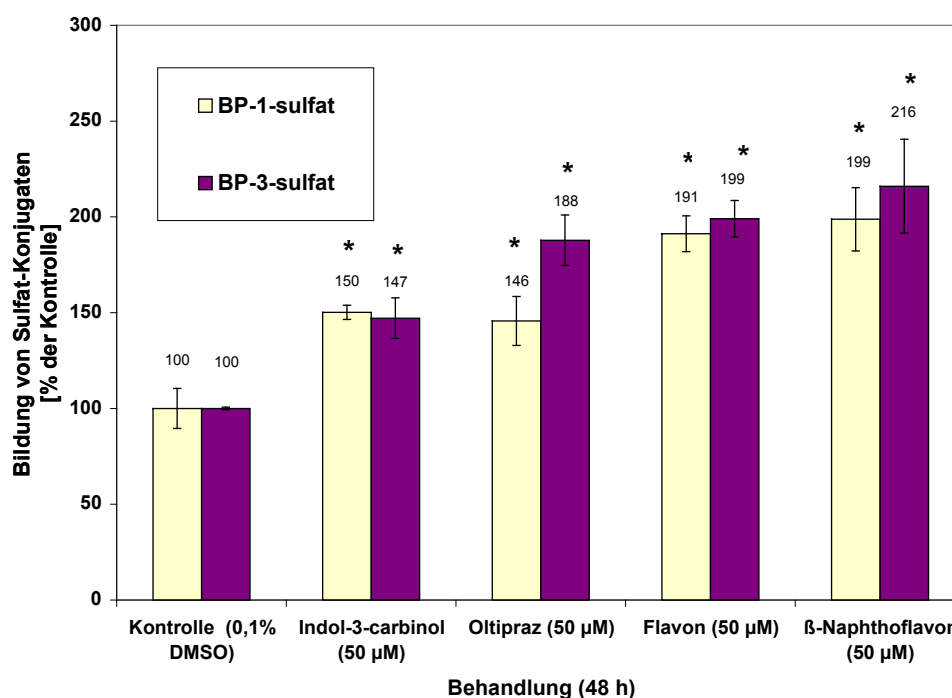


Abbildung 10: Einfluss einer 48-stündigen Vorbehandlung von Caco-2-Zellen auf die Metabolisierung von BP (10 µM) zu den Hauptmetaboliten BP-1- und BP-3-sulfat. Dargestellt sind die Werte aus n = 3 Bestimmungen als % der Kontrolle (0,1% DMSO). * Markiert statistisch signifikante Werte (P < 0,05; ANOVA, Tukey-Test) gegenüber der Kontrolle.

Die in Abbildung 10 präsentierten Werte zeigen deutlich eine Erhöhung der Gehalte beider BP-Sulfat-Konjugate im Medium der vorbehandelten Caco-2-Zellen, wobei sich die Effektivität der Behandlung in dieser Hinsicht in folgender Reihenfolge darstellen lässt:

β-Naphthoflavon > Flavon > Oltipraz > Indol-3-carbinol.

Das synthetische Flavon β-Naphthoflavon wurde hierbei als etablierter AhR-Agonist und CYP1A1 Induktor eingesetzt, daher war eine hohe Steigerung der Metabolisierung von BP zu den Sulfat-Konjugaten (hier 216 % an BP-3- und 199% an BP-1-sulfat, bezogen auf die Kontrolle) zu erwarten. Eine fast ebenso starke Steigerung der BP-Sulfat Gehalte im Medium konnte bei den mit Flavon vorbehandelten Zellen beobachtet werden (191% und 199% an BP-1-, bzw. BP-3-sulfat gegenüber der Kontrolle).

Vergleicht man die Erhöhung der Bildung beider Sulfat-Konjugate des BP untereinander, so fällt auf, dass die Vorbehandlungen mit Flavon, Oltipraz und β-NF zu einer größeren Steigerung der Produktion des Metaboliten *BP-3-sulfat* führten, die I3C-vorbehandelten Zellen jedoch eine geringfügig höhere Menge an *BP-1-sulfat* (150% BP-1- und 147% BP-3-sulfat gegenüber der Kontrolle) in das Medium abgaben.

3.1.1.2. Effekte von Oltipraz und Flavon: Untersuchung zur Zeit- und/ oder Konzentrationsabhängigkeit

Um zu untersuchen, welchen Einfluss die gewählte Inkubationsdauer mit dem Substrat BP (10 μM) auf die Bildung der BP-Sulfat-Konjugate hat und ob diese Effekte konzentrationsabhängig sind, wurden zwei ausgewählte Substanzen, Oltipraz (Abb. 11a. und 11b.) und Flavon (Abb. 11c. und 11d.) zur Vorbehandlung (48 h) verwendet.

Beide Verbindungen wurden in drei Konzentrationen eingesetzt (25 μM, 50 μM und 80 μM [Oltipraz] bzw. 25 μM, 50 μM und 100 μM [Flavon]) und die nachfolgende Inkubation mit BP wurde für 8h, 12h und 24h (Flavon: 8h und 12h) durchgeführt. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 11a. bis 11d. dargestellt.

Die grafische Darstellung der Ergebnisse zeigt, dass beide Vorbehandlungen die Bildung und Exkretion beider BP-Sulfat-Konjugate in einer konzentrationsabhängigen Weise beeinflussten. Dabei ist auffällig, dass die größten Unterschiede bezogen auf die Kontrolle nach der kürzesten Inkubationszeit von 8h zu beobachten war. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass BP selbst auch ein starker CYP1A1-Induktor ist und daher mit zunehmender Inkubationsdauer die Unterschiede zur Kontrolle immer geringer werden. Das CYP1A1-Protein kann offensichtlich auch schon nach relativ kurzer Zeit funktionell exprimiert sein, wie Song *et al.* (2003) bei der Behandlung von murinen Hepa c1c1c7 Zellen mit TCDD festgestellt haben.

Wie in Abb. 11a. dargestellt, wurden die höchsten Gehalte an BP-1-sulfat durch eine Vorbehandlung der Zellen mit 50 μM Oltipraz erzielt ($46,36 \pm 3,00$ pmol/cm² gegenüber $20,8 \pm 1,96$ pmol/cm² für die unbehandelten Zellen; entsprechend 223% der Kontrolle). Die

Bildung des zweiten Phase II BP-Metaboliten, BP-3-sulfat, wurde am stärksten durch eine Vorbehandlung mit 80 µM Oltipraz (72,48 ± 6,80 pmol/cm² gegenüber 43,32 ± 2,03 pmol/cm², entsprechend 167% der Kontrolle) erhöht.

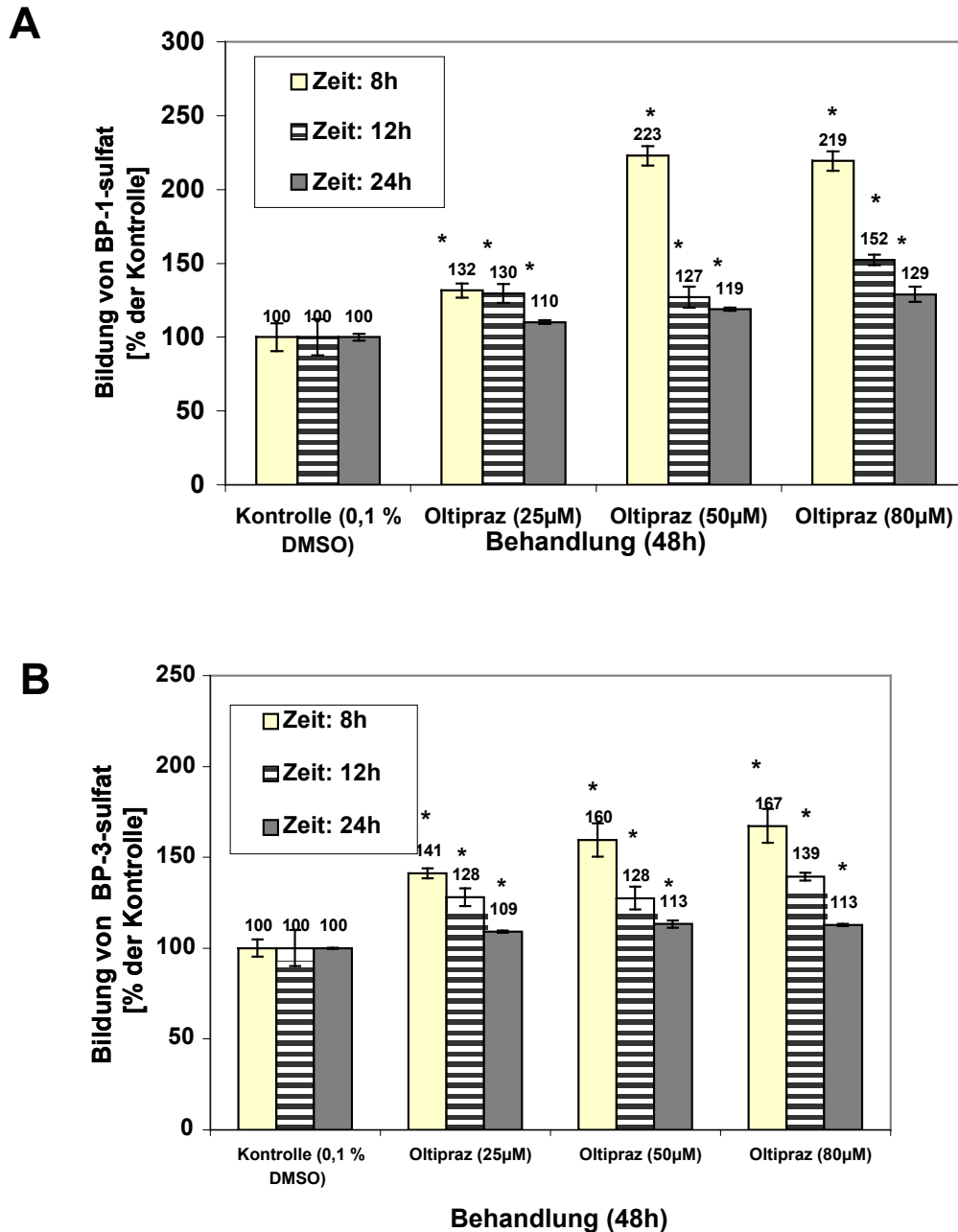
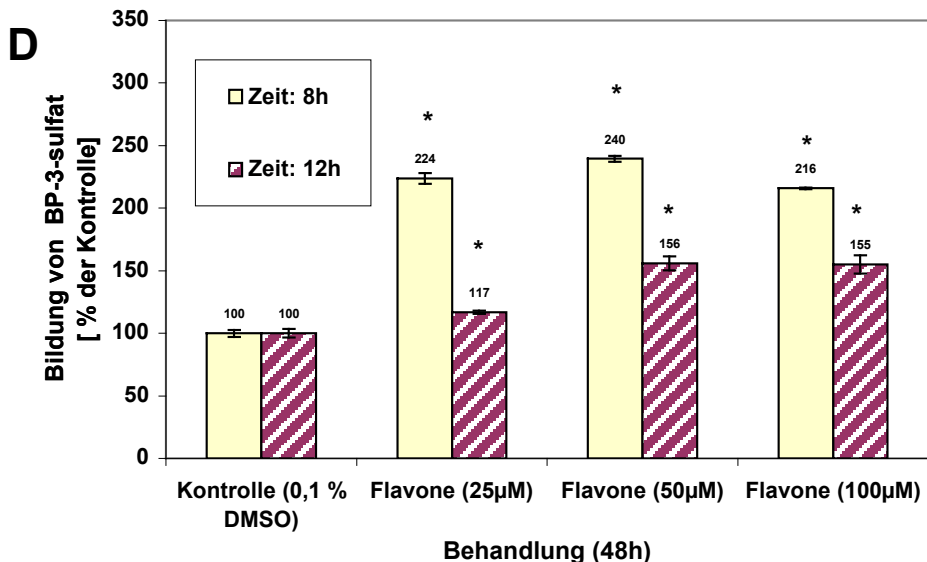
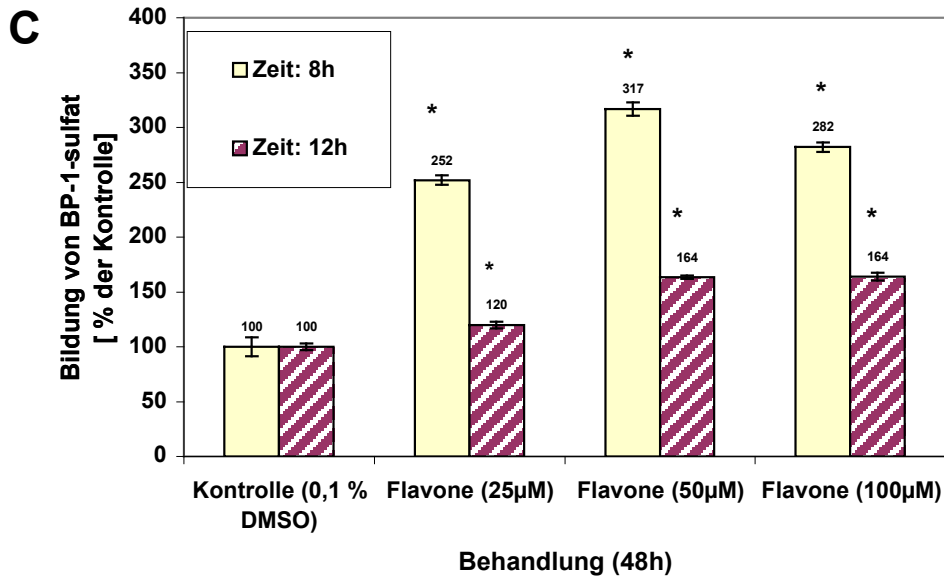


Abbildung 11a-b: Effekte einer Vorbehandlung (48h) von Caco-2-Zellen mit Oltipraz (25, 50 und 80 µM) auf den Metabolismus von BP (10 µM) zu BP-1-sulfat (A) und BP-3-sulfat (B). Die Werte aus n = 3 Bestimmungen sind dargestellt in Prozent bezogen auf die unbehandelten Zellen (Kontrolle, 0,1% DMSO) ± Standardabweichung. * Markiert statistisch signifikante Werte (P < 0,05, t-Test) gegenüber der Kontrolle.

Wie in den Abbildungen 11c. bis 11d. gezeigt, war eine Vorbehandlung mit 50 µM Flavon noch effektiver in Bezug auf die Erhöhung des ins Medium abgegebenen BP-1-sulfats (C) nach einer Inkubationsdauer von 8h (317% des Kontrollwertes). Die gleiche Vorbehandlung und Inkubationsdauer konnte die Bildung und Abgabe von BP-3-sulfat (D) ins Medium um

immerhin noch 240% erhöhen. Dies steht im Einklang mit dem ersten Inkubationsversuch (Abb. 10), bei dem Flavon effektiver als Oltipraz die Bildung und Exkretion von beiden BP-Sulfat-Konjugaten erhöhte. Werden die Gehalte beider BP-Metaboliten miteinander verglichen, so wird durch eine Vorbehandlung mit Flavon und Oltipraz die Bildung von BP-1-sulfat jeweils stärker beeinflusst (1,3-fache Steigerung des Gehaltes an BP-1-sulfat im Vergleich mit dem Gehalt an BP-3-sulfat im Medium).



Abbildungen 11c-d: Effekte einer Vorbehandlung (48h) von Caco-2-Zellen mit Flavon (25, 50 und 100 µM) auf den Metabolismus von BP (10 µM) zu BP-1-sulfat (C) und BP-3-sulfat (D). Die Werte aus n = 3 Bestimmungen sind dargestellt in Prozent bezogen auf die unbehandelten Zellen (Kontrolle, 0,1% DMSO) ± Standardabweichung. * Markiert statistisch signifikante Werte (P < 0,05; t-Test) gegenüber der Kontrolle.

3.1.1.3. Effekte von Indol-3-carbinol auf den Metabolismus von BP: Einfluss der Inkubationsdauer

Da in dem in Abbildung 10 gezeigten Inkubationsversuch die Effekte von I3C auf die verstärkte Metabolisierung von BP zu den Sulfat-Konjugaten nach einer Inkubationsdauer von 12h im Vergleich zur Behandlung mit den anderen Test-Substanzen relativ gering waren, wurde in einem weiteren Experiment untersucht, wie sich eine längere Inkubationsdauer von I3C-vorbehandelten Zellen (48h) mit BP (10 µM) auf die Bildung (und Abgabe ins Medium) der drei BP-Metabolite BP-1-, BP-3-sulfat und BP-3-glucuronid auswirkt. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 12a.-c. in der absoluten Menge [pmol/cm²] angegeben.

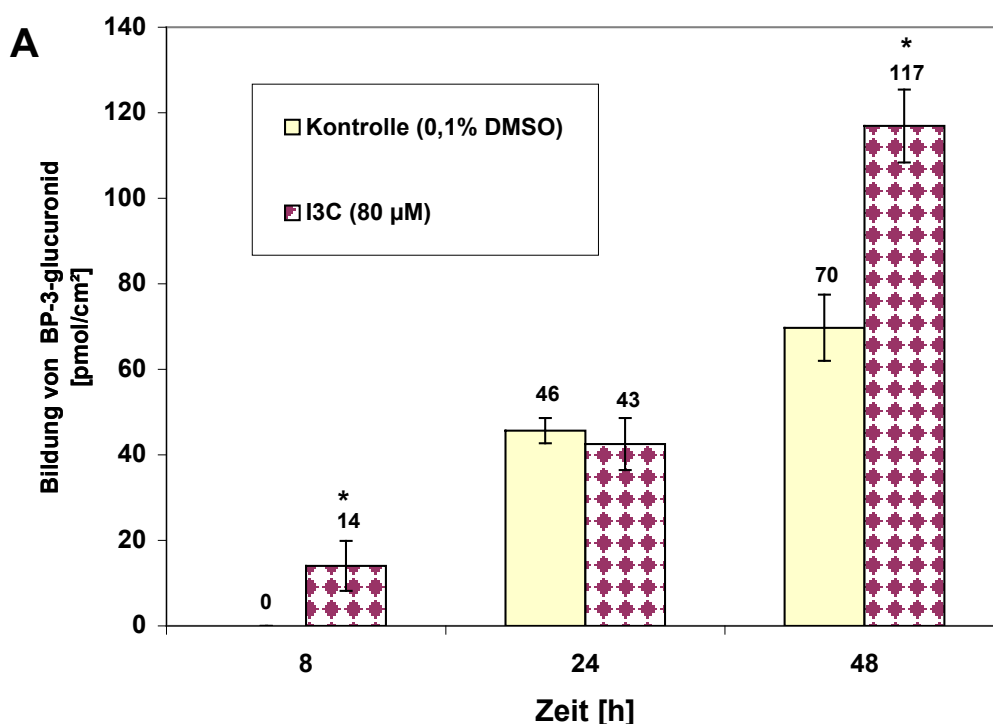
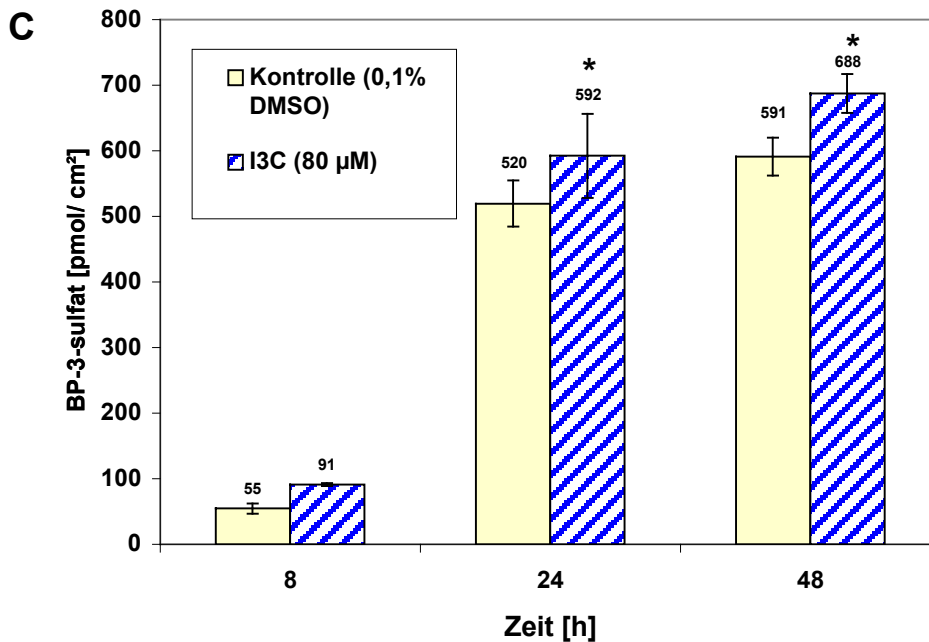
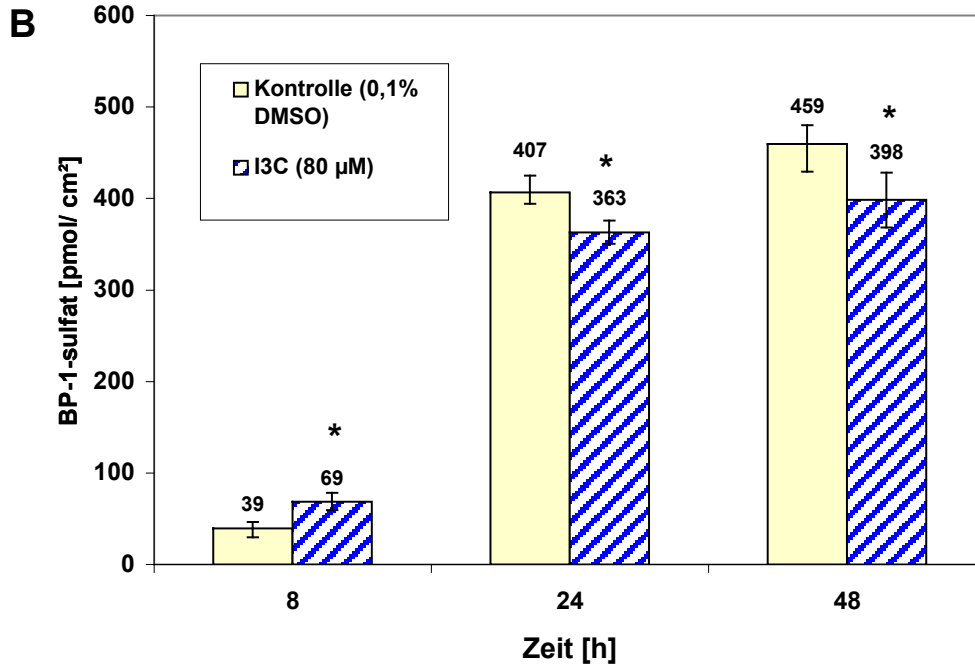


Abbildung 12a: Effekte einer Vorbehandlung (48h) von Caco-2-Zellen mit Indol-3-carbinol (I3C, 80 µM) auf den Metabolismus von BP (10 µM) zu BP-3-glucuronid (A). Die Werte aus n = 3 Bestimmungen sind dargestellt in pmol/cm² ± Standardabweichung. * Markiert statistisch signifikante Werte (P < 0,05; t-Test) gegenüber der Kontrolle.

Wie aus den Abbildungen 12a. bis 12c. zu entnehmen ist, wurden die Caco-2-Zellen für 8h, 24h und 48h mit dem Substrat BP (10 µM) inkubiert. Für die Bildung der einzelnen BP-Metabolite im Vergleich zur Kontrolle ergaben sich über den Zeitverlauf (8h, 24h, 48h) teilweise sehr unterschiedliche Werte. Alle drei Metabolite wurden, bezogen auf die unbehandelten Zellen, nach der kürzesten Inkubationsdauer (8h) in deutlich größerem Umfang ins Medium abgegeben. Dabei fällt insbesondere die Bildung des BP-3-glucuronids ins Gewicht, da die unbehandelten Zellen keine detektierbaren Mengen an BP-3-glucuronid produzierten, die vorbehandelten Zellen jedoch eine geringe Menge (14,06 ± 5,84 pmol/cm²)

ins Medium abgaben (Abb. 12a.). Wie in Abbildungen 12b. und 12c. dargestellt, haben sich auch die Gehalte von BP-1- und BP-3-sulfat im Medium nach 8h deutlich erhöht (176% der Kontrolle an BP-1-sulfat und 167% der Kontrolle an BP-3-sulfat).



Abbildungen 12b.-c.: Effekte einer Vorbehandlung (48h) von Caco-2-Zellen mit Indol-3-carbinol (I3C, 80 µM) auf den Metabolismus von BP (10 µM) zu BP-1-sulfat (**B**) und BP-3-sulfat (**C**). Die Werte aus $n = 3$ Bestimmungen sind dargestellt in $\text{pmol}/\text{cm}^2 \pm$ Standardabweichung. * Markiert statistisch signifikante Werte ($P < 0,05$, t-Test) gegenüber der Kontrolle.

Nach 24h Inkubationsdauer liegt jedoch nur der Gehalt von BP-3-sulfat über dem der unbehandelten Kontrollzellen ($114 \pm 11\%$ der Kontrolle), die Gehalte der beiden anderen Metabolite BP-3-glucuronid ($93 \pm 11\%$ der Kontrolle) und BP-1-sulfat ($89 \pm 3\%$ der Kontrolle) sind sogar geringer als die der unbehandelten Zellen. Die Summe der nach 24h gebildeten BP-Metabolite (BP-1-, BP-3-sulfat und BP-3-glucuronid) ist aber trotz dessen etwas größer (996 pmol/cm^2 gegenüber 973 pmol/cm^2) als die der Kontrollzellen. Erstaunlicherweise steigen die Gehalte von sowohl BP-3-glucuronid ($168 \pm 7\%$ der Kontrolle) als auch von BP-3-sulfat ($116 \pm 4\%$ der Kontrolle) nach der längsten Inkubationsdauer von 48h im Vergleich zur Kontrolle wieder an, die Menge des gebildeten BP-1-sulfats ist jedoch auch nach 48h noch etwas geringer ($87 \pm 7\%$ der Kontrolle) als die des Kontrollwerts.

3.1.1.4. Effekte von weiteren sekundären Pflanzeninhaltsstoffen auf den Metabolismus von BP durch Modulation von Phase I-Enzymen

Um zu testen, ob eine Steigerung der Metabolisierung von BP zu Sulfat-Konjugaten auch durch eine Vorbehandlung mit anderen sekundären Pflanzeninhaltsstoffen zu erreichen ist, wurden in 6-well-Platten kultivierte Caco-2-Zellen für 48h mit verschiedenen Substanzen behandelt und anschließend für 12h mit dem Substrat BP ($10 \mu\text{M}$) inkubiert.

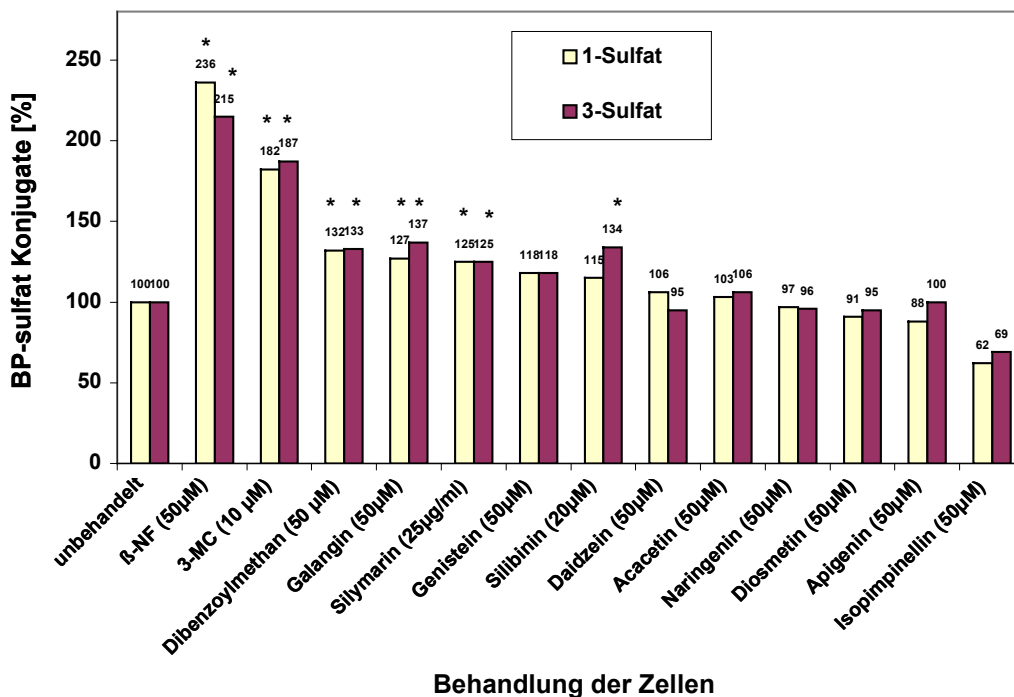


Abbildung 13: Effekte einer Vorbehandlung (48h) von Caco-2-Zellen mit verschiedenen sek. Pflanzeninhaltsstoffen sowie β -NF und 3-MC auf den Metabolismus von BP ($10 \mu\text{M}$) zu BP-1- und BP-3-sulfat nach einer Inkubation von 12h. Die Werte aus $n = 3$ Bestimmungen sind dargestellt in % der Kontrolle. * Markiert statistisch signifikante Werte ($P < 0,05$; ANOVA, Tukey-Test) gegenüber der Kontrolle.

Wie im Abschnitt *Material und Methoden* unter *Punkt 2.2.3.1.* angegeben, wurden hierfür Verbindungen ausgewählt, die sich verschiedenen Stoffklassen (z. B. Flavonoide [Flavone, Isoflavone, Flavanole], Benzophenon, Furocumarin) zuordnen lassen und welche teilweise in der Literatur als chemoprotektiv (z. B. Silymarin, Silibinin) oder als AhR-Agonisten beschrieben wurden (z. B. Dibenzoylmethan, Diosmetin, Galangin). Als „Positivkontrolle“ wurden die etablierten AhR-Agonisten β -NF und 3-MC eingesetzt.

Wie in Abbildung **13** dargestellt, metabolisierten die mit den prototypischen AhR-Agonisten β -NF (50 μ M) und 3-MC (10 μ M) vorbehandelten Zellen das Substrat BP erwartungsgemäß am stärksten im Vergleich zur Kontrolle (236% an BP-1-sulfat; β -NF-Vorbehandlung und 187% an BP-3-sulfat; 3-MC-Behandlung; $P < 0,05$, ANOVA). Die deutlichste Steigerung des BP-Metabolismus wurde durch eine Behandlung mit Galangin (127% BP-1- und 137% BP-3-sulfat), Dibenzoylmethan (132 % BP-1- und 133% BP-3-sulfat), Silibinin (132 % BP-1- und 133% BP-3-sulfat), und Silymarin (125 % BP-1- und 125% BP-3-sulfat) vorbehandelten Zellen erzielt. Einige Behandlungen führten jedoch auch zu geringeren Gehalten an BP-Sulfatkonjugaten im Medium gegenüber der Kontrolle (Naringenin, Diosmetin und Isopimpinellin). Bei dem Vergleich der gebildeten Mengen beider BP-Sulfat-Konjugate fällt auf, dass BP-1- und BP-3-sulfat in fast gleichen Mengen produziert werden. Die relativ geringen Steigerungen der produzierten Mengen an BP-Sulfat-Konjugaten sind auf die Inkubationsdauer von 12h zurückzuführen. Wie in den Abbildungen **11a-d.** gezeigt, können die stärksten Effekte nach einer kürzeren Inkubationsdauer erzielt werden, es muss dann jedoch auch sichergestellt werden, dass die gebildeten Mengen an BP-Metaboliten groß genug für eine Detektion mit der angewendeten HPLC-Methode sind.

3.1.1.5. Effekte auf die Bildung von Glucuronid-Konjugaten des BP

Um zu untersuchen, wie sich eine Vorbehandlung mit verschiedenen sek. Pflanzeninhaltsstoffen auf die Bildung von Glucuronid-Konjugaten des BP auswirkt, wurden TC7-Zellen mit den Flavonoiden Chrysin (50 μ M), Quercetin (20 μ M) und Flavon (50 μ M), dem Stilben Resveratrol (20 μ M), Oltipraz (50 μ M), Indol-3-carbinol (50 μ M), dem phenolischen Antioxidant TBHQ (80 μ M) behandelt. Die Behandlung mit β -NF (50 μ M) diente als Positivkontrolle. Hier wurden Quercetin, TBHQ und Oltipraz ausgewählt, da diese Substanzen sowohl als AhR-Agonisten bekannt sind, als auch Induktoren für ARE-abhängige Genregulation beschrieben wurden (Münzel *et al.*, 2003, Bock *et al.*, 2000, Nguyen *et al.*, 2003). Resveratrol wurde eingesetzt, um zu untersuchen, welche Wirkung ein AhR-Antagonist (Ciolino *et al.*, 1998a, Ciolino *et al.*, 1999) bezüglich der Metabolisierung von BP hat.

Die Umsetzung von Phase I-Metaboliten des BP, 1-OH- und 3-OH-BP, zu den entsprechenden Glucuronid-Konjugaten wird vorwiegend durch UGT1A6 vermittelt. Diese

UGT-Isoform wurde in der Literatur als AhR-abhängig induzierbar beschrieben (Münzel *et al.*, 2003, Bock *et al.*, 2000) und zwar unter Beteiligung eines Antioxidant Response Elements (ARE).

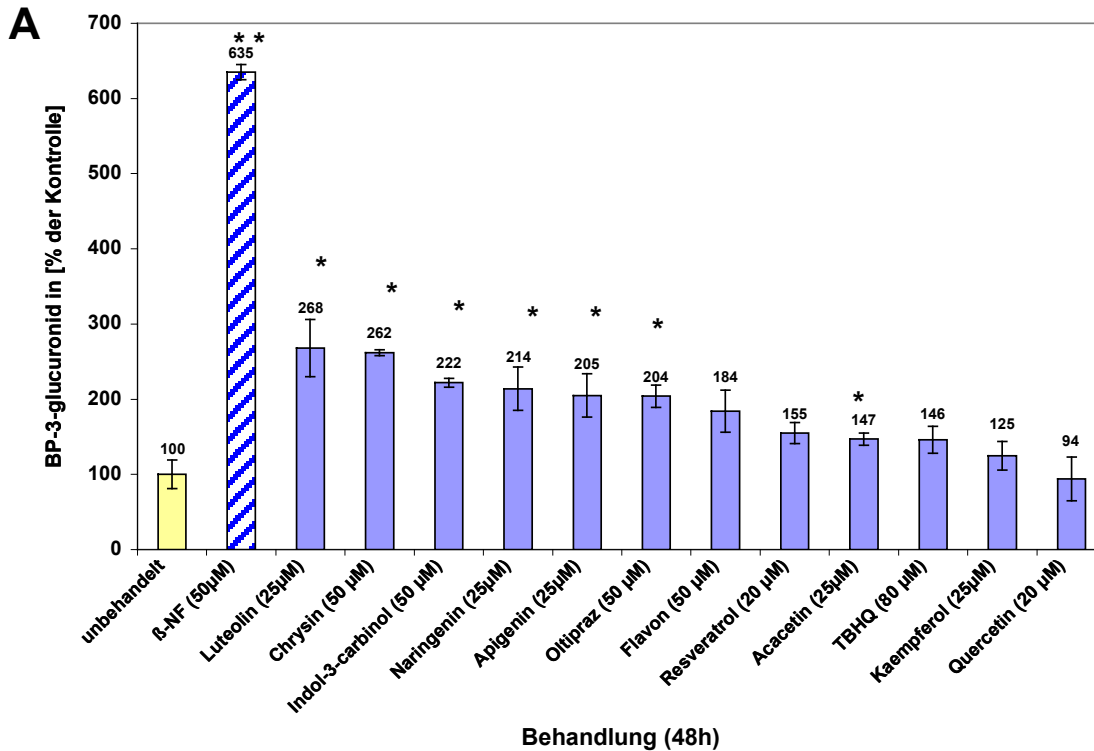
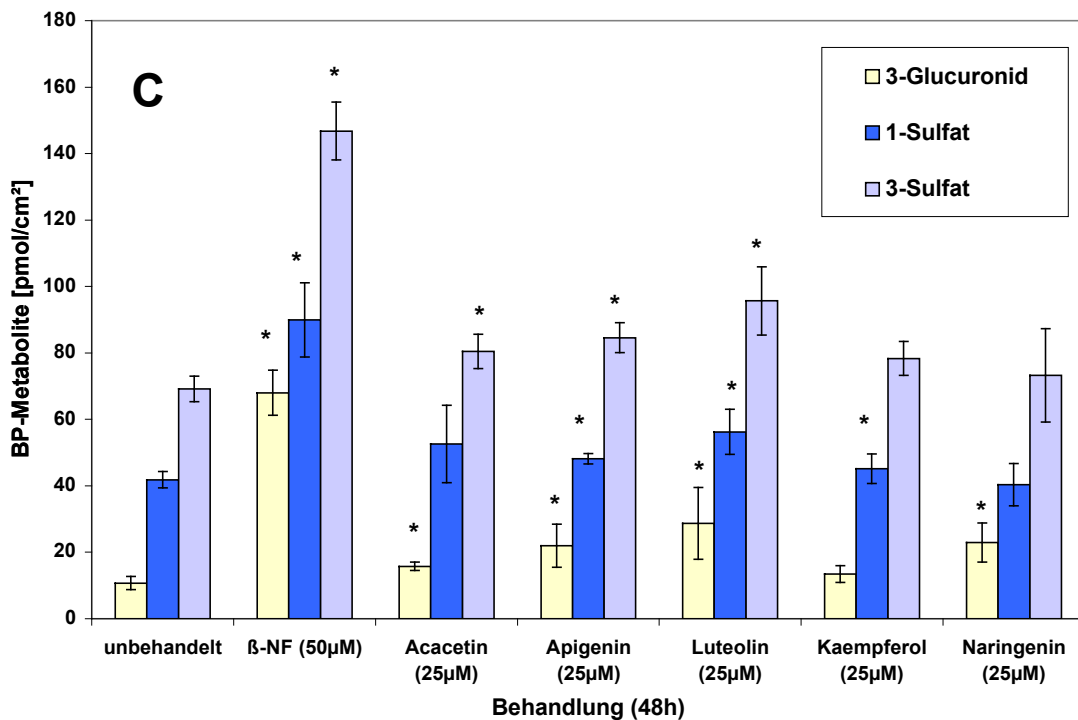
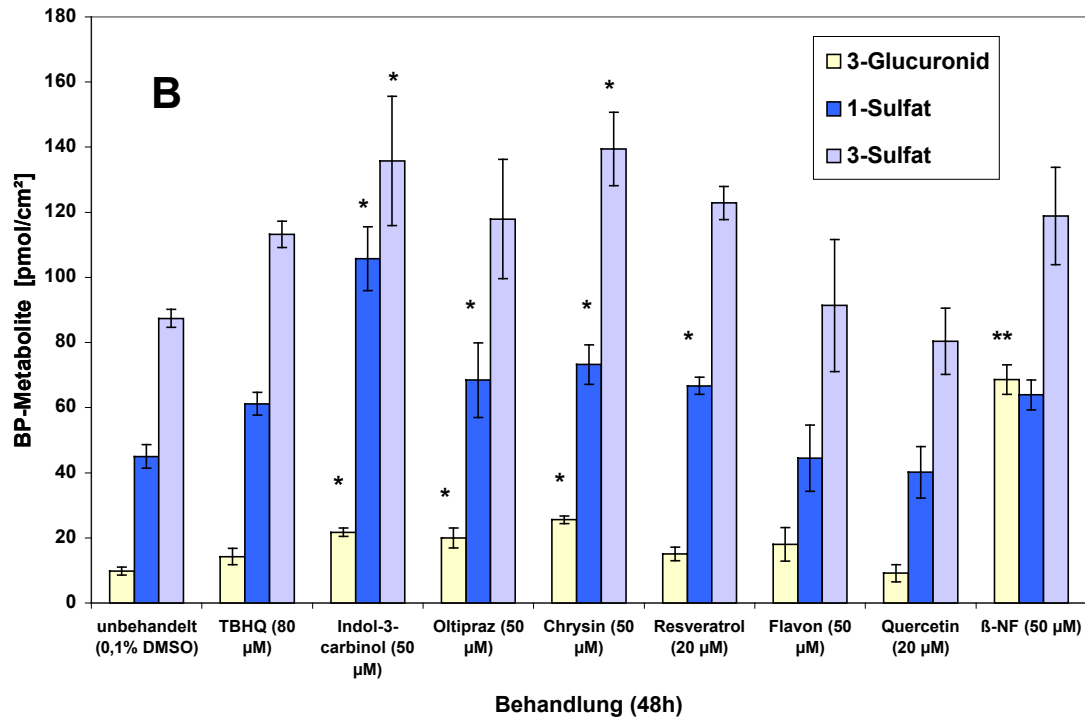


Abbildung 14a.: Effekte einer Vorbehandlung (48h) von TC7-Zellen mit verschiedenen sek. Pflanzeninhaltsstoffen, TBHQ und β -NF auf den Metabolismus von BP (10 μ M) zu BP-3-glucuronid nach einer Inkubation von 12h. Die Werte aus n = 3 Bestimmungen sind dargestellt als % der Kontrolle \pm Standardabweichung in der Reihenfolge ihrer Effektivität. * Markiert statistisch signifikante Werte ($P < 0,05$; ANOVA, Tukey-Test) gegenüber der Kontrolle. ** $P < 0,001$, ANOVA

Wie in Abbildung **14a.** dargestellt, wurden die höchsten Gehalte an BP-3-glucuronid im Medium der β -NF-vorbehandelten Zellen ($635 \pm 10\%$ der Kontrolle) detektiert, gefolgt von Luteolin ($268 \pm 38\%$ der Kontrolle), Chrysin ($262 \pm 5\%$) und Indol-3-carbinol ($222 \pm 6\%$ der Kontrolle). Die Vorbehandlung mit Quercetin führte jedoch zu einer minimalen Erniedrigung des Gehaltes an BP-3-glucuronid im Medium der TC7-Zellen. Die Bildung der beiden Hauptmetabolite, BP-1- und BP-3-sulfat (Abbildungen **14b.** und **14c.**) konnte am stärksten durch die Vorbehandlung mit I3C ($235 \pm 9\%$ und $155 \pm 15\%$), β -NF ($215 \pm 12\%$, und $212 \pm 12\%$), Chrysin ($163 \pm 8\%$ und $155 \pm 8\%$) und Oltipraz ($152 \pm 17\%$ und $135 \pm 16\%$) erhöht werden. Interessant ist hierbei, dass das als AhR-Antagonist beschriebene Stilben Resveratrol die Bildung von allen drei Metaboliten erhöhen konnte, wobei die Erhöhung der Gehalts an BP-1-sulfat statistisch signifikant ($148 \pm 4\%$) war.



Abbildungen 14b.-c.: Effekte einer Vorbehandlung (48h) von TC7-Zellen mit verschiedenen sek. Pflanzeninhaltsstoffen, TBHQ und β-NF auf den Metabolismus von BP (10 μM) zu BP-1-, BP-3-sulfat und BP-3-glucuronid nach einer Inkubation von 12h. Die Werte aus n = 3 Bestimmungen sind dargestellt in pmol/cm² ± Standardabweichung. * Markiert statistisch signifikante Werte (P < 0,05; ANOVA, Tukey-Test) gegenüber der Kontrolle.

Vergleicht man die Bildung von BP-1- und BP-3-sulfat von z. B. Flavon- und Oltipraz-behandelten Zellen zwischen der parentalen Zelllinie Caco-2 und dem Subklon TC7, findet man etwas höhere Gehalte an beiden Sulfat-Konjugaten im Medium von Caco-2-Zellen.

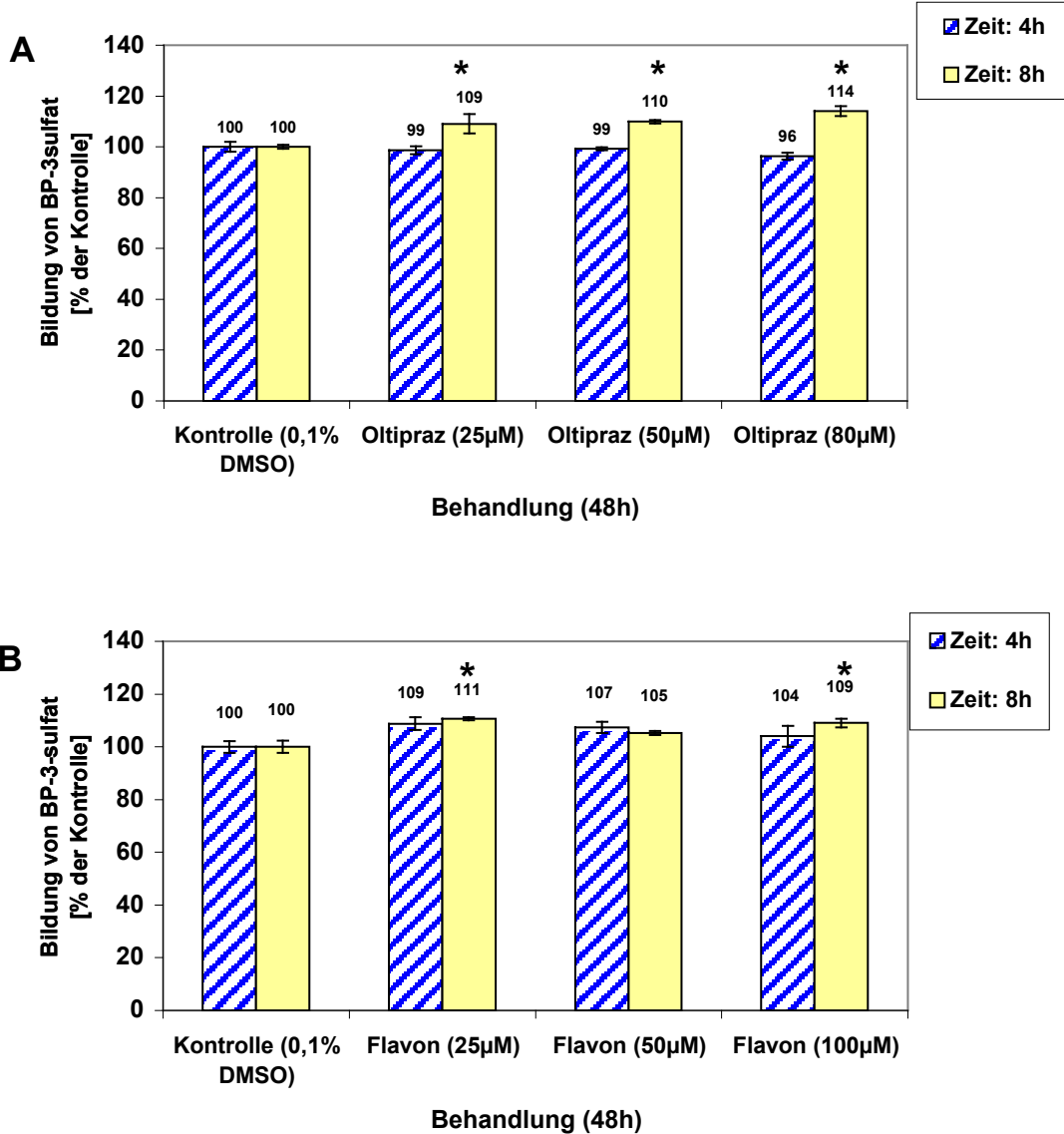
Flavon-behandelte Zellen bilden nach 12h Inkubationsdauer mit BP (10 μM) 191% an BP-1-sulfat im Vergleich zur Kontrolle, TC7-Zellen nur 99% der Kontrolle. Oltipraz-behandelte Caco-2-Zellen bilden 188% des Kontrollwertes an BP-3-sulfat, während TC7-Zellen nur 135% an BP-3-sulfat bilden. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass die von den TC7-Zellen gebildeten Phase I-Metabolite (1-OH-BP und 3-OH-BP) von zwei verschiedenen Phase II-Enzymen (SULTs *und* UGTs) umgesetzt werden und die Gesamtmenge an hydroxylierten BP-Metaboliten auf zwei Reaktionswege „verteilt“ wird.

3.1.2. Modulation von Phase II-Enzymen/ ABC-Transport-Proteinen

3.1.2.1. Zeitabhängigkeit/ Konzentrationsabhängigkeit

Um zu untersuchen, zu welchem Ausmaß die beobachteten Effekte auf die Modulation von Phase II (SULTs und UGTs) und/ oder Phase III (Transport-Proteine) des Biotransformations-Prozesses zurückzuführen sind, wurden mit verschiedenen Substanzen vorbehandelte Caco-2-Zellen mit dem Phase I Haupt-Metaboliten des BP (3-Hydroxy-BP) inkubiert. Auf diese Weise konnte der Effekt der Behandlung auf den Phase I-Metabolismus ausgeschlossen werden. Um auch eventuelle Konzentrations- und Zeitabhängigkeiten zu erfassen, wurden die Zellen wie unter Punkt 2.2.3.1.a. im Kapitel *Material und Methoden* beschrieben mit drei verschiedenen Konzentrationen von Oltipraz oder Flavon für 48h vorbehandelt (25 μM , 50 μM und 80 μM (Oltipraz) bzw. 100 μM (Flavon)). Die nachfolgende Inkubation mit 3-OH-BP (5 μM) wurde für 4h und 8h durchgeführt. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen **15a.** und **15b.** dargestellt.

Im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen wurde bei den Oltipraz- und Flavon-vorbehandelten Zellen nur eine sehr geringe Steigerung der Umsetzung von 3-OH-BP zu BP-3-sulfat beobachtet. Trotz der geringen Unterschiede zur Kontrolle ergaben sich für die längere Inkubationsdauer von 8h für beide Behandlungen statistisch signifikante Unterschiede im Vergleich zu den Kontrollzellen ($P < 0,05$; *t*-Test). Die größte Steigerung des Gehaltes an BP-3-sulfat im Medium konnte bei Oltipraz-behandelten Zellen (80 μM) nach 8h beobachtet werden (114% der Kontrollwertes, Abbildung **15a.**). Nach einer 4-stündigen Inkubation mit dem Substrat konnte keine Erhöhung festgestellt werden. Die Behandlung mit Flavon (25 μM , Abbildung **15b.**) konnte den Gehalt an BP-3-sulfat auf maximal 111% des Kontrollwertes nach 8h Inkubation anheben. Hieraus kann geschlossen werden, dass (a) die Sulfotransferasen nicht durch die Behandlung beeinflusst werden, was auch in Experimenten zur Untersuchung der Genexpression (mRNA, Daten nicht gezeigt) bestätigt werden konnte und (b) ein Effekt auf den beteiligten ABC-Transporter aufgrund der geringen Erhöhung von BP-3-sulfat im Medium der behandelten Zellen zumindest unter den hier angewendeten experimentellen Bedingungen nicht eindeutig zu erkennen ist.



Abbildungen 15a.-b.: Effekte einer Vorbehandlung (48h) von Caco-2-Zellen mit Oltipraz (A) (25, 50 und 80 µM) und Flavon (B) (25, 50 und 100 µM) auf den Metabolismus von 3-OH-BP (5 µM) zu BP-3-sulfat nach einer Inkubation von 4h und 8h. Die Werte aus n = 3 Bestimmungen sind dargestellt in % der Kontrolle ± Standardabweichung. Trotz der geringen Unterschiede ergaben sich für die Inkubationsdauer von 8h für beide Behandlungen statistisch signifikante Erhöhungen (P < 0,05; t-Test.) der BP-3-sulfat Gehalte im Medium im Vergleich zur Kontrolle, mit Ausnahme der Flavon (50 µM) behandelten Zellen.

3.1.2.2. Effekte auf die Bildung von BP-3-glucuronid und BP-3-sulfat

Da das an der Bildung von BP-3-glucuronid hauptsächlich beteiligte Enzym UGT1A6 AhR-abhängig induzierbar ist, war es ebenfalls von Interesse, ob eine stärkere Metabolisierung von BP zu BP-3-glucuronid nur auf die vermehrte Bildung von Phase I-Metaboliten (3-OH-BP) aufgrund der Induktion von CYP1A1/1B1 zurückzuführen war. Für diesen Versuch wurden TC7-Zellen eingesetzt, da diese UGT1A6 stärker konstitutiv exprimieren (Münzel *et al.*, 1996). Zur Vorbehandlung der Zellen wurden einerseits bekannte starke AhR-Agonisten, wie β-NF, 3-Methylcholanthren (3-MC) und Benzo[k]fluoranthren (B[k]F) ausgewählt und

andererseits Substanzen, die sowohl AhR-Agonisten sind (Oltipraz, Quercetin, Dibenzoylmethan) und/ oder ARE-abhängige Gentranskriptionen induzieren können (Oltipraz, Quercetin, TBHQ). Die Ergebnisse sind in Abbildung 16 dargestellt.

Besonders auffällig ist die starke Erhöhung von BP-3-glucuronid ($504 \pm 10\%$) im Medium der Oltipraz-vorbehandelten Zellen. Eine nennenswerte Steigerung des Gehaltes an BP-3-glucuronid konnte des weiteren durch die Behandlung mit β -NF ($183 \pm 7\%$) und Dibenzoylmethan (DBM) erreicht werden ($135 \pm 8\%$). Die Quercetin-behandelten Zellen setzen das Substrat jedoch schlechter um als die Kontrolle ($55 \pm 3\%$). Die Bildung und Exkretion des Hauptmetaboliten, BP-3-sulfat, konnte durch die Behandlungen jedoch nur sehr schwach erhöht werden. Die größte Steigerung des BP-3-sulfat-Gehaltes im Medium konnte bei den Oltipraz-behandelten Zellen ($136 \pm 7\%$), gefolgt von den β -NF- und den DBM-behandelten Zellen (beide 113% der Kontrolle) beobachtet werden.

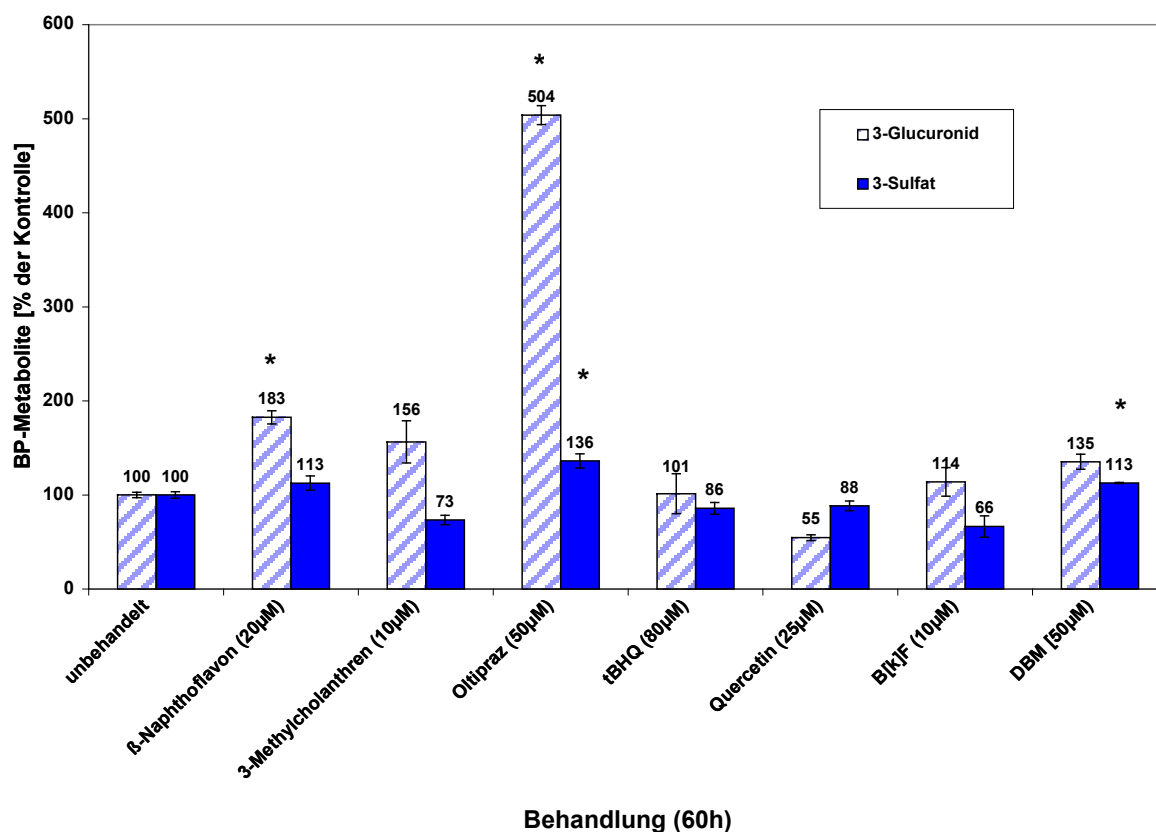


Abbildung 16: Effekte einer Vorbehandlung (60h) von Caco-2-Zellen mit verschiedenen AhR-Agonisten/ UGT1A6-Induktoren auf den Metabolismus von 3-Hydroxy-BP (5μ M) zu BP-3-glucuronid (schraffierte Balken) und BP-3-sulfat (gefüllte Balken) nach einer Inkubation von 4h. Die Werte aus $n = 3$ Bestimmungen sind dargestellt in % der Kontrolle \pm Standardabweichung. * Markiert statistisch signifikante Werte ($P < 0,05$; ANOVA, Tukey-Test) gegenüber der Kontrolle.

3.2. Transportexperimente

3.2.1. Effekte von Oltipraz, Flavon und Indol-3-carbinol auf den Transport von BP-1- und BP-3-sulfat

Um zu untersuchen, ob ein verstärkter Metabolismus von BP durch die Modulation von Phase I auch in einem gerichteten Transport der gebildeten Metabolite (BP-1- und BP-3-sulfat) resultiert, wurden entsprechende Inkubationsexperimente mit Caco-2-Zellen unternommen, welche auf Transwell™-Platten kultiviert wurden. Wie unter Punkt 2.2.3.3. im Kapitel *Material und Methoden* beschrieben, wurden ausdifferenzierte Caco-2-Zellen zunächst für 48h mit Flavon (50 µM), Oltipraz (50 µM) oder I3C (50 µM) behandelt, daraufhin für 4h, 8h, 18h und 24h mit dem Substrat BP (10 µM) inkubiert und die Menge der von den Zellen zu beiden Seiten der Transwell™-Kammern abgegebenen Metabolite BP-1- und BP-3-sulfat bestimmt. In den Abbildungen 17a. bis d. ist der Nettoflux (Wert a – Wert b) von BP-1-sulfat zur apikalen Seite der Transwell™-Kammern in [pmol/cm²] dargestellt. Die entsprechende Grafik für den zweiten Metaboliten, BP-3-sulfat, verläuft sehr ähnlich. Zum Vergleich der Effektivität der Vorbehandlung auf die Bildung und den Transport beider Metabolite können hier die Abbildungen 17d. und 17e. herangezogen werden, in denen die Gehalte von BP-1-sulfat (17d.) und BP-3-sulfat (17e.) als [%] der Kontrolle dargestellt sind.

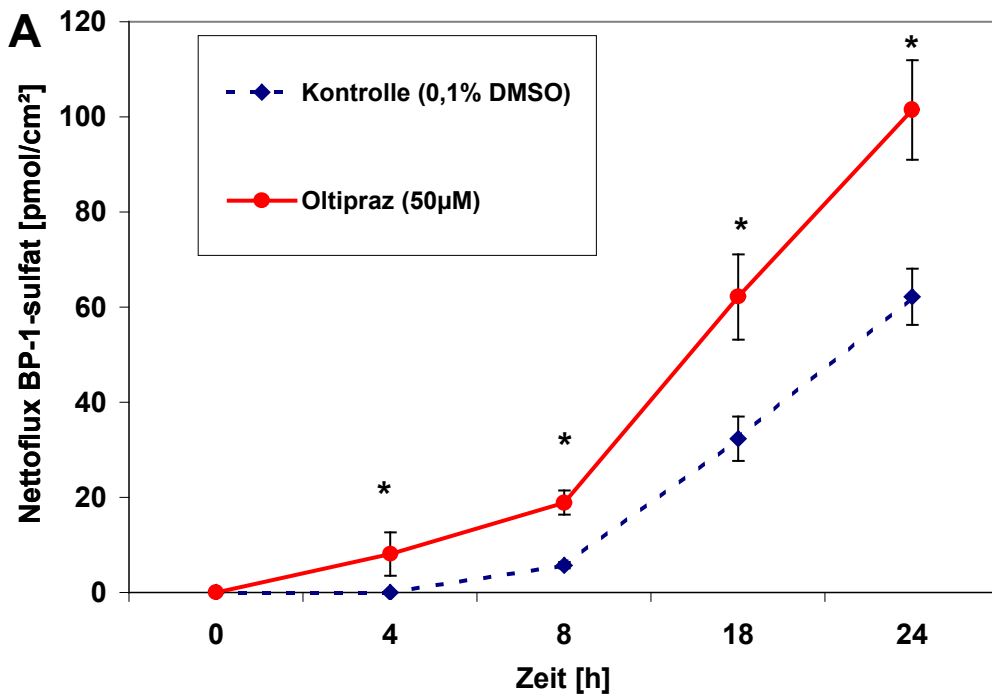
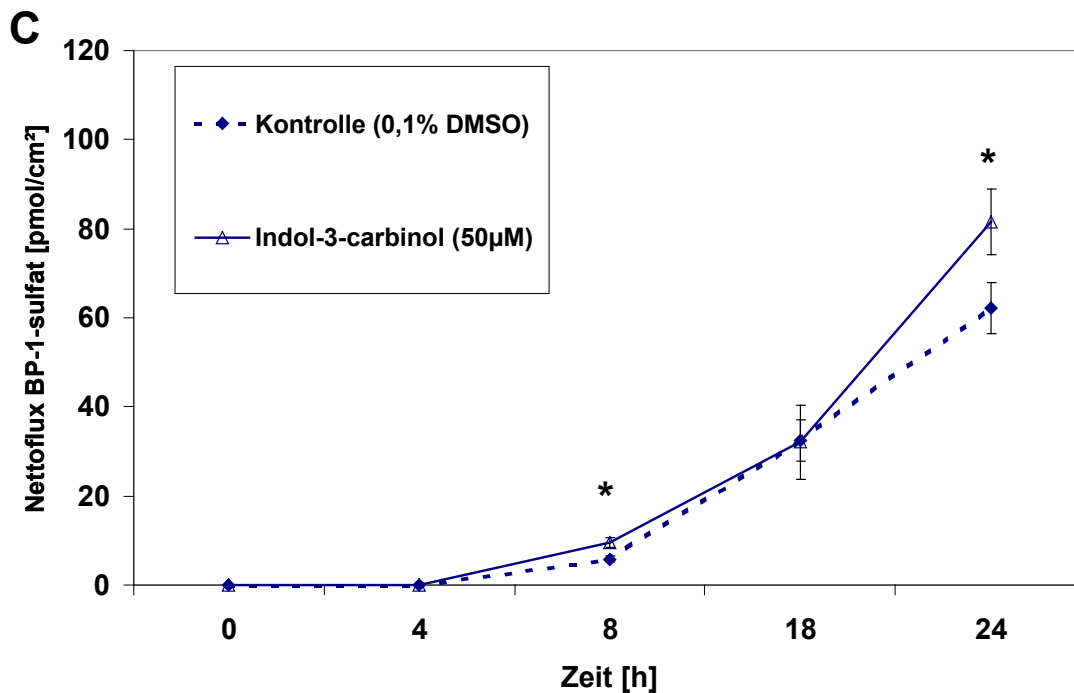
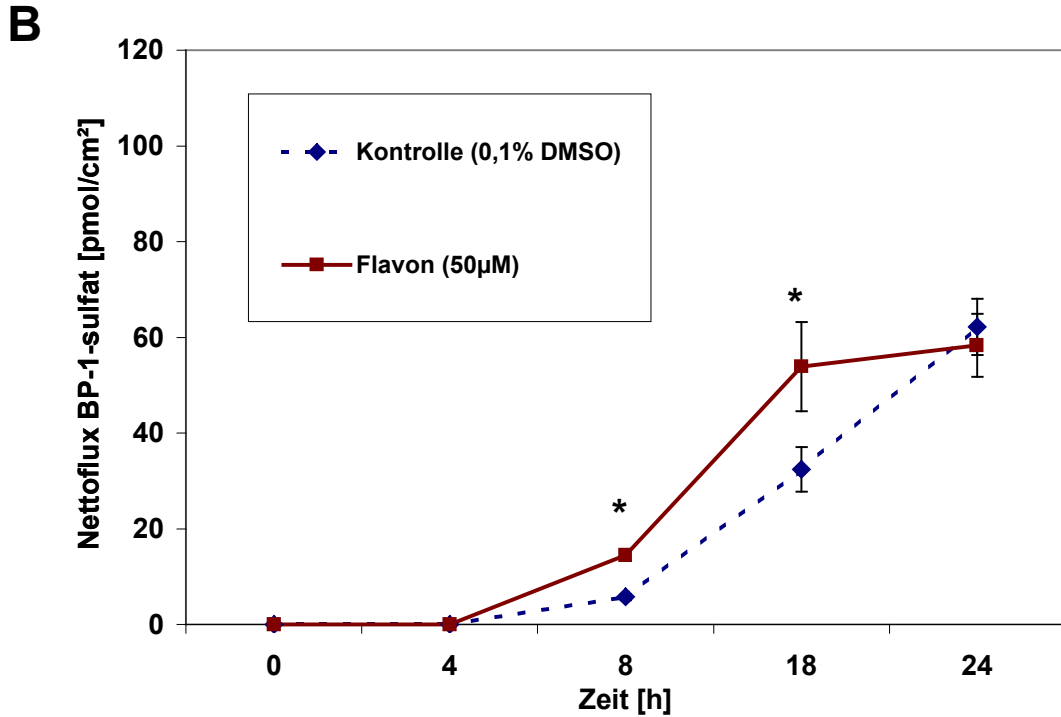


Abbildung 17a: Effekte einer Vorbehandlung (48h) von Caco-2-Zellen mit Oltipraz (50 µM) auf den Metabolismus von BP (10 µM) zu BP-1-sulfat und dessen Transport. Die Werte aus n = 3 Bestimmungen sind dargestellt als Nettoflux (apikal) in pmol/cm² ± Standardabweichung. * Markiert statistisch signifikante Werte (P < 0,05; ANOVA, Tukey-Test) gegenüber der Kontrolle.

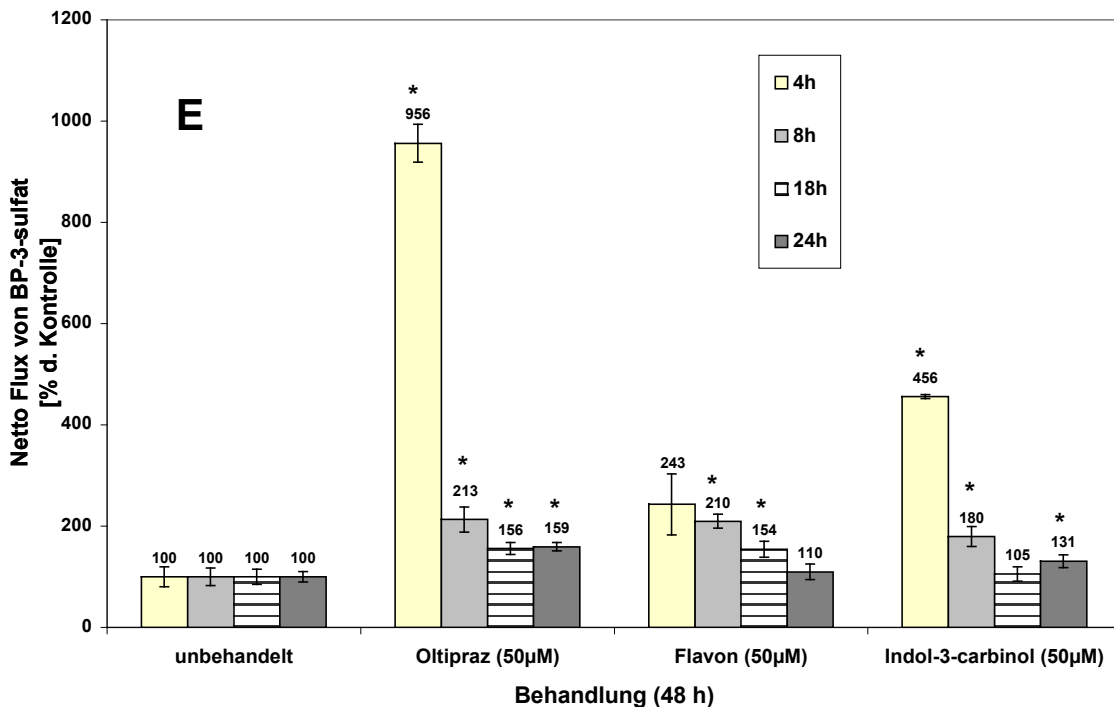
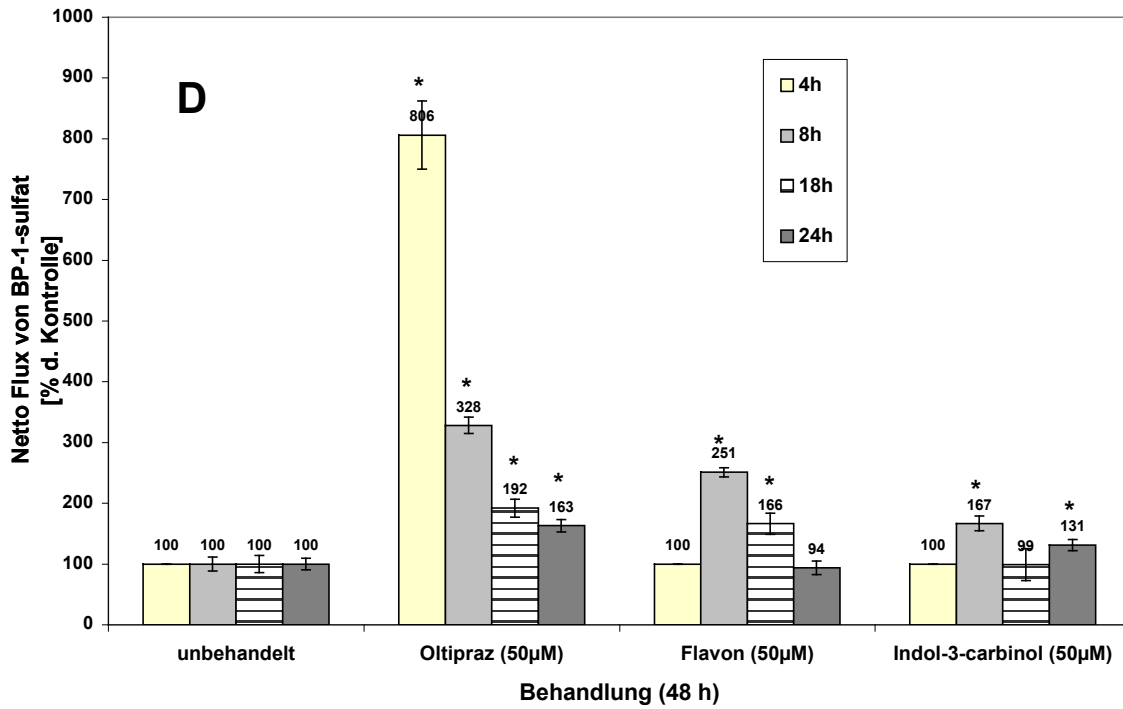


Abbildungen 17b und c: Effekte einer Vorbehandlung (48h) von Caco-2-Zellen mit Flavon (**B**) und I3C (**C**) auf den Metabolismus und von BP (10 µM) zu BP-1-sulfat und dessen Transport nach einer Inkubation von 4h, 8h, 18h und 24h. Die Werte aus n = 3 Bestimmungen sind dargestellt als Nettoflux (apikal) in pmol/cm² ± Standardabweichung. * Markiert statistisch signifikante Werte (P < 0,05; ANOVA, Tukey-Test) gegenüber der Kontrolle.

Wie aus den Abbildungen **17a.-c.** zu entnehmen ist, resultieren die Vorbehandlungen mit Oltipraz, Flavon und I3C in einem deutlichen Netto-Transport zur apikalen (luminalen) Seite der Transwell™-Kammer. Dabei konnte die stärkste Erhöhung des Transportes beider Sulfat-Konjugate im Vergleich zu den unbehandelten Zellen durch die Behandlung mit Oltipraz (50

µM) erzielt werden. Wie auch schon für den Metabolismus gezeigt, so lässt sich die Effektivität der Behandlungen in folgender Reihenfolge darstellen:

Oltipraz > Flavon > Indol-3-carbinol.



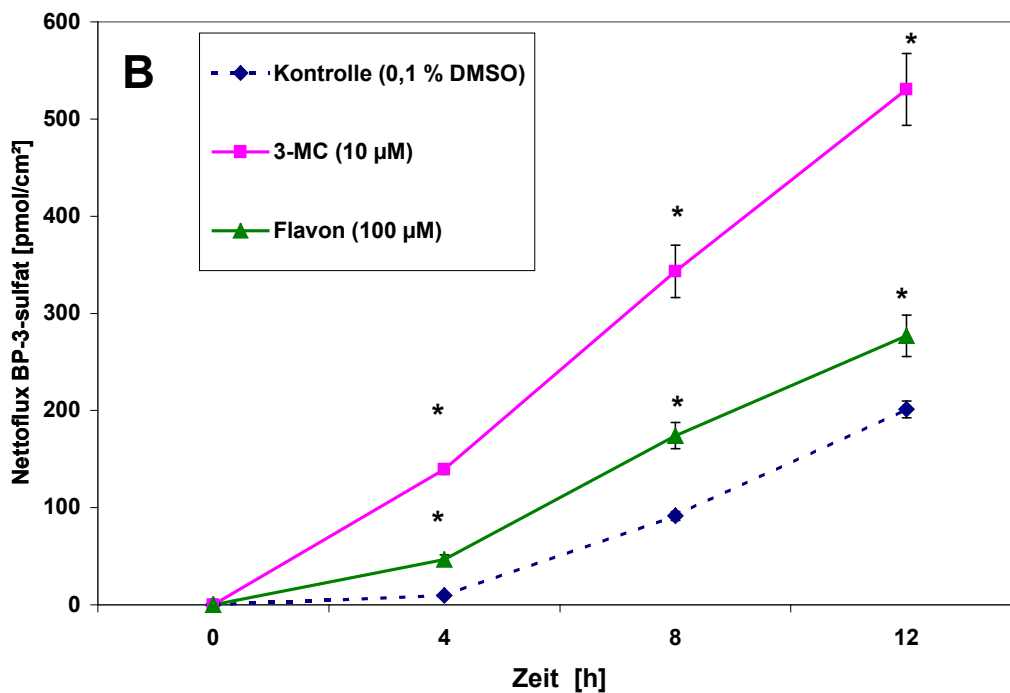
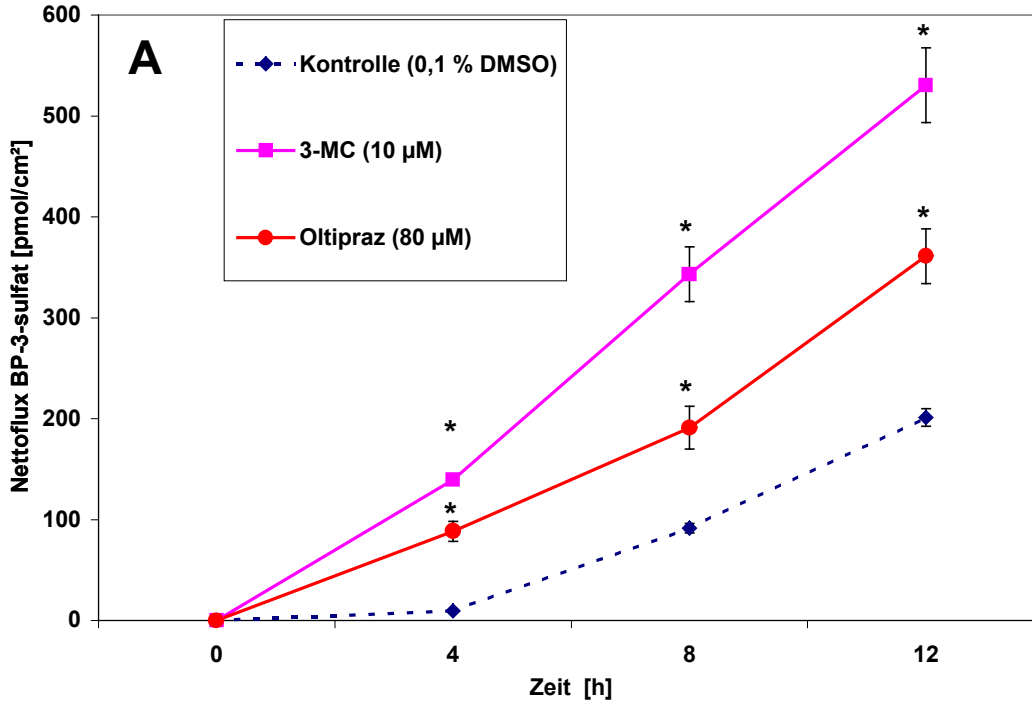
Abbildungen 17d. und e.: (Transportversuch) Effekte einer Vorbehandlung (48h) von Caco-2-Zellen mit Oltipraz, Flavon und I3C auf den Metabolismus von BP (10 µM) zu BP-1-sulfat (D) und BP-3-sulfat (E) nach einer Inkubation von 4h, 8h, 18h und 24h. Die Werte aus n = 3 Bestimmungen sind dargestellt als Nettoflux (apikal) in % der Kontrolle ± Standardabweichung. * Markiert statistisch signifikante Werte (P < 0,05; ANOVA, Tukey-Test) gegenüber der Kontrolle.

Die Oltipraz-Vorbehandlung führte für den Transport beider Metabolite für jeden Zeitpunkt zu statistisch signifikanten ($P < 0,05$; ANOVA, Tukey-Test) Erhöhungen im Vergleich zur Kontrolle, wobei nach der kürzesten Inkubationsdauer von 4h die stärksten Unterschiede sowohl für den Transport von BP-3-sulfat ($956 \pm 37\%$, s. Abb. **17e.**) als auch von BP-1-sulfat ($806 \pm 56\%$, s. Abb. **17c.**) zu beobachten war. Vergleicht man die Erhöhung der Level beider BP-Sulfate untereinander, so ergibt sich für den Transport von BP-1-sulfat für die Zeitpunkte 8h, 18h und 24h ein jeweils höherer Wert als für BP-3-sulfat (z. B. **8h**: $328 \pm 13\%$ für BP-1- und $213 \pm 25\%$ für BP-3-sulfat). Betrachtet man die prozentuale Erhöhung beider BP-Sulfat-Konjugate im *Verlauf der Inkubationsdauer*, so fällt auf, dass die Unterschiede zur Kontrolle mit der Dauer der Inkubation stetig abnahmen, die I3C-behandelten Zellen nach der längsten Inkubationszeit von 24h jedoch wieder etwas mehr BP-1- und BP-3-sulfat (jeweils 131 %) zur apikalen Seite der Transwell™-Kammer transportierten, als nach 18h (99 % und 105%). Dieser geringe Anstieg könnte ein Hinweis darauf sein, dass nach dieser Zeit (insgesamt 72h: 48h Vorbehandlung und 24h Inkubation) das beteiligte Transportprotein BCRP funktionell induziert ist.

3.2.2. Effekte von Oltipraz und Flavon: Konzentrationsabhängigkeit und Effekte einer Vorbehandlung mit dem prototypischen AhR-Agonisten 3-MC

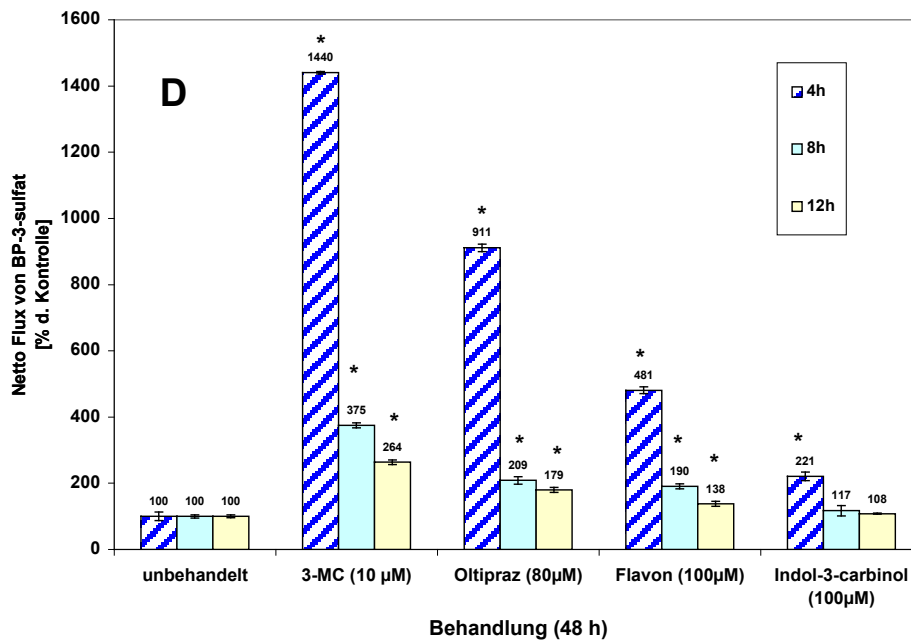
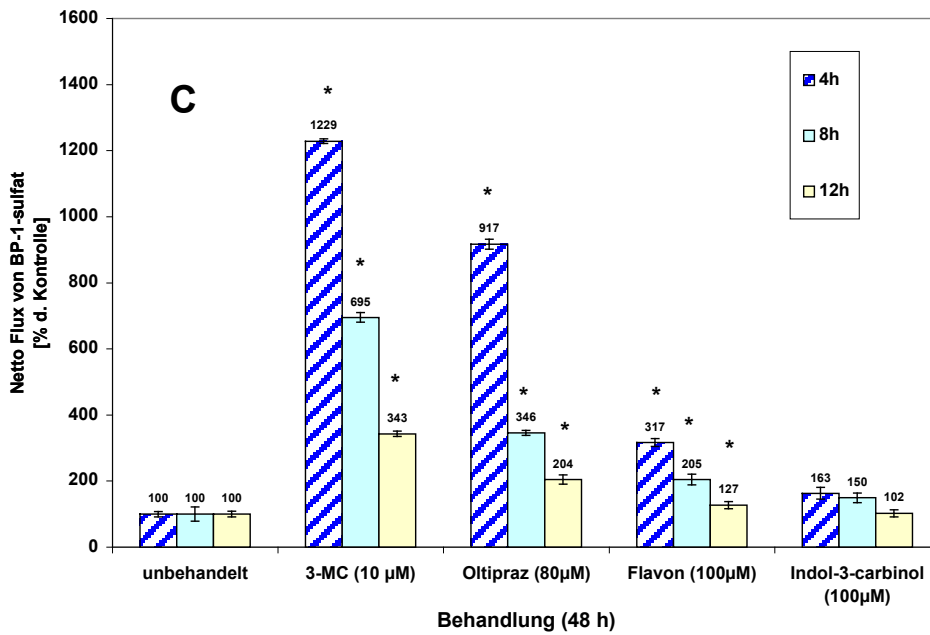
Da sich aus den Experimenten zum Metabolismus von BP eine Konzentrationsabhängigkeit zwischen Behandlung und Steigerung der Bildung (und Exkretion) von BP-Sulfat-Konjugaten ergab, war es zu klären, ob dies auch für den gerichteten Transport der BP-Metaboliten BP-1- und BP-3-sulfat galt. Des weiteren war es von Interesse, wie sich eine Vorbehandlung mit einem im Vergleich zu Oltipraz, Flavon und I3C stärkeren AhR-Agonisten und CYP1A1-Induktor, dem PAK 3-Methylcholanthren (3-MC), auf die Bildung und den Transport der BP-Sulfate auswirkt. Für diesen Versuch wurden auf Transwell™-Platten kultivierte Caco-2-Zellen für 48h mit Oltipraz ($80 \mu\text{M}$; die Löslichkeit limitierte die Konzentration), Flavon ($100 \mu\text{M}$) und 3-MC ($10 \mu\text{M}$) vorbehandelt und dann für 4h, 8h und 12h mit dem Substrat BP ($10 \mu\text{M}$) inkubiert. In den Abbildungen **18 a.** und **18b.** ist der Netto-Transport von BP-3-sulfat für Oltipraz- (**A**) und Flavon-vorbehandelte Zellen (**B**) in pmol/cm^2 dargestellt, jeweils im Vergleich zu den 3-MC-behandelten Zellen. Die Behandlung mit dem PAK 3-MC resultierte erwartungsgemäß in der größten Steigerung des Netto-Transportes beider Sulfat-Konjugate. Wie aus den Abbildungen **18c.** und **18d.** zu entnehmen ist, war diese Steigerung wiederum nach der kürzesten Inkubationsdauer (4h) am größten (1223% der Kontrolle an BP-1- und 1440% an BP-3-sulfat) und fiel dann stetig bis auf 340% und 260% (BP-1- bzw. BP-3-sulfat). Die 3-MC-behandelten Zellen transportierten jedoch auch nach 12h immer noch mehr Sulfat-Konjugate zur apikalen Seite der Transwell™-Kammer, als die anderen Behandlungsgruppen. Wie in den Abbildungen **18c.** und **d.** dargestellt, so konnte durch den Einsatz einer höheren

Konzentration an Oltipraz (hier: 80 μM statt 50 μM) und Flavon (hier: 100 μM statt 50 μM) zur Vorbehandlung der Zellen teilweise noch zu einer Steigerung des apikal gerichteten Netto-Transportes der BP-Sulfate f"uhren.



Abbildungen 18 a. und b.: Effekte einer Vorbehandlung (48h) von Caco-2-Zellen mit Oltipraz (80 μM , **A**) und Flavon (100 μM , **B**) auf den Metabolismus von BP (10 μM) zu BP-3-sulfat und dessen Transport nach einer Inkubation von 4h, 8h und 12h, (3-MC (10 μM) = Positivkontrolle). Die Werte aus $n = 3$ Bestimmungen sind dargestellt als Nettoflux (apikal) in pmol/ cm² \pm Standardabweichung. * Markiert statistisch signifikante Werte ($P < 0,05$, ANOVA, Tukey-Test) gegen"uber der Kontrolle.

Hier konnte die stärkste Steigerung nach einer 4-stündigen Inkubation mit BP durch eine Vorbehandlung mit Flavon erreicht werden (481 % an BP-3-sulfat, Abb. 18d. und 317% an BP-1-sulfat, Abb. 18c.). Eine Behandlung mit 50 µM an Flavon (wie im vorangegangenen Abschnitt gezeigt) führte nach einer Inkubation von 4h nur zu einer Steigerung von 243% des Transportes von BP-3-sulfat (Abb. 17e.) und es konnte kein vermehrter Transport von BP-1-sulfat (Abb. 17d.) beobachtet werden.



Abbildungen 18 c und d: (Transportversuch) Effekte einer Vorbehandlung (48h) von Caco-2-Zellen mit 3-MC (10 µM), Oltipraz (80 µM) Flavon (100 µM) und I3C (100 µM) auf den Metabolismus von BP (10 µM) zu BP-1-sulfat (C) und BP-3-sulfat (D) nach einer Inkubation von 4h, 8h und 12h. Die Werte aus n = 3 Bestimmungen sind dargestellt als Nettoflux (apikal) in % der Kontrolle ± Standardabweichung.

* Markiert statistisch signifikante Werte (P < 0,05; ANOVA, Tukey-Test) gegenüber der Kontrolle.

Keine Steigerung des apikal gerichteten Transportes der Sulfat-Konjugate konnte jedoch durch die Vorbehandlung mit einer höheren Konzentration an Indol-3-carbinol (100 μM) erzielt werden (Abb. 18 c und 18d).

3.2.3. Chemische Hemmung von Transportproteinen: Hemmung von MRP2

Um den am Transport von BP-1- und BP-3-sulfat beteiligten ABC-Transporter zu identifizieren, wurden die Caco-2-Zellen zunächst (wie unter *Punkt 2.2.3.3.b.* beschrieben) mit dem MRP2-Hemmer Genistein (Jager *et al.*, 1997) vorinkubiert und daraufhin mit dem Substrat BP (10 μM) und Genistein (25 μM) zusammen inkubiert. In den Abbildungen 19a. und b. ist der apikal gerichtete Nettoflux von BP-1-sulfat (A) und BP-3-sulfat (B) über einen Zeitraum von 4h, 6h, 8h und 12h dargestellt.

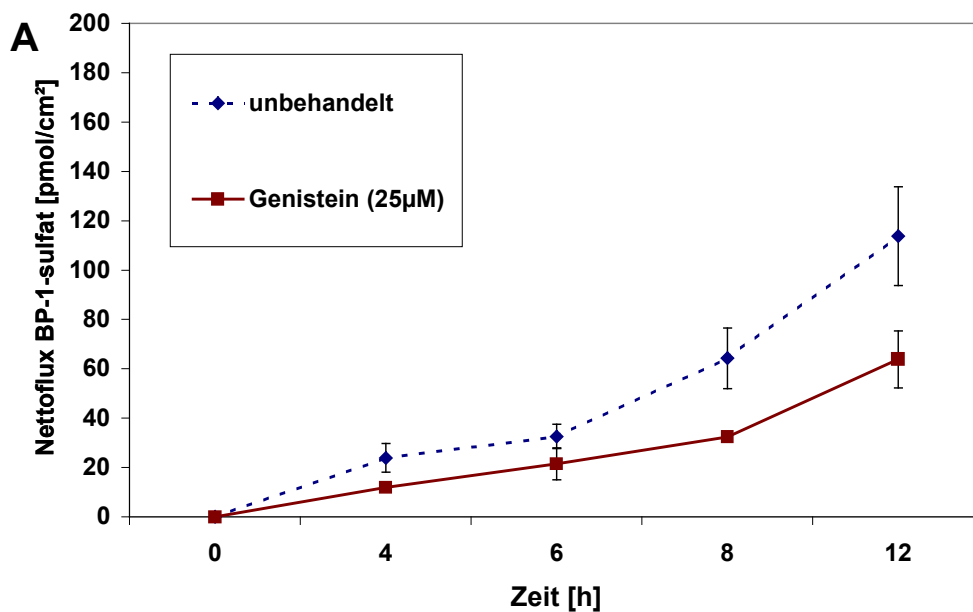


Abbildung 19a.: Chemische Hemmung von MRP2 durch Co-Inkubation von Caco-2-Zellen mit Genistein (25 μM) und BP (10 μM) und Einfluss auf den Transport von BP-1-sulfat (A). Die Werte aus $n = 3$ Bestimmungen sind dargestellt als Nettoflux (apikal) in $\text{pmol}/\text{cm}^2 \pm$ Standardabweichung. Für alle Messpunkte ergaben sich statistisch signifikante Werte ($P < 0,05$; ANOVA, Tukey-Test) gegenüber der Kontrolle.

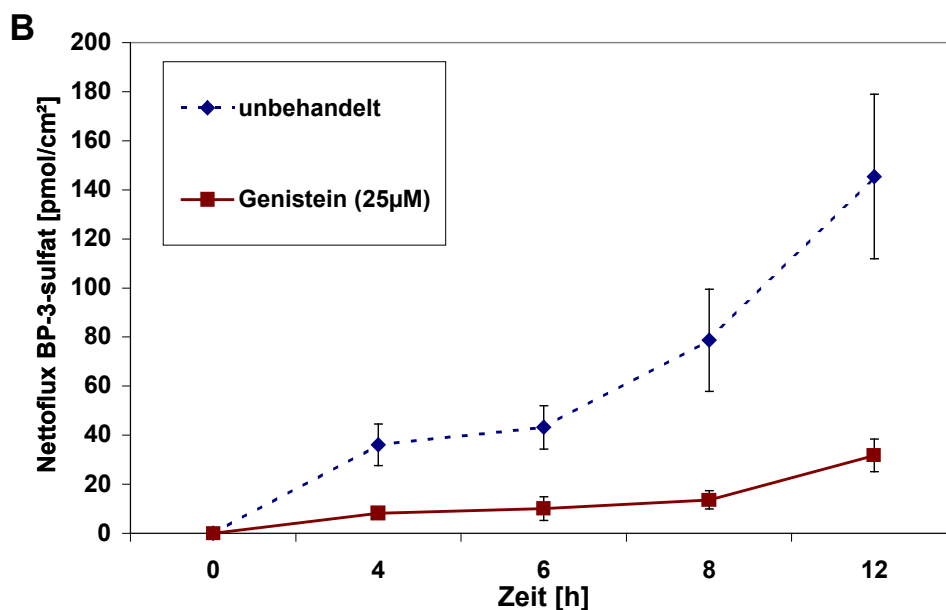


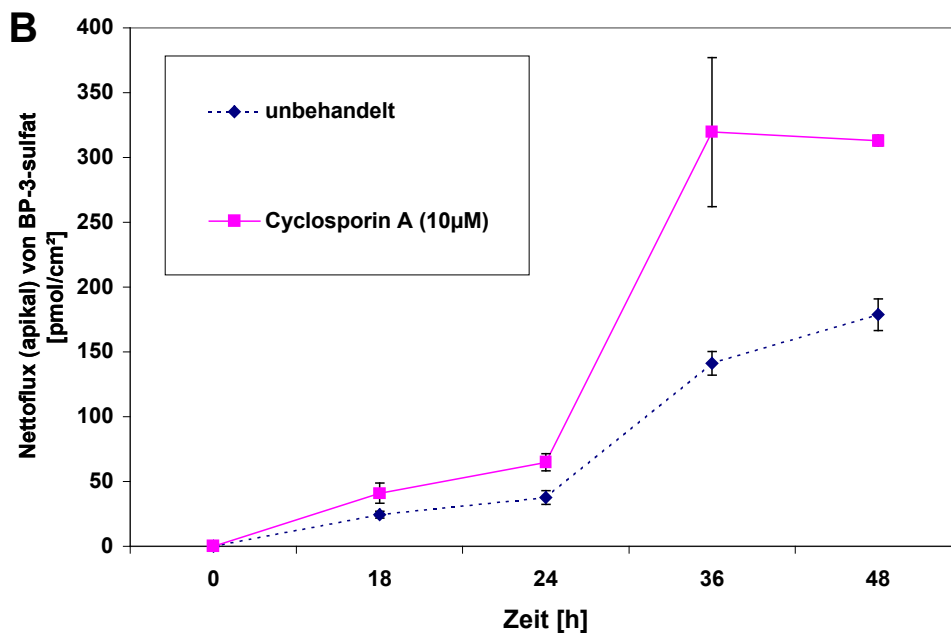
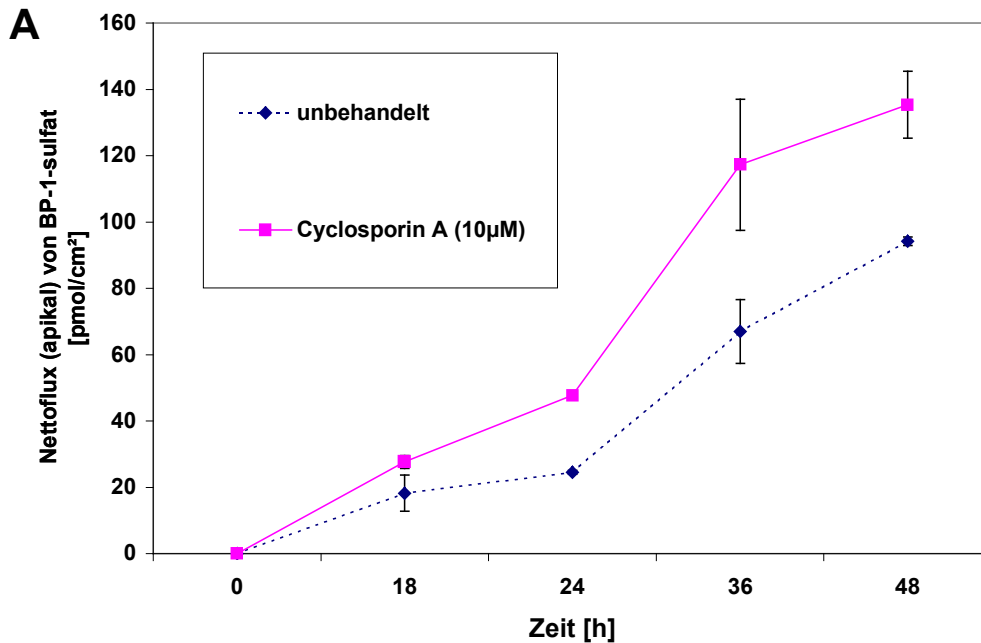
Abbildung 19b.: Chemische Hemmung von MPR2 durch Co-Inkubation von Caco-2-Zellen mit Genistein (25 µM) und BP (10 µM) und Einfluss auf den Transport von BP-3-sulfat (B). Die Werte aus $n = 3$ Bestimmungen sind dargestellt als Nettoflux (apikal) in $\text{pmol}/\text{cm}^2 \pm$ Standardabweichung. Für alle Messpunkte ergaben sich statistisch signifikante Werte ($P < 0,05$; ANOVA, Tukey-Test) gegenüber der Kontrolle.

Die zur apikalen Seite des Transwell™-Systems transportierten Mengen an BP-Sulfaten liegen für alle Zeitpunkte unter den Mengen der Kontrolle. Betrachtet man jedoch die von beiden Gruppen (Genistein-behandelt und Kontrolle) gebildeten und transportierten *Gesamt*mengen an BP-1- und BP-3-sulfat (nicht gezeigt), so ergibt sich nur für den Metaboliten BP-1-sulfat für die ersten beiden Zeitpunkte 4h und 6h eine deckungsgleiche Kurve. Dies bedeutet, dass nur in diesem Bereich die Verminderung des Transportes von BP-1-sulfat auf eine *Hemmung der Transportes* und nicht auf eine Hemmung des Metabolismus zurückzuführen ist. Besonders der Netto-Transport von BP-3-sulfat (Abb. 19b.) der Genistein-behandelten Zellen weist deutliche Unterschiede zu den unbehandelten Kontrollzellen auf, die Betrachtung der insgesamt gebildeten Mengen an BP-3-sulfat lässt jedoch den Schluss zu, dass dies auf eine Hemmung des Metabolismus von BP zurückzuführen ist. An dieser Stelle sei angemerkt, dass Genistein ein effektiver Hemmer der Phenol-Sulfotransferasen ist (Eaton *et al.*, 1996) jedoch auch kürzlich als BCRP-Hemmer identifiziert wurde (Imai *et al.*, 2004).

3.2.4. Chemische Hemmung von Transportproteinen: Hemmung von P-Gp

Die Co-Inkubation mit dem P-Glycoprotein-Hemmer Cyclosporin A (CsA, 10 µM) führte ebenfalls nicht zu einer Hemmung des Transportes von BP-1- (Abb. 20a.) und BP-3-sulfat (Abb. 20b.), sondern eher noch zu einer vermehrten Bildung und apikal gerichtetem

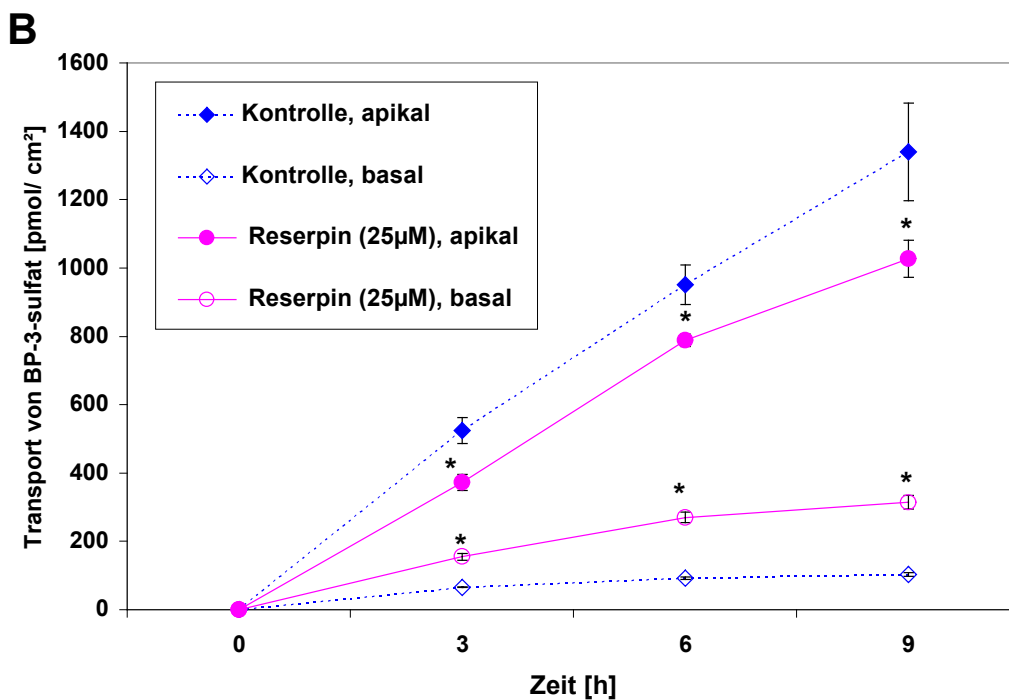
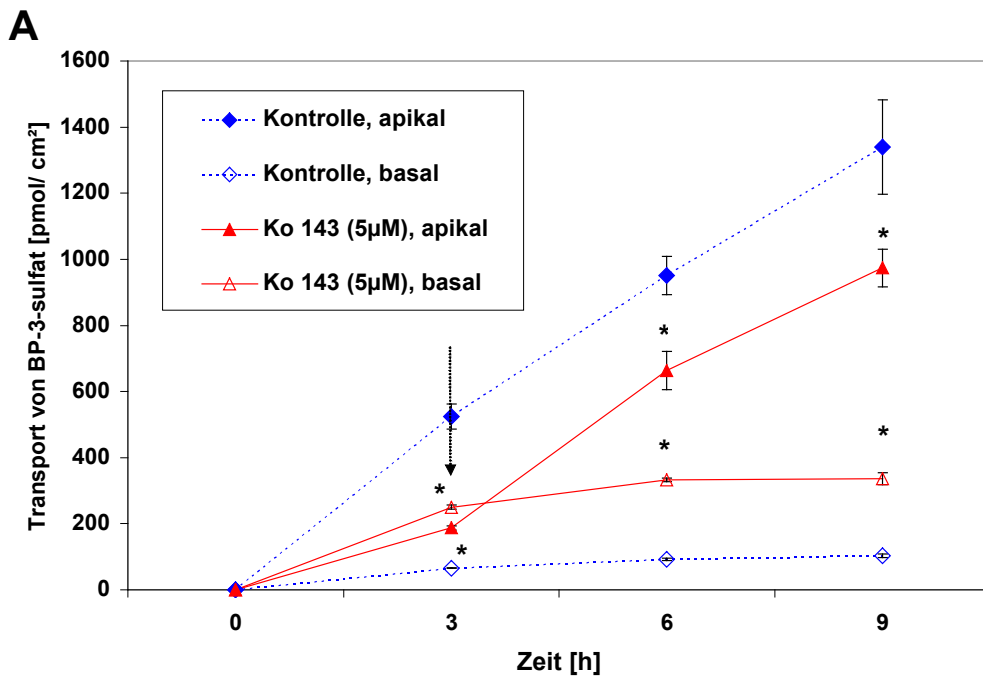
Nettotransport beider Metabolite. Dies könnte auf eine Induktion von Phase I oder durch die Beeinflussung der Expression des beteiligten Transportproteins zurückzuführen sein.

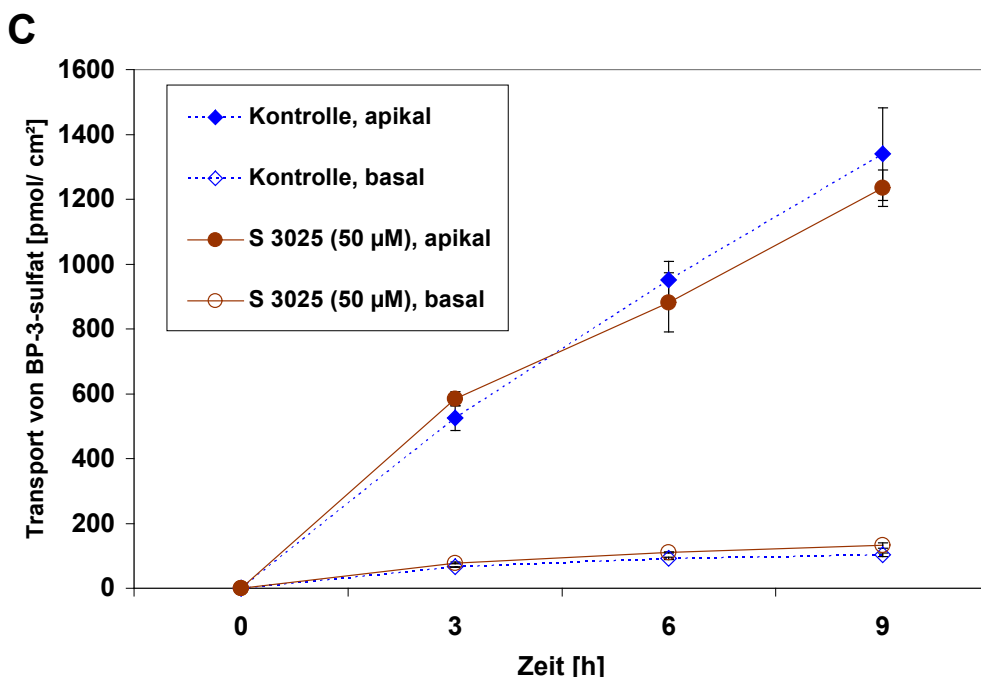


Abbildungen 20 a. und b.: Nettotransport von BP-1-sulfat (A) und BP-3-sulfat (B) durch TC7-Zellen nach Co-Inkubation mit P-Gp-Hemmer Cyclosporin A (CsA, 10 µM). Die Mittelwerte aus n = 3 Bestimmungen sind dargestellt in pmol/cm² ± Standardabweichung. Für alle Messpunkte ergaben sich statistisch signifikante Werte (P < 0,05, ANOVA, Tukey-Test) gegenüber der Kontrolle.

3.2.5. Chemische Hemmung von BCRP und MRP2 unter Ausschluss möglicher Effekte der Hemmung auf Phase I

Um die möglichen Effekte eines Hemmers von ABC-Transport-Proteinen auf dem Metabolismus von BP zu den Sulfat-Konjugaten weitgehend auszuschließen, wurde für die im folgenden Abschnitt beschriebenen Transportexperimente zur Identifizierung des beteiligten ABC-Transporters als Substrat 3-OH-BP eingesetzt.





Abbildungen 21a.-c.: Transport von BP-3-sulfat durch Caco-2-Zellen nach einer Co-Inkubation mit BCRP-Hemmern (Ko 143 (A), Reserpin (B)), bzw. mit einem MRP2-Hemmer (S 3025 (C)) und 3-OH-BP (5 µM). Dargestellt sind die Werte aus $n = 4$ Bestimmungen in $\text{pmol}/\text{cm}^2 \pm$ Standardabweichung.

* Markiert statistisch signifikante Werte ($P < 0,05$, ANOVA, Tukey-Test) gegenüber der Kontrolle.

Der Pfeil \longrightarrow in Abb.21a markiert die Umkehr des Netto-Transportes nach basal.

In den Abbildungen **21a.** bis **21c.** sind die jeweils zur apikalen und basolateralen Seite des Transwell™-Systems transportierten Mengen an BP-3-sulfat in Anwesenheit der BCRP-Hemmer Ko143 (5 µM) [Abb. **21a.**] und Reserpin (25 µM) [Abb. **21b.**] und des MRP2-Hemmers S3025 (50 µM), einem synthetischen Chlorogensäure-Derivat (Herling *et al.*, 2002), [Abb. **21c.**] dargestellt.

Aus den Ergebnissen dieses Experiments geht deutlich hervor, dass MRP2 nicht am Transport von BP-3-sulfat beteiligt ist, da die Zellen, welche mit dem MRP2-Hemmer S3025 inkubiert wurden, keinen Unterschied zu den Kontrollzellen zeigten. Die Berechnung der von den drei Behandlungsgruppen gebildeten Gesamtmengen an BP-3-sulfat ergab, dass die Co-Inkubation mit Ko 143, Reserpin und S3025 keinen Einfluss auf die *Bildung* des transportierten Metaboliten hatte. Denn auch nach Ausschluss der Einflussmöglichkeit auf Phase I durch den Einsatz des Phase I-Metaboliten 3-OH-BP als Substrat, könnte ein chemischer Inhibitor immer noch durch eine Interaktion mit den Sulfotransferasen die Bildung von BP-3-sulfat beeinflussen. Dies ist jedoch auszuschließen, was auch besonders deutlich wird aus der Tatsache, dass der stärkste BCRP-Hemmer, Ko 143, den normalerweise apikal gerichteten Netto-Transport von BP-3-sulfat umkehrt, das heißt, vermehrt BP-3-sulfat zur basolateralen Seite transportiert wird, da die Exkretionsmöglichkeit zur apikalen Seite durch die Hemmung von BCRP blockiert wird.

Wie aus Abb. **21a**. zu entnehmen ist, führte die Inkubation der Caco-2-Zellen mit dem selektiven BCRP-Hemmer Ko 143 (3h) zu einem basolateral gerichteten Netto-Transport von 14% ($62,46 \pm 2,11$ pmol/cm² zur basalen Kammer) im Vergleich zur Kontrolle ($459,28 \pm 36,96$ pmol/cm² zur apikalen Kammer, dies entspricht einem Unterschied von 114% im Vergleich zur Kontrolle; siehe Abb. **21d**.). In Abbildung **21d**. ist der Netto-Flux zur apikalen Kammer der Transwell[™]-Systems dargestellt. Die Co-Inkubation mit Reserpin (25 µM) hatte einen geringeren Effekt auf die Hemmung des apikal gerichteten Transportes von BP-3-sulfat ($373,77 \pm 23,03$ vs. $524,93 \pm 37,80$ pmol/cm²; dies entspricht 71% der Kontrolle oder ausgedrückt als Netto-Flux: 47% der Kontrolle) im Vergleich zur Hemmung mit Ko 143 ($187,41 \pm 6,22$ vs. $524,93 \pm 37,80$ pmol/cm²; dies entspricht 36% der Kontrolle oder ausgedrückt als Netto-Flux: -14% der Kontrolle). Aufgrund dieses geringeren inhibitorischen Effektes konnte keine Umkehr des Netto-Transportes durch Reserpin beobachtet werden. Im zeitlichen Verlauf über die Inkubationsdauer von 3h, 6h und 9h betrachtet, wird der hemmende Effekt von Ko 143 (nach 9h: 73% der Kontrolle nach apikal, bzw. 52% des Netto-Fluxes) und Reserpin (nach 9h: 77% d. Kontrolle nach apikal, bzw. 58% des Netto-Fluxes) immer schwächer, was auf eine Metabolisierung und/ oder Transport der hemmenden Substanzen hindeutet.

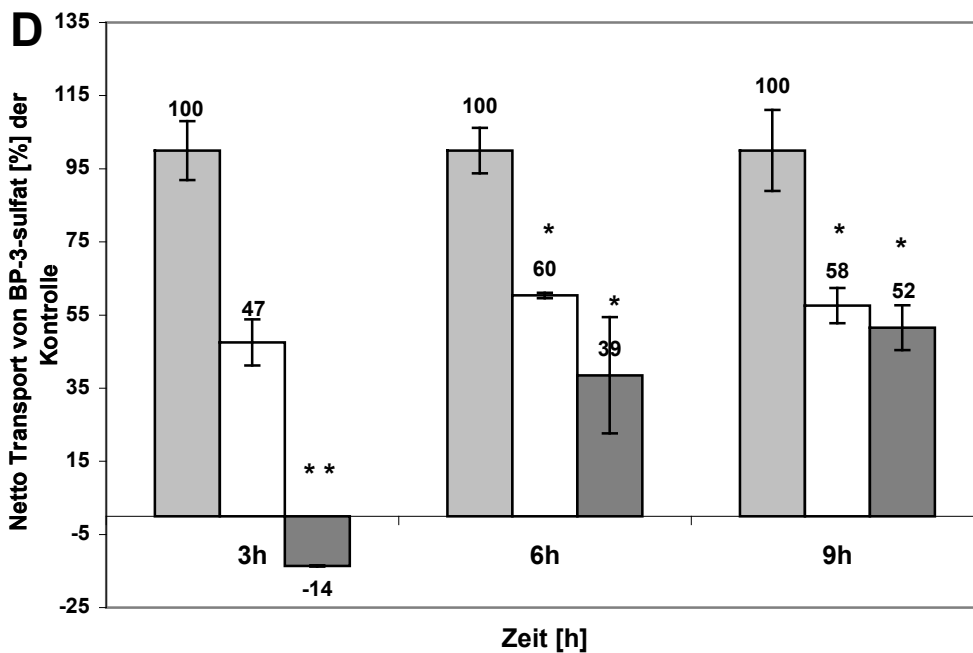


Abbildung 21d.: Netto-Transport (apikal) von BP-3-sulfat durch Caco-2-Zellen nach einer Co-Inkubation mit einem Hemmer (Reserpin und Ko 143) und 3-Hydroxy-BP (5 µM). Dargestellt sind die Werte aus n = 4 Bestimmungen als % der Kontrolle ± Standardabweichung. Ko 143 (5 µM). * Markiert statistisch signifikante Werte (P < 0,05, ANOVA, Tukey-Test) gegenüber der Kontrolle.)(** P < 0,001, ANOVA.)

- Kontrolle (ohne Inhibitor)**
- Reserpin (25 µM)**
- Ko 143 (5 µM)**

3.2.5.1. Chemische Hemmung von BCRP durch Ko 143 und die unterschiedlichen Effekte auf den Transport von BP-3-glucuronid und BP-3-sulfat

Da der BCRP-Hemmer Ko 143 sehr effektiv den Transport von BP-3-sulfat hemmen konnte, sollte als nächstes untersucht werden, ob der Transport von BP-3-glucuronid ebenso effektiv gehemmt werden konnte. Für dieses Experiment wurde als Zellmodell der Caco-2 Subklon TC7 verwendet, der sich durch seine größere UGT-Aktivität im Vergleich zur parentalen Zelllinie auszeichnet (Münzel *et al.*, 1996). Darüber hinaus wurden die eingesetzten TC7-Zellen zuvor zur Induktion von UGT1A6 für 48h mit Oltipraz (Le Ferrec *et al.*, 2002) vorbehandelt. Wie in Abb. 22a. gezeigt, konnte die zur apikalen Seite des Transwell™-Systems transportierte Menge an BP-3-glucuronid durch die Co-Inkubation mit Ko 143 auf 24% ($48,57 \pm 2,24$ vs. $203,88 \pm 25,33$ pmol/cm²) des Kontrollwertes nach der kürzesten Inkubationszeit von 3h reduziert werden. Wie auch schon im oben beschriebenen Experiment (s. Abb. 21d.) mit Caco-2-Zellen beobachtet werden konnte, nahm die Effektivität der Hemmung mit zunehmender Inkubationsdauer stetig ab. Der apikale Transport von BP-3-glucuronid entsprach 37% der Kontrolle ($118,38 \pm 6,68$ pmol/cm²) nach 6h und reduzierte sich nach 9h auf nur noch 67% ($179 \pm 9,09$ pmol/cm²) des Kontrollwertes.

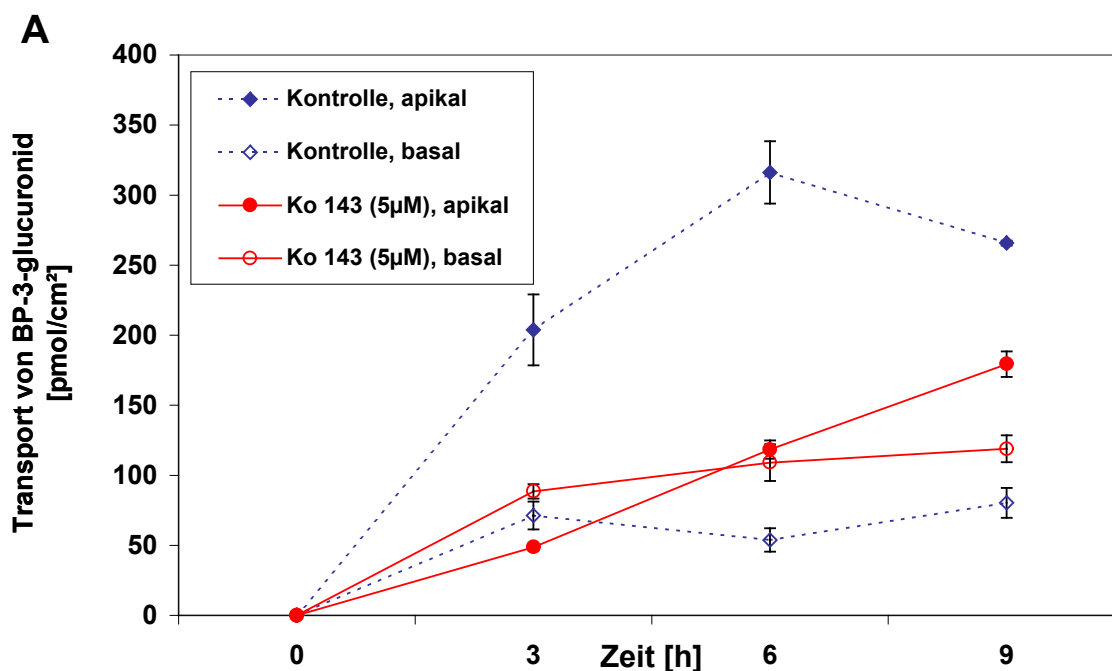


Abbildung 22a.: Transport (apikal und basal) von BP-3-glucuronid durch TC7-Zellen nach einer Co-Inkubation mit BCRP-Hemmer Ko 143 (5 μM) und 3-OH-BP (5 μM). Dargestellt sind die Werte aus $n = 4$ Bestimmungen in pmol/cm² ± Standardabweichung. Für alle Messpunkte der behandelten Zellen ergaben sich statistisch signifikante Werte ($P < 0,001$; t-Test) gegenüber der Kontrolle.

An dieser Stelle sei angemerkt, dass die Gesamtmenge an BP-3-glucuronid, welche durch die unbehandelten Zellen transportiert wurde, ebenfalls nach einer Inkubationsdauer von 9h abnahm, vermutlich durch die Aktivität von endogenen Glucuronidasen, welche Dekonjugation der gebildeten Metaboliten bewirkten (siehe Abb. 22a.).

B

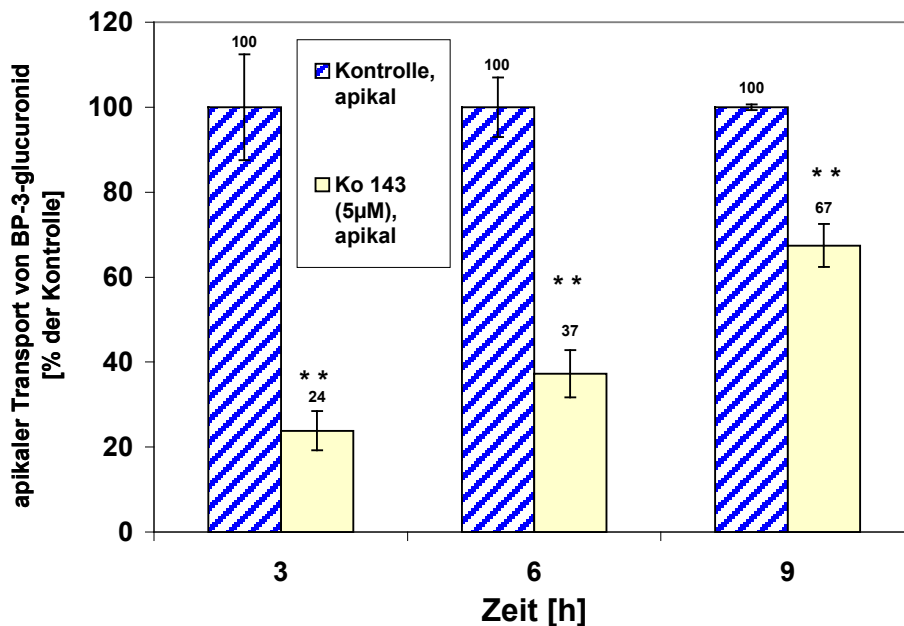


Abbildung 22b.: Apikal gerichteter Transport von BP-3-glucuronid durch TC7-Zellen nach einer Co-Inkubation mit BCRP-Hemmer Ko 143 und 3-Hydroxy-BP (5 μM). Dargestellt sind die Werte aus n = 4 Bestimmungen in % der Kontrolle ± Standardabweichung. Für alle Messpunkte ergaben sich statistisch signifikante Werte (**P < 0,001, t-Test) gegenüber der Kontrolle.

Vergleicht man den hemmenden Effekt von Ko 143 auf den Transport beider BP-Metabolite, (BP-3-glucuronid und BP-3-sulfat) untereinander, so wird der Transport des Hauptmetaboliten BP-3-sulfat in TC7-Zellen viel effizienter gehemmt. Dies kann einmal sehr deutlich aus Abbildung **22c.** entnommen werden, denn hier liegt die nach basal transportierte Menge an BP-3-sulfat für alle Zeitpunkte über der nach apikal abgegebenen Menge dieses Metaboliten. Dies bedeutet, dass die Hemmung in diesem Fall so effizient war, dass sich der normalerweise apikal gerichtete Netto-Transport in die Gegenrichtung umkehrte. Die große Effektivität der Hemmung des Transportes von BP-3-sulfat ist auch aus dem Säulendiagramm in Abbildung **22d.** zu entnehmen, aus dem hervorgeht, dass die zur apikalen Seite transportierte Menge dieses Metaboliten über den gesamten Zeitverlauf des Experiments mindestens zu 24% (17%, 20%, 24% nach 3h, 6h, 9h) bezogen auf die Kontrolle reduziert war. Dabei konnte die stärkste Hemmung des Transportes nach der kürzesten Inkubationsdauer von 3h beobachtet werden (17% oder 67,08 ± 7,09 vs. 401,54 ± 20,57 pmol/cm²). Nach einer 6-stündigen Inkubationsdauer konnte immer noch eine Hemmung von 20% des Kontrollwertes verzeichnet werden (171,04 ± 22,63 vs. 869,78 ± 17,93 pmol/cm²) und nach der Dauer von 9h verminderte sich der hemmende Effekt nur auf 24% des Kontrollwertes.

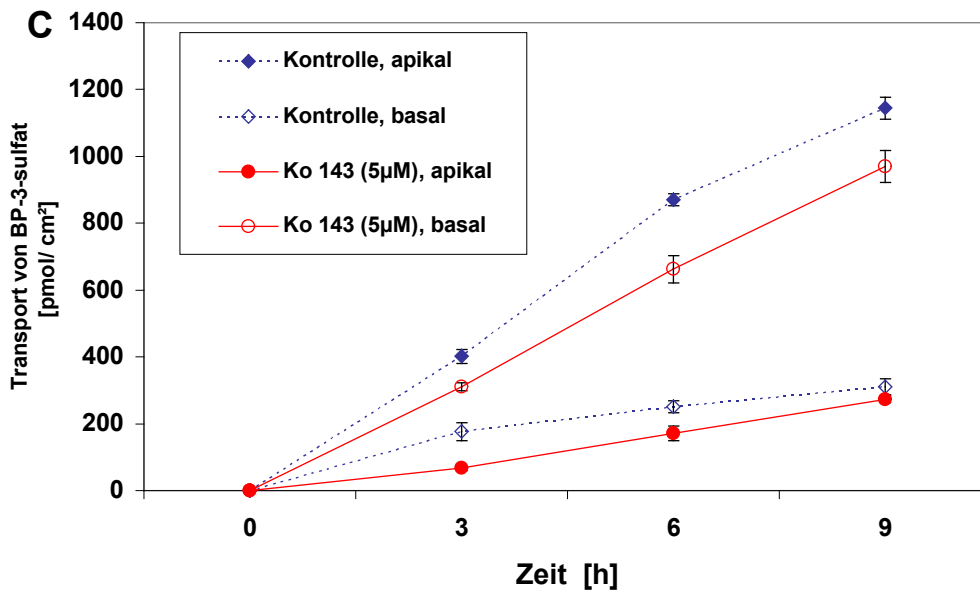


Abbildung 22c.: Transport (apikal und basal) von BP-3-sulfat durch TC7-Zellen nach einer Co-Inkubation mit BCRP-Hemmer Ko 143 und 3-Hydroxy-BP (5 µM). Dargestellt sind die Werte aus n = 4 Bestimmungen in pmol/cm² ± Standardabweichung. Für alle Messpunkte ergaben sich statistisch signifikante Werte (P < 0,001; t-Test) gegenüber der Kontrolle.

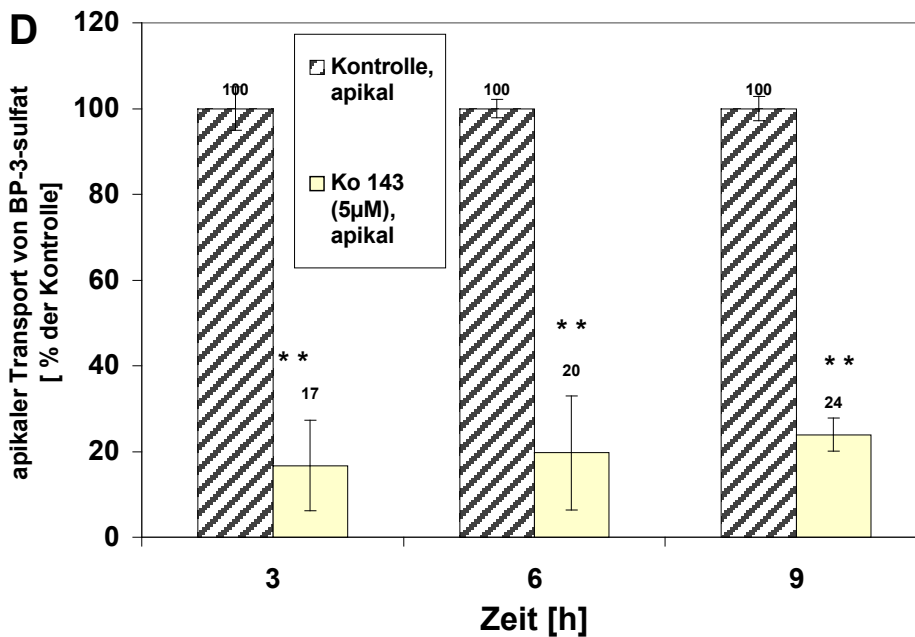


Abbildung 22d.: Apikal gerichteter Transport von BP-3-sulfat durch TC7-Zellen nach einer Co-Inkubation mit BCRP-Hemmer Ko 143 und 3-Hydroxy-BP (5 µM). Dargestellt sind die Werte aus n = 3 Bestimmungen in % der Kontrolle ± Standardabweichung. Für alle Messpunkte ergaben sich statistisch signifikante Werte (**P < 0,001, t-Test) gegenüber der Kontrolle.

Wird der hemmende Effekt von Ko 143 auf den Transport von BP-3-sulfat zwischen den beiden Zelllinien Caco-2 und TC7 verglichen, so fällt eine effektivere Hemmung des apikal gerichteten Transportes bei den TC7-Zellen auf. Dies kann unterschiedliche Gründe haben,

z. B. eine geringere Expressionsrate von BCRP in den TC7-Zellen (siehe *Kapitel 4, Diskussion*).

3.2.6. Modulation von BCRP: Effekte auf den Transport von BP-3-sulfat in TC7-Zellen

Aus Experimenten zur Genexpression auf RNA- und Proteinebene konnte festgestellt werden, dass der ABC-Transporter BCRP offensichtlich durch AhR-Agonisten induziert werden kann. Daher war es von Bedeutung zu untersuchen, ob eine Behandlung mit etablierten AhR-Agonisten unterschiedlicher Affinität zum Ah-Rezeptor (ICZ > B[k]F > Oltipraz) eine Expression von BCRP-Protein induzieren konnte und ob dieses Protein auch funktionell exprimiert war, d. h. ob die vermehrte Expression auch zu einem vermehrten Transport von BP-3-sulfat führen würde.

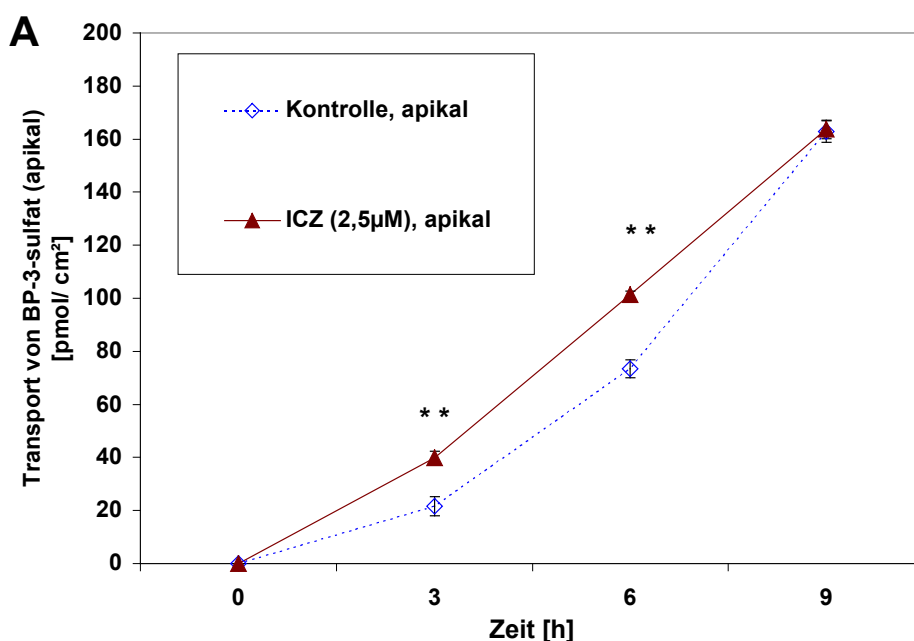
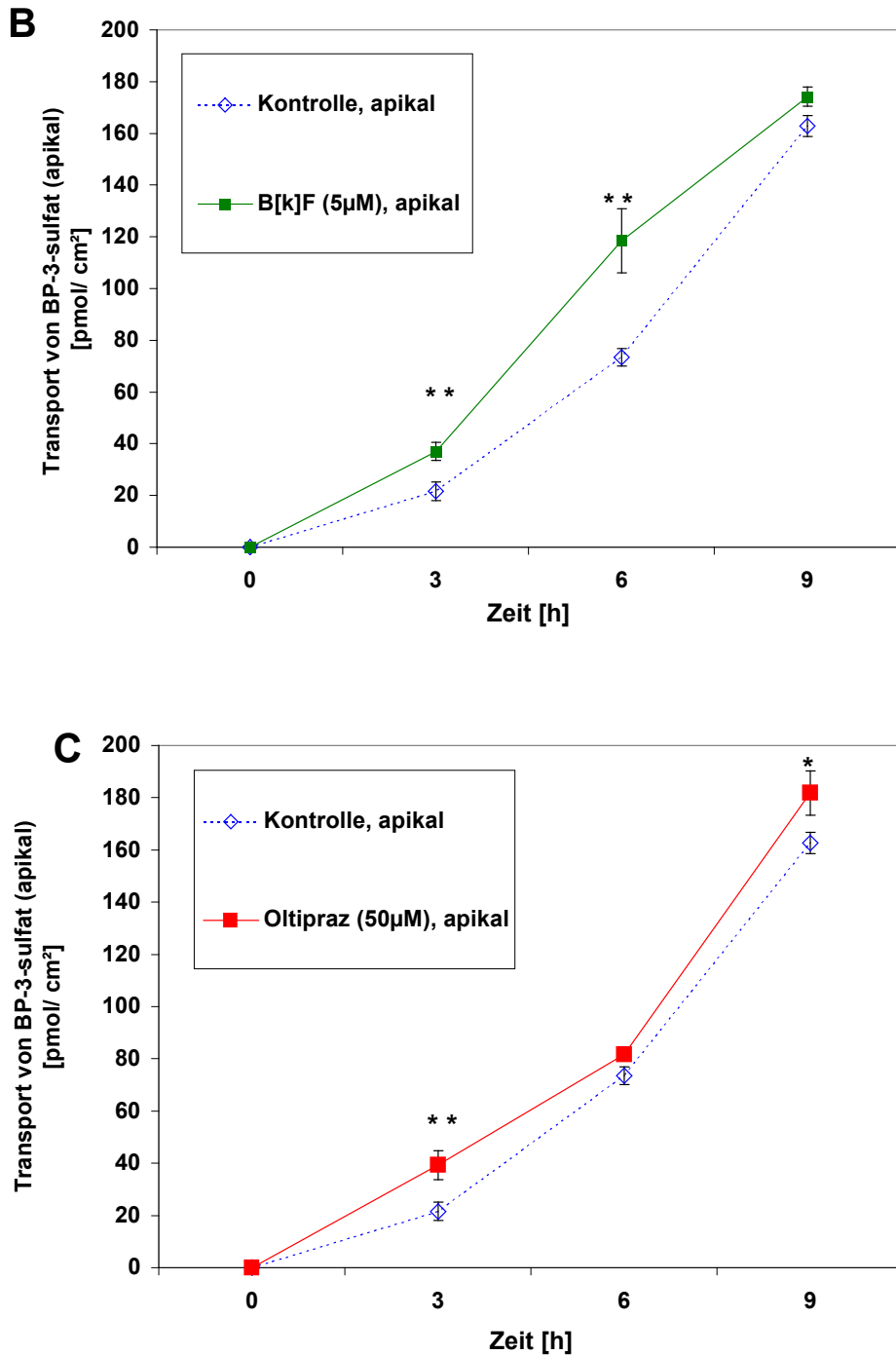


Abbildung 23a.: Apikal gerichteter Transport von BP-3-sulfat durch TC7-Zellen (für 3 Tage mit ICZ (2,5 µM) behandelt) nach einer Co-Inkubation mit CYP1A1-Hemmer α -Naphthoflavin (50 µM) und 3-Hydroxy-BP (5 µM). Dargestellt sind die Werte aus $n = 3$ Bestimmungen in $\text{pmol}/\text{cm}^2 \pm$ Standardabweichung. ** Markiert statistisch signifikante Werte ($P < 0,001$; ANOVA, Tukey-Test) gegenüber der Kontrolle.

Wie unter Punkt 2.2.3.3. e. im Kapitel *Material und Methoden* beschrieben, wurden für diesen Versuch TC7-Zellen für 3 Tage mit den Testsubstanzen behandelt (ICZ [2,5 µM], B[k]F [5 µM] und Oltipraz [50 µM]) und zur Hemmung der ebenfalls durch die Behandlung induzierten Phase I-Enzyme, CYP1A1/ 1B1, mit α -Naphthoflavin (50 µM) und dem Substrat 3-OH-BP (5 µM) co-inkubiert.

Wie die Abbildungen **23 a.** bis **c.** zeigen, resultierte die Behandlung mit ICZ und B[k]F in einer statistisch signifikanten Erhöhung des apikalen Transportes von BP-3-sulfat für die ersten beiden Zeitpunkte, 3h und 6h.



Abbildungen 23b.-c.: Apikal gerichteter Transport von BP-3-sulfat durch TC7-Zellen (für 3 Tage mit B[k]F (5 μM)(B) und Oltipraz (50 μM)(C) behandelt) nach einer Co-Inkubation mit CYP1A1-Hemmer α-NF (50 μM) und 3-Hydroxy-BP (5 μM). Dargestellt sind die Werte aus n = 3 Bestimmungen in pmol/cm² ± Standardabweichung. * Markiert statistisch signifikante Werte (P < 0,05, ANOVA, Tukey-Test) gegenüber der Kontrolle. ** P < 0,001, ANOVA.

Oltipraz-behandelte Zellen zeigten nach 3h und nach 9h eine statistisch signifikante Erhöhung des apikalen Transportes dieses Metaboliten. Nach der Inkubationsdauer von 9h konnte jeweils nur eine geringe (112% für Oltipraz-behandelte Zellen) oder keine (ICZ- und

B[k]F-Behandlung) Erhöhung der BP-3-sulfat Gehalte in den apikalen Kammern des Transwell™-Systems beobachtet werden.

Wie in Abbildung **23a.** dargestellt, konnte die Behandlung mit ICZ die größten Unterschiede zur Kontrolle bezüglich des apikalen Transportes von BP-3-sulfat erzielen ($39,68 \pm 2,51$ vs. $21,59 \pm 3,6$ pmol/ cm², entsprechend 185% der Kontrolle, nach 3h), gefolgt von Oltipraz-behandelten Zellen (182% der Kontrolle; Abb. **23c.**) und B[k]F-behandelten Zellen (171 % der Kontrolle; Abb. **23b.**).

Die Behandlung mit B[k]F konnte nach einer Inkubation von 6h die größten Unterschiede zu den unbehandelten Kontrollzellen erzielen (162% der Kontrolle), während die anderen beiden Behandlungsgruppen nach dieser Zeit einen geringeren Anstieg des apikal exportierten BP-3-sulfates zeigten (111% der Kontrolle für Oltipraz-Behandlung und 138% der Kontrolle für ICZ-Behandlung).

Bei diesem Experiment konnte außerdem die interessante Beobachtung gemacht werden, dass die Co-Inkubation mit α -Naphthoflavon (α -NF) zu einer Umkehr des Nettotransports von BP-3-sulfat zur basolateralen Region der Transwell™-Kammer führte (aus diesem Grunde sind nur die Werte für den Transport nach apikal dargestellt). Offensichtlich ist α -NF auch ein Substrat für BCRP oder es hemmt das Transportprotein auf nicht-kompetitive Weise (vergl. Diskussion).

3.2.7. Transport von BP-3-sulfat durch HCT116 NRI-Zellen

Die BCRP-überexprimierende Zelllinie HCT116 NRI (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. H. Komatani, *Merck Research Laboratories, Ibaraki, Japan*) wurde eingesetzt, um zu überprüfen, wie effektiv BP-3-sulfat durch BCRP transportiert wird. Die HCT116 NRI-Zellen wurden durch eine Selektion von HCT116 WT-Zellen mit dem Indolocarbazol-Derivat NB-506 (s. Kapitel 1. Einleitung, Abschnitt BCRP (ABCG2)) generiert und deren Überexpression von BCRP wurde durch Western Blot-Analysen bestätigt (Abb. **24b.**).

Wie in Abbildung **24a.** gezeigt wird, war nach einer Inkubation von 3h der apikal gerichtete Netto-Transport von BP-3-sulfat durch die HCT116 NRI-Zellen ($23,31 \pm 1,03$ vs. $12,71 \pm 2,30$ pmol/ cm², $P < 0,05$, t-Test) höher im Vergleich zu den Wild-Typ Zellen, der Unterschied zwischen beiden Zelllinien wurde jedoch im Verlauf der Inkubationsdauer (6h und 9h) immer geringer.

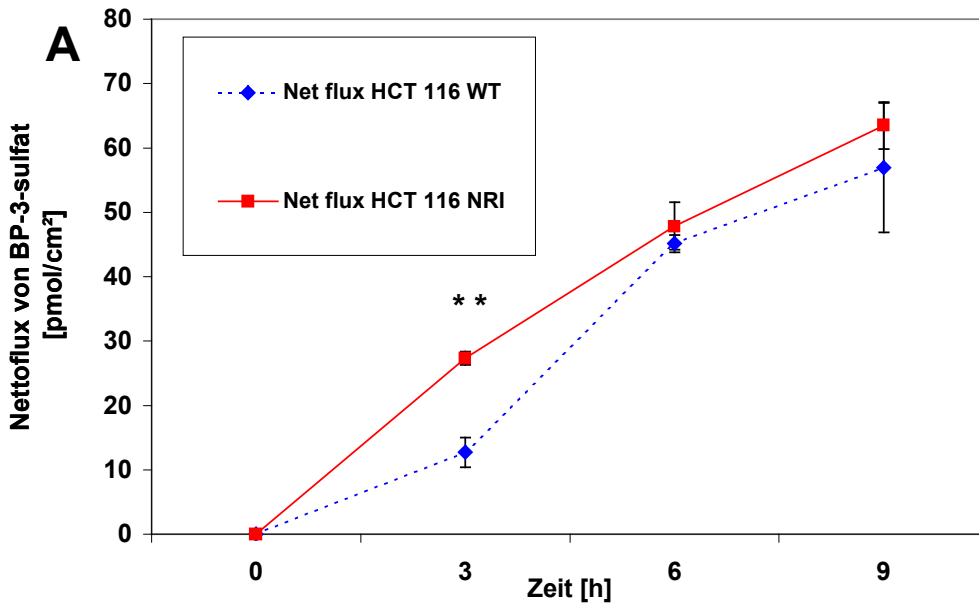


Abbildung 24a.: Nettoflux (apikal) von BP-3-sulfat nach einer Inkubation von BCRP-überexprimierenden HCT116 NRI-Zellen und HCT116 WT-Zellen mit 3-OH-BP (2,5 µM). Die Werte aus n = 3 Bestimmungen sind dargestellt in pmol/cm² ± Standardabweichung. (* *P < 0,001, t-Test, gegenüber der Kontrolle (HCT116 WT)).

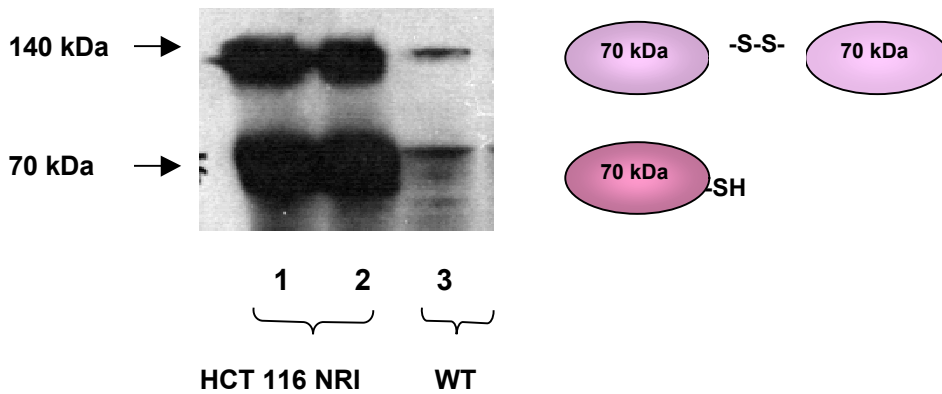


Abbildung 24b: BCRP-Proteinexpression (Western Blot, Membransuspension, 80 µg Protein) von HCT116 NRI-Zellen (Bande 1 und 2) und HCT 116 WT-Zellen (Bande 3). Die Pfeile markieren die Position des 70 kDa Proteins der Marker (hier erscheint die monomere Form des BCRP) bzw. die Position des ca. 140 kDa schweren Proteins (hier erscheint die dimere Form des BCRP; dies tritt auf, wenn das Protein bei der Präparation nicht ausreichend reduziert wurde, da das Dimer über Disulfid-Bridgen verknüpft ist [Kage et al., 2002]).

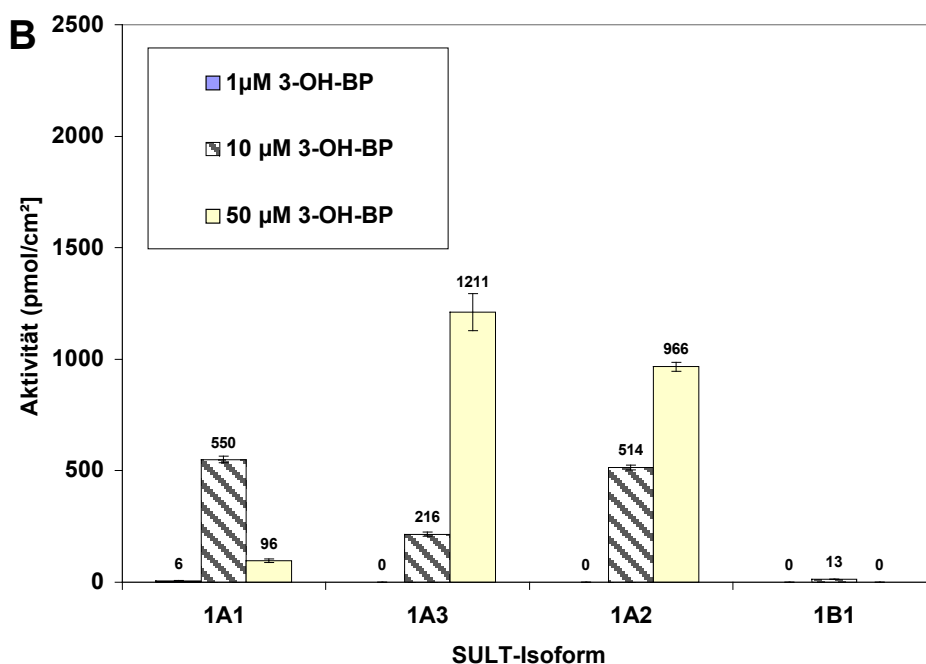
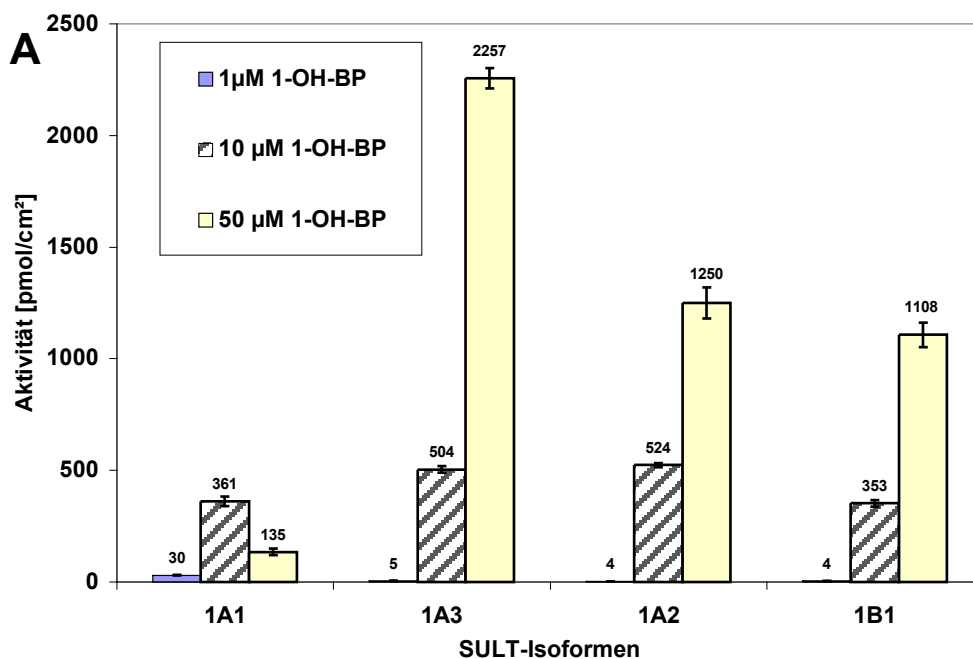
3.3. Untersuchungen zu Sulfotransferasen

3.3.1. Substratspezifität verschiedener SULT-Isoformen

Um zu ermitteln, welche der verschiedenen SULT-Isoformen am stärksten an der Umsetzung von BP zu den Sulfat-Konjugaten BP-1- und BP-3-sulfat beteiligt ist, wurden genetisch veränderte V79-Zellen eingesetzt. Diese Zellen waren stabil transfiziert mit den Genen für *SULT 1A1*, *SULT 1A3*, *SULT 1A2* und *SULT 1B1*. Die Zellen wurden für 8h (vgl. *Material und Methoden*, Punkt 2.2.4.1.) mit verschiedenen Konzentrationen an 1-Hydroxy-BP (1-OH-BP; Abb. **25a.**) und 3-Hydroxy-BP (3-OH-BP; Abb. **25b.**) inkubiert und die von den Zellen ins Medium abgegebenen Mengen an Sulfat-Konjugaten des BP wurden per HPLC bestimmt.

Vergleicht man beide Grafiken untereinander, so ist sehr deutlich zu erkennen, dass fast alle SULT-Isoformen das 1-OH-BP besser umsetzten als das 3-OH-BP. Eine Ausnahme ist die SULT1A1, welche bei einer Substatkonzentration von 10 µM das 3-OH-BP ($550,3 \pm 14,4$ pmol/cm²) besser umsetzte als das Substrat 1-OH-BP ($360,94 \pm 20,89$ pmol/cm²). Die größten Unterschiede zwischen der Umsetzung beider Substrate ergab sich für alle Isoformen bei der geringsten Konzentration (1 µM), denn hier setzte nur SULT1A1 detektierbare Mengen ($6,29 \pm 0,45$ pmol/cm²) an 3-OH-BP um, alle anderen Formen jedoch nicht. Im Gegensatz dazu konnte das Substrat 1-OH-BP bei der geringsten Substratkonzentration von allen getesteten SULTs in noch detektierbaren Mengen umgesetzt werden, wobei auch hier die Form SULT1A1 die größten Mengen an BP-1-sulfat ($30,26 \pm 1,62$ pmol/cm²) produzierte, alle anderen Isoformen Mengen an BP-1-sulfat im Bereich von 4 pmol/cm² ins Medium abgaben. Die SULT1B1 setzte nur im mittleren Konzentrationsbereich (10 µM) das Substrat 3-OH-BP zu einer relativ geringen Menge ($13,27 \pm 0,58$ pmol/cm²) um, im geringsten (1 µM) und höchsten (50 µM) Konzentrationsbereich jedoch nicht. Eine Übersicht über die Rangfolge bezüglich der Umsetzung beider Substrate in den verschiedenen Konzentrationen gibt die folgende Tabelle: *(die Isoform ist nicht aufgeführt, wenn keine Umsetzung stattgefunden hat.)*

Substrat Konzentration	1-OH-BP	3-OH-BP
1 µM	1A1 > 1A3 > 1B1 > 1A2	1A1
10 µM	1A2 > 1A3 > 1A1 > 1B1	1A1 > 1A2 > 1A3 > 1B1
50 µM	1A3 > 1A2 > 1B1 > 1A1	1A3 > 1A2 > 1A1



Abbildungen 25a. und b: Umsetzung von 1-Hydroxy-BP (1 µM, 10 µM, 50 µM; „1-OH-BP“ Abb. A) und 3-Hydroxy-BP (1 µM, 10 µM, 50 µM; „3-OH-BP“ Abb. B) zu den entsprechenden Sulfat-Kojugaten (BP-1-sulfat und BP-3-sulfat) durch V79-Zellen (stabil transfiziert mit SULT 1A1, 1A2, 1A3 und 1B1) nach einer Inkubationsdauer von 8h. Die Werte aus n= 5 Bestimmungen sind dargestellt als Mittelwerte in pmol/cm² ± Standardabweichung.

3.3.2. Einfluss der Differenzierung auf die Proteinexpression der Sulfotransferasen

Wie unter Punkt 2.2.4.2. im Kapitel *Material und Methoden* beschrieben, wurde für dieses Experiment die SULT-Expression verschiedener Isoformen (1A1, 1A2, 1A3, 1B1, 1C1) in Caco-2 und TC7-Zellen während der Differenzierung bestimmt. Wie in Abbildung 26 dargestellt, steigt die Expression aller SULT-Isoformen während der Ausdifferenzierung der Zellen an, wobei SULT1A3 am stärksten exprimiert wird und sowohl in TC7-Zellen, als auch in Caco-2-Zellen bereits im undifferenzierten Zustand (Tag 0 = Konfluenz) detektierbar ist. Die Formen 1B1 und 1C1 sind in beiden Zelllinien relativ schwach (jedoch stärker als 1A1 und 1A2) exprimiert, wobei die TC7-Zellen beide Enzyme stärker exprimieren als Caco-2-Zellen. Die geringste Expression konnte für die beiden Isoformen SULT1A1 und 1A2 festgestellt werden, und hierbei fällt auf, dass in TC7-Zellen beide Formen erst ab dem 4. Tag der Kultivierung detektierbar sind, in Caco-2-Zellen erst nach dem 8. Tag. Dies steht im Einklang mit der Tatsache, dass TC7-Zellen schneller ausdifferenzieren.

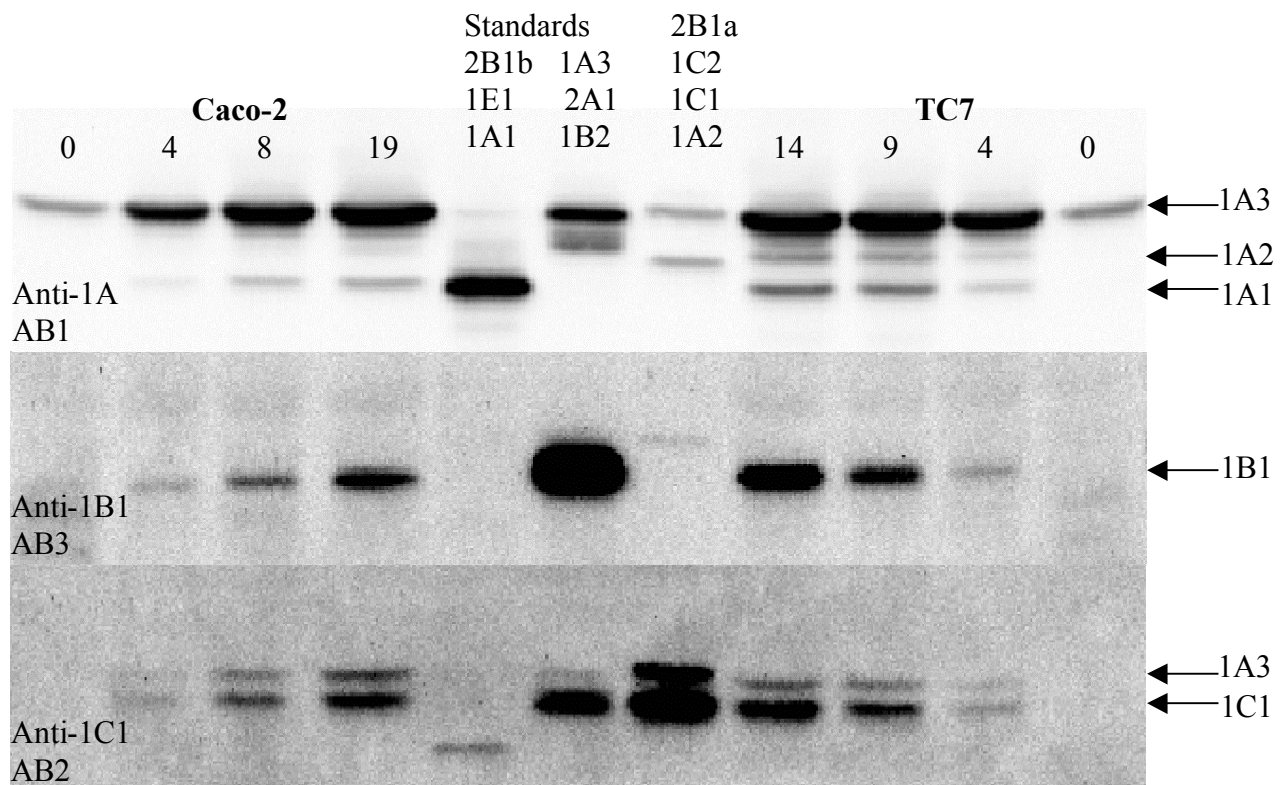


Abbildung 26: Western Blot Analyse zur Bestimmung der SULT-Proteinexpression (SULT1A1, 1A2, 1A3, 1B1 und 1C1) im Verlauf der Differenzierung (0-19 Tage, bzw. 0-14 Tage) von Caco-2 und TC7-Zellen. Die Zellen wurden zu den angezeigten Zeiten geerntet und je 100 µg cytosolisches Protein wurden zur Western Blot Analyse eingesetzt.

3.4. Untersuchungen zur Genexpression

3.4.1. Untersuchungen zur Expression von BCRP

3.4.1.1. Untersuchung zur Ah-Rezeptor-Abhängigkeit durch Superinduktion

Das Phänomen der „Superinduktion“ wurde von Ma *et al.* (1999) für das etablierte AhR-Target-Gen CYP1A1 in murinen Leberzellen (Hepa 1c1c7) beschrieben. Der Ligand-aktivierte Ah Rezeptor wird durch 26S Proteasomen abgebaut, so dass die Genregulation dem Bedarf der Zelle angepasst wird und es nicht zu einer schädlichen Dauerinduktion der betreffenden Gene kommt. Bei der Hemmung der 26S Proteasomen durch MG-132 kann der Ligand : AhR : ARNT-Komplex weiterhin die Gentranskription bewirken, so dass es zu einer „Superinduktion“ kommt.

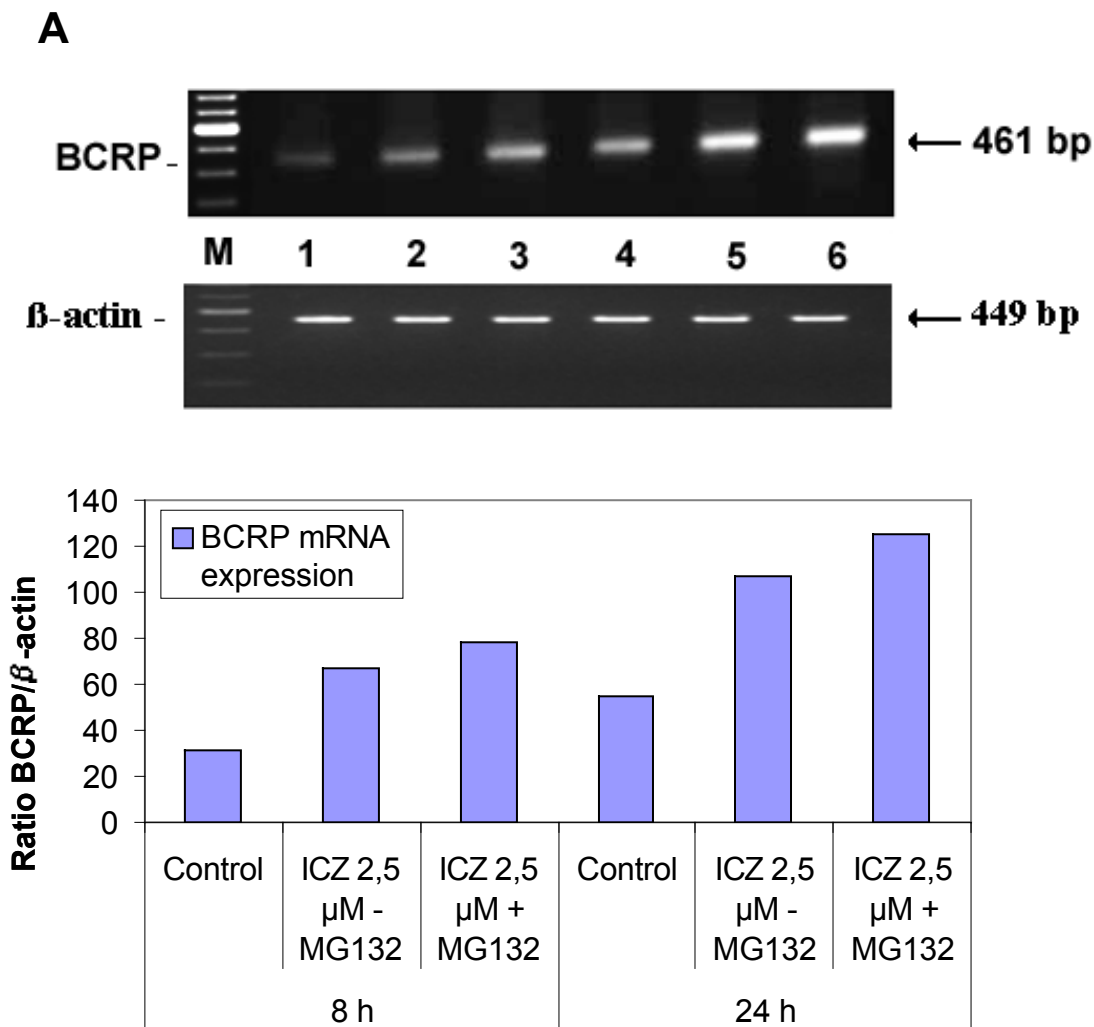


Abbildung 27a: Superinduktion von BCRP (mRNA) durch Hemmung der 26S Proteasomen; die Inkubation von Caco-2-Zellen mit DMSO (0,1%, Kontrolle), ICZ (2,5 μ M) oder ICZ (2,5 μ M) + MG-132 (20 μ M) erfolgte für 8h (Banden 1-3) oder 24h (Banden 4-6).

1 = DMSO, 2 = ICZ 2,5 μ M -MG-132, 3 = ICZ 2,5 μ M + MG-132 { 8h
 4 = DMSO, 5 = ICZ 2,5 μ M -MG-132, 6 = ICZ 2,5 μ M + MG-132 { 24h

Wie in Abbildung 27 dargestellt, so konnte die gleichzeitige Behandlung mit dem starken AhR-Agonisten ICZ (2,5 µM) und MG-132 (20 µM) eine deutliche weitere Steigerung der Induktion („Superinduktion“) von BCRP und CYP1A1 bewirken, als eine Behandlung mit ICZ alleine (Abb. 27a-b.). Auffällig ist hierbei, dass deutliche Effekte bezüglich der Superinduktion von BCRP bereits nach einer Inkubationsdauer von 8h zu beobachten waren, eine Superinduktion von CYP1A1 jedoch erst nach 24h zu detektieren war. Diese beobachtete Superinduktion sowohl von CYP1A1 als auch von BCRP kann als ein Hinweis darauf gewertet werden, dass die Expression von BCRP mit großer Wahrscheinlichkeit über Ah-Rezeptor-abhängige Signalwege verläuft.

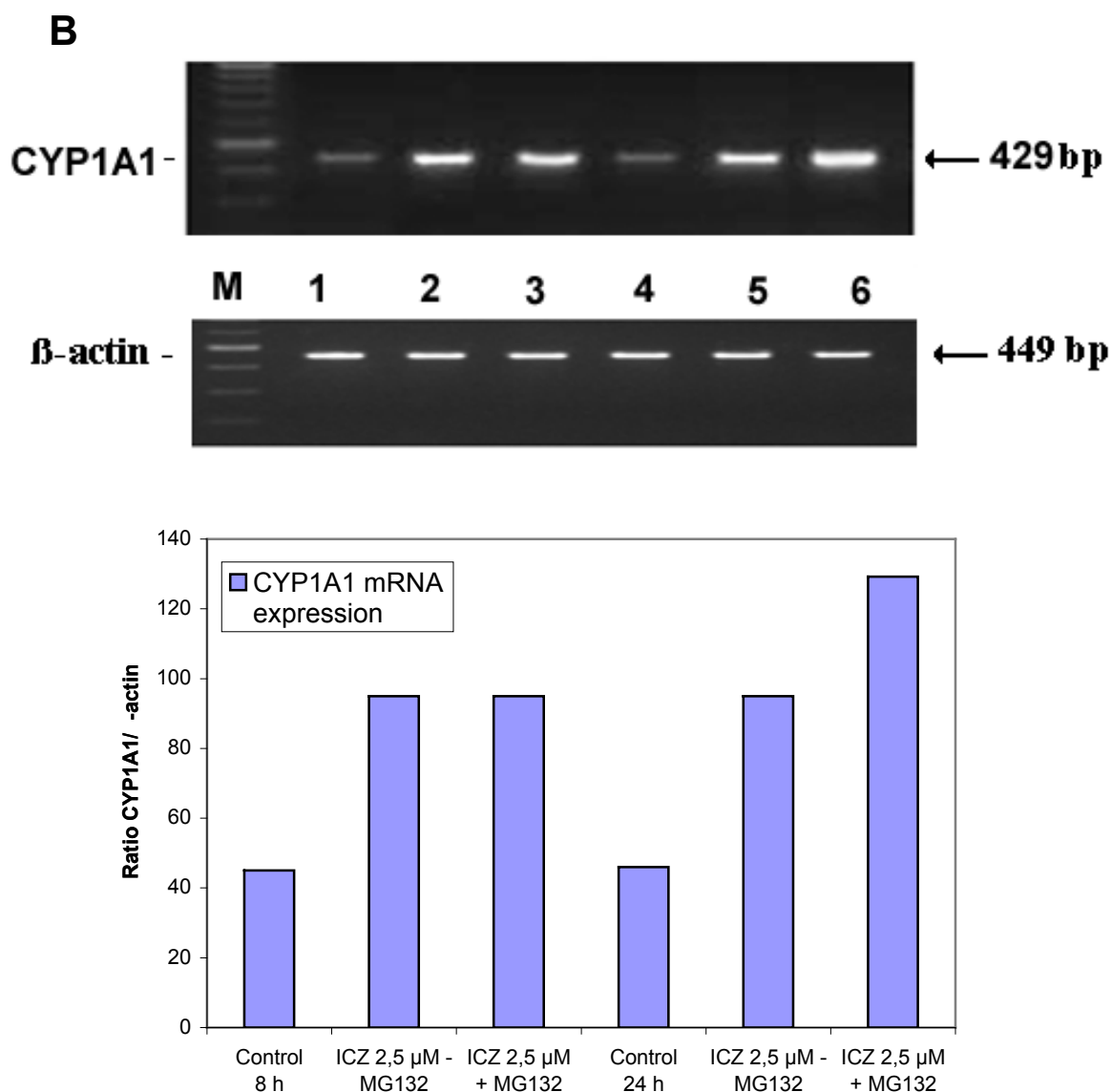


Abbildung 27b: Superinduktion von CYP1A1 (mRNA) durch Hemmung der 26S Proteasomen; die Inkubation von Caco-2-Zellen mit DMSO (0,1%, Kontrolle), ICZ (2,5 µM) oder ICZ (2,5 µM) + MG-132 (20 µM) erfolgte für 8h (Banden 1-3) oder 24h (Banden 4-6).

1 = DMSO, 2 = ICZ 2,5 µM -MG-132, 3 = ICZ 2,5 µM + MG-132 { 8h
 4 = DMSO, 5 = ICZ 2,5 µM -MG-132, 6 = ICZ 2,5 µM + MG-132 { 24h

3.4.1.2. Untersuchung zur Ah-Rezeptor-Abhängigkeit durch Behandlung mit dem AhR-Antagonisten PD 98059 (2'-Amino-3'-methoxyflavon)

Eine Co-Inkubation von Caco-2-Zellen mit dem AhR-Antagonisten PD 98059 (10 µM) und ICZ (5 µM) konnte die Induktion von BCRP durch ICZ hemmen. Auch die Induktion von CYP1A1 konnte durch diese Behandlung unterdrückt werden, wobei sich eine deutlichere Hemmung der CYP1A1 Induktion nach einer Inkubationszeit von 8h ergab (Abb. 28a), vermutlich aufgrund der Metabolisierung des Antagonisten PD 98059. Die Hemmung der Induktion der BCRP RNA war allerdings nach 24h deutlicher zu erkennen (Abb. 28b).

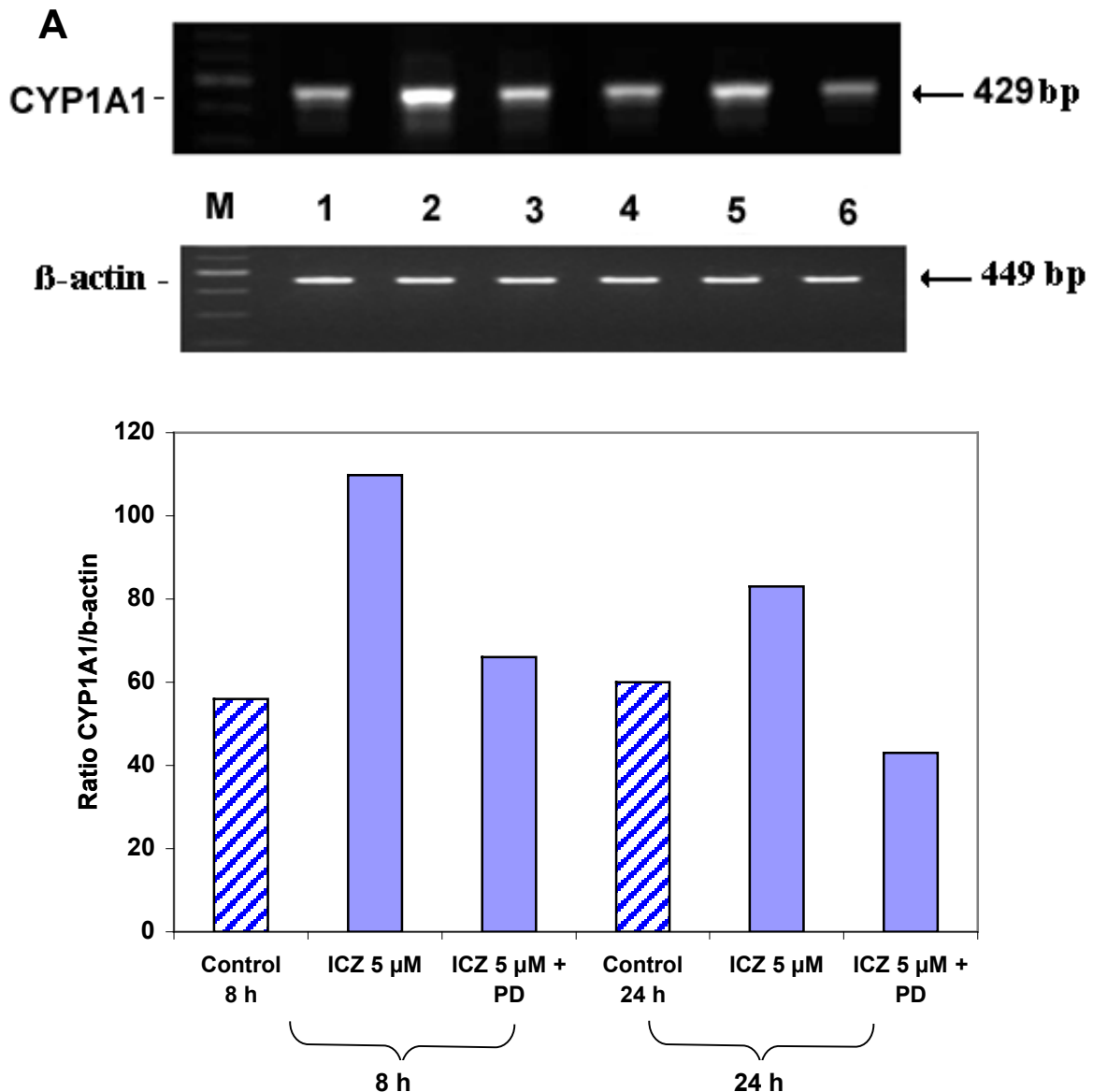


Abbildung 28a: Genexpression von CYP1A1 (mRNA) nach Co-Inkubation von Caco-2-Zellen mit ICZ (5 µM) und dem AhR-Antagonisten PD 98059 (10 µM) nach einer Inkubationszeit von 8 h (Banden 1-3) und 24 h (Banden 4-6)

1 = Kontrolle DMSO (0,2%), 2 = ICZ 5 µM, 3 = ICZ 5 µM + PD 98059 (10 µM) { 8h
 4 = Kontrolle DMSO (0,2%), 5 = ICZ 5 µM, 6 = ICZ 5 µM + PD 98059 (10 µM) {24h

B

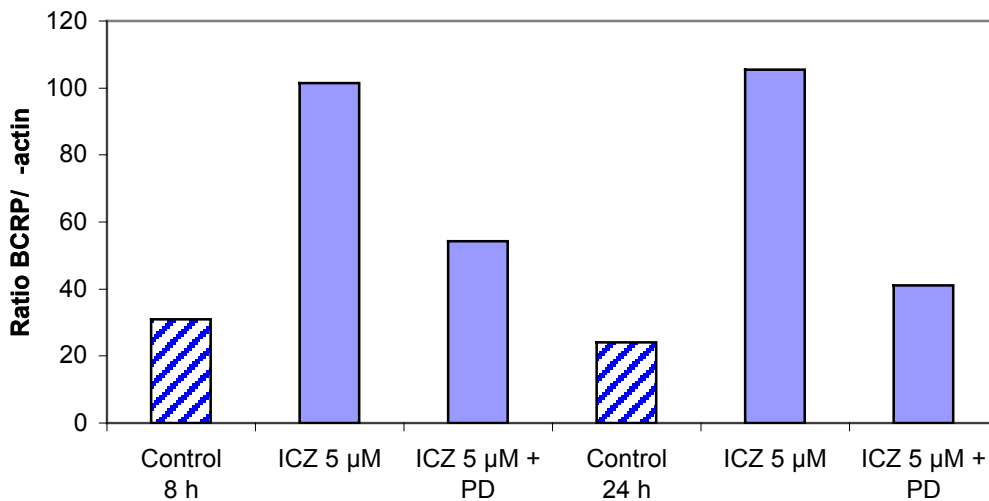
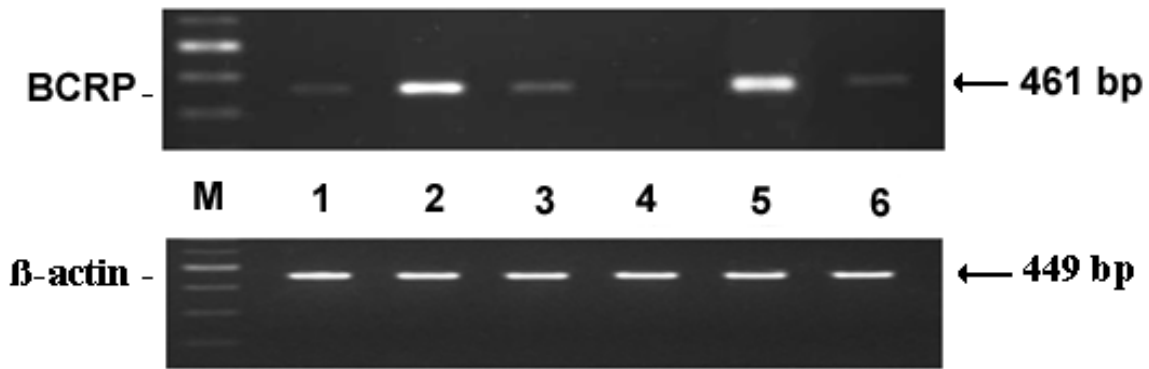


Abbildung 28b: Genexpression von BCRP (mRNA) in Caco-2-Zellen nach Co-Inkubation mit ICZ (5 μM) und dem AhR-Antagonisten PD 98059 (10 μM) nach einer Inkubationszeit von 8 h (Banden 1-3) und 24 h (Banden 4-6)

1 = Kontrolle DMSO (0,2%), 2 = ICZ 5 μM, 3 = ICZ 5 μM + PD 98059 (10 μM) { 8h
 4 = Kontrolle DMSO (0,2%), 5 = ICZ 5 μM, 6 = ICZ 5 μM + PD 98059 (10 μM) {24h

Die Hemmung der Induktion beider Gene (CYP1A1 und BCRP) durch den AhR-Antagonisten PD 98059 kann ebenfalls als ein deutlicher Hinweis darauf gewertet werden, dass der AhR an der Regulation des BCRP-Gens beteiligt sein könnte.

3.4.2. Einfluss von B[k]F, DB[a,]P und einem PAK-Gemisch („Tabakrauch“) auf die Expression von BCRP

Um zu untersuchen, welchen Effekt PAK mit unterschiedlicher AhR-Affinität und Kanzerogenität (DB[a,]P ist ein starkes Karzinogen, B[k]F mäßig karzinogen) und ein PAK-Gemisch, das der PAK-Zusammensetzung von Tabakrauch entspricht, auf die Expression von BCRP (mRNA) haben, wurden Caco-2-Zellen mit den unten angegebenen Verbindungen inkubiert.

Die densitometrische Auswertung des in Abbildung 29 dargestellten Ergebnisses zeigt eine starke Induktion von BCRP durch 10 µM B[k]F, gefolgt von der PAK-Mischung (10 µg/ml) und DB[a,]P (20 µM). Dieses Ergebnis zeigt deutlich an, dass die Induktion des BCRP-Gens offensichtlich von der AhR-Affinität abhängt, denn B[k]F konnte in Reporteragen-Assays als sehr starker AhR-Agonist bestimmt werden, wobei sich DB[a,]P als schwacher AhR-Agonist in diesem Assay erwies (Machala *et al.*, 2001).

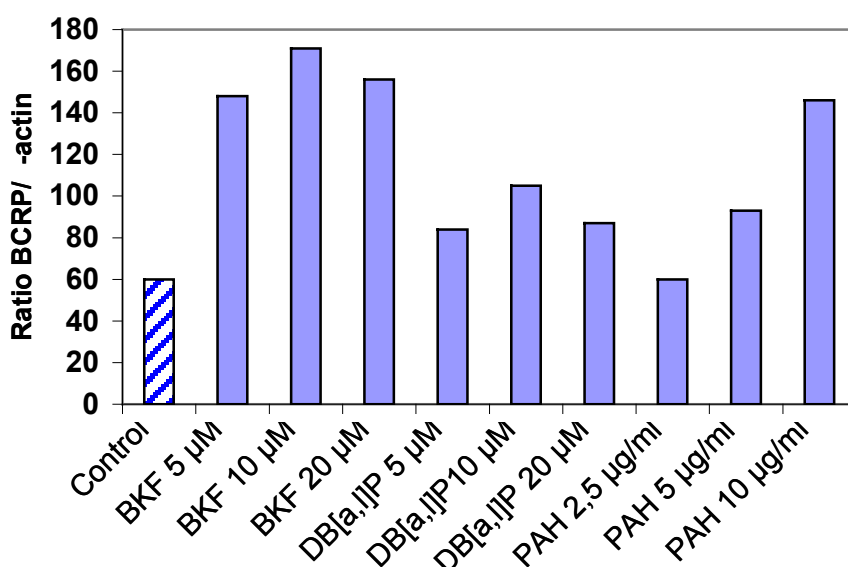
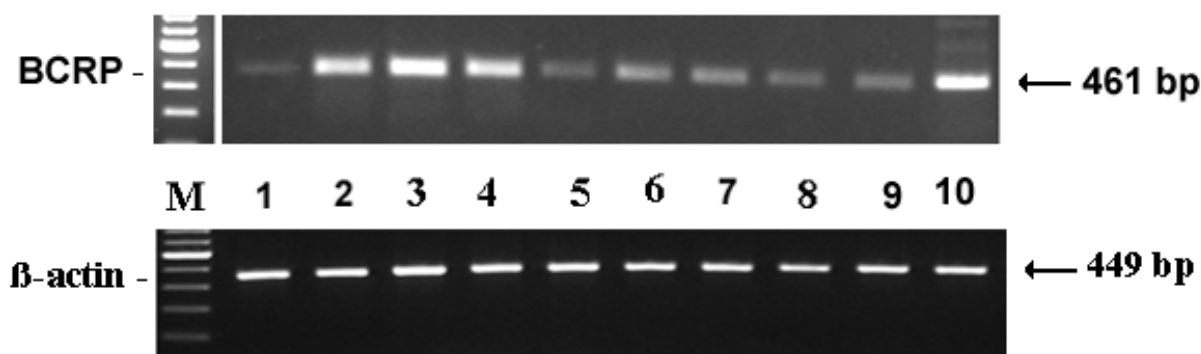


Abbildung 29: Induktion von BCRP (mRNA) in Caco-2-Zellen nach der Behandlung (48 h) mit B[k]F (5, 10, 20 µM), DB[a,]P (5, 10, 20 µM) und einem PAK-Gemisch (2,5, 5, und 10 µg/ml).

Interessant ist, dass das PAK-Gemisch in der höchsten Konzentration eine relativ starke Induktion von BCRP bewirken konnte. Denn wie aus der Tabelle unter Punkt 2.2.7.2. im Kapitel *Material und Methoden* zu entnehmen ist, besteht dieses Gemisch (in der Konz. 10 µg/ml) zum größten Teil aus relativ schwachen AhR-Agonisten wie Phenanthren (38 µM) und Pyren (13 µM). Starke AhR-Agonisten (BP und B[k]F) sind auch in der höchsten Konzentration nur in geringen Mengen (0,4-1 µM) enthalten. Eine synergistische Wirkung von nicht-karzinogenen PAK wie Benzo[*g,h,i*]perylen und BP wurde bezüglich der Induktion von CYP1A1 von Cherng *et al.* (2001) beschrieben. Das Benzo[*g,h,i*]perylen führt zu einer vermehrten Akkumulation des AhR im Kern, bzw. zu einer „Vorbereitung“ des AhR zur Liganden-bindenden Form. Ein ähnlicher Mechanismus, bei dem Phenanthren oder Pyren den AhR aktivieren und die starken AhR-Agonisten auch in geringer Konzentration eine große Wirkung haben, könnte eine Erklärung für die beobachtete starke Induktion von BCRP durch das PAK-Gemisch sein.

3.5. Untersuchungen zur Expression von BCRP (Protein)

3.5.1. Effekte von AhR-Agonisten (PAK) auf die BCRP-Expression

Da aus Experimenten zur Genexpression (mRNA) die Induzierbarkeit von BCRP durch AhR-Agonisten hervorging, war es von Bedeutung zu untersuchen, ob die vermehrte mRNA-Expression auch in einer stärkeren Expression des BCRP-Proteins resultierte. Dazu wurden Caco-2-Zellen (8-10 Tage alt) jeweils für 3 Tage mit verschiedenen Verbindungen (PAK, Flavonoide und weitere sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe wie Juglon, Curcumin, Dibenzoylmethan, etc.) behandelt und dann entweder die Plasmamembranen isoliert oder ein Gesamt-Zelllysat präpariert.

Zur grafischen Darstellung des Ergebnisses wurde das Foto eines repräsentativen Blots eingescannt und mit Hilfe des Programms Scion image™ densitometrisch ausgewertet.

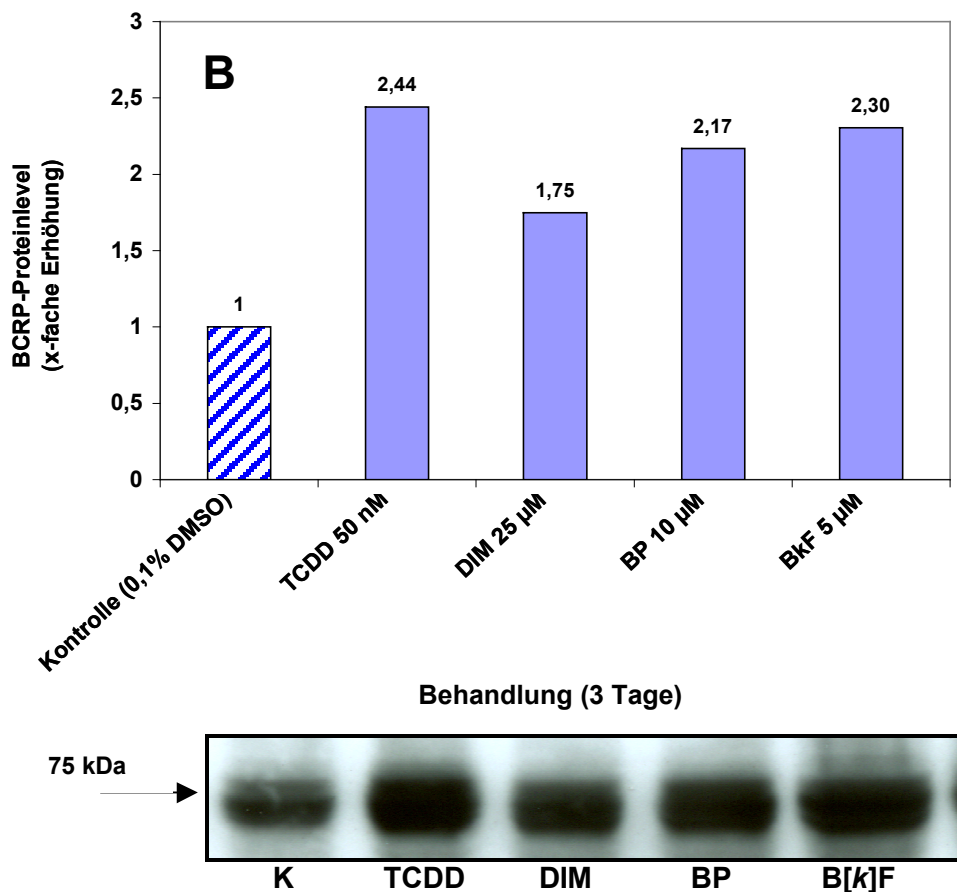


Abbildung 30: BCRP-Western Blot; **Plasmamembranen** von Caco-2-Zellen (40 µg Protein pro Tasche) nach einer Behandlung (3 Tage) mit: DMSO (0,1%, K = Kontrolle), TCDD (50 nM), DIM (25 µM), BP (10 µM), B[k]F (5 µM); (der Pfeil markiert das 75 kDa Protein des Markers).
(B): grafische Darstellung der densitometrischen Auswertung eines repräsentativen Blots

Aus Abbildung 30 geht sehr deutlich hervor, dass insbesondere starke AhR-Agonisten wie z. B. TCDD (50 nM) eine Induktion (2,44-fach im Vergleich zur Kontrolle, s. Abb. 30 B) von BCRP bewirken können. Auch die Behandlung mit B[k]F (5 µM) war in dieser Hinsicht sehr effektiv (2,30-fach im Vergleich zur Kontrolle), gefolgt von der Behandlung mit BP (10 µM; 2,17-fach) und dem dimeren Kondensationsprodukt von I3C, DIM (25 µM; 1,75-fach).

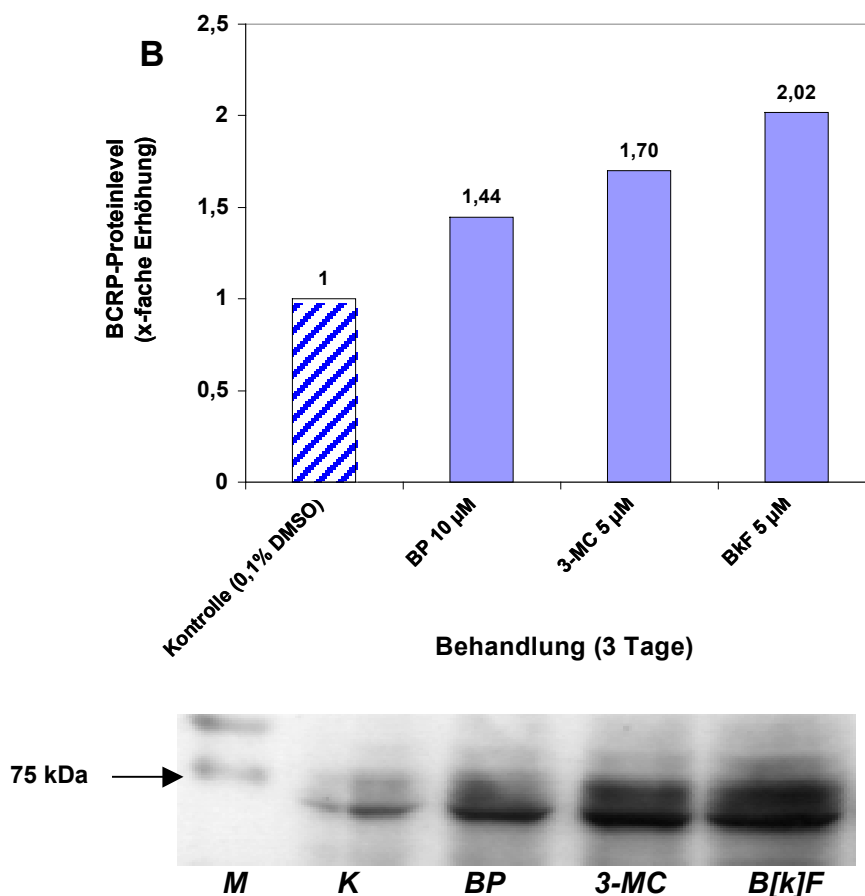


Abbildung 31: BCRP-Western Blot; **Gesamt-Zelllysate** von Caco-2-Zellen (75 µg Protein pro Tasche) nach einer Behandlung (3 Tage) mit: DMSO (0,1%, K = Kontrolle), BP (10 µM), 3-MC (5 µM) und B[k]F (5 µM). M = Marker; der Pfeil markiert das 75 kDa Protein des Markers. (B): grafische Darstellung der densitometrischen Auswertung eines repräsentativen Blots

Vergleicht man die x-fache Erhöhung des BCRP-Proteinlevels zwischen den Bestimmungen aus Membranisolaten und Gesamt-Zelllysate, so unterscheiden sich die Werte geringfügig, obwohl die Tendenz gleich bleibt. Zur Western Blot Analyse des in Abbildung 31 dargestellten Fotos wurde Gesamt-Zelllysate von Caco-2-Zellen verwendet.

Die induzierende Wirkung bezüglich der Produktion von BCRP-Protein steigt in der Reihenfolge BP < 3-MC < B[k]F. Wie aus der densitometrischen Auswertung (Abb. 31 B) zu entnehmen ist, führt eine Behandlung mit BP in diesem Fall zu einer etwas geringeren Steigerung (1,44-fach) des BCRP-Proteinlevels (Plasmamembranen: 2,17-fach). Auch die Induktion durch B[k]F war bei der Bestimmung aus Gesamt-Zelllysate (2,03-fach) etwas schwächer, als bei der Analyse der Plasmamembranen (2,30-fach).

Eine mögliche Erklärung dieses Unterschiedes wäre die Änderung des Anteils des Membranproteins am Gesamtprotein, z. B. durch die Induktion von Zellproteinen (z. B. Phase II Proteine, etc.). Bei der Bestimmung des Gesamtproteingehaltes von insbesondere Oltipraz- und B[k]F-behandelten Zellen fiel auf, dass diese fast die doppelte Menge an Gesamtprotein pro Kulturflasche enthielten (im Vergleich zur Kontrolle und anderen Behandlungsgruppen), was jedoch nicht auf die Zellzahl zurückzuführen ist, da in jedem Fall ausdifferenzierte Zellen verwendet wurden, die sich nicht weiter teilen.

3.5.2. Effekte von verschiedenen sek. Pflanzeninhaltsstoffen auf die BCRP-Expression

Da es offensichtlich einen Zusammenhang zwischen der Affinität einer Verbindung zum Ah-Rezeptor und der Induktion von BCRP gab, war es von Interesse zu untersuchen, ob eine Induktion von BCRP auch durch schwache, natürlich vorkommende AhR-Agonisten zu erzielen ist [wie z. B.: Flavonoide (*Silymarin, Quercetin, Flavon, Daidzein*), Indol-Derivate (*I3C, DIM, ICZ, Sempervirin*), polyphenolische Verbindungen und strukturell ähnliche Derivate (*Curcumin, Dibenzoylmethan*) und Naphthochinone wie *Juglon*]. Einige dieser Verbindungen, wie Silymarin, Daidzein und Quercetin, wurden erst kürzlich als BCRP-Substrate (kompetitive Hemmer) identifiziert (Cooray *et al.*, 2004, Zhang *et al.*, 2004).

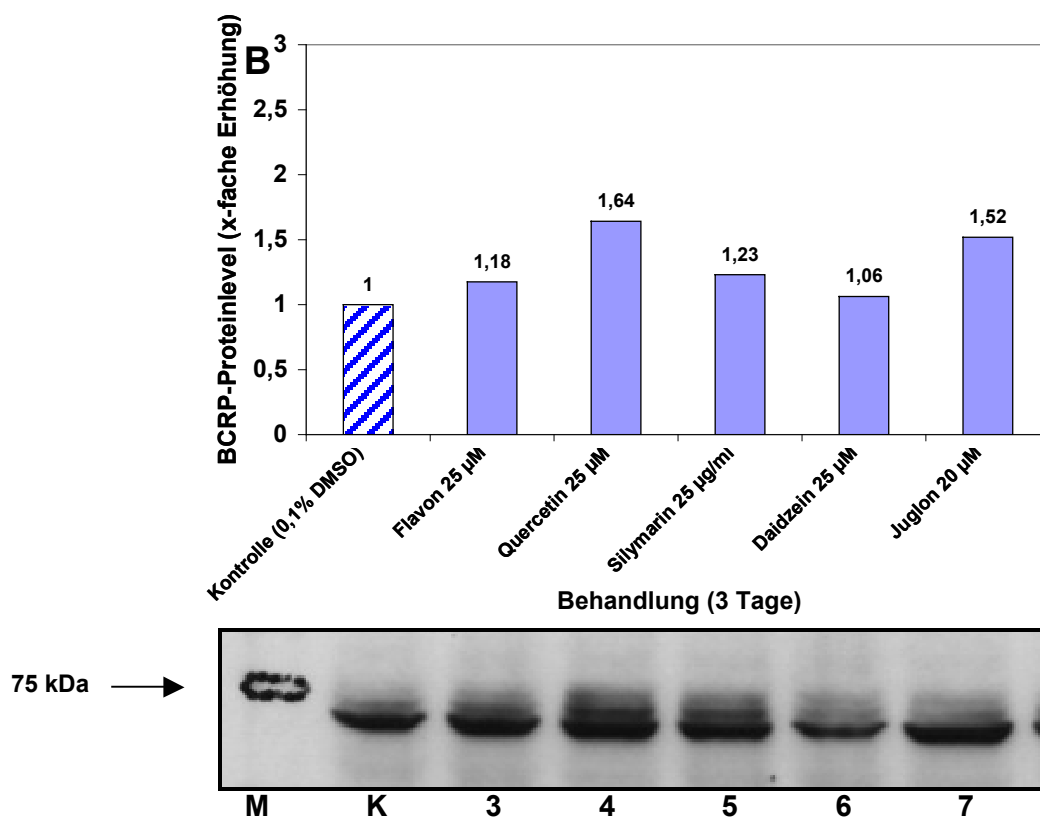


Abbildung 32: BCRP-Western Blot; Gesamt-Zellysate von Caco-2-Zellen (75 μ g Protein pro Tasche) nach einer Behandlung (3 Tage) mit: DMSO (0,1%, K= Kontrolle), 3: Flavon (25 μ M), 4: Quercetin (25 μ M), 5: Silymarin (25 μ g/ml), 6: Daidzein (25 μ M), Juglon (20 μ M); M= Marker; der Pfeil markiert das 75 kDa Protein des Markers. (B): grafische Darstellung der densitometrischen Auswertung eines repräsentativen Blots

Abbildung 32 zeigt eine Western Blot Analyse von Caco-2-Zellen (Gesamt-Zelllysat), welche mit verschiedenen sekundären Pflanzeninhaltsstoffen behandelt wurden. Dabei fällt insbesondere die relativ starke Induktion von BCRP-Protein durch das Flavonol Quercetin (25 µM) auf (1,64-fache Erhöhung gegenüber der Kontrolle). Diese relativ starke Erhöhung konnte in mehreren Blots betätigt werden, wobei sich bei der Analyse von Plasmamembranen ein noch höherer Wert (2,34-fache Erhöhung des BCRP-Proteingehaltes; vgl. Abb. 33B).

Eine relativ starke Induktion des BCRP-Proteins konnte auch durch das Naphthochinon Juglon (20 µM; 1,52-fach) und durch das Isomergemisch substituierter Flavonoide, Silymarin (25 µg/ml), beobachtet werden (1,23-fach). Die Behandlung mit Daidzein (25 µM) erzielte keinen Unterschied zur Kontrolle (1,06-fach).

In der nachfolgend in Abbildung 33 dargestellten Western Blot Analyse zeigt TCDD (50 nM) abermals die stärkste Induktion unter allen verwendeten Test-Substanzen (2,46-fache Erhöhung des BCRP-Proteins gegenüber der Kontrolle) und auch in diesem Beispiel konnte das Flavonol Quercetin einen erstaunlichen Effekt bezüglich der Induktion des BCRP-Proteins erzielen (2,34-fache Erhöhung gegenüber der Kontrolle).

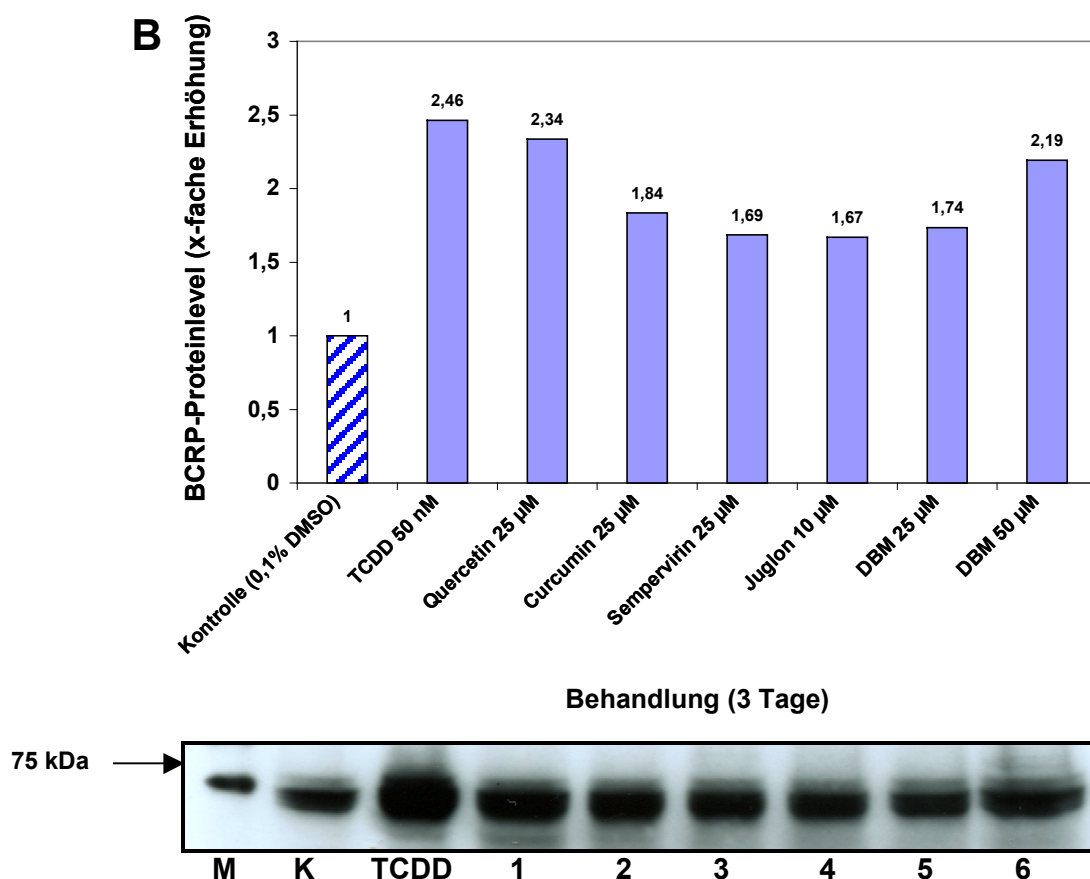
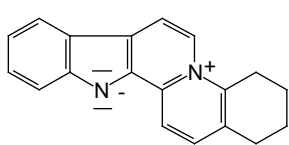


Abbildung 33: BCRP-Western Blot; **Plasmamembranen** von Caco-2-Zellen (40 µg Protein pro Tasche) nach einer Behandlung (3 Tage) mit: DMSO (0,1%, K= Kontrolle), TCDD (50 nM), 1: Quercetin (25 µM), 2: Curcumin (25 µM), 3: Sempervirin (25 µM), 4: Juglon (10 µM), 5: DBM (25 µM), 6: DBM (50 µM).

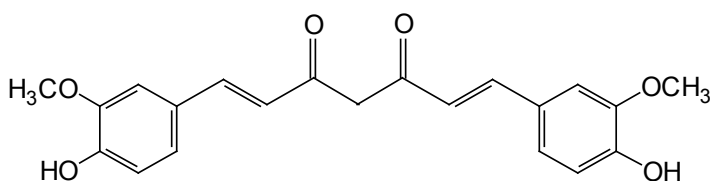
M= Marker; der Pfeil markiert das 75 kDa Protein des Markers.

Des weiteren zeigt dieses Experiment einen konzentrationsabhängigen Effekt der BCRP-Induktion in Bezug auf die Behandlung mit Dibenzoylmethan (DBM), da eine Konzentration von 50 μM stärker (2,19-fach) induziert, als die Hälfte (25 μM) dieser Konzentration (1,74-fach). Zwei weitere zur Behandlung der Caco-2-Zellen eingesetzte sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe, die phenolische Verbindung Curcumin (*Curcuma longa*, Gelbwurz) und das Alkaloid Sempervirin (*Gelsemium sempervirens*, gelber Jasmin) konnten ebenfalls eine deutliche, wenn auch geringere Erhöhung des BCRP-Proteinlevels bewirken (1,84-fach und 1,69-fach). Die induzierende Wirkung auf BCRP lässt sich in folgender Reihenfolge darstellen: **TCDD > Quercetin > DBM (50 μM) > Curcumin > DBM (25 μM) > Sempervirin > Juglon (10 μM)**

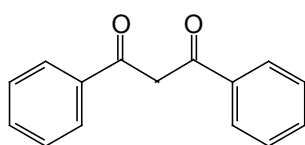
Nachfolgend sind die Strukturen einiger zur Induktion von BCRP verwendeten Verbindungen (vgl. Abb. 32 und 33) dargestellt. Als Hauptkomponente des Silymarins (Isomerengemisch aus Silibinin, Silidianin und Silichristin) ist hier das Silibinin dargestellt. Juglon ist in fast allen Teilen der Walnuß (*Juglans regia*) enthalten, besonders in den Hüllen der „Nüsse“, [Exo- und Mesokarp] und in den Blättern. Dibenzoylmethan ist ein natürlicher Bestandteil der Süßholzpflanze (*Glycyrrhiza glabra*) und damit ein Inhaltsstoff von Lakritz. Alle Verbindungen besitzen ähnliche strukturelle Einheiten aus planaren aromatischen Ringen.



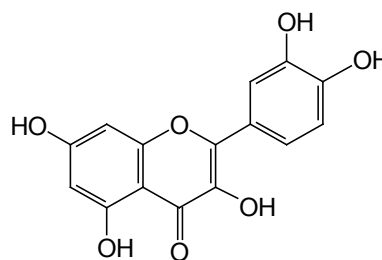
Sempervirin



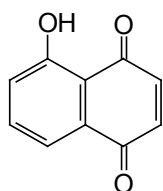
Curcumin



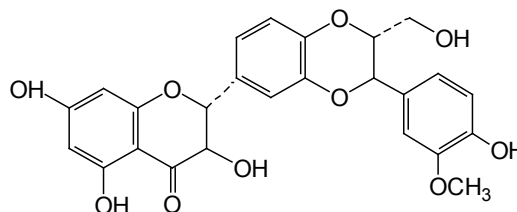
Dibenzoylmethan



Quercetin



Juglon



Silibinin

In der folgenden Abbildung (Abb. 34) ist die Western Blot Analyse (Gesamt-Zelllysat) von Caco-2-Zellen dargestellt, die mit dem Indol-Derivat Indol-3-carbinol (I3C; 50 µM) und dessen Kondensationsprodukte (vgl. Kapitel 1) 3,3'-Diindolylmethan (DIM, 25 µM) und Indolo[3,2-*b*]carbazol (ICZ, 2,5 µM) behandelt worden sind. Die densitometrische Auswertung (B) ergab eine deutliche Steigerung der BCRP-Proteinexpression in der Reihenfolge: **ICZ** (1,58-fach) > **I3C** (1,48-fach) > **DIM** (1,44-fach).

Interessant ist hierbei, dass die x-fache Steigerung des BCRP-Proteins bei allen Behandlungen relativ ähnlich ist, wenn man jedoch die zur Behandlung eingesetzten Konzentrationen vergleicht, so wurde eine 10-fach geringere Menge an ICZ (2,5 µM) im Vergleich zu DIM (25 µM) verwendet, ICZ war trotzdem effektiver in der Induktion von BCRP.

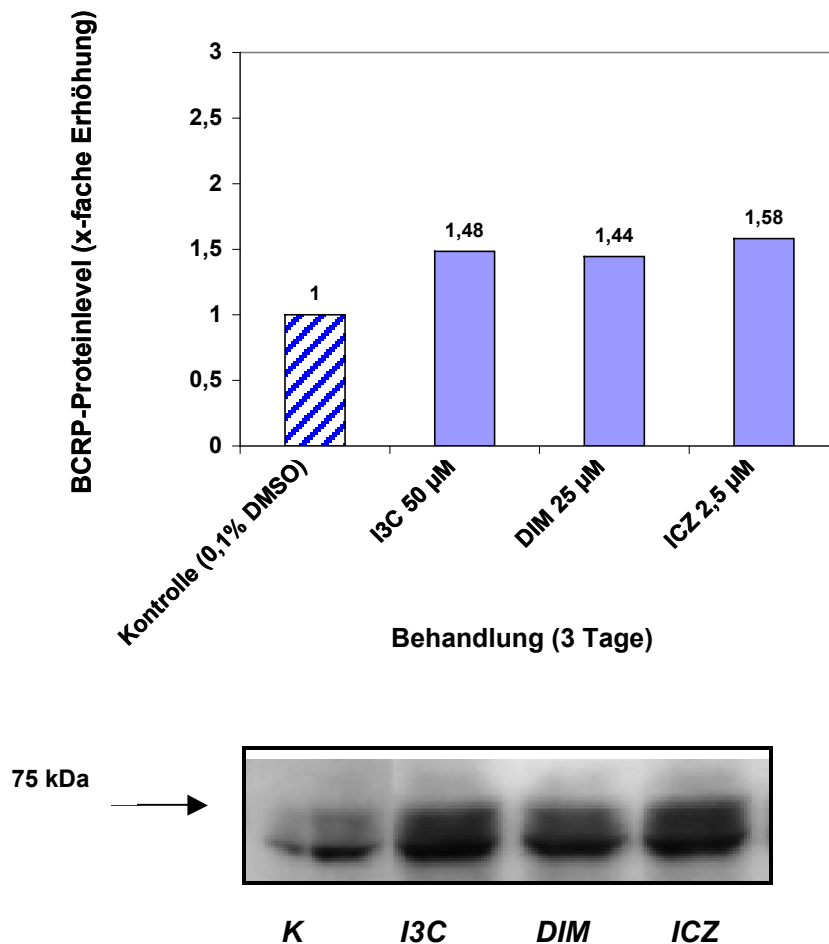


Abbildung 34: BCRP-Western Blot; **Gesamt-Zelllysat** von Caco-2-Zellen (75 µg Protein pro Tasche) nach einer Behandlung (3 Tage) mit: DMSO (0,1%, K = Kontrolle), I3C (50 µM), DIM (25 µM), ICZ (2,5 µM). Die grafische Darstellung der densitometrischen Auswertung eines repräsentativen Blots ist im Säulendiagramm dargestellt.

Dies deutet stark daraufhin, dass es einen Zusammenhang zwischen der Stärke der BCRP-Induktion durch eine Verbindung und dessen AhR-Affinität gibt. (Wie schon in Kapitel 1 angesprochen, so ist ICZ einer der stärksten natürlichen AhR-Agonisten).

3.6. Zusammenfassung der Ergebnisse

1. Eine Vorbehandlung von Caco-2-Zellen mit Flavon, Oltipraz und Indol-3-carbinol führte zu einer vermehrten Metabolisierung von Benzo[a]pyren (BP) zu den Phase II-Metaboliten BP-1- und BP-3-sulfat (150-200% der Kontrolle), wobei die Effektivität der Behandlung in der Reihenfolge Flavon > Oltipraz > Indol-3-carbinol abnahm.
2. Die stärksten Effekte bezüglich der vermehrten Umsetzung von BP zu BP-1- und BP-3-sulfat nach einer Vorbehandlung mit verschiedenen Konzentrationen von Oltipraz und Flavon konnten nach der kürzesten Inkubationszeit von 8 h beobachtet werden. Dabei waren die Effekte konzentrationsabhängig und es wurde im Vergleich zur Kontrolle mehr BP-1-sulfat (1,3-mal mehr) als BP-3-sulfat gebildet.
3. Eine Steigerung des Metabolismus von BP war auch durch eine Vorbehandlung mit weiteren sekundären Pflanzeninhaltsstoffen (z. B. Dibenzoylmethan, Silymarin, Galangin, Silybinin und Genistein etc.) zu erreichen.
4. Eine Vorbehandlung von TC7-Zellen mit verschiedenen sekundären Pflanzeninhaltsstoffen führte zu einer verstärkten Bildung von BP-3-glucuronid aus BP (ca. 270- 125% der Kontrolle), wobei die Behandlung mit Luteolin, Chrysin, Indol-3-carbinol und Naringenin den stärksten Anstieg von BP-3-glucuronid im Medium bewirkte.
5. Eine Vorbehandlung von Caco-2-Zellen mit Flavon und Oltipraz konnte die Metabolisierung von 3-Hydroxy-BP zu BP-3-sulfat nur geringfügig steigern (max. 114% der Kontrolle).
6. Die größte Steigerung der Metabolisierung von 3-Hydroxy-BP zu BP-3- glucuronid in TC7-Zellen konnte durch eine Vorbehandlung (60 h) mit Oltipraz (504% d. Kontrolle), β -NF (183%), 3-MC (154%) und Dibenzoylmethan (135%) erzielt werden.
7. Eine Vorbehandlung von Caco-2-Zellen mit 3-MC, Oltipraz, Flavon und Indol-3-carbinol resultierte in einem apikal gerichteten Netto-Transport (3-MC > Oltipraz > Flavon > I3C) im Transwell™-System, wobei die größten Unterschiede zur Kontrolle nach der kürzesten Inkubationszeit von 4 h auftraten.
8. Der Transport von BP-3-sulfat (Substrat: 3-OH-BP) war am stärksten durch den spezifischen BCRP-Inhibitor Ko 143 hemmbar, jedoch auch durch das natürliche Alkaloid Reserpin. Der MRP2-Hemmer S3025 konnte den Transport von BP-3-sulfat nicht beeinflussen. Daher wird der aktive, apikal gerichtete Transport von BP-3-sulfat von BCRP vermittelt, jedoch nicht von MRP2.
9. Der Transport von BP-3-glucuronid (Substrat: 3-OH-BP) in TC7-Zellen konnte ebenfalls durch Ko 143 gehemmt werden. Die Hemmung von BCRP war in diesen Zellen effektiver als in Caco-2-Zellen, denn die Co-Inkubation mit Ko 143 führte hier über einen Zeitraum von 3 h,

6 h und 9 h zu einer Umkehr des Netto-Transportes von BP-3-sulfat zur basolateralen Seite des Transwell™-Systems.

10. Eine Behandlung von TC7-Zellen (3 Tage) mit Oltipraz, B[k]F und Indolo[3,2-b]carbazol führte bei einer gleichzeitigen Hemmung von CYP1A1 und 1B1 durch α -NF zu einem vermehrten Transport von BP-3-sulfat (Substrat: 3-OH-BP) zur apikalen Seite des Transwell™-Systems. (ICZ: 185%, Oltipraz: 182% und B[k]F: 171% der Kontrolle nach 3 h).

11. Der Transport von BP-3-sulfat durch BCRP-überexprimierende HCT116 NRI-Zellen war nach 3 h, jedoch nicht nach 6 h und 9 h, deutlich erhöht im Vergleich zu den HCT116 WT-Zellen.

12. Die SULT-Isoformen SULT1A1 und SULT1A2 waren am stärksten an der Umsetzung von 1-Hydroxy- und 3-Hydroxy-BP zu den entsprechenden BP-Sulfaten beteiligt.

Während der Ausdifferenzierung von TC7 und Caco-2-Zellen konnte eine Steigerung der Protein-Expression von SULT 1A3, 1A2, 1A1 und 1B1 sowie 1C1 beobachtet werden, wobei SULT1A3 schon zu Beginn des konfluenten Zustandes zu detektieren war und über den gesamten Zeitraum von 14 (TC7) bzw. 24 (Caco-2) Tagen die dominierende SULT-Isoform blieb.

13. Die Hemmung des Abbaus des Ligand-aktivierten Ah Rezeptors durch MG-132 führte zu einer „Superinduktion“ von BCRP und dem etablierten AhR Target-Gen CYP1A1 (mRNA).

14. Die Blockierung des AhR durch PD 98059 führte zu einer Hemmung der BCRP-Induktion (mRNA) durch ICZ.

14. BCRP-Protein war durch eine Behandlung mit TCDD, B[k]F, 3-MC, BP in Caco-2-Zellen induzierbar.

16. CYP1A1 und BCRP mRNA war durch PAK wie B[k]F, DB[a,l]P und durch ein PAK-Gemisch, welches der PAK-Zusammensetzung in Tabakrauch entspricht, induzierbar. In diesem Experiment konnte B[k]F die stärkste Induktion beider Gene bewirken.

17. BCRP-Protein war durch sek. Pflanzeninhaltsstoffe, wie z. B. Quercetin, Silymarin, Dibenzoylmethan, Indol-3-carbinol, Juglon und Curcumin induzierbar.

Anmerkung: einige Ergebnisse zur Genexpression (z. B. Induktion von CYP1A1 und CYP1B1 durch Oltipraz, Flavon, I3C und zahlreiche weitere sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe, die in den Metabolismus-Experimenten untersucht worden sind, sowie die Untersuchung der Effekte dieser Verbindungen auf die SULTs und UGT1A6) konnten aus Platzgründen nicht abgebildet werden.

4. DISKUSSION

4.1. Der Beitrag von Phase I-Enzymen zur Detoxifikation von BP in Caco-2-Zellen

Die gesundheitsfördernden Effekte von sogenannten „nicht-nutritiven“ Komponenten pflanzlicher Lebensmittel, zu denen sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe wie Flavonoide, Indole und polyphenolische Verbindungen etc. zählen, basieren auf vielfältigen biologischen Wirkungen. Epidemiologische Studien haben gezeigt, dass ein Zusammenhang zwischen dem hohen Konsum von Obst und Gemüse und einem reduzierten Risiko, an bestimmten Krebsarten zu erkranken, besteht (Potter *et al.*, 1996), weshalb die dahinter stehenden molekularen Mechanismen zum Gegenstand intensiver Forschung geworden sind.

Die sogenannten „*chemopräventiven Effekte*“ bestimmter sekundärer Pflanzeninhaltsstoffe bezüglich der Entstehung von Krebserkrankungen lassen sich auf unterschiedliche charakteristische Eigenschaften dieser Verbindungen (wie z. B. dem Abfangen freier Radikale, der Inaktivierung von Pro-Karzinogenen durch Adduktbildung, oder dem Schutz „sensitiver“ Regionen im DNA-Molekül) zurückführen.

Große Bedeutung kommt in dieser Hinsicht auch der Modulation von Xenobiotika-metabolisierenden Enzymen (XMEs) zu, denn diese Enzymsysteme ermöglichen es dem Körper, sich an eine geänderte chemische Umwelt anzupassen und aufgenommene, potentiell toxische Substanzen schneller zu entgiften.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit den Effekten von sekundären Pflanzeninhaltsstoffen (und Oltipraz) auf die Komponenten der biochemischen Barriere des Darmes hinsichtlich der Detoxifikation des Pro-Karzinogens Benzo[*a*]pyren (BP) am Beispiel des intestinalen Zellmodells Caco-2. Zu den hier untersuchten Komponenten der biochemischen Barriere zählen die Phase I- (CYP1A1 und CYP1B1) und Phase II- (SULTs und UGTs) Enzyme des Biotransformationsprozesses sowie das ABC-Transportprotein BCRP („Phase III“) (vgl. Kapitel 1, Abb. 5 und 7).

Die in dieser Arbeit präsentierten Daten belegen eindeutig, dass eine Modulation (Induktion) von Phase I-Enzymen (CYP1A1 und 1B1) durch Flavon, Oltipraz und Indol-3-carbinol eine Metabolisierung von BP zu den Hauptmetaboliten BP-1- und BP-3-sulfat beschleunigt, und dass dies letztendlich zu einem vermehrten Transport der Konjugate in die apikale (luminale) Region der Caco-2-Zellen führt. Dies unterstreicht die bedeutende Rolle, welche die Phase I-Enzyme (CYP1A1 und 1B1) bei der Detoxifikation von BP in intestinalen Zellen spielen.

Da paradoxerweise die Phase I-Enzyme (CYP1A1 und 1B1) die an sich nicht-karzinogenen PAK (wie BP) erst metabolisch aktivieren, wird die Induktion von Phase I-Enzymen im allgemeinen mit schädlichen Effekten wie Kanzerogenität und Toxizität assoziiert. Dies muss

jedoch etwas differenzierter betrachtet werden, denn es hängt von einer Reihe von Umständen ab, ob dies der Fall ist. Dabei sollten folgende Punkte in Betracht gezogen werden:

- (a) die AhR-Affinität des Phase I Induktors**
- (b) die Dauer der AhR-Aktivierung, welche mit der Metabolisierbarkeit des Induktors durch endogene Enzyme zusammenhängt**
- (c) die Fähigkeit des Induktors, aktivierte Pro-Karzinogene zu inaktivieren**
- (d) die Fähigkeit des Induktors Phase II-Enzyme und ABC-Transport-Proteine zu induzieren, welche die Exkretion der entstandenen Schadstoff-Metabolite beschleunigen**
- (e) Die Gewebeart (wie z. B. Lunge oder Leber), in der die Induktion von CYP1A1 und 1B1 stattfindet (z. B. gewebespezifische Unterschiede in der Induzierbarkeit und Expression von Enzymen.)**

Die toxischen Effekte des stärksten bekannten AhR-Liganden, TCDD (2,3,7,8,-Tetrachlordibenzo-*p*-dioxin), wurden intensiv untersucht und sie werden auf die Induktion von einer Reihe von Genen, insbesondere von CYP1A1 und CYP1B1 zurückgeführt. Aus Struktur-Aktivitäts-Beziehungen verschiedener AhR-Agonisten (z. B. PCBs und PAKs) konnte abgeleitet werden, dass die Fähigkeit der Substanzen, toxische Effekte in biologischen Systemen zu erzeugen, stark mit deren Affinität zum Ah-Rezeptor korrelierten (Safe *et al.*, 1990, Safe *et al.*, 1995). Das große toxische Potential von TCDD ist daher hauptsächlich auf zwei Eigenschaften dieses Stoffes zurückzuführen: erstens die extrem hohe AhR-Affinität (im *picomol*-Bereich) und zweitens auf die schlechte Metabolisierbarkeit durch körpereigene Enzyme aufgrund der besonderen chemischen Struktur dieses Moleküls. Durch diese besonderen Eigenschaften können bereits sehr geringe Mengen an TCDD eine anhaltende AhR-Aktivierung mit der daraus resultierenden vermehrten Genexpression bewirken. Interessanterweise konnten Grady *et al.* (1992) in einem Experiment mit Fischen zeigen, dass eine Verabreichung von β -Naphthoflavon (einem im Vergleich zu TCDD schwachen AhR-Liganden) mit dem Futter über einen längeren Zeitraum zu ähnlichen toxikologischen Effekten führte, wie sie auch durch TCDD verursacht werden.

Die in der vorliegenden Arbeit zur Induktion von Phase I-Enzymen verwendeten AhR-Agonisten (z. B. Flavon, Oltipraz, I3C) besitzen alle eine relativ schwache Affinität zum Ah-Rezeptor und sie unterliegen darüber hinaus einem intensiven Phase I- (CYPs) und Phase II-Metabolismus (SULTs und UGTs) [Murota *et al.*, 2000, Liu *et al.*, 2000, Vaidyanathan *et al.*, 2002].

Ein weiterer Aspekt, der darüber entscheiden kann, ob ein Phase I-Induktor zu toxischen Effekten führt, ist die Fähigkeit der Verbindung, reaktive Metabolite eines Pro-Karzinogens

„abzufangen“. Die metabolische Aktivierung von BP verläuft zunächst über die Bildung eines 7,8-Epoxy-Derivats¹, welches durch die Epoxidhydrolase (vgl. *Kapitel 1*) weiter zum 7,8-Diol² umgesetzt wird. Die erneute Oxidierung des entstandenen 7,8-Diols durch Cytochrom P450 Enzyme (z. B. CYP1A1) führt zur Bildung des eigentlichen Karzinogens, dem 7,8-Diol-9,10-epoxid³. Die besondere Reaktivität dieses „*Bay-Region-Epoxids*“, welche letztendlich zu schädlichen Effekten wie Zelltransformation und Kanzerogenität führen kann, liegt in dessen Fähigkeit begründet, stabilisierte und dadurch besonders langlebige Carbokationen zu bilden. Darüber hinaus ist das 7,8-Diol-9,10-epoxid durch die besonderen, von der Bay-Region verursachten sterischen Bedingungen, relativ resistent gegenüber einer Detoxifikation durch Konjugation (vgl. *Kapitel 1*). Die Inaktivierung des reaktiven Bay-Region-Epoxids (bzw. dessen Carbokation) ist daher entscheidend für die Abwendung kanzerogener Effekte. Dabei kann eine Inaktivierung sowohl von exogenen Substanzen, wie z. B. durch einen Induktor selbst (z. B. ein Flavonoid), oder durch redox-aktive zelleigene Verbindungen (z.B. GSH oder Thioredoxin) bewirkt werden. Flavonoide sind seit langem bekannt für ihre antioxidativen Fähigkeiten, die sich aus ihrer Eigenschaft ableiten lässt, sauerstoffhaltige freie Radikale, sog. „*Reaktive Oxygen Spezies*“ (ROS) abfangen zu können (Cos *et al.*, 1998, Böhm *et al.*, 1998). So konnte in einem *in vitro* Experiment gezeigt werden, dass einige chemopräventive Verbindungen, wie z. B. Oltipraz, Genistein und Ellag-Säure, die Bildung von DNA-Addukten mit aktivierten Epoxy-Derivaten von Dibenzo[*a,l*]pyren (Smith *et al.*, 1998) und Benzo[*a*]pyren (Smith *et al.*, 1999) verhindern können.

Diese chemopräventiven Verbindungen stellen ein nukleophiles Zentrum bereit, mit welchem der aktivierte Metabolit reagieren kann und somit inaktiviert wird. Des weiteren ist z. B. Ellag-Säure in der Lage, mit potentiellen Angriffspunkten für mutagene Verbindungen in der DNA selbst kovalente Addukte zu bilden, welche jedoch nicht zu Fehlablesungen bei der DNA-Replikation führen (Watzl und Rechkemmer 2001).

Eine weitere chemopräventive Wirkung durch eine Komplexbildung mit Pro-Karzinogenen wurde erst kürzlich von Mata *et al.* (2004) beschrieben. Durch die Bildung von starken nicht-kovalenten Komplexen von z. B. DB[*a,l*]P und Aflatoxin B1 mit Chlorophyllin (einem Natrium-Kupfer-Derivat von Chlorophyll) konnte die Absorption dieser Stoffe im Caco-2-Zellmodell signifikant vermindert werden, wodurch ein Entgiftungseffekt erzielt werden konnte.

Bei der Diskussion von schädlichen Auswirkungen einer Induktion von Phase I-Enzymen hinsichtlich der Entstehung von Krebs sollte berücksichtigt werden, dass diese Effekte unter Umständen gewebespezifische Unterschiede aufweisen können, welche auf der unterschiedlichen Ausstattung der Zellen mit Phase- und Phase II-Enzymen und

¹ 7,8-Epoxy-7,8-dihydro-BP

² 7,8-Dihydroxy-7,8-dihydro-BP

³ (±) (syn/anti)- 7,8-Dihydroxy-9,10-epoxy-7,8,9,10-tetrahydro-BP

Transportproteinen, sowie deren unterschiedliche Induzierbarkeit basieren. Ein interessantes Experiment, aus dem diese gewebespezifischen Unterschiede deutlich hervorgehen, wurde bereits in den 70er Jahren von Estabrook *et al.* (1978) durchgeführt. Hierzu wurde die Bildung verschiedener BP-Metabolite durch Mikrosomen (aus Lunge und Leber) von unbehandelten Ratten (Kontrolle) und Ratten, welche zuvor mit 3-MC (20 mg/ kg, *i. p.*) behandelt wurden, untersucht und dabei konnten erstaunliche Unterschiede festgestellt werden. Die Cytochrome der Lunge waren offensichtlich stärker induzierbar, da die Mikrosomen der 3-MC-behandelten Ratten im Vergleich zur Kontrolle etwa die 4-fache Menge an BP-Metaboliten produzierten, während die 3-MC-behandelten Leber-Mikrosomen nur 2-mal mehr BP-Metabolite bildeten als die entsprechenden Mikrosomen der unbehandelten Tiere. Betrachtet man einmal die Bildung von „kritischen Metaboliten“ des BP (7,8-Diol, der Vorläufer für das Bay-Region-Epoxid), so bewirkte eine Behandlung der Lungen-Mikrosomen mit 3-MC eine fast 10-fache Steigerung der Bildung des 7,8-Diols. Die Leber-Mikrosomen produzierten nach der Behandlung mit 3-MC nur etwa die 3-fache Menge an 7,8-Diol im Vergleich zur Kontrolle, allerdings auch insgesamt eine größere Menge.

Beide Systeme bilden jedoch bezüglich der untersuchten BP-Metabolite (9,10-Diol⁴, 7,8-Diol⁵, 9-OH⁶, Chinone, 4,5-Diol⁷ und 3-OH⁸) sowohl vor als auch nach der Induktion mit 3-MC als Hauptmetaboliten das 3-Hydroxy-BP („3-OH“) mit einem Anteil im Bereich von 35 bis 46% der Gesamtmetabolite.

Bei diesem experimentellen Ansatz wird jedoch nur der Einfluss der Cytochrome (und der Epoxidhydrolasen) erfasst; die Bedingungen in der intakten Zelle können sich durch den Beitrag von Phase II-Enzymen und Transportproteinen wiederum von diesem isolierten System unterscheiden.

Wie im folgenden Abschnitt (Punkt 4.2.) näher erläutert wird, konnten im Medium von TC7-Zellen (bei Caco-2-Zellen nicht nachweisbar) nur extrem geringe Mengen an 7,8-Diol und 7,8,9,10-Tetrol detektiert werden, so dass daraus der Schluss gezogen werden kann, dass ganz offensichtlich die Präsenz von Phase II-Enzymen und ABC-Transportproteinen in der intakten Zelle für diese unterschiedliche Metabolisierung von BP im Vergleich zu den Mikrosomen verantwortlich ist.

Da jedoch auch Spezies-spezifische Unterschiede in der Aktivierung/Metabolisierung von PAK wie BP bestehen können, ist eine Extrapolation tierexperimenteller Daten auf die Situation im menschlichen Körper nur bedingt möglich.

Zum Beispiel wird eine unterschiedliche Empfindlichkeit der Lunge von Ratte und Syrischem Hamster gegenüber PAK auf deren unterschiedliche Induzierbarkeit der Cytochrom P450

⁴ 9,10-Dihydroxy-9,10-dihydro-BP

⁵ 7,8-Dihydroxy-7,8-dihydro-BP

⁶ 9-Hydroxy-BP

⁷ 4,5-Dihydroxy, 4,5-dihydro-BP

⁸ 3-Hydroxy-BP

Enzyme zurückgeführt, welche für die metabolische Aktivierung dieses Pro-Karzinogens verantwortlich sind. Eine gleichzeitige Behandlung der Lungenzellen des Syrischen Hamsters (M3E3/C3-Zellen) mit dem Proteinsynthese-Hemmer Cycloheximid und einem CYP1A1-Induktor (Benzo[a]anthracen) konnte die Fähigkeit dieser Zellen, Chrysen zu metabolisieren, erheblich steigern (Jacob *et al.*, 1996b). Die Autoren diskutieren in diesem Zusammenhang, dass die M3E3/C3-Zellen offensichtlich eine große Menge eines labilen Repressorproteins bilden, welches die Transkription von CYP1A1 durch den Ligand-aktivierten AhR zum größten Teil verhindert. Bei diesem Protein könnte es sich z. B. um das Ah-Rezeptor-Repressorprotein (AhRR; vgl. Kapitel 1) handeln. Das AhRR-Protein kann einmal als direkter transkriptioneller Repressor von XRE-regulierten Genen agieren und darüber hinaus konkurriert es mit dem ARNT um die Dimerisierung mit dem AhR und dient somit in der Zelle als negative Rückkopplung bei einer Induktion von z. B. CYP1A1, um eine anhaltende Überexpression zu vermeiden (Gu *et al.*, 2000, Denison und Nagy, 2003).

4.2. Die Bildung „toxischer“ Phase I-Metabolite des BP in Caco-2-Zellen

Die Enzymsysteme der intestinalen Zelllinie Caco-2 bilden als Benzo[a]pyren-Hauptmetabolite die Sulfat-Konjugate BP-1- und BP-3-sulfat, sowie das BP-3-glucuronid. In geringen Mengen konnte auch ein Diol (9,10-Diol⁴) detektiert werden. Aufgrund ihrer extremen Reaktivität sind jedoch die Epoxy-Derivate selbstverständlich nicht nachweisbar, allerdings wäre das Auftreten der Hydrolyse-Produkte 7,8-Diol⁵ und 7,8,9,10-Tetrol⁹ ein Hinweis auf deren Entstehung. Da die Bay-Region-Epoxyde offensichtlich nur in sehr geringen Mengen entstehen, hängt der Nachweis deren Reaktionsprodukte von der Empfindlichkeit der Detektionsmethode und von den experimentellen Bedingungen, wie z. B. von der Zahl der metabolisierenden Zellen, ab. In der überwiegenden Zahl der Inkubationsexperimente (Fläche: 4,71 cm² oder 9,00 cm²) mit vorbehandelten Caco-2-Zellen konnten keine Hydrolyse-Produkte (7,8-Diol, 7,8,9,10-Tetrol) der reaktiven Epoxy-Derivate des BP detektiert werden, mit einer Ausnahme. Dabei handelte es sich um einen Inkubationsversuch, bei dem TC7-Zellen in einem größerem Format (28 cm² Petrischalen) mit Flavonoiden (Luteolin, Apigenin, Acacetin, β -NF, etc.) vorbehandelt wurden. Das 7,8,9,10-Tetrol konnte nur in geringen Spuren nachgewiesen werden (Ausnahme: β -NF-behandelte Zellen), während das 7,8-Diol im Bereich von 2 bis 5 pmol/cm² in den Medium-Proben enthalten war.

⁴ 9,10-Dihydroxy-9,10-dihydro-BP

⁵ 7,8-Dihydroxy-7,8-dihydro-BP

⁹ 7,8,9,10-Tetrahydroxy-7,8,9,10-tetrahydro-BP

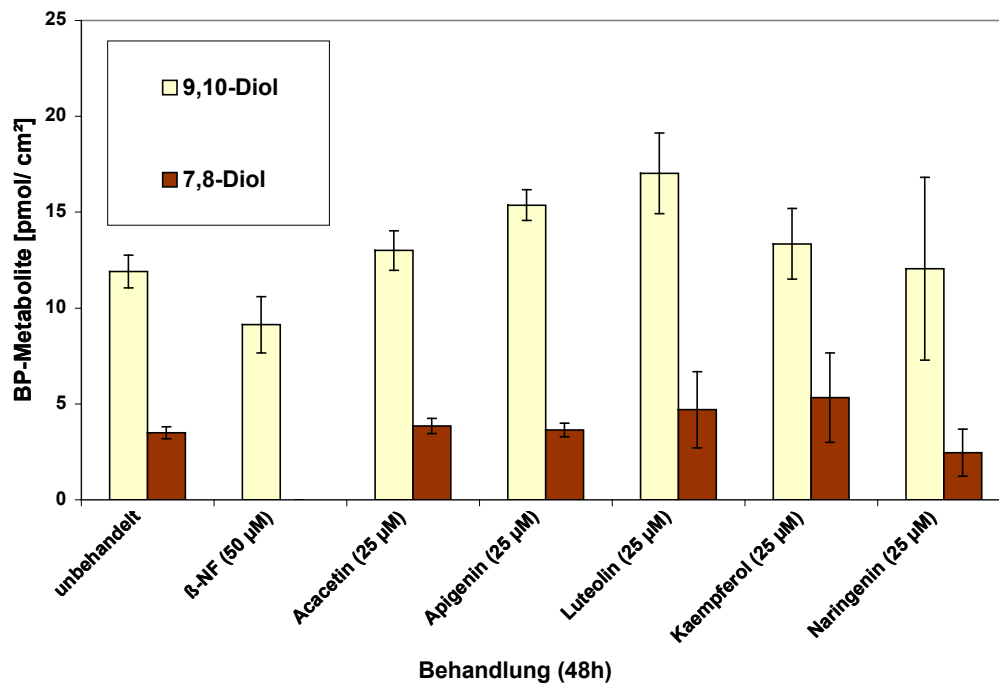


Abbildung 35: Metabolisierung von BP (10 µM) durch TC7-Zellen (vorbehandelt mit natürlichen Flavonoiden und β-NF): Bildung der Nebenprodukte 9,10-Diol und 7,8-Diol. β-NF-behandelte Zellen bildeten das 7,8-Diol nur geringen Spuren, aber dafür geringfügig mehr 7,8,9,10-Diol (nicht dargestellt) als die anderen Gruppen.

Dabei ist interessant anzumerken, dass auch die unbehandelten Zellen das 7,8-Diol produzierten, jedoch Zellen, die mit dem stärksten (im Vergleich zu den anderen Flavonoiden) AhR-Agonisten β-Naphthoflavon vorbehandelt wurden, nur Spuren von 7,8-Diol in das Medium abgaben. Es konnte jedoch bei diesen Zellen eine erhöhte Bildung von BP-1- und BP-3-sulfat, sowie in geringen Mengen mehr 7,8,9,10-Tetrol im Vergleich zu den anderen Behandlungsgruppen beobachtet werden. Aus dieser Beobachtung könnte man den Schluss ziehen, dass in diesen Zellen alles verfügbare Substrat (BP) von den relativ stark induzierten CYPs (1A1 und 1B1) zum 3-Hydroxy- und 1-Hydroxy-BP umgesetzt und daraufhin der anschließenden Konjugationsreaktion zugeführt wurde. Die Bildung von 7,8,9,10-Tetrol in den β-NF-behandelten Zellen kann auf die Induktion von CYP3A4 durch β-NF zurückgeführt werden (Conney, 2003), da dieses Enzym neben CYP1A1 und CYP1B1 die Umsetzung von 7,8-Diol zum 7,8-Diol-9,10-epoxy-BP katalysiert.

In einem Experiment mit genetisch veränderten V79-Zellen (stabil transfiziert mit *CYP1A1* und *CYP1A2*) konnten Jacob *et al.* (1996a) zeigen, dass CYP1A1 stark an der Oxidation von BP an der Position 7,8 beteiligt ist (19,9% der Gesamtmetabolite), jedoch die Isoform CYP1A2, die auch in Colonzellen exprimiert wird (Ding und Kaminsky, 2003), in dieser Hinsicht nur eine untergeordnete Rolle spielt (3,2% der Gesamtmetabolite). Beide Formen oxidieren das BP bevorzugt an der Position C₃ (CYP1A1: 53,9% bzw. CYP1A2: 86,3%). Da

die V79-Zellen keine endogenen Phase II-Enzyme wie SULTs und UGTs, jedoch GSTs exprimieren, könnte in diesem Zusammenhang spekuliert werden, ob die sehr geringen Mengen an 7,8-diol-BP, welche in Caco-2 (TC7) Zellen im Vergleich zu den CYP1A1-transfizierten V79-Zellen detektiert wurden, auf die Expression von SULTs und UGTs zurückzuführen ist. Elektrophile Verbindungen, wie sie aus dem 7,8-Epoxid (der Vorstufe des 7,8-Diols) entstehen können, werden auch „passiv“ ohne die Katalyse von GST an GSH konjugiert. Daher wäre eine weitere spekulative Erklärung für das oben erläuterte Phänomen ein unterschiedlicher Gehalt an intrazellulärem GSH in den beiden Zelllinien.

Aufgrund der in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse können hierzu keine Aussagen getroffen werden, da die hier verwendete Detektionsmethode keine Sulfat- oder Glucuronsäure-Konjugate erfasst, die aus der Vorstufe 7,8-Diol hervorgehen.

Da auch Caco-2-Zellen in diesem Format (28 cm²) kultiviert wurden, dort jedoch keine Hydrolyse-Produkte der reaktiven Epoxy-Derivate nachweisbar waren, könnte dies möglicherweise auf die unterschiedliche Enzym-Ausstattung, eine stärkere Induzierbarkeit von CYP1A1 und CYP1B1 in Caco-2-Zellen oder eventuell sogar auf Unterschiede in der Expression von ABC-Transportern zurückzuführen ist (vgl. Punkt 4.4). Die große Bedeutung, die auch ABC-Transportproteine bei Verminderung der Bildung von DNA-Addukten mit aktivierten Metaboliten wie BP spielen, könnte aus einer Studie von Srivastava *et al.*, (2002) abgeleitet werden. Dort wurde bei einer Überexpression von MRP2 in MDCK-Zellen eine verminderte Akkumulation von BPDE-SG (Glutathion-Konjugat des Bay-Region-Epoxids, s. o.) und damit einhergehend auch eine geringere Adduktbildung mit der DNA beschrieben. Offensichtlich kann auch eine Anreicherung von Konjugaten in der Zelle eine schädliche Wirkung haben (z. B. durch Produkt-Hemmung des konjugierenden Enzyms GST) und erst nach dem Abtransport dieser Verbindungen aus der Zelle ist diese Möglichkeit ausgeschlossen.

Die stärkere basale Expression von CYP3A4 in TC7-Zellen könnte jedenfalls ein Grund für die geringen, aber noch detektierbaren Mengen an 7,8,9,10-Tetrol im Medium der unbehandelten sowie mit Flavonoiden behandelten TC7-Zellen sein, da CYP3A4, wie oben bereits erwähnt, an der zweiten Epoxidierung von 7,8-Diol zum 7,8-diol-9,10-Epoxid des BP beteiligt ist (Guengerich *et al.*, 2003). In dieser Hinsicht stellen die TC7-Zellen aufgrund ihrer stärkeren Expression von CYP3A4 ein besseres Modell für menschliche Enterozyten dar, denn sowohl Colon- als auch Dünndarmzellen weisen einen höheren Gehalt an CYP3A4 auf als Caco-2-Zellen (Lin *et al.*, 1999, Ding und Kaminsky, 2003).

Eine Aussage darüber, ob nun eine Behandlung mit sekundären Pflanzeninhaltsstoffen (z. B. Flavonoiden) und die damit einhergehende Induktion von CYP1A1 und CYP1B1 letztendlich zu einer „schädlichen“ Auswirkung durch Bildung von reaktiven BP-Metaboliten führt, kann

definitiv nur getroffen werden, indem die tatsächliche Anzahl an BP-DNA-Addukten in behandelten Zellen und unbehandelten Zellen bestimmt wird. Ein *in vitro* Experiment gibt in der Regel nur Aufschluss über mögliche biologische Mechanismen, jedoch ist die Situation im intakten Organismus sicherlich viel komplexer. Darüber hinaus führt nicht jede DNA-Adduktbildung mit einem Karzinogen zur Zelltransformation und für viele dieser sekundären Pflanzeninhaltsstoffe (z. B. Flavon) konnten anti-präneoplastische Effekt durch Einleitung der Apoptose beschrieben werden (Dempke *et al.*, 2001).

Eine bessere Vorhersage, wie sich eine Induktion von Phase I-Enzymen letztendlich auf den gesamten Organismus auswirkt, kann sicherlich nur durch ein *in vivo* Experiment z. B. mit genetisch veränderten Tier-Modellen getroffen werden.

Ein interessantes Experiment zu der Fragestellung, wie sich die orale Verabreichung von BP bei einer genetischen Abwesenheit von *Cyp1a1* auf eine DNA-Adduktbildung auswirkt, wurde von Uno *et al.* (2004) durchgeführt. Nach der Verabreichung von BP konnten bei der Untersuchung von verschiedenen Körpergeweben der *Cyp1a1*(-/-)-Mäuse stark erhöhte Level von BP-DNA-Addukten in fast allen Geweben, bis auf den Dünndarm, beobachtet werden. Dieses Experiment zeigt deutlich, dass bei einer oralen Verabreichung des kanzerogenen Stoffs die Aktivität von *Cyp1a1* für den Detoxifikations-Prozess eine wichtigere Rolle spielt, als für die metabolische Aktivierung. Dies unterstützt die in dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse, dass eine Induktion von Phase I-Enzymen im Gegensatz zur allgemeinen Assoziation mit schädlichen Effekten wie Toxizität auch einen „positiven“ Effekt, wie die Beschleunigung der Entgiftung von Pro-Karzinogenen wie BP, haben kann.

4.3. Der Beitrag von Phase II und ABC-Transportern (Phase III) zum Detoxifikationsprozess von BP in Caco-2-Zellen

Von den untersuchten Phase II-Enzymen (SULTs und UGTs) war die Expression von Sulfotransferasen (mRNA) durch die Behandlungen sowohl mit sekundären Pflanzeninhaltsstoffen, als auch mit PAK, nicht beeinflussbar. Aus den Versuchen zur Bestimmung der Substratspezifität der verschiedenen SULT Isoformen ging hervor, dass SULT1A1 und SULT1A2 am stärksten (im geringeren Konzentrationsbereich des Substrates) an der Bildung von BP-1- und BP-3-sulfat beteiligt war, diese Isoformen jedoch nur relativ schwach in Caco-2 und TC7-Zellen exprimiert sind. Aufgrund der dominierenden Expression von SULT1A3 in beiden Zelllinien ist diese Isoform mit größter Wahrscheinlichkeit auch am stärksten an der Umsetzung von 1-Hydroxy-BP und 3-Hydroxy-BP zu den entsprechenden Sulfatkonjugaten beteiligt.

Die vermehrte Expression aller untersuchten SULTs im Verlauf der Zelldifferenzierung von Caco-2- und TC7-Zellen impliziert eine stärkere Empfindlichkeit der Zelle gegenüber

Xenobiotika im undifferenzierten Zustand. (Dies sollte auch bei Zytotoxizitätstests bedacht werden). Eine zunehmende Protein-Expression im Verlauf der Differenzierung von Enterozyten konnte bereits für MRP2 (Haimeur *et al.*, 2004) und für den Glucose-Transporter SGLT1 in Enterozyten beobachtet werden (Ferraris, 2001).

Nennenswerte Effekte bezüglich der vermehrten Bildung von Glucuronsäure-Konjugaten des BP konnte nur durch wenige Verbindungen erzielt werden, wobei hier offensichtlich ein Zusammenhang zwischen der Erhöhung der BP-3-glucuronide und der AhR-Affinität besteht. Dies ist auf die gleichzeitige Induktion von Cytochromen (CYP1A1 und CYP1B1) und UGT1A6 zurückzuführen. Der Beitrag, welcher ausschließlich auf die Induktion von Phase II (und evtl. Phase III) zurückzuführen ist, geht nur aus dem Experiment hervor, in dem 3-Hydroxy-BP als Substrat eingesetzt wurde.

In diesem Versuch erzielte die Behandlung mit Oltipraz den größten Anstieg des Gehaltes von BP-3-glucuronid im Medium gegenüber der Kontrolle. Die Vorbehandlung mit den stärkeren AhR-Agonisten B[k]F und 3-MC führte jedoch zu einer verminderten Produktion von BP-3-glucuronid, was vermutlich damit zusammenhängt, dass durch die Behandlung gleichzeitig auch CYP1A1 und CYP1B1 induziert wurden, und beide Enzyme das Substrat 3-Hydroxy-BP weiter zum 3,6-Chinon oxidieren können. Dadurch steht den behandelten Zellen weniger Substrat zur Verfügung, das zum BP-3-glucuronid umgesetzt werden kann.

Die Bezeichnungen „Modulation von Phase I/ bzw. Phase II und/ oder Phase III“ sind hier gewählt worden, um die Experimente in Kategorien einteilen zu können; es sei jedoch an dieser Stelle angemerkt, dass eine Behandlung immer mehrere Komponenten beeinflussen kann. Werden jedoch nur die Sulfat-Konjugate betrachtet, so kann ein Beitrag zum beobachteten Effekt durch die Modulation von Phase II ausgeschlossen werden, da die Sulfotransferasen durch die verwendeten Substanzen nicht induziert werden können.

Bei Experimenten zur „Modulation von Phase I“ diente als Substrat das BP und durch die relativ kurze Behandlungsdauer von 48h konnte angenommen werden, dass der Beitrag von BCRP zur vermehrten Exkretion von BP-Konjugaten eher gering war. Denn wie aus Untersuchungen zur Proteinexpression hervorging, war die Expression des BCRP-Proteins erst nach einer Behandlungsdauer von 72h deutlich induziert (durch z. B. ICZ). Des weiteren zeigte ein funktioneller Transport-Assay, bei dem TC7-Zellen zur Induktion von BCRP vorbehandelt wurden (72h) zwar einen deutlich verstärkten Transport im Gegensatz zu den unbehandelten Zellen, dieser Effekt war jedoch längst nicht so stark wie die vermehrte Exkretion durch eine Induktion von Phase I-Enzymen (*Beispiel*: vermehrter Transport von BP-3-sulfat nach Behandlung mit B[k]F zur Induktion von BCRP: ca. **2**-fach; dagegen Induktion von CYP1A1 und 1B1 durch 3-MC: ca. **12**-fache Steigerung des Transportes von BP-3-sulfat im Vergleich zur Kontrolle).

Bei der „Modulation von Phase II und Phase III“ wurde der Phase I-Metabolit des BP, 3-Hydroxy-BP als Substrat eingesetzt und damit die möglichen Einflüsse einer Induktion von Phase I-Enzymen auf die beobachteten Effekte ausgeschlossen.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die größte Steigerung in der Bildung und Exkretion von BP-Metaboliten (BP-1-, BP-3-sulfat und BP-3-glucuronid) durch eine Modulation von Phase I des Fremdstoffmetabolismus erzielt werden konnte. Einen deutlichen, aber etwas geringeren Beitrag leisten in dieser Hinsicht das Phase II Enzym UGT1A6 (und evtl. andere Isoformen) und das ABC-Transportprotein BCRP.

4.4. Identifizierung des am Transport von BP-3-sulfat und BP-3-glucuronid beteiligten ABC-Transporters

Unter der stetig steigenden Zahl an bekannten BCRP-Substraten befinden sich überwiegend Chemotherapeutika (Mitoxantron, Topotecan, Irinotecan, Doxorubicin etc.), allerdings scheint BCRP auch eine wichtige physiologische Rolle bei der Ausscheidung von toxischen Lebensmittelkomponenten zu spielen. Dieses konnte durch die Entdeckung von zwei neuen BCRP-Substraten belegt werden, dem phototoxischen Chlorophyll-Abbauprodukt Phaeophorbid A (Jonker *et al.*, 2002) und dem heterozyklischen aromatischen Amin PhIP (2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridin), welches in erhitzten Fleischwaren (70 ng/g; Augustsson *et al.*, 1997) vorkommt und sich *in vitro* und *in vivo* als effektiv transportiertes BCRP-Substrat erwiesen hat (van Herwaarden *et al.*, 2003). Beide Arbeitsgruppen konnten den Transport der genannten Verbindungen für die murine Form (Bcrp1) zeigen, bedeutende Unterschiede in der Substratspezifität zwischen BCRP und Bcrp1 sind bisher in der Literatur nicht beschrieben worden (Dezember 2004). Durch eine erst kürzlich veröffentlichte Arbeit von Pavék *et al.* (2004) konnte belegt werden, dass PhIP auch für die humane Form BCRP ein gutes Substrat darstellt.

Obwohl es sich bei dem Großteil der heute bekannten BCRP-Substrate um unveränderte Pharmaka handelt, wurden auch zahlreiche Sulfat- und Glucuronsäure-Konjugate (z. B. Estron-sulfat, Dehydroepiandrosteron-sulfat und 4-Methylumbelliferon-glucuronid; Suzuki *et al.*, 2003) als BCRP-Substrate identifiziert. Die wichtige Rolle, die BCRP im Transport und damit in der Ausscheidung von Sulfat-Konjugaten auch *in vivo* spielt, konnte erst kürzlich von Mizuno *et al.* (2004) an einem Bcrp1(-/-) Mausmodell gezeigt werden. Die fehlende Expression von Bcrp1 führte bei diesen Tieren zu einer Beeinträchtigung der renalen Exkretion eines Thiazol-Sulfat-Konjugates, was gleichzeitig auch die Bedeutung von BCRP für Ausscheidungsprozesse von Fremdstoffen über andere Organe als über den Darm hervorhebt.

Mit den in dieser Arbeit als BCRP-Substrate identifizierten Verbindungen BP-3-sulfat und BP-3-glucuronid können zwei weitere Beispiele für von BCRP transportierte Sulfat- und

Glucuronsäure-Konjugate angeführt werden. Dies unterstreicht ein weiteres Mal die bedeutende Rolle, die BCRP im Schutz des Körpers vor potentiell toxischen Nahrungsmittelinhaltsstoffen spielt.

Drei apikal lokalisierte ABC-Transporter (P-Gp, MRP2 und BCRP) konnten als mögliche Kandidaten für den Transport von BP-3- (und BP-1-sulfat) und BP-3-glucuronid in Frage kommen, denn abgesehen von ihrer Eigenschaft, als apikale Effluxpumpen arbeiten zu können, besitzen alle drei ABC-Proteine auch teilweise überlappende Substratspezifitäten (Bates *et al.*, 2001, Haimeur *et al.*, 2004).

Eine Beteiligung von P-Gp am Transport von BP (Schuetz *et al.* 1998), BP-1- und BP-3-sulfat (Büsen *et al.* 2002, Büsen *et al.*, 2003) konnte bereits durch andere Arbeiten widerlegt¹⁰ werden. Die in dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse bestätigen dies, denn eine Co-Inkubation von Caco-2-Zellen mit dem P-Gp-Hemmer Cyclosporin A (CsA) konnte keine Verminderung des Transportes von BP-Sulfat-Konjugaten bewirken. Es konnte bei diesem Experiment eher noch eine Steigerung der transportierten BP-Sulfate beobachtet werden. Dies könnte einerseits auf eine Induktion von Cytochromen (z. B. CYP1A1 und 1B1) zurückzuführen sein, andererseits könnte dies auch einen Hinweis darauf geben, dass BCRP eventuell noch über einen zweiten nukleären Rezeptor reguliert werden kann (vgl. Abschnitt „*Regulation von BCRP*“). Da CsA ein bekanntes Substrat für CYP3A4 ist und dieses Cytochrom PXR-abhängig reguliert wird, könnte CsA eine Induktion von BCRP unter Beteiligung des PXR bewirken. Interessant wäre es in diesem Zusammenhang, zu prüfen, ob der BCRP-Hemmer Reserpin ebenfalls eine Induktion von BCRP bewirken kann, denn Reserpin stellt auch ein Substrat für CYP3A4 dar (Ding und Kaminsky, 2003).

Der zweite, für den Transport von BP-Konjugaten in Frage kommende ABC-Transporter, der in dieser Arbeit untersucht wurde, war MRP2, da Konjugate von organischen Verbindungen mit Sulfat oder Glucuronsäure bekannte Substrate von MRP2 sind (König *et al.*, 1999 b). Wie jedoch in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, hatte eine Hemmung von MRP2 mit S3025, einem synthetischen Chlorogensäure-Derivat (Herling *et al.*, 2002), keinen Effekt auf den Transport von BP-3-sulfat in Caco-2-Zellen. Damit kann eine Beteiligung von MRP2 am Transport von BP-3-sulfat ausgeschlossen werden.

Dagegen geht aus den Experimenten zur chemischen Hemmung von BCRP mit Reserpin und Ko 143 eindeutig hervor, dass BCRP am Transport von BP-3-sulfat und BP-3-glucuronid beteiligt ist. Da bei diesem experimentellen Ansatz die zu transportierende Verbindung zunächst in den Zellen gebildet werden musste, war es daher von größter Bedeutung, dass der verwendete chemische Hemmer des Transportproteins weder einen Einfluss auf die Phase I noch auf die Phase II des Fremdstoffmetabolismus hatte. Da als Substrat das 3-Hydroxy-BP eingesetzt wurde, konnte jeglicher Einfluss des Hemmers auf die Phase I

¹⁰ hierzu existieren in der Literatur teilweise widersprüchliche Angaben, Yeh *et al.* beschreibt BP als P-Gp-Substrat (Yeh *et al.*, 1992)

ausgeschlossen werden. Nach einer Berechnung des Gesamtgehaltes an Konjugaten im Medium konnte auch ein Einfluss auf die konjugierenden Enzyme (SULTs und UGTs) ausgeschlossen werden, da Kontrollzellen und behandelte Zellen die gleichen Mengen an BP-Konjugaten produzierten.

Vergleicht man den hemmenden Effekt von Ko 143 auf den Transport von BP-3-sulfat in Caco-2-Zellen und in TC7-Zellen, so fällt auf, dass trotz gleicher Versuchsbedingungen der Transport dieses BP-Metaboliten in den TC7-Zellen stärker gehemmt wurde (TC7: 17%, 20%, 24% und Caco-2: 36%, 70%, 73%; an apikal transportiertem BP-3-sulfat im Vergleich zur Kontrolle nach 3h, 6h und 9h). Dies impliziert, dass in Caco-2-Zellen das BCRP-Protein stärker exprimiert wird als in TC7-Zellen.

Eine Reihe von Bedingungen kann die Expression von ABC-Transportern beeinflussen. Hirohashi *et al.* (2000) konnten zeigen, dass z. B. Kulturbedingungen von Zellen einen Einfluss auf die Expression von P-Gp haben und eine Studie von Makhey *et al.* (1998) berichtet von einem Zusammenhang zwischen der Passage-Zahl von Caco-2-Zellen und deren relative Expression von LRP, MRP und P-Gp. Da die TC7-Zellen durch die wiederholte Passagierung von Caco-2-Zellen (ca. 200 mal) generiert wurden, könnte dies eine mögliche Erklärung sein. Dies bleibt jedoch durch Western Blot Analysen zu klären.

Taipalensuu *et al.* (2001) konnten bei einem Vergleich von humanem Jejunum-Gewebe und Caco-2-Zellen in Letzteren eine 100-fach geringere BCRP-Expression (mRNA) feststellen. Hierbei ist jedoch anzumerken, dass in dieser Studie Caco-2-Zellen mit einer sehr hohen Passage-Zahl von 99 und in vollständig ausdifferenziertem Zustand (21 Tage alt) untersucht wurden. Da jedoch die Expression von mRNA und des korrespondierenden Proteins gegenläufig sein kann, bleibt zu vermuten, dass die Expression des BCRP Proteins im ausdifferenzierten Zustand der Caco-2-Zellen trotzdem relativ hoch sein kann.

Wie im Abschnitt *Ergebnisse* unter Punkt 3.2.5. und 3.2.5.1. beschrieben, konnte die Co-Inkubation mit Ko 143 den normalerweise apikal gerichteten Netto-Transport von BP-3-sulfat und BP-3-glucuronid zur basolateralen Seite des Transwell™-Systems umkehren. Übertragen auf die Situation im menschlichen Körper würde dies bedeuten, dass eine Hemmung von BCRP in einer Aufnahme von BP-Konjugaten ins Blut resultieren würde, die Bioverfügbarkeit von potentiell toxischen Stoffen würde dadurch also erhöht werden. Dies wäre insbesondere für Krebspatienten von Bedeutung, denen zur Umgehung einer entwickelten *Multidrug Resistance* im Zuge einer chemotherapeutischen Behandlung ein BCRP-Hemmer über längere Zeit verabreicht wird.

Da bei einer Hemmung von BCRP die gebildeten BP-Metabolite zur basolateralen Seite der Caco-2-Zelle transportiert wurden, muss auf dieser Seite ebenfalls ein aktives Transportsystem zur Verfügung stehen, das sowohl Sulfat- als auch Glucuronid-Konjugate transportieren kann. Dieser Transport könnte von den basolateral exprimierten ABC-

Transportern MRP1 und MRP3 vermittelt werden. MRP1 ist hauptsächlich als Transporter für GSH-Konjugate bekannt und einige unkonjugierte Verbindungen (Daunorubicin) werden im Co-Transport mit freiem GSH aus der Zelle heraus befördert (Haimeur *et al.*, 2004). Zahlreiche MRP1-Substrate werden jedoch auch von BCRP transportiert (Estron-3-sulfat, Methotrexat, SN-38, SN-38-Glucuronid, Doxorubicin; [Haimeur *et al.*, 2004]), allerdings scheint MRP1 in Caco-2-Zellen relativ schwach exprimiert zu sein, da zwar die Expression von MRP1 auf RNA-Ebene vielfach berichtet wurde (Taipalensuu *et al.*, 2001, Prime-Chapman *et al.*, 2004), allerdings zumindest in einem Fall die Protein-Expression nicht nachgewiesen werden konnte (Walle *et al.*, 1999).

Der zweite basolateral exprimierte ABC-Transporter, MRP3, transportiert bevorzugt Glucuronid-Konjugate aber auch Sulfat-Konjugate. Bei Patienten, die am *Dubin-Johnson Syndrom* leiden, ist die Expression des apikal lokalisierten MRP2 in der Leber vermindert. Statt dessen kommt es zu einer verstärkten Expression von MRP3 (König *et al.*, 1999 a, König *et al.*, 1999 b), wobei der normalerweise apikale Transport von MRP2-Substraten zur basolateralen Seite verlagert wird. Dabei scheint MRP3 als eine Art „Überlauf-Mechanismus“ zu funktionieren, der alternativ zur Verfügung steht, wenn der apikale Abtransport gestört wird. Ähnliches konnte auch bei der Hemmung von BCRP durch Ko143 und durch eine Co-Inkubation von TC7-Zellen mit α -Naphthoflavon beobachtet werden, was darauf hindeutet, dass auch α -Naphthoflavon als ein BCRP-Hemmer agieren kann.

Da bislang kein selektiver MRP3-Hemmer bekannt ist (z. B. Methotrexat hemmt auch BCRP und MRP2) ist die Identifizierung des verantwortlichen basolateralen Transporters mit dem Prinzip der chemischen Hemmung schwierig.

Zur Bestätigung der Beteiligung von BCRP am Transport von BP-3-sulfat wurde ein Transportexperiment mit BCRP-überexprimierenden HCT116 NRI-Zellen durchgeführt. Diese Zellen wurden durch eine Langzeit-Behandlung von HCT116 WT-Zellen mit dem Indolocarbazol-Derivat NB-506 (vgl. *Kapitel 1*) erzeugt.

Eine Überexpression von BCRP konnte durch eine Western Blot Analyse bestätigt werden (vgl. *Ergebnisse*, Abb. 24c). Die HCT116 NRI-Zellen transportierten deutlich mehr BP-3-sulfat zur apikalen Seite der Zellen im Vergleich zu den HT116 WT-Zellen. Wurde jedoch das apikal transportierte BP-3-sulfat auf die Gesamtmenge bezogen, die von den Zellen gebildet wurde, so war nur für den ersten Zeitpunkt eine deutliche Erhöhung im Vergleich zu den Wild-Typ-Zellen zu erkennen.

Eine Behandlung von Zellen mit mutagenen Substanzen über einen längeren Zeitraum führt zwar zu einer Überexpression von BCRP, dies kann jedoch auch zur Mutation des Transporters führen, was sich auf dessen Substratspezifität auswirkt (Nakagawa *et al.*, 2002, Miwa *et al.*, 2003). Diese Mutation betrifft das Codon 482, welches in der Wild-Typ Form für

die Expression von Arginin (482 Arg) in der 3. Transmembrandomäne des BCRP-Proteins verantwortlich ist. Enthält das Protein an dieser Stelle Threonin (482T) so verleiht dies den betroffenen Zellen eine stärkere Kreuz-Resistenz gegenüber Anthracyclinen und die mutanten Formen mit Threonin oder Glycin (482G) transportieren den Farbstoff Rhodamin 123, die Wild-Typ Form jedoch nicht. Da jedoch bei der Sequenzanalyse von BCRP in den HCT116 NRI-Zellen die WT-Form (482 Arg) detektiert werden konnte (Komatani *et al.*, 2001) und die Caco-2-Zellen vermutlich auch die WT-Form exprimieren, scheidet eine unterschiedliche molekulare Struktur des BCRP als mögliche Erklärung für die schlechte Übereinstimmung der Ergebnisse aus den Transportversuchen (HCT116, Caco-2 und TC7-Zellen) aus. Die Polarität des Transportes von BP-3-sulfat ist in Caco-2-Zellen viel stärker ausgeprägt als in HCT116-Zellen (es wird 16-19-fach zur apikalen Seite der Zellen abgegeben; HCT116 transportieren nur etwa 2-mal mehr zur apikalen Seite des Transwell™-Systems). Daher liegt die Vermutung nahe, dass nur durch eine empfindlichere Analysenmethode (z. B. radioaktiv markierte Substrate) die im Vergleich zu den Caco-2-Zellen geringen Unterschiede zwischen apikal und basolateral transportiertem BP-3-sulfat in den HCT116-Zellen detektiert werden können.

4.5. Regulation von BCRP

Zahlreiche unterschiedliche regulatorische Mechanismen wurden bisher für die Expression von ABC-Transport-Proteinen in der Literatur beschrieben. Kast *et al.* (2002) konnten an humanen Hepatozyten und Hepatozyten aus Ratten zeigen, dass die Expression von MRP2 die Aktivierung verschiedener nukleärer Rezeptoren (PXR¹¹, FXR¹², CAR¹³) erfordert.

Die Induktion von MRP1 und MRP2 durch redox-aktive Substanzen wie Quercetin und TBHQ (Kauffmann *et al.*, 2002, Bock *et al.*, 2000) impliziert, dass die Regulation dieser Gene über einen alternativen Signalweg verlaufen kann, an dem der Transkriptionsfaktor Nrf2¹⁴ beteiligt ist. In der Promoter-Region sowohl von MRP1 als auch von MRP2 konnten ARE-ähnliche Sequenzen identifiziert werden, allerdings konnte durch Deletion dieser Sequenz die Induzierbarkeit durch Quercetin nicht unterdrückt werden (Kauffmann *et al.*, 2002). Die Autoren diskutieren in diesem Zusammenhang, dass sich die relevanten Sequenzen eventuell weiter „*upstream*“ (in Richtung des 5'-Endes) befinden, denn dies konnte auch schon für die PXR-bindende Region im Promoter des *MDR1* Gens erwiesen werden, welches sich 8 kb entfernt vom transkriptionellen Startpunkt der Gens befindet (Geick *et al.*, 2001).

¹¹ Pregnane X Receptor

¹² Farnesoid X-activated Receptor

¹³ Constitutive Androstane Receptor

¹⁴ NF-E2-related factor2 = Erythroid transcription factor related factor 2

Obwohl es in der Literatur viele Beispiele für eine vermehrte Expression von BCRP unter bestimmten Bedingungen gibt, so konnte der zugrunde liegende molekulare Mechanismus bisher nicht eindeutig identifiziert werden. Eine Beteiligung des zytokin-induzierbaren Transkriptionsfaktors NF- κ B wurde von Van der Heijden *et al.* (2004) diskutiert, da die meisten Pharmaka, welche eine Expression von BCRP induzieren konnten (z. B. Mitoxantron, Doxorubicin und Flavopiridol) auch NF- κ B aktivierten.

Die in dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse zur Untersuchung der Regulation von BCRP lassen den Schluss zu, dass BCRP mit größter Wahrscheinlichkeit über Ah-Rezeptor-abhängige Signalwege reguliert wird. Der augenfälligste Hinweis darauf ist die relativ starke Induktion des BCRP-Proteins durch den prototypischen AhR-Liganden TCDD (50 nM). Darüber hinaus konnten weitere etablierte AhR-Agonisten, wie 3-MC, B[k]F und BP die Expression von BCRP-Protein in Caco-2-Zellen deutlich induzieren. Ein weiterer Hinweis auf die Beteiligung des AhR an der Expression von BCRP ist die Superinduktion von BCRP mRNA durch die Hemmung der 26S Proteasomen. Der Ligand-aktivierte AhR wird dadurch nach der Ausschleusung aus dem Kern nicht abgebaut und kann daher weiter die Gentranskription induzieren. Dieses Phänomen wurde für das etablierte AhR Target-Gen, *CYP1A1*, in der Literatur bereits beschrieben (Ma *et al.*, 1999).

Eine Blockierung des Ah-Rezeptors durch den AhR-Antagonisten PD 98059 (10 μ M) führte zu einer Unterdrückung der Induktion von BCRP mRNA durch den starken AhR-Liganden Indolo[3,2-*b*]carbazol (ICZ).

Bei den Experimenten zur BCRP-Proteinexpression konnte die interessante Beobachtung gemacht werden, dass eine Behandlung von Caco-2-Zellen mit dem Flavonol Quercetin eine erstaunlich hohe Induktion des BCRP-Proteins bewirken konnte. In der selben Versuchsreihe wurde die gleiche Konzentration an Flavon zur Behandlung eingesetzt, bei diesen Zellen konnte jedoch nur eine schwache BCRP-Induktion festgestellt werden. Betrachtet man die Effekte von TCDD, 3-MC, B[k]F und BP auf die Induktion von BCRP, so könnte man daraus einen Zusammenhang zwischen AhR-Affinität und Stärke der BCRP-Induktion ableiten. Vergleicht man die zur Behandlung eingesetzten Konzentrationen (z. B. TCDD: 50 nM, und B[k]F: 5 μ M), so konnte eine um den Faktor 100 geringere Konzentration an TCDD eine stärkere BCRP-Induktion bewirken, als das B[k]F.

Flavon ist ein stärkerer AhR-Agonist als Quercetin (Ashida *et al.*, 2000), was aus dessen Struktur abgeleitet werden kann. Durch das Fehlen jeglicher Hydroxyl-Gruppen ist Flavon lipophiler und passt damit besser in die hydrophobe „Tasche“ des Ah-Rezeptors. Darüber hinaus entsteht durch die Metabolisierung von Flavon durch Phase I-Enzyme eine Reihe von hydroxylierten Flavonen, welche ihrerseits wieder an den AhR binden und so die Wirkung von Flavon noch verstärken können. Ein weiterer wesentlicher Aspekt, durch den sich Flavon und Quercetin unterscheiden, ist deren antioxidatives Potential. Die antioxidativen

Wirkungen von Flavonoiden werden auf deren Fähigkeit, Wasserstoffatome abzugeben, zurückgeführt. Diese Wasserstoffatome werden aus den Hydroxylgruppen freigesetzt, wobei eine Anzahl von 4 bis 6 Hydroxyl-Gruppen (Quercetin besitzt 4 Hydroxyl-Gruppen) bezüglich der antioxidativen Wirkung als optimal angesehen wird (Böhm *et al.*, 1998).

Die antioxidative Wirkung von Quercetin übertrifft sogar die von Vitamin E, einem bekannten, starken Antioxidans. Die starke Induktion von BCRP durch Quercetin impliziert, dass eventuell noch ein alternativer, AhR-unabhängiger Regulationsweg existiert, der über die Aktivierung von Nrf2¹⁴ verläuft.

Substanzen mit elektrophilen Eigenschaften (z. B. Quercetin, TBHQ, Isothiocyanate wie Sulforaphan) können über die Aktivierung des MAPK¹⁵-Signalweges den Transkriptionsfaktor Nrf2 rekrutieren, welcher durch die Bindung an ein mit dem Zytoskelett assoziiertes Protein (*Keap1*¹⁶) im Zytosol gehalten wird. Elektrophile Verbindungen¹⁷ (z. B. TBHQ, Quercetin Oltipraz) können die Thiol-Gruppen bestimmter Cystein-Reste von Keap1 oxidieren, so dass dieses den Transkriptionsfaktor Nrf2 freisetzt und Nrf2 nach einer Heterodimerisation mit einem *small Maf-Protein* an bestimmte Sequenzen (AREs) in der Promoterregion von Target-Genen binden kann.

XMEs-induzierende Verbindungen können in „*monofunktionale*“ und „*bifunktionale*“ Induktoren eingeteilt werden. Dabei stellen metabolisierbare Verbindungen wie PAK und Flavonoide bifunktionale Induktoren dar, da sie über eine Interaktion mit dem AhR zunächst Phase I-Enzyme und nach Metabolisierung durch Cytochrom P450 Enzyme über Nrf2-abhängige Signalwege auch Phase II-Enzyme zu induzieren vermögen. Monofunktionale Induktoren (z. B. Diethylmaleat, Sulforaphan, Phenethylisothiocyanat) dagegen interagieren nicht mit dem Ah-Rezeptor, und sie induzieren Phase II-Enzyme allein über Nrf2-abhängige Signalwege (siehe Abbildung 37). Die Nrf2-vermittelte Genregulation spielt eine bedeutende Rolle bei der Expression von Phase II-Enzymen (z. B. GST, QR [NAD(P)H:quinone oxidoreductase]) und des weiteren bei der Expression von Genen, welche die Zelle vor oxidativen Stress schützen sollen, wie z. B. Thioredoxin (Kim *et al.*, 2001) und γ -Glutamylcystein Synthetase (Moinova *et al.*, 1998).

Das Auftreten von oxidativem Stress in der Zelle kann mehrere Ursachen haben, wie z. B. UV-Strahlung, Entzündungsvorgänge, die Aktivität von Acetyl-CoA (Peroxisomen Proliferation), die katalytische Aktivität von CYPs und die Aufnahme von pro-oxidativen Xenobiotika (Morel und Barouki, 1999). Die vermehrte Expression von ABC-Transportern, welche die metabolisierten pro-oxidativen Xenobiotika aus der Zelle heraus transportieren, könnte einen weiteren Weg der Zelle repräsentieren, sich vor oxidativem Stress zu schützen.

¹⁴ NF-E2-related factor2 = Erythroid transcription factor related factor 2

¹⁵ mitogen-activated protein kinase

¹⁶ Kelch-like ECH-associated protein 1; ECH = chicken Nrf2

¹⁷ Antioxidantien können durch die Aufnahme von Elektronen (*H-Atomen*) auch pro-oxidativ wirken

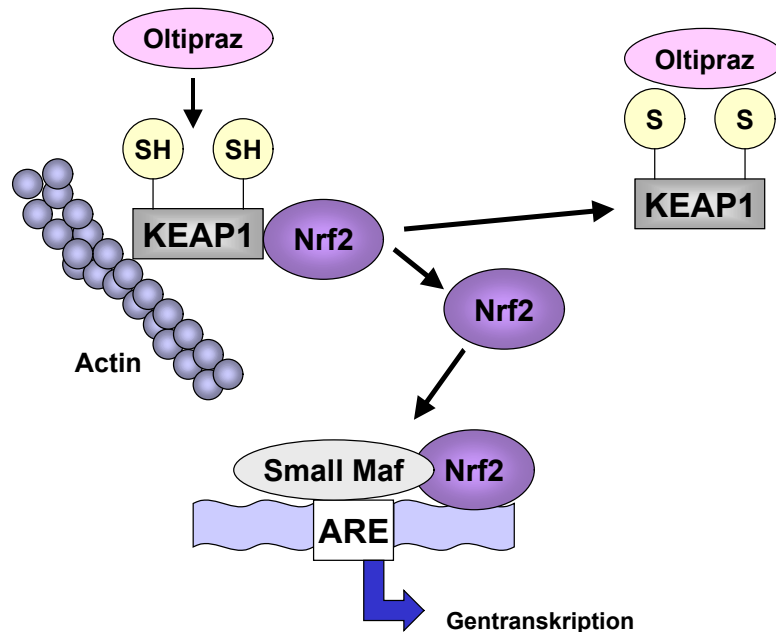


Abbildung 36: Oxidation der Thiol-Gruppen des Proteins Keap1 durch Oltipraz, Heterodimerisierung von Nrf2 mit dem small Maf Protein und nachfolgende ARE-abhängige Gentranskription. (Quelle: *Nature Reviews Cancer* 3; 312-329 (2003); verändert)

Möglicherweise stellt der Regulationsweg über den MAPK-Signalweg, an dessen Ende die Aktivierung von Nrf2 steht, einen „allgemeinen Regulationsweg“ dar, der allen Zelltypen gleichermaßen zur Verfügung steht, da die Regulation über nukleäre Rezeptoren teilweise spezielle Liganden erfordert und die Expression einiger dieser Rezeptoren auf bestimmte Zelltypen beschränkt ist (z. B. ER, GR).

Um eine Beteiligung des Transkriptionsfaktors Nrf2 an der Regulation von BCRP zu belegen, sollte als nächstes die Promoterregion des BCRP-Gens auf AREs untersucht werden. Darüber hinaus könnte durch eine Behandlung von Zellen mit monofunktionalen Induktoren (z. B. Diethylmaleat, Sulforaphan), welche nicht mit dem AhR interagieren, geprüft werden, ob die alleinige Aktivierung des Nrf2 ausreicht, um eine BCRP-Induktion hervorzurufen.

Da die Untersuchung an *nrf2*(-/-) Mäusen zeigte, dass Nrf2 sowohl für die basale Expression von Genen (z. B. *Gsta1*) als auch für die Induktion von ARE-regulierten Genen wichtig ist (Itoh *et al.*, 1997; Nguyen *et al.*, 2003), wäre es interessant zu untersuchen, ob die basale Expression und die Induzierbarkeit von BCRP durch die genetische Abwesenheit von Nrf2 vermindert ist.

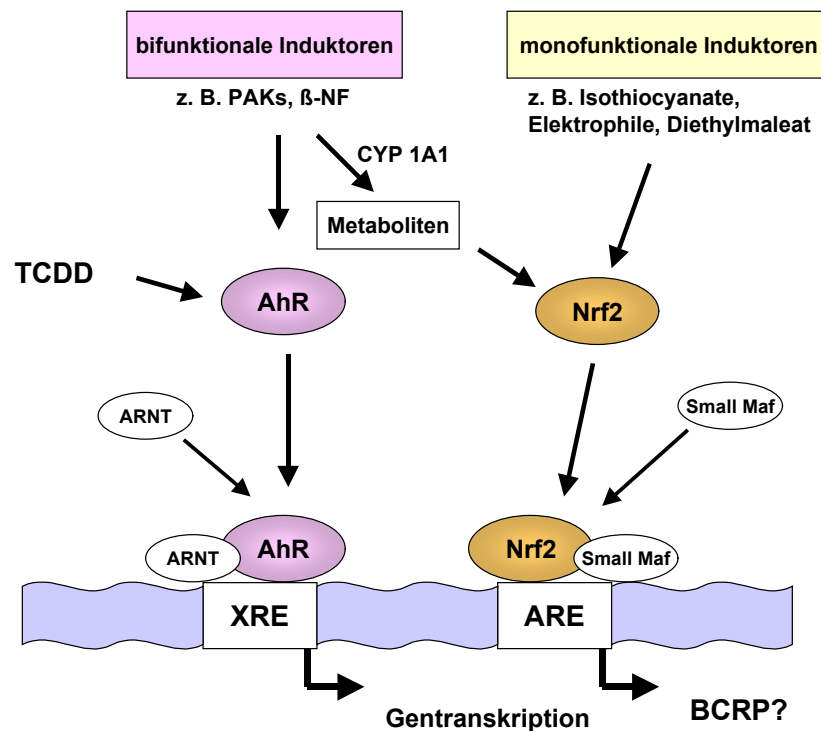


Abbildung 37: AhR-vermittelte Gentranskription bifunktionaler Induktoren und TCDD über das Xenobiotic Response Element (XRE) und Nrf2-vermittelte Gentranskription durch mono- und bifunktionale Induktoren über das Antioxidant Response Element (ARE). (Quelle: Nguyen et al. 2003; verändert).

Die Induktion von ABC-Transportern durch Umwelt-Stress-Faktoren wurde z. B. auch schon für P-Gp beschrieben. Durch Einflüsse wie Hitze-Schock (Kioka et al., 1992) und UV-Strahlung (Hu et al., 1999) konnte eine Überexpression dieses Proteins bewirkt werden.

Interessanterweise konnte bei der Langzeit-Kultivierung von humanen Magenkrebszellen unter erhöhten Temperaturen ebenfalls eine Überexpression von BCRP beobachtet werden (Stein et al., 2002), woraus die Präsenz eines *Hitze-Schock responsiven Elements* im Promoter des BCRP-Gens abgeleitet werden könnte, wie es auch in der Promoter-Region von P-Gp identifiziert werden konnte.

Die Regulation des BCRP-Gens über Ah-Rezeptor-abhängige Signalwege impliziert einen möglichen Zusammenhang zwischen der Expression des Proteins und der Differenzierung der Zelle, da der Ah-Rezeptor an der Regulation des Zellzyklus beteiligt ist und während der Differenzierung von Zellen in Kultur „heraufreguliert“ wird (Hayashi et al., 1995, Okey et al., 1994, Sadek und Hoffmann, 1994). Des Weiteren konnten Shimba et al. (2002) in AhR-überexprimierenden A549-Zellen eine beschleunigte Zell-Proliferation feststellen, andererseits führte eine AhR-Defizienz zu einer verminderten Proliferation durch Verlängerung des Zellzyklus (G1-Phase) [Ma and Whitlock, 1996]. Daher wäre es interessant, zu untersuchen, ob Agentien, welche die Differenzierung von Zellen beschleunigen (HDAC-Hemmer wie Trichostatin A [TSA] oder Natriumbutyrat [NaB]), die

Expression von BCRP beeinflussen können. Eine Induktion von P-Gp durch eine Behandlung mit TSA oder NaB wurde bereits in der Literatur beschrieben (Jin *et al.*, 1998; Morrow *et al.* 1994). Hinsichtlich der *in vivo* Situation ist das Salz der Buttersäure von besonderer Bedeutung, da es durch die Darmflora z. B. bei der Verdauung von Getreide produziert wird.

Wenn der AhR auch für die basale Expression von BCRP eine Bedeutung hat, so müsste eine AhR-defiziente Zelle auch weniger BCRP exprimieren, bzw. eine AhR-Überexpression auch zu einer vermehrten BCRP-Expression führen.

Eine erst kürzlich publizierte Arbeit von Krishnamurthy *et al.* (2004) berichtet von einer BCRP-Überexpression unter Sauerstoff-defizienten Bedingungen („*Hypoxia*“). Der zugrunde liegende Regulationsweg führt über die Aktivierung des *Hypoxia-inducible Factor 1* (HIF-1, bestehend aus den Untereinheiten α und β), wobei hier eine Ähnlichkeit zum AhR-vermittelten Mechanismus besteht, da HIF-1 zur transkriptionellen Aktivierung mit seiner Untereinheit HIF-1 β ein Heterodimer bildet, und HIF-1 β identisch ist mit ARNT (Gu *et al.*, 2000). Ein Cross-Talk zwischen beiden Signalwegen wurde bereits in der Literatur berichtet (Chan *et al.*, 1999), ob jedoch beide Signalwege zur gleichen Zeit in der Zelle ablaufen, ist fraglich, da HIF-1 bei „normalem“ Sauerstoffangebot („*Normoxia*“) über einen Ubiquitin-Proteasom-abhängigen Weg schnell degradiert. Die vermehrte Expression von BCRP unter Hypoxia lässt vermuten, dass unter diesen Bedingungen Produkte in der Zelle entstehen, die von BCRP transportiert werden können, wie z. B. Häm-Abbauprodukte (Krishnamurthy *et al.* 2004). Zustände „lokaler Hypoxia“ können z. B. bei der Wundheilung, der Embryogenese und in Tumoren auftreten, wobei Letzteres bei der Behandlung von soliden Tumoren eine Rolle spielen könnte, wenn man davon ausgehen kann, dass Sauerstoff-defiziente Bedingungen eine Induktion von BCRP nach sich ziehen.

Der Hypoxia-vermittelte Signalweg scheint jedoch ein relativ komplexer Vorgang zu sein, da so verschiedene Einflüsse, wie geringe Sauerstoff-Spannung, Eisen-Ionen, Cobalt-Ionen und oxidativer Stress die gleichen Zellantworten hervorrufen können (Gu *et al.* 2000).

Die oben zitierte Studie von Krishnamurthy zeigt außerdem, dass die Fähigkeit von BCRP, Porphyrine zu transportieren, den Bcrp1(+/-) Zellen unter Sauerstoff-defizienten Bedingungen eine größere Überlebenschance bietet. Dies ist neben der Arbeit von Jonker *et al.* (2002) ein weiteres Beispiel für die Beteiligung von BCRP am Transport von Porphyrinen, welche offensichtlich für Zellen zytotoxisch sein können. Daher wäre es interessant zu testen ob, auch Bilirubin (ebenfalls ein Metabolit des Häm) ein Substrat für BCRP ist, denn auch Bilirubin ist ein AhR-Agonist (Denison und Nagy, 2003) und könnte so mit der Induktion von BCRP seine eigene Entgiftung beschleunigen.

Die parallele Induktion von CYP3A4 und P-Gp unter Beteiligung des PXR ist ein etablierter Mechanismus (Goodwin *et al.*, 2002). Dabei scheinen die Induktoren sowohl für CYP3A4 als

4.6. Übertragbarkeit auf die *in vivo*-Situation

In vitro Experimente an Zellmodellen wie dem Caco-2 Zellmodell besitzen eine große Bedeutung bei der Aufklärung von den biochemischen Mechanismen, die z. B. einer Zelltransformation vorausgehen. Da jedoch gerade die Entstehung von Krebs ein komplexer Vorgang ist, bei dem viele Ereignisse zusammentreffen müssen, damit eine transformierte Zelle auch überleben „darf“ und sich weiter teilt, ist die Übertragbarkeit der Ergebnisse aus einem solchen *in vitro* Experiment auf die *in vivo*-Verhältnisse natürlich begrenzt.

Die in dieser Arbeit als CYP1A1-Induktoren verwendeten Flavonoide liegen im Lebensmittel in der Regel glycosidisch gebunden vor, hier wurden jedoch die Aglyca eingesetzt, da die Glycoside hinsichtlich der Transaktivierung des AhR keine Wirksamkeit besitzen. Darüber hinaus können die Glycoside der Flavonoide wegen ihrer größeren Hydrophilie die Zellmembranen nicht frei passieren. Es konnte allerdings festgestellt werden, dass bestimmte Glucoside (z. B. von Quercetin) über einen sekundär aktiven Transport, der von SGLT1 vermittelt wird, in die Zelle aufgenommen werden können. Fermentierte Lebensmittel (wie z. B. Miso und Natto, fermentierte Soja-Produkte) besitzen einen höheren Gehalt an freien Aglyca, der durch die enzymatische Aktivität der mikrobiellen Flora während des Reifungsprozesses entsteht. Auch die Darmflora verfügt über β -Glucosidase-Aktivität und so entstehen beim Verdauungsprozess ebenfalls freie Aglyca der Flavonoide.

Über die täglich aufgenommenen Mengen an Flavonoiden existieren unterschiedliche Angaben. Sie reichen von 200 mg/Tag (Scalbert *et al.*, 2000) bis zu 10-20 mg/Tag (Böhm *et al.*, 1998). Die in den Inkubationsversuchen eingesetzten Konzentrationen von z. B. 50 μ M kommen einem Gesamtgehalt von ca. 20 μ g gleich, die im Transwellversuch auf eine Fläche von 4,7 cm² Zellen einwirken. Wie die Untersuchungen zur Genexpression bestätigen, reichen diese Menge an Flavonoiden aus, um in der Zelle AhR-agonistisch zu wirken, da viele Flavonoide im Bereich von 1-3 μ M (wie sie z. B. im Plasma zu erwarten wären) AhR-antagonistisch wirken (Ashida *et al.*, 2000). Bei den oben genannten mit der täglichen Nahrung aufgenommenen Mengen an Flavonoiden ist eine agonistische Wirkung auch in der Darmzelle zu erwarten.

Die für die Versuche eingesetzte Konzentration an Benzo[a]pyren (10 μ M) entspricht mit einer absoluten Menge von ca. 5 μ g pro 4,7 cm² Zellen in etwa der doppelten Menge, die als durchschnittliche täglich aufgenommene Menge an BP aus Literaturwerten zu entnehmen ist (Hattemer-Frey und Travis, 1991).

Die überwiegende Anzahl der hier präsentierten Versuche beschäftigt sich mit den Auswirkungen einer *Vorbehandlung* der Zellen mit den sekundären Pflanzeninhaltsstoffen auf die nachfolgende Metabolisierung von BP, jedoch kann davon ausgegangen werden, dass in der „*in vivo*“ Situation im menschlichen Organismus beide Stoffe auch zusammen

aufgenommen werden können. Da Flavonoide sowohl gute CYP1A1-Substrate als auch Substrate für Phenol-Sulfotransferasen (Eaton *et al.*, 1996, Coughtrie *et al.*, 2001) und Glucuronosyltransferasen (Vaidyanathan *et al.*, 2002) sind, ist zu erwarten, dass die Metabolisierung von BP bei einer gleichzeitigen Applikation von Flavonoiden nicht so intensiv verläuft, da beide Verbindungen um die fremdstoff-metabolisierenden Enzyme konkurrieren. Dies konnte in einem Transportexperiment, bei dem Genistein und BP gleichzeitig angewendet wurden, bestätigt werden. (s. Abb. 19a.-b., Punkt 3.2.3., S. 77-78).

Darüber hinaus wurden einige Flavonoide (Chrysin, Quercetin, Silymarin, Daidzein und Genistein) als BCRP-Hemmer identifiziert (Zhang *et al.*, 2004, Cooray *et al.*, 2004, Imai *et al.*, 2004) was den Export von BP-Konjugaten aus der Zelle verlangsamen würde. Allerdings müsste im Fall einer kompetitiven Hemmung auch die Metabolisierung dieser Verbindungen und die eventuell unterschiedliche Affinität von BCRP zu Flavonoiden und BP-Metaboliten in Betracht gezogen werden. Dazu kommt auch die Tatsache, dass BCRP nicht der alleinige apikale Transporter in der Zelle ist und viele Flavonoide, bzw. deren Konjugate effektiv durch MRP2 exportiert werden.

4.7. Schlussfolgerung und Ausblick

Zusammenfassend kann also festgehalten werden, dass es sich bei diesem Thema um ein sehr komplexes Szenario handelt, da sowohl das BP als auch die sekundären Pflanzeninhaltsstoffe die Komponenten der biochemischen Barriere (Phase I, Phase II und ABC-Transportproteine) sowohl in ihrer Aktivität als auch in ihrer Expression beeinflussen können.

Die Identifizierung von BCRP als Transporter für Sulfat- und Glucuronid-Konjugate von BP wirft wiederum die Frage auf, ob auch weitere PAK von toxikologischer Bedeutung (wie z. B. B[a]F und DB[a,h]P) von diesem Transporter aus der Zelle exportiert werden.

Die offensichtlich hohe Affinität von BCRP zu heterozyklischen stickstoffhaltigen Verbindungen impliziert eine Transportkapazität für strukturell verwandte Verbindungen wie z. B. Solanidin, Tomatidin (toxische Steroid-Alkaloide aus der Kartoffel, bzw. Tomate) oder Pyrazine (entstehen bei der Erhitzung von proteinhaltigen Lebensmitteln; „Röstaromen“).

Da auch endogene Verbindungen wie Cholesterin (Janvilisri *et al.*, 2003) und Phosphatidylserin (Woehlecke *et al.*, 2002) als BCRP-Substrate identifiziert wurden, lässt dies die Vermutung zu, dass BCRP eventuell nicht nur als Transporter für Xenobiotika eine bedeutende Rolle spielt, sondern auch bei anderen physiologischen Vorgängen wie dem Membranaufbau oder -umbau eine wichtige Funktion erfüllt.

Die große Anzahl von neu erscheinenden Publikationen über neue BCRP-Substrate (HIV-Protease-Inhibitoren, Antibiotika) oder Hemmer (Novobiocin, Glucocorticoide) verdeutlicht

die große Bedeutung dieses relativ neu entdeckten Transport-Proteins für viele Forschungsbereiche.

Die Regulation von BCRP stellt des weiteren einen wichtigen Bereich dar, in dem noch viel Forschungsbedarf besteht, denn wie schon angedeutet, existieren vermutlich mehrere parallele Regulationswege für das BCRP-Protein, wobei auch eine mögliche Regulation auf post-transkriptioneller Ebene zu bedenken ist. Trotz der in dieser Arbeit aufgezeigten Hinweise zur Regulation von BCRP kann ein definitiver Beweis der AhR-Abhängigkeit nur erbracht werden, indem die Bindung des aktivierten AhR an den BCRP-Promoter (z. B. mittels *EMSA*, „*electrophoretic mobility shift assay*“, oder *in vivo* mittels „*chromatin immuno precipitation*“, *ChIP*) nachgewiesen wird.

Aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit kann also die Schlussfolgerung gezogen werden, dass die Komponenten der biochemischen Barriere des Darmes durch natürlich in der Nahrung vorkommende Substanzen so beeinflussbar sind, dass dies zu einer beschleunigten Entgiftung von Pro-Karzinogenen wie Benzo[a]pyren führt. Insbesondere der große Beitrag einer Induktion von Phase I-Enzymen zu diesem Entgiftungsprozess gibt einen wichtigen Hinweis darauf, dass eine Induktion von Phase I-Enzymen nicht in jedem Fall mit schädlichen Auswirkungen wie der metabolischen Aktivierung von Pro-Karzinogenen gleichgesetzt werden kann.

5. LITERATURVERZEICHNIS

Allen JD, Jackson SC, and Schinkel AH. (2002a): A mutation hot spot in the Bcrp1 (Abcg2) multidrug transporter in mouse cell lines selected for doxorubicin resistance. *Cancer Res.* **62** (8): 2294-2299.

Allen JD, van Loevezijn A, Lakhai, JM, van der Valk M, van Tellingen O, Reid G, Schellens JH, Koomen G-J, and Schinkel AH. (2002b): Potent and specific inhibition of the breast cancer resistance protein multidrug transporter in vitro and in mouse intestine by a novel analogue of fumitremorgin C. *Mol Cancer Ther.* **1** (6): 417-425.

Allen JD and Schinkel AH (2002c): Multidrug resistance and pharmacological protection mediated by breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2). *Mol Cancer Ther.* **1** (6): 427-434.

Allen SW, Mueller L, Williams SN, Quattrochi LC, and Raucy J. (2001): The use of a high-volume screening procedure to assess the effects of dietary flavonoids on human CYP1A1 expression. *Drug Metab Dispos.* **29** (8): 1074-1079.

Ambudkar SV, Dey S, Hrycyna CA, Ramachandra M, Pastan I, and Gottesmann MM. (1999): Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* **39**: 361-398.

Antonsson C, Whitelaw ML, McGuire J, Gustafsson JA, and Poellinger L. (1995): Distinct roles of the molecular chaperone hsp90 in modulating dioxin receptor function via the basic helix-loop-helix and PAS domains. *Mol Cell Biol.* **15** (2): 756-765.

Artursson P, and Karlsson, J. (1991): Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial (Caco-2) cells. *Biochem Biophys Res Commun.* **175**: 880-885.

Ashida H, Fukuda I, Yamashita T and Kanazawa K. (2000): Flavones and flavonols at dietary levels inhibit a transformation of aryl hydrocarbon receptor induced by dioxin. *FEBS Lett.* **476**: 213-217.

Augustsson K, Skog K, Jagerstad M, and Steineck G. (1997): Assessment of the human exposure to heterocyclic amines. *Carcinogenesis* **18**: 1931-1935.

Auyeung DJ, Kessler FK, and Ritter JK. (2003): Mechanism of rat UDP-glucuronosyltransferase 1A6 induction by oltipraz: evidence for a contribution of the aryl hydrocarbon receptor pathway. *Mol Pharmacol.* **63** (1): 119-127.

Badger GM, Kimber RWL, Novotny J. (1964): Formation of aromatic hydrocarbons at high temperatures. XXI. Pyrolysis of n-butylbenzene over a range of temperatures from 300° to 900° at 50° intervals. *Aust J Chem.* **17**: 778.

Badger GM. (1962): Mode of formation of carcinogens in human environment. *Natl Cancer Inst. Monogr.* **9**: 1.

Bates SE, Robey R, Miyake K, Rao K, Ross DD, and Litman T. (2001): The role of half-transporters in multidrug resistance. *J Bioenerg Biomembr.* **33** (6): 503-511.

Benson AB 3rd (1993): Oltipraz: a laboratory and clinical review. *J Cell Biochem Suppl.* **17F**: 278-291

Bergander L, Wahlström N, Alsberg T, Bergman J, Rannug A, and Rannug U. (2003): Characterization of *in vitro* metabolites of the aryl hydrocarbon receptor ligand 6-formylindolo[3,2-*b*]carbazole by liquid chromatography-mass spectrometry and NMR. *Drug Metab Dispos.* **31** (2): 233-241.

Bjeldanes LF, Kim J-Y, Grose KR, Bartholomew JC, and Bradfield CA. (1991): Aromatic hydrocarbon responsiveness – receptor agonists generated from indole-3-carbinol *in vitro* and *in vivo*: Comparisons with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 9543-9547.

Blumer M, and Youngblood WW. (1977): Polycyclic aromatic hydrocarbons in soils. *Science* **188**: 53.

Bock KW, Eckle T, Ouzzine M, and Fournel-Gigleux S. (2000): Coordinate induction by antioxidants of UDP-glucuronosyltransferase UGT 1A6 and the apical conjugate export pump MRP2 (multidrug resistance protein 2) in Caco-2 cells. *Biochem Pharmacol.* **59** (5): 467-470.

Böhm H, Boeing H, Hempel J, Raab B, and Kroke A. (1998): Flavonole, Flavone und Anthocyane als natürliche Antioxidantien der Nahrung und ihre mögliche Rolle bei der Prävention chronischer Erkrankungen. *Z Ernährungswiss.* **37**: 147-163.

Bonnesen C, Eggleston IA, and Hayes, JD. (2001): Dietary indoles and isothiocyanates that are generated from cruciferous vegetables can both stimulate apoptosis and confer protection against DNA damage in human colon cell lines. *Cancer Res.* **61**: 6120-6130.

Borlak J and Zwadlo C. (2003): Expression of drug-metabolizing enzymes, nuclear transcription factors and ABC transporters in Caco-2 cells. *Xenobiotica* **33** (9): 927-943.

Borst P and Schinkel AH. (1997): Genetic dissection of the function of mammalian P-glycoproteins. *Trends Genet.* **13**: 217-222.

Brangi M, Litman T, Ciotti M, Nishiyama K, Kohlhagen G, Takimoto C, Robey R, Pommier Y, Fojo T, and Bates S. (1999): Camptothecin resistance: role of the ATP-binding cassette (ABC), mitoxantron-resistance half-transporter (MXR), and potential for glucuronidation in MXR-expressing cells. *Cancer Res.* **59**: 5938-5946.

Buening MK, Wislocki PG, Levin W, Yagi H, Thakker DR, Akagi H, Koreeda M, Jerina, DM, and Conney AH. (1978): Tumorigenicity of the optical enantiomers of the diastereomeric benzo[*a*]pyrene 7,8-diol-9,10-epoxides in new-born mice: exceptional activity of (+)-7 β ,8 α -dihydroxy-9 α ,10 α -epoxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo[*a*]pyrene. *Proc Acad Natl Sci USA* **75** (11): 5358-5361.

Büsen R, Mock M, Seidel A, Jacob J, and Lampen A. (2002): Interaction between metabolism and transport of benzo[*a*]pyrene and its metabolites in enterocytes. *Toxicol Appl Pharmacol.* **183**: 168-178.

Büsen R, Mock M, Nau H, Seidel A, Jacob J, and Lampen A. (2003): Human intestinal Caco-2 cells display active transport of benzo[*a*]pyrene metabolites. *Chem Biol Interact.* **142** (3): 201-221.

Buters JTM, Mahadevan B, Quintanilla-Martinez L, Gonzalez FJ, Greim H, Baird WM, and Luch A. (2002): Cytochrome P450 1B1 determines susceptibility to dibenzo[*a,l*]pyrene-induced tumor formation. *Chem Res Toxicol.* **15** (9): 1127-1135.

Carlson DB and Perdew GH. (2002): A dynamic role for the Ah receptor in cell signaling? Insights from a diverse group of Ah receptor interacting proteins. *J Biochem Mol Toxicol.* **16** (6): 317-325.

Carriere V, Lesuffleur T, Barbat A, Rousset M, Dussaulx E, Costet P, de Waziers I, Beaune P, and Zweibaum A. (1994): Expression of cytochrome P-450 3A in HT29-MTX cells and Caco-2 clone TC7. *FEBS Lett.* **355** (3):247-50.

Chan W, Yao G, Gu Y-Z, and Bradfield CA. (1999): Cross-talk between the aryl hydrocarbon receptor and hypoxia inducible factor signaling pathway. *J Biol Chem.* **274** (17): 12115-12123.

Chantret I, Rodolosse A, Barbat A, Dussaulx E, Brot-Laroche E, Zweibaum A, and Rousset M. (1994): Differential expression of sucrase-isomaltase in clones isolated from early and late passages of the cell line Caco-2: evidence for glucose-dependent negative regulation. *J Cell Sci.* **107** (Pt 1): 213-225.

Chen Y-H, Riby J, Srivastava P, Bartholomew JC, Denison M, and Bjeldanes L. (1995): Regulation of CYP1A1 by indolo[3,2-b]carbazole in murine hepatoma cells. *J Biol Chem.* **270** (38): 22548-22555.

Cherng SH, Lin P, Yang JL, Hsu SL, and Lee H. (2001): Benzo[*g,h,i*]perylene synergistically transactivates benzo[*a*]pyrene-induced CYP1A1 gene expression by aryl hydrocarbon receptor pathway. *Toxicol Appl Pharmacol.* **170** (1): 63-68.

Chomczynski P and Sacchi N. (1987): Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* **162**: 156-159.

Ciolino HP, Daschner PJ, Wang TT, and Yeh GC. (1998): Effect of curcumin on the aryl hydrocarbon receptor and cytochrome P450 1A1 in MCF-7 human breast carcinoma cells. *Biochem Pharmacol.* **56** (2): 197-206.

Ciolino HP, Yeh GC. (1999): Inhibition of aryl hydrocarbon-induced cytochrome P-450 1A1 enzyme activity and CYP1A1 expression by resveratrol. *Mol Pharmacol.* **56** (4): 760-767.

Ciolino HP, Daschner PJ, and Yeh GC. (1998a): Resveratrol inhibits transcription of CYP1A1 in vitro by preventing activation of the aryl hydrocarbon receptor. *Cancer Res.* **58** (24): 5707-5712.

Conney AH. (1982): Induction of microsomal enzymes by foreign chemicals and carcinogenesis by polycyclic aromatic hydrocarbons: *G.H.A. Clowes memorial lecture.* *Cancer Res.* **4**: 4875-4917.

Conney AH. (2003): Induction of drug-metabolizing enzymes: a pathway to the discovery of multiple cytochromes P450. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* **43**: 1-30.

Cooray HC, Janvilisri T, van Veen HW, Hladky SB, and Barrand MA. (2004): Interactions of the breast cancer resistance protein with plant polyphenols. *Biochem Biophys Res Commun.* **317**(1): 269-275.

Cos P, Ying L, Calomme M, Hu JP, Climanga K, and Van Poel B. (1998): Structure-activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers. *J Nat Prod.* **61**: 71-76.

Cotoneo MS, Wang J, Fritz WA, Eltoum IE, and Lamartiniere CA. (2002): Genistein action in the prepubertal mammary gland in a chemoprevention model. *Carcinogenesis* **23** (9): 1467-1474.

Coughtrie MWH and Johnston LE. (2001): Interactions between dietary chemicals and human sulfotransferases - molecular mechanisms and clinical significance. *Drug Metab Dispos.* **29**: 522-528.

Davidson NE, Egner PA, and Kensler TW. (1990): Transcriptional control of glutathione S-transferase gene expression by the chemoprotective agent 5-(2-pyrazinyl)-4-methyl-1,2-dithiole-3-thione (oltipraz) in rat liver. *Cancer Res.* **50** (8): 2251-2255.

De Vos RH, van Dokkum W, Schouten A, and de Jong-Berkhout T. (1990): Polycyclic aromatic hydrocarbons in dutch total diet samples (1984-1986). *Food Chem Toxicol.* **28**(4): 263-268.

Dempke W, Rie C, Grothey A, and Schmoll HJ. (2001): Cyclooxygenase-2: a novel target for cancer chemotherapy? *J Cancer Res Clin Oncol.* **127** (7): 411-417.

Denison MS and Nagy SR. (2003): Activation of the aryl hydrocarbon receptor by structurally diverse exogenous and endogenous chemicals. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* **43**: 309-334.

Dennis MJ, Massey RC, Cripps G, Venn I, Howarth N, and Lee G. (1991): Factors affecting the polycyclic aromatic hydrocarbon content of cereals, fats and other food products. *Food Addit Contam.* **8**(4): 517-530.

Di Pietro A, Conseil G, Perez-Victoria JM, Dayan G, Baubichon-Cortay H, Trompier D, Steinfeld E, Jault JM, de Wet H, Maitrejean M, Comte G, Boumendjel A, Mariotte AM, Dumontet C, McIntosh DB, Goffeau A, Castanys S, Gamarro F, and Barron D. (2002): Modulation by flavonoids of cell multidrug resistance mediated by P-glycoprotein and related ABC transporters. *Cell Mol Life Sci.* **59** (2): 307-322.

Dietrich CG, de Waart DR, Ottenhoff R, Bootsma AH, van Gennip AH, and Oude Elferink RPJ. (2001): Mrp2-deficiency in the rat impairs biliary and intestinal excretion and influences metabolism and disposition of the food-derived carcinogen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP). *Carcinogenesis* (Lond.) **22**: 805-811.

Ding X and Kaminsky L. (2003): Human extrahepatic cytochromes P450: Function in xenobiotic metabolism and tissue-selective chemical toxicity in the respiratory and gastrointestinal tracts. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **43**: 149-173.

Dipple A, Moschel R, and Bigger CAH. (1984): Polynuclear aromatic carcinogens, in: *Chemical Carcinogens*, 2nd ed., CE Searle Ed., American Chemical Society, Washington DC, 1984, pp. 277-301.

Dolwick KM, Swanson HI, and Bradfield CA. (1993): *In vitro* analysis of Ah receptor domains involved in ligand-activated DNA recognition. *Proc Natl Acad Sci. USA* **90**: 8566-8570.

Doyle LA, Yang W, Abruzzo LV, Krogmann T, Gao Y, Rishi AK, and Ross DD. (1998): A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci. USA* **95**:15665-15670.

- Eaton EA, Walle UK, Lewis AJ, Hudson T, Wilson AA, and Walle T. (1996): Flavonoids, potent inhibitors of the human p-form phenolsulfotransferase. *Drug Metab Dispos.* **24** (2): 232-237.
- Eisenblätter T and Galla H-J. (2002): A new multidrug resistance protein at the blood-brain barrier. *Biochem Biophys Res Commun.* **293** :1273-1278.
- Estabrook RW, Werringloer J, Capdevila J, and Prough RA. (1978): The role of cytochrome P-450 and the microsomal electron transport system: the oxidative metabolism of benzo[a]pyrene. In: *Gelboin HV and Ts'Ö, POP. (ed.) Polycyclic hydrocarbons and cancer Academic press, New York, San Francisco, London, Vol. 1* (15) pp 300-304.
- Fardel O, Lecreur V, Corlu A, and Guillouzo A. (1996): P-glycoprotein induction in rat liver epithelial cells in response to acute 3-methylcholanthrene treatment. *Biochem Pharmacol.* **51**: 1427-1436.
- Ferraris R. (2001): Dietary and developmental regulation of intestinal sugar transport. *Biochem J.* **360**: 265-276.
- Ford JM and Hait WN. (1990): Pharmacology of drugs that alter multidrug resistance in cancer. *Pharmacol Rev.* **42** (3): 155-199.
- Gant TW, Silverman JA, Bisgaard HC, Burt RK, Marino PA, and Thorgeirsson SS. (1991): Regulation of 2-acetylaminofluorene and 3-methylcholanthrene mediated induction of multidrug resistance and cytochrome P4501A gene family expression in primary hepatocyte cultures and rat liver. *Mol Carcinog.* **4** (6): 499-509.
- Geick A, Eichelbaum M, and Burk O. (2001): Nuclear receptor response elements mediate induction of intestinal MDR1 by rifampicin. *J Biol Chem.* **276** (18): 14581-14587.
- Gelboin HV. (1980): Benzo[a]pyrene metabolism, activation and carcinogenesis: role and regulation of mixed-function oxidases and related enzymes. *Physiol Rev.* **60**: 1107-1166.
- Gentilini M, Duflo B, Richard-Lenoble D, Brucker G, Danis M, Niel G, and Meunier Y. (1980): Assessment of RP35972 (oltipraz) a new antischistosomal drug against *schistosoma hematobium*, *schistosoma mansoni*, and *schistosoma intercalatum*. *Acta Trop.* **37**: 271-274.
- Germann UA, Chambers TC, Ambudkar SV, Licht T, Cardarelli CO, Pastan I, and Gottesman MM. (1996): Characterization of phosphorylation-defective mutants of human P-glycoprotein expressed in mammalian cells. *J Biol Chem.* **271** (3): 1708-1716.
- Gibson P, Gill JH, Khan PA, Seargent JM, Martin SW, Batmen PA, Griffith J, Bradley C, Double JA, Bibby MC, and Loadman PM (2003): Cytochrome P450 CYP1B1 (CYP1B1) is overexpressed in human colon adenocarcinomas relative to normal colon: implications for drug development. *Mol Cancer Ther.* **2**: 527-534.
- Glatt H. (1997): Bioactivation of mutagens via sulfation. *FASEB J* **11**: 314-321.
- Glatt H (2000): Sulfotransferases in the bioactivation of xenobiotics. *Chem Biol Int.* **129**: 141-170.
- Goodwin B, Redinbo MR, and Kliewer SA. (2002): Regulation of CYP3A gene transcription by the pregnane x receptor. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* **42**: 1-23.

- Gottesmann MM and Pastan I. (1993): Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. *Annu Rev Biochem.* **62**: 385-427.
- Gradin K, Whitelaw ML, Toftgard R, Poellinger L, and Berghard AA. (1994): A tyrosin kinase-dependent pathway regulates ligand-dependent activation of the dioxin receptor in human keratinocytes. *J Biol Chem.* **269** (38): 23800-23807.
- Grady AW, Fabacher DL, Frame G, and Steadman BL. (1992): Morphological deformities in brown bullheads administered dietary β -naphthoflavone. *J Aquat Animal Health* **4**: 7-16.
- Graef W and Diehl H. (1966): The natural normal levels of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons and the reasons therefore. *Arch Hyg Bacteriol.* **150**: 49.
- Gu Y-Z, Hogenesch JB, and Bradfield CA. (2000): The PAS Superfamily: sensors of environmental and developmental signals. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* **40**: 519-561.
- Guengerich FP, Chun Y-J, Kim D, Gillam EMJ, Shimada T. (2003): Cytochrome P450 1B1: a target for inhibition in anticarcinogenesis strategies. *Mutat Res.* **523-524** 173-182.
- Haimeur A, Conseil G, Deeley RG, and Cole SPC. (2004): The MRP-related and BCRP/ABCG2 multidrug resistance proteins: biology, substrate specificity and regulation. *Current Drug Metabolism* **5**: 21-53.
- Halaby GA, and Fagerson IS. (1971): Polycyclic aromatic hydrocarbons in heat-treated foods. Pyrolysis of some lipids, β -carotene and cholesterol. *Proc. SOS/70, Int. Congr. Food Sci. Technol., 3rd, 1970*, p. 820.
- Harnish DC, Scicchitano MS, Adelman SJ, Lyttle CR, and Karathanasis SK. (2000): The role of CBP in estrogen receptor cross talk with nuclear factor-kappaB in HepG2 cells. *Endocrinology* **141** (9): 3403-3411.
- Hattemer-Frey HA and Travis CC. (1991): Benzo[a]pyrene: environmental partitioning and human exposure. *Toxicol Ind Health* **7**(3): 141-157.
- Hayashi S, Okabe-Kado J, Honma Y, and Kawajiri K. (1995): Expression of Ah receptor (TCDD receptor) during human monocytic differentiation. *Carcinogenesis* **16**: 1403-1407.
- Herling AW, Schwab D, Burge HJ, Maas J, Hammerl R, Schmidt D, Strohschein S, Hemmerle H, Schubert G, Petry S, and Kramer W. (2002): Prolonged blood glucose reduction in mrp2-deficient rats GY/TR(-) by the glucose-6-phosphate translocase inhibitor S 3025. *Biochim Biophys Acta.* **1569** (1-3): 105-110.
- Hernandez O, Walker M, Cox RH, Foureman GL, Smith BR, and Bend JR. (1980): Regiospecificity and stereospecificity in the enzymatic conjugation of glutathione with (+/-)-benzo(a)pyrene 4,5-oxide. *Biochem Biophys Res Commun.* **96** (4):1494-1502.
- Hertog MGL, Feskens EJM, Hollman PCH, Katan MB, and Kromhout D. (1993): Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease. The Zutphen Elderly Study. *Lancet* **342**: 1007-1011.
- Hidalgo IJ, Raub TJ, and Borchardt RT. (1989): Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability. *Gastroenterology* **96** (3): 736-49.

Higgins CF. (1992): ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu Rev Cell Biol.* **8**: 67-113.

Hirohashi T, Suzuki H, Chu X-Y, Tamai I, Tsuji A, and Sugiyama Y. (2000): Function and expression of multidrug resistance-associated protein family in human colon adenocarcinoma cells (Caco-2). *J Pharmacol Exp Ther.* **292** (1): 265-270.

Hu Z, Jin S, and Scotto KS. (2000): Transcriptional activation of the MDR1 gene by UV irradiation. *J Biol Chem.* **275** (4): 2979-2985.

Huang YT, Hwang JJ, Lee PP, Ke FC, Huang JH, Huang CJ, Kandaswami C, Middleton E Jr, and Lee MT. (1999): Effects of luteolin and quercetin, inhibitors of tyrosine kinase, on cell growth and metastasis-associated properties in A431 cells overexpressing epidermal growth factor receptor. *Br J Pharmacol.* **128** (5): 999-1010.

Hunter J, Jepson MA, Tsuruo T, Simmons NL, and Borst, BH. (1993): Functional expression of P-glycoprotein in apical membranes of human intestinal Caco-2 cells: Kinetics of vinblastine secretion and interaction with modulators. *J Biol Chem* **268**: 14991-14997.

Imai Y, Tsukahara S, Assada S, and Sugimoto Y. (2004): Phytoestrogens/flavonoids reverse breast cancer resistance protein/ABCG2-mediated multidrug resistance. *Cancer Res.* **64** (12): 4346-4352.

Itoh K, Chiba T, Takahashi S, Ishii T, Igarashi K, Katoh Y, Oyake T, Hayashi N, Satoh K, Hatayama I, Yamamoto M, and Nabeshima Y. (1997): An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements. *Biochem Biophys Res Commun.* **236**: 313-322.

Jacob J, Doehmer J, Grimmer G, Soballa V, Raab G, Seidel A, and Greim H. (1996): Metabolism of phenanthrene, benz[a]anthracene, benzo[a]pyrene, chrysene, and benzo[e]phenanthrene by eight cDNA-expressed human and rat cytochromes P450. *Polycyclic Aromatic Compounds* **10**: 1-9.

Jacob J, Emura M, Grimmer G, Knebel JW, Raab G, and Mohr U. (1996): Requirement of monooxygenase induction in cultured lung epithelial cells for metabolism of PAH. *Polycyclic Aromatic Compounds* **10**: 123-128.

Jager W, Winter O, Halper B, Salamon A, Sartori M, Gajdzik L, Hamilton G, Theyer G, Graf J, and Thalhammer T. (1997): Modulation of liver canalicular transport processes by the tyrosine-kinase inhibitor genistein: implications of genistein metabolism in the rat. *Hepatology* **26** (6): 1467-1476.

Jedlitschky G, Leier I, Buchholz U, Center M, and Keppler D. (1994): ATP-dependent transport of glutathione S-conjugates by the multidrug resistance-associated protein. *Cancer Res.* **54** (18): 4833-4836.

Jin S and Scotto KS. (1998): Transcriptional regulation of the MDR1 gene by histone acyltransferase and deacetylase is mediated by NF- κ B. *Mol Cell Biol.* **18**(7): 4377-4384.

Jonker JW, Buitelaar M, Wagenaar E, Van Der Valk MA, Scheffer GL, Scheper RJ, Plosch T, Kuipers F, Elferink RP, Rosing H, Beijnen JH, and Schinkel AH. (2002): The breast cancer resistance protein protects against a major chlorophyll-derived dietary phototoxin and protoporphyrin. *Proc Natl Acad Sci USA.* **99** (24):15649-15654.

Juliano RL and Ling V. (1976): A surface glycoprotein modulating drug permeability in chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim Biophys Acta* **455**: 152-162.

Kage K, Tsukahara S, Sugiyama T, Asada S, Ishikawa E, Tsurou T, and Sugimoto Y. (2002): Dominant-negative inhibition of breast cancer resistance protein as drug efflux pump through the inhibition of S-S dependent homodimerization. *Int J Cancer* **97**: 626-630.

Kast HR, Goodwin B, Tarr PT, Jones SA, Anisfeld AM, Stoltz CM, Tontonoz P, Kliewer S, Willson TM, and Edwards PA (2002): Regulation of multidrug resistance-associated protein 2 (ABCC2) by the nuclear receptors pregnane X receptor, farnesoid X-activated receptor, and constitutive androstane receptor. *J Biol Chem.* **277**(4): 2908-2915.

Kauffmann H-M, Gant TW, Keppler D, and Schrenk D. (1998): Induction of hepatic mrp2 (cmrp/cmrat) gene expression in nonhuman primates treated with rifampicin or tamoxifen. *Arch Toxicol.* **72**: 763-768.

Kauffmann H-M, Pfannschmidt S, Zöllner H, Benz A, Vorderstemann B, Webster JI, and Schrenk D. (2002): Influence of redox-active compounds and PXR-activators on human MRP1 and MRP2 gene expression. *Toxicology* **171**: 137-146.

Kazerouni N, Sinha R, Hsu CH, Greenberg A, and Rothman N. (2001): Analysis of 200 food items for benzo[a]pyrene and estimation of its intake in an epidemiologic study. *Food Chem Toxicol.* **39**(5): 423-36.

Kelly JD, Eaton DL, Guengerich FP, and Coulombe RAJR. (1997): Aflatoxin B1 activation in human lung. *Toxicol Appl Pharmacol.* **144** (1): 88-95.

Kensler TW, Egnor PA, Dolan PM, Groopman JD, and Roebuck BD (1987): Mechanism of protection against aflatoxin tumorigenicity of rats fed 5-(2-pyrazinyl)-4-methyl-1,2-dithiole-3-thione (oltipraz) and related 1,1-dithiole-3-thione and 1,2-dithiole-3-ones. *Cancer Res.* **47**: 4271-4277.

Kim JH, Stansbury KH, Walker NJ, Trush MA, Strickland PT, and Sutter TR. (1998): Metabolism of benzo[a]pyrene and benzo[a]pyrene-7,8-diol by human cytochrome P450 1B1. *Carcinogenesis* **19** (10): 1847-1853.

Kim H, Peterson TG, and Barnes S. (1998a): Mechanisms of action of the soy-isoflavone genistein: emerging role for its effects via transforming growth factor β -signaling pathways. *Am J Clin Nutr.* **68** (Suppl 6): 1418S-1425S.

Kim Y-C, Masutani H, Yamaguchi Y, Itoh K, Yamamoto M, et al., (2001): Hemin-induced activation of the thioredoxin gene by nrf2. *J Biol Chem.* **276**: 18399-18406.

Kioka N, Yamano Y, Komano T, and Ueda K. (1992): Heat-shock responsive elements in the induction of the multidrug resistance gene (MDR1). *FEBS Lett.* **301**: 37-40.

Klein I, Sarkadi B, and Varadi A. (1999): An inventory of the human ABC proteins. *Biochim Biophys Acta* **1461** (2): 237-62.

Knekt P, Järvinen R, Seppänen R, Heliövaara M, Teppo L, Pukkala E, and Aromaa A. (1997): Dietary flavonoids and the risk for lung cancer and other malignant neoplasms. *Am J Epidemiol.* **146**: 223-230.

Knorr M, and Schrenk D. (1968): About the question of the synthesis of polycyclic aromatics by bacteria. *Arch Hyg Bacteriol.* **152**: 282.

Komatani H, Kotani H, Hara Y, Nakagawa R, Matsumoto M, Arakawa H, and Nishimura S. (2001): Identification of breast cancer resistance protein/ mitoxantrone resistance/ placenta-specific, ATP-binding cassette transporter of NB-506 and J-107088, topoisomerase I inhibitors with an indolocarbazole structure. *Cancer Res.* **61**: 2827-2832.

König J, Rost D, Cui Y, and Keppler D. (1999a): Characterization of the human multidrug resistance protein isoform MRP3 localized to the basolateral hepatocyte membrane. *Hepatology* **29** (4): 1156-1163.

König J, Nies AT, Cui Y, Leier I, and Keppler D (1999b): Conjugate export pumps of the multidrug resistance protein (MRP) family: localization, substrate specificity, and MRP2-mediated drug resistance. *Biochim Biophys Acta* **1461**: 377-394.

Krishnamurthy P, Ross DD, Nakanishi T, Bailey-Dell K, Zhou S, Mercer KE, Sarkadi B, Sorrentino BP, and Schuetz JD. (2004): The stem cell marker Bcrp/ABCG2 enhances hypoxic cell survival through interactions with heme. *J Biol Chem.* **279**(23): 24218-24225.

Kuo SM (1997): Dietary flavonoids and cancer prevention: evidence and potential mechanism. *Crit Rev Oncol.* **8**: 47-69.

Lahvis GP, Lindell SL, Thomas RS, McCuskey RS, Murphy C, Glover E, Bentz M, Southard J, and Bradfield CA. (2000): Portosystemic shunting and persistent fetal vascular structures in aryl hydrocarbon receptor deficient mice. *PNAS* **97** (19): 10442-10447.

Lang KF, Buffleb H, and Zander M. (1963): Pyrolysis of polynuclear aromatic hydrocarbons. *Erdöl, Kohle, Erdgas, Petrochem.* **16**: 944.

Le Ferrec E, Lagadic-Gossmann D, Rauch C, Bardiau C, Maheo K, Massiere F, Le Vee M, Guillouzo A, and Morel F (2002): Transcriptional induction of CYP1A1 by oltipraz in human Caco-2 cells is aryl hydrocarbon receptor- and calcium dependent. *J Biol Chem.* **277**(27): 24780-24787.

Leibowitz BE, and Mueller JA. (1993): Bioflavonoids and polyphenols: medical application. *J Optima Nutr.* **2**: 17-35.

Leier I, Hummel-Eisenbeiss J, Cui Y, and Keppler D. (2000): ATP-dependent para-aminohippurate transport by apical multidrug resistance protein MRP2. *Kidney Int.* **57**: 1636-1642.

Leslie EM, Ito K, Upadhyaya P, Hecht SS, Deeley RG, and Cole SP. (2001): Transport of the beta-O-glucuronide conjugate of the tobacco-specific carcinogen 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol (NNAL) by the multidrug resistance protein 1 (MRP1). Requirement for glutathione or a non-sulfur-containing analog. *J Biol Chem.* **276** (30): 27846-54.

Lijinski W (1991): The formation and occurrence of polynuclear aromatic hydrocarbons associated with food. *Mutat Res.* **259**(3-4): 251-61.

Lin JH, Chiba M, and Baillie TA. (1999): Is the role of the small intestine in first-pass metabolism overemphasized? *Pharmacol Rev.* **51** (2): 135-157.

Liu N, Thang QY, Vakharia D, Dunbar D, and Kaminski LS. (2001): Induction of CYP 1A by benzo[k]fluoranthene in human hepatocytes: CYP1A1 or CYP1A2? *Arch Biochem Biophys.* **389** (1): 130-134.

- Liu Y and Hu M (2002): Absorption and metabolism of flavonoids in the Caco-2 cell culture model and a perfused rat intestinal model. *Drug Metab Dispos.* **30** (4): 370-373.
- Loe DW, Stewart RK, Massey TE, Deeley RG, and Cole SP. (1997): ATP-dependent transport of aflatoxin B₁ and its glutathione conjugates by the product of the multidrug resistance protein (MRP) gene. *Mol Pharmacol.* **51** (6):1034-41.
- Luch A, Schober W, Soballa VJ, Raab G, Jacob J, Doehmer J, and Seidel A. (1999): Metabolic activation of dibenzo[*a,h*]pyrene by human cytochrome P450 1A1 and 1B1 expressed in V79 Chinese hamster cells. *Chem Res Toxicol.* **12**: 353-364.
- Ma Q and Baldwin KT. (1999): 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced degradation of aryl hydrocarbon receptor (AhR) by the ubiquitin-proteasome pathway. *J Biol Chem.* **275** (12): 8432-8438.
- Ma Q and Whitlock JP. (1996): The aryl hydrocarbon receptor modulates the Hepa 1c1c7 cell cycle and differentiated state independently of dioxin. *Mol Cell Biol.* **16**: 2144-2150.
- MacDonald, CJ, Ciolino, HP and Yeh GC. (2001): Dibenzoylmethane modulates aryl hydrocarbon receptor function and expression of cytochromes P450 1A1, 1A2 and 1B1. *Cancer Res.* **61**: 3919-3924.
- Machala M, Vondracek J, Blaha L, Ciganek M, and Neca JV. (2001): Aryl hydrocarbon receptor-mediated activity of mutagenic polycyclic aromatic hydrocarbons determined using in vitro reporter gene assay. *Mutat Res.* **497** (1-2): 49-62.
- Makhey VD, Guo A, Norris DA, Hu P, Yan J, and Sinko PJ. (1998): Characterization of the regional intestinal kinetics of drug efflux in rat and human intestine and in Caco-2 cells. *Pharm Res.* **15**(8): 1160-7.
- Maliepaard M, van Gastelen MA, de Jong LA, Pluim D, van Waardenburg RC, Ruevekamp-Helmers MC, Floot BG, and Schellens JH. (1999): Overexpression of the BCRP/MXR/ABCP gene in a topotecan-selected ovarian tumor cell line. *Cancer Res.* **59** (18): 4559-63.
- Masuda Y, Mori K, and Kuratsune M. (1967): Polycyclic aromatic hydrocarbons formed by pyrolysis of carbohydrates, amino acids and fatty acids. *Gann* **58**, 69.
- Mata JE, Yu Z, Gray JE, Williams DE, and Rodriguez-Proteau R. (2004): Effects of chlorophyllin on transport of dibenzo[*a,h*]pyrene, 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine, and aflatoxin B₁ across Caco-2 cell monolayers. *Toxicology* **196**: 117-125.
- Meunier V, Bourrie M, Berger Y, and Fabre G. (1995): The human intestinal epithelial cell line Caco-2; pharmacological and pharmacokinetic applications. *Cell Biol Toxicol.* **11** (3-4): 187-94.
- Miwa M, Tsukahara S, Ishikawa E, Asada S, Imai Y, and Sugimoto Y. (2003): Single amino acid substitutions in the transmembrane domains of breast cancer resistance protein (BCRP) alters cross resistance patterns in transfectants. *Int J Cancer* **107** (5): 757-763.
- Mizuno N, Suzuki M, Kusuhara H, Suzuki H, Takeuchi K, Niwa T, Jonker JW, and Sugiyama Y. (2004): Impaired renal excretion of 6-hydroxy-5,7-dimethyl-2-methylamino-4-(3-pyridylmethyl) benzothiazole (E3040) sulfate in breast cancer resistance protein (BCRP1/ABCG2) knockout mice. *Drug Metab Dispos.* **32** (9): 898-901.

Moinova HR, Mulcahy RT. (1998): An electrophile responsive element (EpRE) regulates β -naphthoflavone induction of the human γ -glutamylcysteine synthetase regulatory subunit gene. *J Biol Chem.* **273**: 14683-14689.

Morel Y and Barouki R. (1999): Repression of gene expression by oxidative stress. *Biochem J.* **342**: 481-496.

Morrow CS, Nakagawa M, Goldsmith ME, Madden MJ, and Cowan KH. (1994): Reversible transcriptional activation of *mdr1* by sodium butyrate treatment of human colon cancer cells. *J Biol Chem.* **269** (14): 10739-10746.

Mosser J, Douar AM, Sarde CO, Kioschis P, Feil R, Moser H, Poustka AM, Mandel JL, and Aubourg P. (1993): Putative x-linked adrenoleukodystrophy gene shares unexpected homology with ABC transporters. *Nature* **361** (6414): 682-683.

Münzel PA, Schmohl S, Buckler F, Jaehrling J, Raschko FT, Kohle C, and Bock KW. (2003): Contribution of the Ah receptor to the phenolic antioxidant-mediated expression of human and rat UDP-glucuronosyltransferase UGT 1A6 in Caco-2 and rat hepatoma 5L cells. *Biochem Pharmacol.* **66** (5): 841-7.

Münzel PA, Bookjans G, Mehner G, Lehmköster T, and Bock KW. (1996): Tissue-specific 2,3,7,8,-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-inducible expression of human UDP-glucuronosyltransferase. *Arch Biochem Biophys.* **335** (1): 205-210.

Murota K, Shimizu S, Chujo H, Moon J-H, and Terao J. (2000): Efficiency of absorption and metabolic conversion of quercetin and its glucosides in human intestinal cell line Caco-2. *Arch Biochem Biophys.* **384**: 391-397.

Murray GI, Taylor MC, McFayden MC, McKay JA, Greenlee WF, Burke MD, and Melvin WT (1997): Tumor-specific expression of cytochrome P450 CYP1B1. *Cancer Res.* **57**: 3026-3031.

Nagata K and Yamazoe Y. (2000): Pharmacogenetics of sulfotransferase. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* **40**: 159-176.

Nakagawa R, Hara Y, Arakawa H, Nishimura S, and Komatani H. (2002): ABCG2 confers resistance to indolocarbazole compounds by ATP-dependent transport. *Biochem Biophys Res Commun.* **299** (4):669-75.

Nakatomi K, Yoshikawa M, Oka M, Ikegami Y, Hayasaka S, Sano K, Shiozawa K, Kawabata S, Soda H, Ishikawa T, Tanabe S, and Kohno S. (2002): Transport of 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin (SN-38) by breast cancer resistance protein ABCG2 in human lung cancer cells. *Cancer Res.* **62** (19): 5451-6.

Nebert DW, Roe AL, Dieter MZ, Solis WA, Yang Y, and Dalton TP. (2000): Role of the aromatic hydrocarbon receptor and [Ah] gene battery in the oxidative stress response, cell-cycle control, and apoptosis. *Biochem Pharmacol.* **59** (1): 65-85.

Nguyen T, Sherratt, PJ, and Pickett CB. (2003): Regulatory mechanisms controlling gene expression mediated by the antioxidant response element. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* **43**: 233-260.

Paulusma CC, Kool M, Bosma PJ, Scheffer GL, ter Borg F, Scheper RJ, Tytgat GN, Borst P, Baas F, and Oude Elferink, RP. (1997): A mutation in the human canalicular

multispecific organic anion transporter gene causes the Dubin-Johnson syndrome. *Hepatology* **25**: 1539-1542.

Pavek P, Merino G, Wagenaar E, Bolscher E, Novotna M, Jonker JV, and Schinkel AH (2005): Human breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2): interactions with steroid drugs, hormones, the dietary carcinogen PhIP, and transport of cimetidine. *J Pharmacol Exp Ther.* **312**: 144-152.

Pinto M, Robine-Leon S, Appay MD, Keding M, Triadou N, Dussaulx E, Lacroix B, Simon-Assmann P, Haffen K, Fogh J, and Zweibaum A. (1983): Enterocyte-like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line Caco-2. *Biol Cell.* **47**: 323-330.

Pollenz RS, Sattler CA, and Poland A. (1994): The aryl hydrocarbon receptor and aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator protein show distinct subcellular localizations in Hepa 1c1c7 cells by immunofluorescence microscopy. *Mol Pharmacol.* **45**: 428-438.

Potter JD, Steinmetz K. (1996): Vegetables, fruit and phytoestrogens as preventive agents. In *Principles of Chemoprevention*, ed BW Stewart, D McGregor, P Kleinhues. No. **139**: IARC Scientific publications, pp 61-90. Lyon, France: Int. Agency Res. Cancer.

Prestera T, Zhang Y, Spencer SR, Wilczak CA, and Talalay P. (1993): Chemical and molecular regulation of enzymes that detoxify carcinogens. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 2965-2969.

Prueksaritanont T, Gorham LM, Hochman JH, Tran LO, and Vyas KP. (1996): Comparative studies of drug-metabolizing enzymes in dog, monkey, and human small intestines and in Caco-2 cells. *Drug Metab Dispos.* **24** (6): 634-42.

Rao CV, Tokoma K, Kelloff G, and Reddy BS. (1991): Inhibition by dietary oltipraz of experimental intestinal carcinogenesis induced by azoxymethane in male F344 rats. *Carcinogenesis (Lond)* **12**: 1051-1055.

Reiners JJR, Clift Russel, and Mathieu P. (1999): Suppression of the cell cycle progression by flavonoids: dependence on the aryl hydrocarbon receptor. *Carcinogenesis* **20** (8): 1561-1566.

Reiners JJR, Lee J-Y, Clift RE, Dudley DT, and Myrand SP. (1998): PD 98059 is an equipotent antagonist of the aryl hydrocarbon receptor and inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase. *Mol Pharmacol.* **53**: 438-445.

Renes J, de Vries EG, Nienhuis EF, Jansen PL, and Müller M. (1999): ATP- and glutathione-dependent transport of chemotherapeutic drugs by the multidrug resistance protein MRP1. *Br J Pharmacol.* **126** (3): 681-688.

Rice-Evans CA, Miller HJ, Paganga G. (1996): Structure-antioxidant activity relationship of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biol Med.* **20**: 933-956.

Rifkind AB, Tseng L, Hirsch MB, and Lauersen NH. (1978): Aryl hydrocarbon hydroxylase activity and microsomal cytochrome content of human fetal tissues *Cancer Res.* **38**: 1572-77.

Rinaldi AL, Morse MA, Fields HW, Rothas DA, Pei P, Rodrigo KA, Renner RJ, and Mallery SR. (2002): Curcumin activates the aryl hydrocarbon receptor yet significantly inhibits (-)-benzo(a)pyrene-7R-trans-7,8-dihydrodiol bioactivation in oral squamous cell carcinoma cells and oral mucosa. *Cancer Res.* **62** (19): 5451-6.

- Robey RW, Medina-Perez WY, Nishiyama K, Lahusen T, Miyake K, Litman T, Senderowicz AM, Ross DD, and Bates SE. (2001) Overexpression of the ATP-binding cassette half-transporter, ABCG2 (MXR/BCRP/ABCP1), in flavopiridol-resistant human breast cancer cells. *Clin Cancer Res.* **7**: 145-52
- Sabolovic N, Magdalou J, Netter P, and Abid A. (2000): Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and phenols glucuronidation in Caco-2 cells: identification of the UDP-glucuronosyltransferases UGT1A6, 1A3 and 2B7. *Life Sci.* **67** (2): 185-196.
- Sadek CM and Allen-Hoffmann BL (1994): Suspension-mediated induction of Hepa 1c1c7 Cyp 1a1-expression is dependent on the Ah receptor signal transduction pathway. *J Biol Chem.* **269**: 31505-31509.
- Safe S. (1990): Polychlorinated biphenyls (PCBs), dibenzo-p-dioxins (PCDDs), dibenzofurans (PCDFs), and related compounds: environmental and mechanistic considerations which support the development of toxic equivalency factors (TEFs) *Crit Rev Toxicol.* **21**: 51-88.
- Safe S. (1995): Modulation of gene expression and endocrine response pathways by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and related compounds *Pharm Therap.* **67**: 247-281.
- Scalbert A and Williamson G. (2000): Dietary intake and bioavailability of polyphenols *J Nutr.* **130**: 2073S-2085S.
- Schinkel AH, Wagenaar E, van Deemter L, Mol CA, Borst P. (1995): Absence of the mdr1a P-Glycoprotein in mice affects tissue distribution and pharmacokinetics of dexamethasone, digoxin, and cyclosporin A. *J Clin Invest.* **96**(4):1698-705.
- Schmidt JV, Su GH, Reddy JK, Simon MC, and Bradfield CA. (1996): Characterization of a murine Ahr null allele: involvement of the Ah receptor in hepatic growth and development. *PNAS* **93** (13): 6731-6736.
- Schmiedlin-Ren P, Thummel KE, Fisher JM, Paine MF, Lown KS, and Watkins PB. (1997): Expression of enzymatically active CYP3A4 by Caco-2 cells grown on extracellular matrix-coated permeable supports in the presence of 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃. *Mol Pharmacol.* **51** (5):741-54.
- Sheppard KA, Phelps KM, Williams AJ, Thanos D, Glass CK, Rosenfeld MG, Gerritsen ME, and Collins T. (1998): Nuclear integration of corticoid receptor and nuclear factor-kappaB signaling by CREB-binding protein and steroid receptor coactivator-1. *J Biol Chem.* **273** (45): 29291-29294.
- Shimada T and Fujii-Kuriyama Y. (2004): Metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbons to carcinogens by cytochromes P450 1A1 and 1B1. *Cancer Sci.* **95** (1): 1-6.
- Shimada T, Gillam EMJ, Oda Y, Tsumura F, Sutter TR, Guengerich FP, and Inoue K. (1999): Metabolism of benzo[a]pyrene to *trans*-7,8-dihydroxy-7,8-dihydrobenzo[a]pyrene by recombinant human cytochrome P4501B1 and purified liver hydrolase. *Chem Res Toxicol.* **12**: 623-629.
- Shimba S, Komiyama K, Moro I, and Tezuka M. (2002): Overexpression of the aryl hydrocarbon receptor (AhR) accelerates the cell proliferation of A549 cells. *J Biochem. (Tokyo)* **132** (5): 795-802.

Shiozawa K, Oka M, Soda H, Yoshikawa M, Ikegami Y, Tsurutani J, Nakatomi K, Nakamura Y, Doi S, Kitazaki T, Mizuta Y, Murase K, Yoshida H, Ross DD, and Kohno S. (2004): Reversal of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2)-mediated drug resistance by novobiocin, a coumermycin antibiotic. *Int J Cancer* **108** (1): 146-151.

Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, and Klenk DC (1985): Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem.* **150**: 76-85.

Smith WA, Arif JM, and Gupta RC. (1998): Effects of cancer chemopreventive agents on microsome-mediated DNA adduction of the breast carcinogen dibenzo[*a,h*]pyrene. *Mutat Res.* **412**(3): 307-14.

Smith WA, Gupta RC. (1999): Determining efficacy of cancer chemopreventive agents using a cell-free system concomitant with DNA adduction. *Mutat Res.* **425** (1): 143-152.

Song Z, Pollenz, RS. (2003): Functional analysis of murine aryl hydrocarbon (AH) receptors defective in nuclear import: impact on AH receptor degradation and gene regulation. *Mol Pharmacol.* **63**: 597-606.

Sonoda J, Xie W, Rosenfeld JM, Barwick JL, Guzelian PS, and Evans RM. (2002): Regulation of a xenobiotic sulfonation cascade by nuclear pregnane x receptor (PXR). *PNAS* **99** (21): 13801-13806.

Srivastava SK, Watkins, SC, Schuetz E, and Singh SV. (2002): Role of glutathione conjugate efflux in cellular protection against benzo[*a*]pyrene-7,8-diol-9,10-epoxide-induced DNA damage. *Mol Carcinog.* **33**: 156-162.

Stein U, Lage H, Jordan A, Walther W, Bates S E, Litman T, Hohenberger P, and Dietel M. (2002): Impact of BCRP/MXR, MRP1 and MDR1/P-glycoprotein on thermoresistant variants of atypical and classical multidrug resistant cancer cells. *Int J Cancer* **97**: 751-760.

Suzuki M, Suzuki H, Sugimoto Y, and Sugiyama Y. (2003): ABCG2 transports sulfated conjugates of steroids and xenobiotics. *J Biol Chem.* **278** (25): 22644-9.

Taipalensuu J, Törnblom H, Lindberg G, Einarsson C, Sjöqvist F, Melhus H, Garberg P, Sjöström B, Lundgren B, and Artursson P. (2001): Correlation of gene expression of ten drug efflux proteins of the ATP-binding cassette transporter family in normal human jejunum and in human intestinal epithelial Caco-2 cell monolayers. *J Pharmacol Exp Ther.* **299**: 164-170.

Tamura H, Taniguchi K, Hayashi E, Hiyoshi Y, and Nagai F. (2001): Expression profiling of sulfotransferases in human cell lines derived from extra-hepatic tissues. *Biol Pharm Bull.* **24**(11): 1258-1262.

Thiebaut F, Tsurou T, Hamada H, Gottesman MM, Pastan I, and Willingham MC. (1987): Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in human normal tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* **84** (21): 7735-7738.

Tsujii H, König J, Rost B, Stöckel D, Leuschner U, and Keppler D. (1999): Exon-intron organization of the human multidrug-resistance protein 2 (MRP2) gene mutated in Dubin-Johnson syndrome. *Gastroenterology* **117**: 653-660.

Tukey RH and Strassburg CP. (2000): Human UDP-Glucuronosyltransferases: Metabolism, Expression, and Disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* **40**: 581-616.

- Uno S, Dalton TP, Derkenne S, Curran CP, Miller ML, Shertzer HG, and Nebert DW. (2004): Oral exposure to benzo[a]pyrene in the mouse: detoxication by inducible cytochrome P450 is more important than metabolic activation. *Mol Pharmacol.* **65**: 1225-1237.
- Vaidyanathan JB and Walle T. (2002): Glucuronidation and sulfation of the tea flavonoid (-)-epicatechin by the human and rat enzymes. *Drug Metab Dispos.* **30** (8): 897-903.
- Vakharia DD, Liu N, Pause R, Fasco M, Besette E, Zhang QY, and Kaminski LS. (2001): Polycyclic aromatic hydrocarbon/metal mixtures: effect on PAH induction of CYP1A1 in human HEPG2 cells. *Drug Metab Dispos.* **29** (7): 999-1006.
- Van der Heijden J, de Jong MC, Dijkmans BA, Lems WF, Oerlemans R, Kathmann I, Schalkwijk CG, Scheffer GL, Scheper RJ, and Jansen G. (2004): Development of sulfasalazine resistance in human T cells induces expression of the multidrug resistance transporter ABCG2 (BCRP) and augmented production of TNF . *Ann Rheum Dis.* **63** (2): 138-142.
- Van Herwaarden AE, Jonker JW, Wagenaar E, Brinkhuis RF, Schellens JH, Beijnen JH, and Schinkel AH. (2003): The breast cancer resistance protein (Bcrp1/Abcg2) restricts exposure to the dietary carcinogen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine. *Cancer Res.* **63** (19): 6447-52.
- Waliser JA, Bradfield CA. (2002): The aryl hydrocarbon receptor: A model of gene-environment interactions. *In: Van den Heuvel JP, Perdew GH, Mattes WB, Greenlee WF, editors. Comprehensive Toxicology: Cellular and Molecular Toxicology. Amsterdam: Elsevier; 119-132.*
- Wall ME, Wani MC, Manikumar G, Abraham P, Taylor H, Hughes TJ, Warner J, and McGivney R. (1988): Plant antimutagenic agents, 2 Flavonoids. *J Nat Prod.* **51**: 1084-1091.
- Walle UK, Galijatovic A, and Walle T. (1999): Transport of the flavonoid chrysin and its conjugated metabolites by the human intestinal cell line Caco-2. *Biochem Pharmacol.* **58**(3): 431-8.
- Wattenberg LW and Bueding E, (1986): Inhibitory effects of 5-(2-pyrazinyl)-4-methyl-1,2-dithiole-3-thione (oltipraz) on carcinogenesis induced by benzo[a]pyrene, diethylnitrosamine and uracil mustard. *Carcinogenesis (Lond)* **7**: 1379-1381.
- Watzl B and Rechkemmer G. (2001): Flavonoide. *Ernährungs-Umschau* **48** (12): 498-502.
- Weiss C, Kolluri SK, Kiefer F, and Göttlicher M (1996): Complementation of Ah receptor deficiency in hepatoma cells: negative feedback regulation and cell cycle control by the Ah receptor. *Exp Cell Res.* **226** (1): 154-163.
- Whitelaw ML, McGuire J, Picard D, Gustafsson JA, and Poellinger L. (1995): Heat shock protein hsp90 regulates dioxin receptor *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 4437-41.
- Williams SN, Shih H, Guenette DK, Brackney W, Denison MS, Pickwell GV, and Quattrochi LC. (2000): Comparative studies on the effects of green tea extracts and individual tea catechins on human CYP1A gene expression. *Chem Biol Interact.* **128** (3): 211-229.

Wislocki PG, Gadek KM, Chou MW, Yang SK, and Lu AY. (1980): Carcinogenicity and mutagenicity of the 3,4-dihydrodiols and other metabolites of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene and its hydroxymethyl derivatives. *Cancer Res.* **40** (10): 3661-3664.

Woehlecke H, Osada H, Herrmann A, and Lage H. (2003). Reversal of breast cancer resistance protein-mediated drug resistance by tryprostatin A. *Int J Cancer* **107**: 721-728.

Woehlecke H, Pohl A, Alder-Baerens N, Lage H, and Herrmann A. (2003): Enhanced exposure of phosphatidylserine in human gastric carcinoma cells overexpressing the half-size ABC transporter BCRP (ABCG2). *Biochem J.* **376**: 489-495.

Yang SK. (1988): Stereoselectivity of cytochrome P-450 isozymes and epoxide hydrolase in the metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biochem Pharmacol.* **37** (1): 61-70.

Yeh GC, Lopaczynska J, Poore CM, and Phang JM. (1992): A new functional role for P-glycoprotein: efflux pump for benzo[a]pyrene in human breast cancer MCF-7 cells. *Cancer Res.* **52**: 6692-6695.

Zhang S, Yang X, and Morris ME. (2004): Flavonoids are inhibitors of breast cancer resistance protein (ABCG2)-mediated transport. *Mol Pharmacol.* **65** (5): 1208-16.

Zhao C, Shi Y, Wang W, Jia Z, Yao S, Fan B, and Zheng R. (2003): Fast repair of deoxythymidine radical anions by two polyphenols rutin and quercetin. *Biochem Pharmacol.* **65** (12): 1967-71.

Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (BfG): Stellungnahme des BgVV von 12. Juli 2001; Polycyclische Aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK) in spanischen Oliventresterölen.

Bei der Erstellung der vorliegenden Arbeit wurden folgende Hilfen in Anspruch genommen:

Die Western Blot Analysen der Sulfotransferasen wurden im *Deutschen Institut für Ernährungsforschung (DIfE), Arthur Scheunert Allee 114-116, 14558 Bergholz-Rehbrücke*, von der Abteilung von Prof. Dr. Glatt und Dr. W. Meinel durchgeführt.

Die PCR-Analysen wurden von Frau Birgit Kühlein und Frau Nicole Brauer-Dewor durchgeführt.

Die mit TCDD behandelten Caco-2-Zellen, das INF, B[k]F, 1-Hydroxy- und 3-Hydroxy-BP sowie die PAK-Mischung (Tabakrauch) wurden vom *Biochemischen Institut für Umweltkarzinogene, Prof. Dr. Gernot Grimmer Stiftung, 22927 Grosshansdorf*, zur Verfügung gestellt.

Die SULT-transfizierten V79-Zellen wurden von Prof. H. Glatt (*DIfE*), zur Verfügung gestellt.

Die HCT116 NRI Zellen wurden von Dr. H. Komatani, *Merck Research Laboratories, Ibaraki, Japan*, zur Verfügung gestellt.

Das Indolo[3,2-*b*]carbazol wurde von Prof. J. Bergman, *Karolinska Institut, Stockholm, Schweden*, zur Verfügung gestellt.

Der BCRP-Hemmer Ko 143 wurde von Prof. A.H. Schinkel, *Krebsforschungsinstitut der Niederlande, Amsterdam*, zur Verfügung gestellt.

Der MRP2-Hemmer S3025 wurde von Dr. A.W. Herling (*Aventis Pharma, Frankfurt*) zur Verfügung gestellt.

Erklärung

Ich habe die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und alle benutzten Hilfsmittel, Quellen und zu Hilfeleistungen herangezogenen Institutionen vollständig angegeben.

Die vorliegende Dissertation habe ich nicht als Diplomarbeit oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet.

Hannover, den 01.12.04

Bettina Ebert

Publikationen

Lampen A, Ebert B, Stumkat L, Jacob J, Seidel A.

Induction of gene expression of xenobiotic metabolism enzymes and ABC-transport proteins by PAH and a reconstituted PAH mixture in human Caco-2 cells. *Biochim Biophys Acta*. 2004 Nov 24; **1681**(1):38-46.

Ebert B, Seidel A, Lampen A.

Induction of phase-1 metabolizing enzymes by oltipraz, flavone and indole-3-carbinol enhance the formation and transport of benzo[a]pyrene sulfate conjugates in intestinal Caco-2 cells.

Toxicol Lett. 2005 May 9; [Epub ahead of print].

Ebert B, Seidel A, Lampen A.

Identification of BCRP as transporter of benzo[a]pyrene conjugates metabolically formed in Caco-2 cells and its induction by Ah-receptor agonists. *Carcinogenesis*. 2005 May 25; [Epub ahead of print].

Danksagung

Ein ganz herzlicher Dank geht an all jene Personen und Institutionen, die zur Entstehung meiner Arbeit beigetragen haben:

Dem Direktor des Institutes für Lebensmitteltoxikologie Herrn Prof. Dr. Dr. H. Nau für die Ermöglichung dieses Projektes.

Meinem Betreuer Herrn PD Dr. Dr. A. Lampen danke ich für die intensive Betreuung inklusive dem allmontäglichen Motivations-Coaching.

Für die angenehme Prüfungsatmosphäre während der mündlichen Doktorprüfung möchte ich mich herzlich bei meinen Prüfern Herrn Prof. Dr. W. Müller, Herrn Prof. Dr. B. Otto und dem Prüfungsvorsitzenden Herrn Prof. Dr. B. Hitzmann bedanken.

Ein besonderer Dank gilt auch allen Kolleginnen und Kollegen der Zentrumsabteilung für Lebensmitteltoxikologie für das gute Arbeitsklima im Institut; insbesondere danke ich hier Frau Birgit Kühlein und Frau Nicole Brauer-Dewor für die unzähligen RNA-Analysen.

Darüber hinaus möchte ich mich bei allen Wissenschaftlern und Institutionen bedanken, die Ressourcen und Hilfen zur Verfügung gestellt haben, ohne welche die Entstehung meiner Arbeit nicht möglich gewesen wäre (PD Dr. A. Seidel (BIU, Grosshansdorf), Prof. Dr. Glatt H. und Dr. W. Meinel (DifE, Potsdam-Rehbrücke), Dr. A. Herling (Aventis Pharma, Frankfurt), Prof. A.H. Schinkel (Krebsforschungsinstitut der Niederlande, Amsterdam), Prof. J. Bergman, Karolinska Institut, Stockholm, Schweden) und Dr. H. Komatani (Merck Research Laboratories, Ibaraki, Japan).

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft gilt mein Dank für die Finanzierung des Projektes (LA1177, JA270).

Ein besonderer Dank gilt natürlich nicht zuletzt Herrn Dr. med. vet. Lutz Stumkat für **die** zündende Idee.