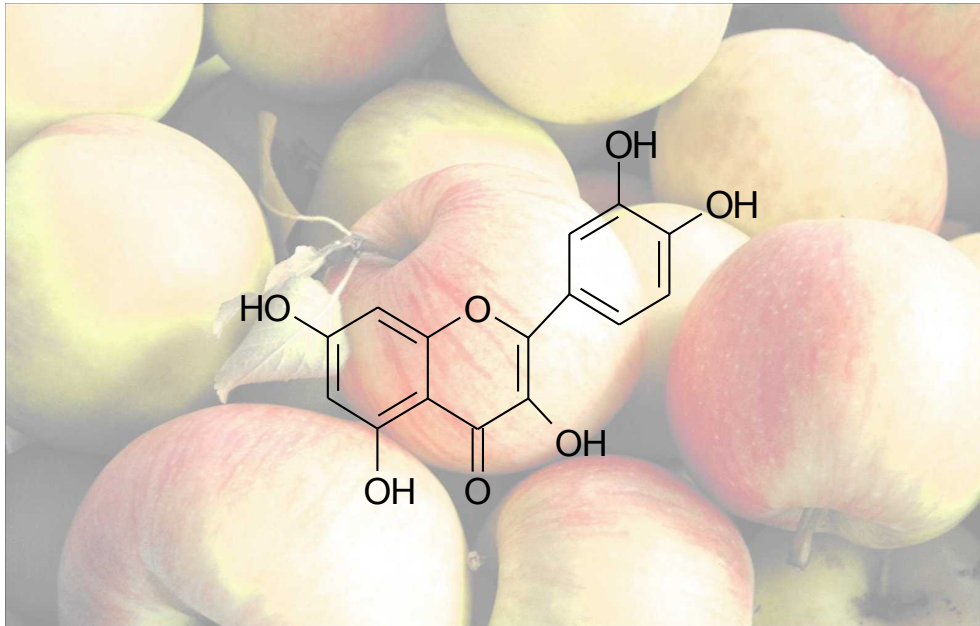


Flavonoide des Apfels: Transport in Caco-2-Kolonzellen und Einfluss auf den Fremdstoffmetabolismus



Dem Fachbereich Chemie der Technischen Universität Kaiserslautern
zur Verleihung des akademischen Grades
'Doktor der Naturwissenschaften'
genehmigte

Dissertation

vorgelegt von

Dipl. Lebensmittelchemikerin Christine Pohl

Betreuer der Arbeit: Prof. Dr. Dr. D. Schrenk

Kaiserslautern 2005

Die Experimente zu vorliegender Arbeit wurden von September 2002 bis August 2005 am Fachbereich Chemie der Technischen Universität Kaiserslautern, Abteilung Lebensmittelchemie und Umwelttoxikologie, in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Dr. D. Schrenk durchgeführt.

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 24. November 2005

Promotionskommission:

Vorsitzender:	Prof. Dr. S. Ernst
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Dr. D. Schrenk
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. T. Kietzmann

Erfüllte Wünsche sind oft die,
für deren Verwirklichung
etwas getan wurde.

Else Pannek

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Rolle von Nahrungsbestandteilen in der Genese von Darmerkrankungen	1
1.2	Polyphenole	3
1.2.1	Struktur und physiologische Bedeutung	3
1.2.2	Biosynthese der Polyphenole	5
1.2.3	Resorption und Metabolismus	7
1.2.4	Antioxidative Eigenschaften, Tumor-protective und immunmodulatorische Wirkung	11
1.2.5	Toxizität	14
1.2.6	Polyphenole in Apfel und Apfelsaft	14
1.3	Fremdstoffmetabolismus	17
1.3.1	Das Cytochrom P450-System	19
1.3.2	CYP 1A1	20
1.4	Die ABC-Transportproteine im Gastrointestinaltrakt	22
1.5	Klinische Mehrfachresistenz	26
1.5.1	MRP2	27
1.6	Caco 2 Zellen als in vitro Modell	29
2	Ziel der Arbeit	33
3	Material und Methoden	36
3.1	Zelllinie	36
3.2	Chemikalien und Reagenzien	36
3.2.1	Medien und Zusätze	40
3.2.2	Apfelsaftextrakt und Polyphenole	41
3.2.3	Lösungen und Puffer	42
3.2.4	Resazurin-Reagenzien	43
3.2.5	Ethoxyresorufin-O-Deethylase (EROD)-Aktivität	44
3.2.6	Proteinisolierung aus Zelllinien	45
3.2.7	Proteindetektion mittels Western Blot (semi dry)	46
3.2.8	Proteindetektion mittels Western Blot (Tank Blot)	50
3.2.9	Protein-Marker: Kaleidoskope Prestained Standards	52

3.2.10	Antikörper	52
3.2.11	RNA-Isolierung (Chomczynski)	53
3.2.12	Transfektion von Plasmiden	54
3.2.13	Transportversuche	55
3.2.14	'High performance liquid chromatography' (HPLC)	55
3.2.15	Geräte	57
3.2.16	Computerprogramme	59
3.3	Methoden	60
3.3.1	Zellbiologische Methoden	60
3.3.1.1	Kultivierung und Passagierung der Caco-2-Zellen	60
3.3.1.2	Einfrieren der Zellen	61
3.3.1.3	Auftauen von Zellen	61
3.3.1.4	Zellzahl- und Vitalitätsbestimmung	61
3.3.1.5	Kultivierung und Zellbehandlung	62
3.3.1.6	Zellernte	63
3.3.1.6.1	EROD-Assay	63
3.3.1.6.2	Mikrosomengewinnung	63
3.3.1.7	Bestimmung des Proteingehaltes	64
3.3.1.7.1	Methode nach Bradford	64
3.3.1.7.2	Methode nach Lowry	65
3.3.1.8	RNA-Isolierung	65
3.3.2	Molekularbiologische Methoden	66
3.3.2.1	Zytotoxizitätstests	67
3.3.2.2	Bestimmung der 7-Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD)-Aktivität	67
3.3.2.2.1	Durchführung für Mikrosomen	69
3.3.2.2.2	Durchführung in Lebendzellen	71
3.3.2.3	Real Time PCR	71
3.3.2.3.1	RT-PCR	72
3.3.2.3.2	Real Time PCR	73
3.3.2.3.3	Primervalidierung	74
3.3.2.3.4	Quantifizierungskurve	75
3.3.2.3.5	Auswertung der Real Time PCR	77
3.3.2.4	Western Blot Analyse	78
3.3.2.4.1	Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	79
3.3.2.4.2	Semi dry blot	79
3.3.2.4.3	Tank Blot	80
3.3.2.4.4	Immunoblot	81
3.3.2.4.5	Strippen von Membranen	82

3.3.2.5	Transfektion der Caco-2-Zellen mit einem Reporter-genplasmid	82
3.3.2.5.1	Herstellung Kalziumchlorid-kompetenter Bakterien	83
3.3.2.5.2	Transformation eines Reporter-genplasmids in kompetente Zellen	83
3.3.2.5.3	Gewinnung der Plasmide	84
3.3.2.5.4	Durchführung der Transfektion	84
3.3.2.5.5	Reporter-gen-Assay	86
3.3.2.6	Transportversuche	88
3.3.3	Statistische Auswertung	89
4	Ergebnisse und Diskussion	90
4.1	Cytotoxizitätsuntersuchungen	90
4.2	Induktion bzw. Inhibition des Cytochrom P450 1A1	96
4.2.1	Induktion in der Real-Time PCR	96
4.2.2	Induktion in der Western Blot Analyse	98
4.2.3	Inhibition des CYP1A1 in der Real-Time PCR	102
4.2.4	Inhibition des CYP1A1 in der Western-Blot-Analyse	103
4.2.5	Reporter-gen-Assay	106
4.3	Untersuchung der 7-Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD)-Aktivität	108
4.4	Untersuchung der Caco-2-Zellen auf die Induktion des ABC-Transporters MRP2	114
4.4.1	Induktion in der Real-Time PCR	114
4.4.2	Induktion in der Western-Blot-Analyse	115
4.5	Gerichteter Transport der Flavonoide im Caco-2-Transportmodell	118
5	Zusammenfassung	122
6	Literaturverzeichnis	126

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1 Strukturformel des Flavangrundkörpers	3
Abbildung 1.2 Strukturformeln der sechs Flavonoidhauptgruppen	4
Abbildung 1.3 Biosynthesewege der Polyphenole in Pflanzen	6
Abbildung 1.4 Strukturformel von Phloridzin und Phloretin	8
Abbildung 1.5 Strukturformel von Quercetin-4'- β -Glukosid	9
Abbildung 1.6 Metabolismus von Flavonoidglykosiden [modifiziert nach Rice-Evans, 2000]	10
Abbildung 1.7 Metabolismus von Polyphenolen [modifiziert nach Scalbert & Williamson, 2000]	11
Abbildung 1.8 antioxidatives Potential von Quercetin	12
Abbildung 1.9 Aufnahme, Biotransformation und MRP-vermittelter Export endogener Substanzen, Wirkstoffe und Karzinogene (modifiziert nach König, 1999)	18
Abbildung 1.10 Strukturformel von 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)	20
Abbildung 1.11 Ah-Rezeptor-Signaltransduktionsweg	21
Abbildung 1.12 Lokalisation MRP-verwandter Proteine in polarisierten Zellen [Conrad, 2002; modifiziert nach Cole und Deeley, 2001]	23
Abbildung 1.13 Membrantopologie von ABC-Transportern in der Plasmamembran (PM) [Gottesmann, 2002]	25
Abbildung 1.14 Längsschnitt durch das Jejunum (Schema) [Faller, 1999] und funktionelle Kompartimentierung der Sekretions- sowie der Digestions- und Resorptionsvorgänge entlang der Krypten-Zottenachse im Dünndarm [Rehner & Daniel, 1999]	30
Abbildung 2.1 Strukturformel von Phloridzin und Phloretin	34
Abbildung 2.2 Strukturformel von Rutin und Quercetin	34
Abbildung 3.1 Caco-2-Zellen	36
Abbildung 3.2 Resazurin und Resorufin	68
Abbildung 3.3 Oxidative Dealkylierung von 7-Ethoxyresorufin zu Resorufin	68
Abbildung 3.4 Reaktion von Fluorescamin mit Proteinen	69
Abbildung 3.5 Schematische Darstellung eines Real-Time PCR-Experimentes [nach Becker- Follmann & Baas, 2004]	77
Abbildung 3.6 Schematische Darstellung des Proteintransfers mit dem ‚semi-dry-Blotting‘	80
Abbildung 3.7 Schematische Darstellung des Proteintransfers mit dem ‚Tank-Blotting‘	81

Abbildung 3.8 Schematische Darstellung des Immunoblots	82
Abbildung 3.9 Plasmid-Karte von pGL3-Enhancer (Promega)	85
Abbildung 3.10 Luciferase-Reaktionen (modifiziert nach Technical Manual: `Dual-Luciferase® Reporter Assay System`; Promega, Mannheim)	87
Abbildung 3.11 Modell des Transportversuches	88
Abbildung 4.1 Vitalität von Caco-2-Zellen nach 1h Inkubation im MTT-Test	90
Abbildung 4.2 Vitalität von Caco-2-Zellen nach 1h Inkubation mit AS02	91
Abbildung 4.3 Vitalität von Caco-2-Zellen nach 48h Inkubation im Alamar-Blue™-Test	92
Abbildung 4.4 Chatecholbildung bei Flavonoiden	93
Abbildung 4.5 Polymerbildung durch Chinone	94
Abbildung 4.6 Vitalität von Caco-2-Zellen nach 48h Inkubation im Alamar-Blue™-Test	95
Abbildung 4.7 Validierung der Primerpaare für die Enzyme CYP1A1 und GAPDH, halblogarithmische Darstellung	96
Abbildung 4.8 relative Expression in der Real Time PCR nach 48 h Inkubation	97
Abbildung 4.9 Strukturverwandtschaft von Dibenzoylmethan und Phloridzin	98
Abbildung 4.10 Western Blot von CYP1A1 aus Caco-2-Zellen nach 48h Inkubation mit AS02 und den Polyphenolen	99
Abbildung 4.11 Western Blot von CYP1A1 aus Caco-2-Zellen nach 48h Inkubation mit AS02 und den Polyphenolen	100
Abbildung 4.12 Western Blot des Ah-Rezeptors aus Caco-2-Zellen nach 48h Inkubation TCDD	101
Abbildung 4.13 relative Expression von CYP1A1 in der Real Time PCR nach 48h Inkubation	102
Abbildung 4.14 Western Blot von CYP1A1 aus Caco-2-Zellen nach 48h Koinkubation mit den Flavonoiden und TCDD [10 ⁻⁹ M]	104
Abbildung 4.15 Hemmung von CYP1A1 in Caco-2-Zellen nach 48h Koinkubation mit TCDD und den Einzelsubstanzen im Western Blot	105
Abbildung 4.16 Reporterassay aus Caco-2-Zellen nach 48h Inkubation TCDD und den Substanzen	107
Abbildung 4.17 EROD-Aktivität in Caco-2-Zellen nach 48h Inkubation mit TCDD in Lebendzellen	108
Abbildung 4.18 EROD-Aktivität in Caco-2-Zellen nach 48h Inkubation mit den Flavonoiden	109
Abbildung 4.19 EROD-Aktivität in Mikrosomen nach Inkubation mit den Flavonoiden und AS02	110
Abbildung 4.20 EROD-Aktivität in Caco-2-Zellen nach 48h Inkubation mit den Flavonoiden und TCDD	111

Abbildung 4.21 EROD-Aktivität in Mikrosomen nach Inkubation mit den Flavonoiden und TCDD	112
Abbildung 4.22 Validierung der Primerpaare für das Enzym MRP2, halblogarithmische Darstellung	114
Abbildung 4.23 Induktion von MRP2 in Caco-2-Zellen nach 48h Inkubation in der RT-PCR	115
Abbildung 4.24 Western Blot von MRP2 aus Caco-2-Zellen nach 48h Inkubation mit AS02 und Quercetin	116
Abbildung 4.25 Western Blot von MRP2 aus Caco-2-Zellen nach 48h Inkubation	116
Abbildung 4.26 Aktivierung des ARE	118
Abbildung 4.27 UV-Spektrum von Phloridzin und dem Phloretin-ähnlichen Stoff 1	120
Abbildung 4.28 möglicher Mechanismus der Aufnahme der Stoffe in die Enterocyten	121

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1 Gehalt an Flavonoiden in ausgewählten Lebensmitteln [Watzl & Rechkemmer, 2001; Aherne & O'Brien, 2002]	5
Tabelle 1.2 Gehalt an Quercetin in ausgewählten Lebensmitteln und Getränken [Watzl & Rechkemmer, 2001; Aherne & O'Brien, 2002]	5
Tabelle 1.3 Gehalt an Polyphenolen in der frischen Apfelfrucht [Risch & Hermann, 1988, Wald & Galensa, 1989]	15
Tabelle 1.4 Zusammensetzung der polyphenolischen Komponenten des AS02	17
Tabelle 1.5 Überblick über die MRP-Transporterfamilie [Borst, 1999; Leslie, 2001]	24
Tabelle 3.1 Auflistung der verwendeten Chemikalien und Reagenzien	39
Tabelle 3.2 Zusammensetzung der polyphenolischen Komponenten von AS02	42
Tabelle 3.3 Auflistung der Proteinmarker im Kaleidoskope Prestained Standard	52
Tabelle 3.4 Gradientenprogramme	56
Tabelle 3.5 Auflistung der verwendeten Geräte und ihre Typenbezeichnung	58
Tabelle 3.6 Zellkulturbedingungen für Caco-2-Zellen	62
Tabelle 3.7 Pipettierschema	65
Tabelle 3.8 Pipettierschema zur Bestimmung der EROD-Aktivität 96-Well	70
Tabelle 3.9 Pipettierschema zur Bestimmung der EROD-Aktivität 48-Well	71
Tabelle 3.10 Bedingungen für die Reverse Transkription	73
Tabelle 3.11 Thermocycler-Programm RT-PCR	73
Tabelle 3.12 PCR-Bedingungen	74
Tabelle 3.13 Thermocycler-Programm	75
Tabelle 4.1 EC50-Werte der Substanzen im MTT-Test	91
Tabelle 4.2 EC50-Werte der Substanzen im Alamar-Blue TM -Test	93
Tabelle 4.3 EC50-Werte in Mikrosomen und Lebendzellen in der EROD-Aktivität	113
Tabelle 4.4 Permeabilitätskoeffizienten für die einzelnen Substanzen	119

Abkürzungsverzeichnis

2-AAF	2-Acetylaminofluoren
Abb.	Abbildung
ABC	ATP binding cassette
Ac	Acetyl
ADP	Adenosintriphosphat
AhR	aryl hydrocarbon-Rezeptor
AhRE	AhR responsive element
ARNT	aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
bp	Basenpaar
BSA	bovine serum albumin
BSEP	bile salt export pump
CBG	cytosolische β -Glukosidase
CHO	Aldehyd
COMT	Catechol-o-methyltransferase
CYP	Cytochrom P450
DDT	Dichlor-diphenyl-trichlorethan
DEN	Diethylnitrosamin
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DRE	dioxin responsive element
DTT	Dithiotreitol
EGTA	Ethylenglycol-bis-(2-aminoethyl-)tetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EROD	7-Ethoxyresorufin-O-deethylase
FC	Fluorescamin
FKS	fetales Kälberserum
g	Gramm oder Erdbeschleunigung
GAPDH	
GF	growth factor
GSH	Glutathian-S-Transferase
GT	Guanidinthiocyanat
GTP	Guanosin-triphosphat
h	Stunden
HRP	horse radish peroxidase
hsp	heat shock protein
IARC	International Agency for Research on Cancer
IL-6	Interleukin-6
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht

KHK	koronare Herz-Kreislaferkrankung
LPH	Lactat Phloridzin Hydrolase
3-MC	3-Methylcolantren
MCS	multiple cloning site
MDR	Multidrug Resistance
min	Minuten
MNNG	<i>N</i> -Methyl- <i>N'</i> -Nitro- <i>N</i> -Nitrosoguanidin
MSD	Membranbindende Domäne
NADP	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotidphosphat
NAT	N-Acetyltransferase
NBD	nukleotidbindende Domäne
NIH	National Institute of Health
NQO	Chinonoxidoreduktase
OA	organische Anionen
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAPP	Permeabilitätskoeffizient
PBS	phosphate buffered saline
PCB	Polychlorierte Biphenyle
PM	Plasmamembran
PMEA	9-(2-Phosphorylmethoxyethyl)adenin
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidendifluorid
ROS	reactive oxygen species
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
SULT	Sulfotransferasen
Tab.	Tabelle
TCDD	2,3,7,8-Tetrachlordibenzo- <i>p</i> -dioxin
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethyldiamin
TEER	elektrische Widerstand
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UDPGT	UDP-Glucuronosyltransferase
UV	ultraviolette Strahlung
V	Volt
W	Watt
WHO	World Health Organisation
XAP2	hepatitis B virus X-associated protein
XRE	xenobiotic responsive element

Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gebührt Herrn Prof. Dr. Dr. Dieter Schrenk für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und des interessanten Themas, seine immerwährende Diskussionsbereitschaft und Motivation.

Herrn Prof. Dr. Thomas Kietzmann möchte ich für die Übernahme des Koreferates danken und Herrn Prof. Dr.-Ing. Stefan Ernst danke ich für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Herrn Dr. Hans-Joachim Schmitz sei für die gute Teamarbeit und die vielen interessanten und thematisch weitgefächerten Diskussionen und für die Durchsicht der Arbeit gedankt.

Bei Melanie Schmidt bedanke ich mich für eine schöne Zeit bei der Arbeit und darüber hinaus, ihre Hilfsbereitschaft und für die sehr schnelle Korrektur der Arbeit und für die immer bereitwillige Betreuung meines Zoos danken.

Den ‚guten Seelen‘ des Labors, Frau Monika Groß und Wilhelmine Daub, danke ich recht herzlich für Ihre stetige Hilfsbereitschaft im Labor und ganz besonders für Ihre Unterstützung bei den letzten Laborversuchen und der guten Versorgung vor allem mit dem „Bitte-Vollmachen-Kuchen“.

Frau Dr. Susanne Kunz, Stefanie Knerr, Silke Germer, Tanja Kautenburger danke ich für eine sehr erheiternde Zeit in Labor und Büro auf Fachtoxkursen und sonstigen lustigen Dingen und vor allem für Ihre Unterstützung bei allen Problemen.

Den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Prof. Anke, vor allem Anja Meffert, danke ich für die Bereitstellung der Geräte zur HPLC-Messung und ihre ständige Diskussionsbereitschaft. Den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe sei für Ihre gute Unterstützung bei technischen Problemen gedankt.

Anita Strohauer gebührt mein Dank für ihre steten Einsatz bei organisatorischen Dingen, sowie für ihre fröhliche Art, die manchen trüben Tag erheiterte.

Meinen Kolleginnen und Kollegen danke ich für eine sehr schöne Zeit im Labor, Büro und darüber hinaus für jeden netten Abend.

Ein großes Dankeschön gilt meiner Familie und vor allem meinem Bruder Walter Pohl, der den PC vor einem Rauswurf aus dem Fenster bewahrt hat und seiner Unterstützung und Diskussionsbereitschaft, sowie seinen hilfreichen Ratschlägen.

Frau Dr. Astrid Volz möchte ich für die Möglichkeit danken, bei Boehringer die Methode des Transportversuches zu erlernen und für die Bereitstellung der Caco2-Zellen.

An dieser Stelle soll auch die schöne Zeit mit den Diplomanden und Forschungspraktikanten nicht vergessen werden. Die Betreuung Eurer Arbeit machte sehr viel Spaß, mich und meine Arbeit hat es sehr bereichert. Ich habe Euch immer sehr gefordert, aber ich hoffe ihr hattet trotzdem viel Spaß

Diese Arbeit wurde finanziert durch das BMBF, Bonn.

Einleitung

Rolle von Nahrungsbestandteilen in der Genese von Darm- erkrankungen

Kolorektalkrebs ist in Europa und in den meisten Ländern mit „westlicher Ernährungsform“ die zweithäufigste Tumorform in Bezug auf Inzidenz und Mortalität. Nach gegenwärtigen Vorstellungen spielen dabei außer exogenen Faktoren wie zum Beispiel heterocyclische aromatische Amine auch endogene Faktoren wie reaktive Sauerstoffspezies oder Lipidperoxidationsprodukte eine Rolle bei der Pathogenese. Vielfach werden Risikofaktoren erst beim Stoffwechsel der Darmflora gebildet. Einige dieser Faktoren können an der Auslösung von Mutationen beteiligt sein und den Prozess der Karzinogenese fördern.

Die Schleimhaut des menschlichen Dünndarms ist für die Resorption von Nahrungsbestandteilen verantwortlich, was bedingt, dass sie nicht nur mit der aufgenommenen Nahrung, sondern auch mit potentiell toxischen Fremdstoffen in Kontakt kommt. Die Mukosa ist in der Lage, sich mit einer Vielzahl von Lebensmittelkontaminanten und oral verabreichten Pharmaka auseinander zu setzen und durch verschiedene Mechanismen Einfluss auf deren Resorption zu nehmen.

Die Dünndarmschleimhaut besitzt eine große Anzahl von fremdstoffmetabolisierenden Enzymen, die in der Lage sind, lipophilen Fremdstoffen funktionelle Gruppen anzufügen oder solche bei diesen freizulegen (Phase I). Weitere Enzyme (Transferasen) können in einer anschließenden Konjugationsreaktion (Phase II) die in Phase I eingeführten funktionellen Gruppen mit polaren, geladenen Molekülbausteinen wie Glucuronsäure oder Glutathion koppeln. Außerdem verfügen die Zellen der Dünndarmmukosa über eine Reihe von Transportproteinen, deren Aufgabe darin besteht, Fremdstoffe wieder zurück ins Darmlumen zu transportieren (Phase III).

Es ist unbestritten, dass eine entsprechend ausgerichtete Ernährung zur Prävention von Darmerkrankungen beitragen kann. So liegen epidemiologische Studien vor, die zur Verhinderung von vielen Krebsarten eine obst- und gemüsereiche Ernährung postulieren. Auch bei chronisch entzündlichen Erkrankungen wie Morbus Crohn und Colitis ulcerosa wird seit langem ein Einfluss der Nahrung diskutiert. [Lopez-Lazaro, 2002]

Zu den schutzgebenden Inhaltsstoffen pflanzlicher Lebensmittel gehören Ballaststoffe, Vitamine und sekundäre Pflanzenstoffe. Pflanzlichen Inhaltsstoffen wie Polyphenolen/Flavonoiden oder schwer abbaubaren Kohlenhydraten wird aufgrund einer Vielzahl von Studien eine Schutzwirkung gegenüber Krebserkrankungen zugesprochen. Zum Teil können solche Stoffe reaktive kanzerogene Zwischenstufen abfangen oder die Expression und Aktivität von protektiven Enzymsystemen fördern oder von giftenden Systemen hemmen. [Marquardt & Schäfer, 2004, Phillips, 2003]

In *in vitro* Studien konnte von Eberhard (2000) gezeigt werden, dass Apfelsaftextrakte das Wachstum von Kolon- und Leberkrebszellen hemmen. Bei einem jährlichen Pro-Kopf-Verbrauch von ca. 12l Apfelsaft nimmt jeder Bundesbürger viele bioaktive Stoffe auf. Die genaue biologische Wirkung der Nahrungskomponenten und der humantherapeutische Nutzen ist aber weitgehend ungeklärt. Deshalb wurden in dieser Arbeit Flavonoide des Apfels auf die Wirkung des Fremdstoffmetabolismus im Kolon untersucht. Das Augenmerk lag hierbei auf dem Flavonol Quercetin und seinem Glykosid Rutin, dem Dihydrochalkon Phloretin und seinem Glykosid Phloridzin und auf Apfelsaftextrakt, der aus Äpfeln verschiedener Sorten aus dem Erntejahr 2002 gewonnen wurde.

Ich gehe im folgenden in der Einleitung auf die Polyphenole, ihre Struktur und physiologische Bedeutung, auf Metabolismus und Bioverfügbarkeit und die Wirkungen auf den menschlichen Körper ein. Im weiteren werde ich den Fremdstoffmetabolismus und die untersuchten Enzyme beschreiben, bevor ich auf verwendete Methoden eingehe und abschließend die Ergebnisse vorstelle.

Die vorliegende Arbeit entstand im Rahmen der Untersuchungen krebspräventativer Wirkungen von Substanzen aus Apfelsaft auf den Darm des vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) geförderten Netzwerkes „Rolle von Nahrungsbestandteilen in der Genese von Darmerkrankungen und Möglichkeiten ihrer Prävention durch die Ernährung“.

Polyphenole

Struktur und physiologische Bedeutung

Flavonoide sind sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe, oder auch Polyphenole genannt. Man findet sie hauptsächlich in Blättern, Blüten und äußeren Pflanzenteilen wie Haut und Schale von Obst und Gemüse. Sie werden von den Pflanzen synthetisiert und spielen eine wichtige Rolle im Aufbau der Zellwände und schützen die Pflanze vor schädlichen Einflüssen wie UV-Licht und Krankheitserregern und sind an der Reparatur von Zellschäden beteiligt. [Williamson et al., 2000]

Strukturell leiten sich die Flavonoide vom Flavangrundkörper (2-Phenylbenzodihydropyran) (Abb.1.1) ab. Dieser besteht aus zwei aromatischen (A und B) und einem O-heterozyklischen Ring (C), wobei ihre große Variabilität hauptsächlich auf ihrem unterschiedlichen Hydroxylierungs- und /oder Methylierungsmuster der drei Ringe, sowie auf der Art, Anzahl und Anordnung nicht acylierter und acylierter Zuckerreste beruht. [Harborne, 2000]

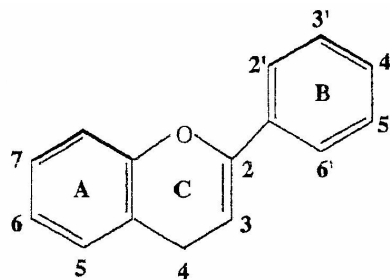


Abbildung 0.1 Strukturformel des Flavangrundkörpers

Flavonoide können aufgrund ihrer verschiedenen Oxidationsstufen am heterocyclischen Ring in 6 Hauptgruppen eingeteilt werden: Flavanone (z.B. Naringenin, Hesperidin), Flavone (z.B. Apigenin, Luteolin), Flavonole (z.B. Quercetin, Kämpferol), Flavanole (Catechin, Epicatechingallate), Anthocyanidine (z.B. Malvidin, Cyanidin) und Isoflavonone (z.B. Genistein, Daizein) (Abb. 1.2). Außerdem kann man noch Aurone, Chalkone, Desoxyanthocyanidine und Leukoanthocyanidine unterscheiden. [Watzl, 2001] Weit verbreitet sind auch die aus zwei Flavonoideinheiten

aufgebauten Bioflavonoide wie die Proanthocyanidine und Amentoflavonoide [Fugmann, 1997].

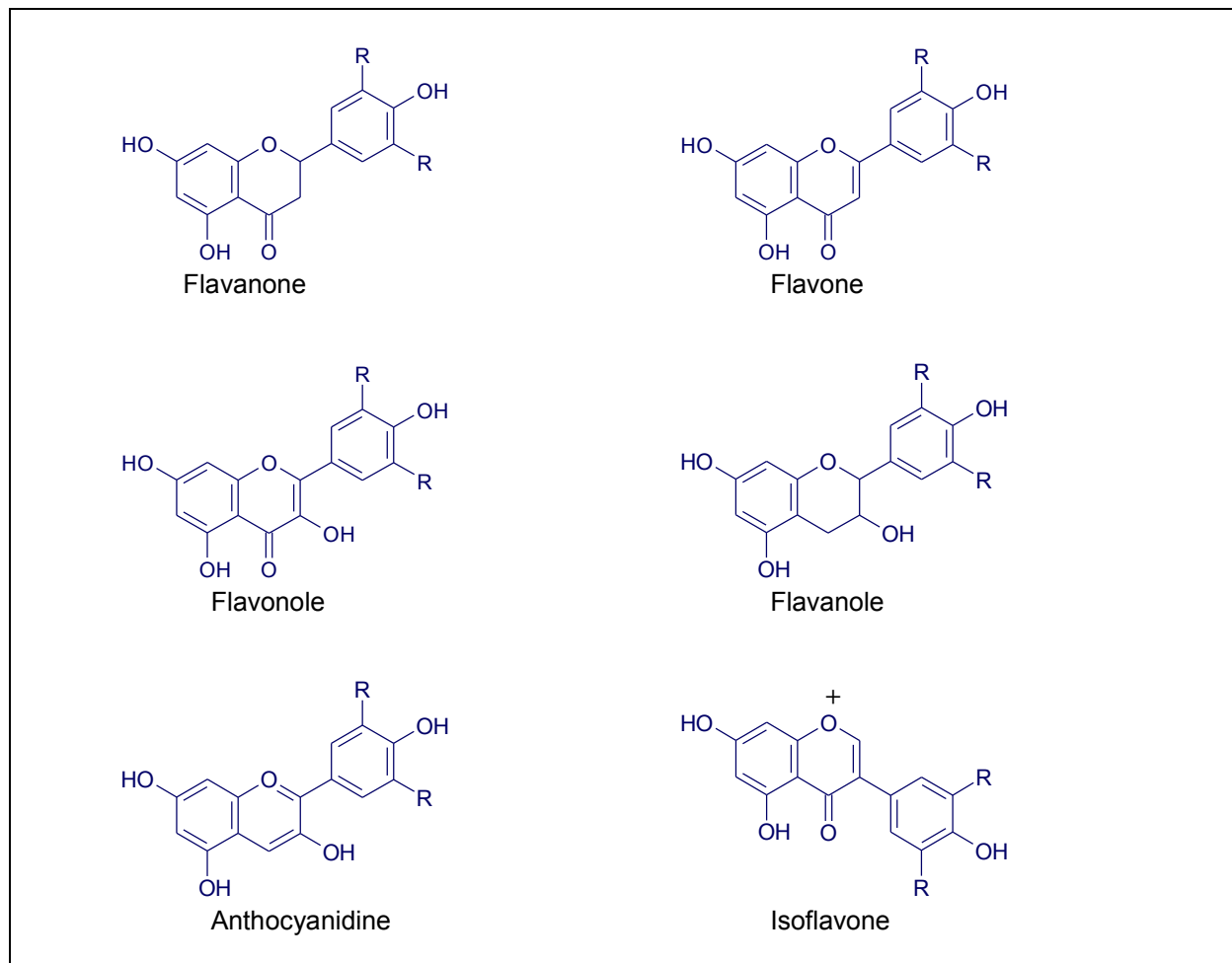


Abbildung 0.2 Strukturformeln der sechs Flavonoidhauptgruppen

Flavonoide kommen in der Natur nicht frei als Aglykone vor, sondern sind mit Ausnahme der Flavanole meist O- β -glykosidisch gebunden. Die bevorzugte Anlagerung der Saccharide ist meist die C-3-Position, in selteneren Fällen ist auch die C-7-Position besetzt. Das am häufigsten gebundene Monosaccharid ist D-Glukose. Daneben wurden aber auch andere Zucker wie Arabinose, Galactose oder L-Rhamnose gefunden. Die Glykosidierung erhöht die Polarität und damit die Löslichkeit der Flavonoidmoleküle, wodurch die Speicherung in den Pflanzenzellvakuolen möglich wird. [Watzl & Rechkemmer, 2001; Aherne & O'Brien, 2002]

Flavonoide sind Inhaltsstoffe vieler pflanzlicher Nahrungsmittel. Sie kommen in Gemüse, Obst und daraus hergestellten Getränken wie Tee, Kaffee, Wein und Fruchtsäften vor [Scalbert, 2002]. Tabelle 1.1 gibt eine Übersicht über die Flavonoide und ihr Vorkommen in den verschiedenen Lebensmitteln.

<i>Flavonoidklasse</i>	<i>Beispiele</i>	<i>Vorkommen</i>
Flavonole	Quercetin, Kämpferol	Zwiebeln, Äpfel, Tee, Kirschen
Flavanole	Catechin, Epicatechingallate	Äpfel, grüner Tee, Rotwein
Flavanone	Naringenin, Hesperidin	Grapefruit, Orange
Flavone	Luteolin, Apigenin	Thymian, Petersilie
Anthocyanidine	Malvidin, Cyanidin	Blaue Trauben, Kirschen
Isoflavone	Genistein, Daidzein	Sojabohnen

Tabelle 0.1 Gehalt an Flavonoiden in ausgewählten Lebensmitteln [Watzl & Rechkemmer, 2001; Aherne & O'Brien, 2002]

Die tägliche Aufnahmemenge von Flavonoiden schwankt sehr stark, da sie von vielen Faktoren wie z.B. den Ernährungsgewohnheiten, dem unterschiedlichen Gehalt in verschiedenen Pflanzensorten, dem Vegetationsklima und der Jahreszeit sowie dem Grad der Reife und dem Verlust bei der Zubereitung abhängt. Nach diversen Studien wird heute die durchschnittliche Aufnahmemenge auf 10-100 mg eingestuft. [Watzl & Rechkemmer, 2001; Aherne & O'Brien, 2002]

Einzelne Gehalte häufig auftretender Flavonoide wie das Quercetin sind in Tabelle 1.2 dargestellt.

<i>Lebensmittel</i>	<i>Äpfel</i>	<i>Apfelsaft</i>	<i>Zwiebeln</i>	<i>Tomaten</i>	<i>Trauben, blau</i>	<i>Rotwein</i>
Quercetin	2-26	0,25	34	0,2-1,4	1,5-3,7	0-1,6

Tabelle 0.2 Gehalt an Quercetin in ausgewählten Lebensmitteln und Getränken (mg/100g bzw. mg/100ml) [Watzl & Rechkemmer, 2001; Aherne & O'Brien, 2002]

Biosynthese der Polyphenole

Alle an der Biosynthese der Polyphenole mitwirkenden Stoffe entstammen dem Kohlehydratstoffwechsel. Die Biosynthese der aromatischen Verbindungen in der Pflanze setzen sich aus drei aufeinanderfolgenden Segmenten wie folgt zusammen: Das *Shikimisäuresegment*, das die Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan produziert, das *Phenylpropanoidsegment*, das die Hydroxyzimtsäure produziert, sowie das *Flavonoidsegment*, das diverse Flavonoide produziert.

Die Biosynthese ist in Abbildung 1.3 schematisch dargestellt.

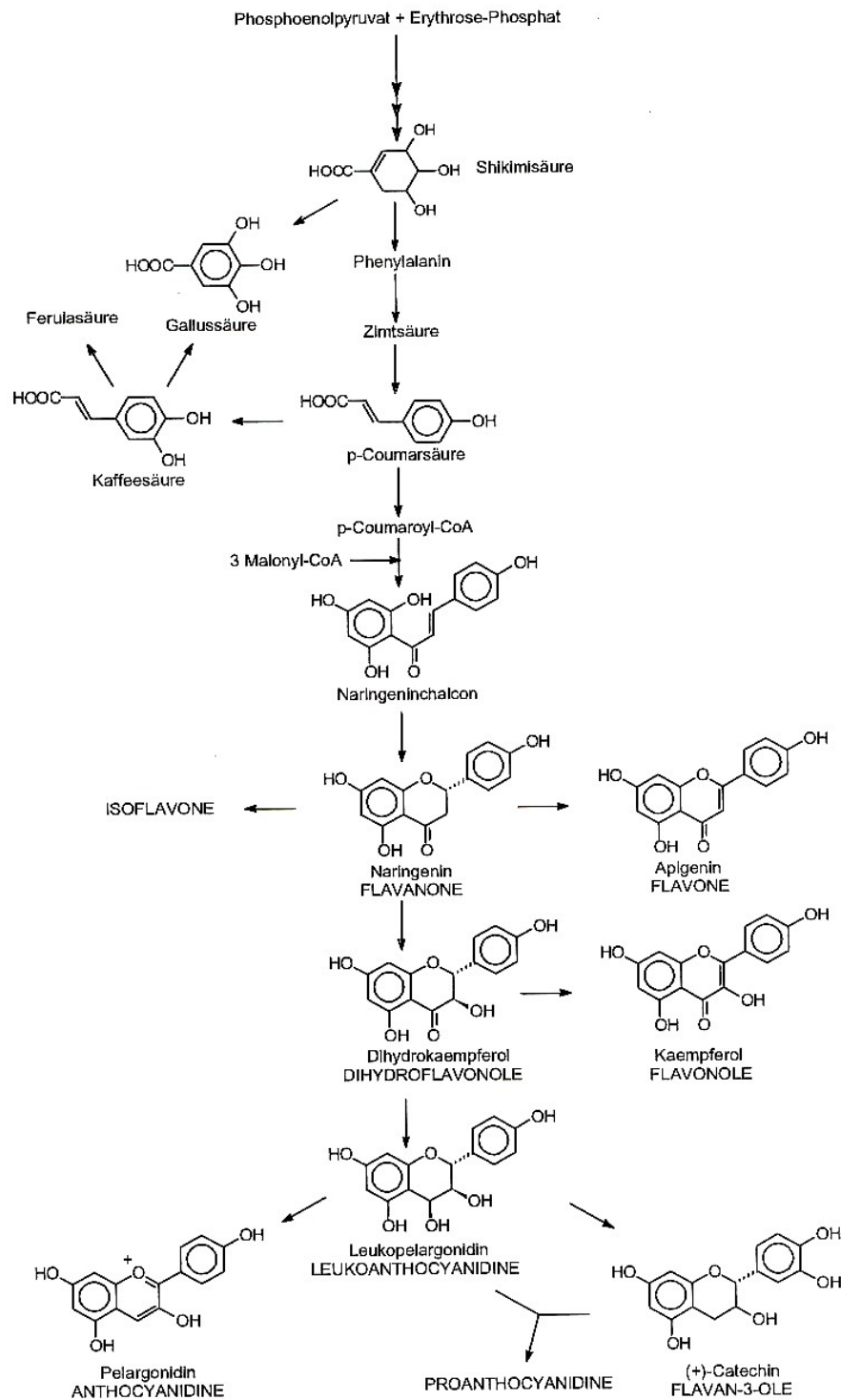


Abbildung 0.3 Biosynthesewege der Polyphenole in Pflanzen

Die Shikimisäure entsteht aus verschiedenen dem Kohlenhydratstoffwechsel entstammenden Vorstufen. Im Shikimisäuresegment führt der Syntheseweg über Phenylalanin, aus dem durch Katalyse Zimtsäure entsteht. Aus der Zimtsäure wird

nach enzymatischer Hydroxylierung die p-Coumarsäure gebildet. Diese kann durch fortschreitende Methylierung in Kaffeesäure, aus der weiter Lignin, ein wichtiger Bestandteil von Holz, synthetisiert werden kann, und Ferulasäure umgewandelt werden. Die p-Coumarsäure kann mit Hilfe von Malonyl-CoA zum Naringenin-chalcon weiterreagieren. Dies stellt nun das C₆-C₃-C₆-Grundgerüst dar, von dem sich die Flavonoide ableiten. Nach Ringschluss durch die Chalcon-Isomerase entsteht das Naringenin, von dem sich die Flavone, Isoflavone und Dihydrokaempferol ableiten. Das Dihydrokaempferol kann durch Katalyse der Flavonol-Synthase, die eine Doppelbindung zwischen C2- und C3-Atom ausbildet, in ein Flavonol, das Kaempferol umgewandelt werden. Ein weiterer Weg des Dihydrokaempferol führt durch katalytische Reduktion der Dihydroflavonol-Reduktase zu einem Flavan-3,4-diol, die als kurzlebige Vorstufen der Anthocyane und Flavan-3-ole, sowie deren Kondensationsprodukten, den Proanthocyanidinen angesehen werden. Die Synthese der Flavan-3-ole und der Proanthocyanidine ist bisher im Detail noch nicht geklärt, ein Zusammenspiel verschiedener Enzyme wird diskutiert. [Forkmann, 1993]

Die Einführung der Hydroxylgruppen am B-Ring der Flavonoide wird durch Hydroxylasen katalysiert, wobei der Zeitpunkt, wann das geschieht, noch nicht geklärt ist. Die Bildung von Glykosiden erfolgt in der Pflanze meist erst sekundär. [Gross, 1992]

Resorption und Metabolismus

Flavonoidaglyka sind hydrophob und können daher durch passive Diffusion über die Zellmembran transportiert werden, während durch erhöhte Hydrophilie der Flavonoidglykoside die Möglichkeit des passiven Transports reduziert wird. [Aherne & O'Brien, 2002] Es konnte gezeigt werden, dass die Aglyka der Flavonole und Flavone im Dünndarm durch passive Diffusion absorbiert werden. [Watzl & Rechkemmer, 2001]

Als ersten Schritt des intestinalen Flavonoidmetabolismus wird die Deglykosylierung der Flavonoidglykoside der Nahrung angenommen, was für den weiteren Metabolismus essentiell ist. Deglykosidierung kann entweder außerhalb der Zelle im Darmlumen stattfinden oder nach dem Transport innerhalb der Enterocyten [Williamson, 2000]. Cytosolische- β -Glukosidase (CBG) in Dünndarm und Leber kann

verschiedene phenolische Glukoside hydrolysieren. Dieses Enzym hat eine hohe Affinität zu Quercetin-4'-Glukosid und Genistein-7-Glukosid. Eine weitere β -Glukosidase im Dünndarm ist die **Laktase Phloridzin Hydrolase (LPH)**, die Aktivität gegenüber Flavonoidglukosiden zeigt. Sie kann Phloridzin in das zugehörige Aglycon Phloretin hydrolysieren. Durch die Ähnlichkeit von Phloridzin zu anderen Flavonoidglykosiden ist es möglich, dass die LPH auch Flavonol-Glykoside hydrolysiert und damit auf der apikalen Seite der Zotten agiert und die Aglykone in das Lumen transportiert. Dadurch könnte der passive Transport in den Enterocyten erhöht werden. [Aherne & O'Brien, 2002] Das Disaccharid Rutin zeigt keine Affinität zur LPH.

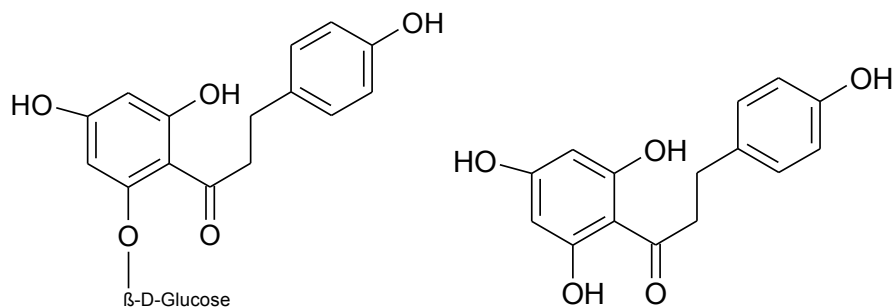


Abbildung 0.4 Strukturformel von Phloridzin und Phloretin

Daneben werden auch durch die Mikroflora des Darms Zuckerreste hydrolysiert. Darmbakterien besitzen verschiedene Enzyme wie Glykosidasen, Glukuronidasen und Sulfatasen, die zur Bildung der Aglyka führen.

Die Flavonoide, die nicht im Dünndarm resorbiert werden, werden durch die Mikroorganismen im Kolon zu Aglyka und phenolischen Säuren metabolisiert. Diese werden dann im Ileum und Caecum des Kolon resorbiert. [Williamson, 2002]

Desweiteren bauen die Mikroorganismen die Flavonoide durch Spaltung des heterocyclischen C-Rings, der zu phenolischen Säuren oder deren Lactone führt, ab. Die Ringspaltung basiert dabei auf dem Hydroxylierungsgrad des Flavonoids. Sind im aromatischen B-Ring keine Hydroxylgruppen vorhanden oder sind freie Hydroxylgruppen an den Positionen 5 und 7 in Gegenwart von O-Methylgruppen vorhanden, wird die Ringspaltung vermieden. Bei Flavonoiden mit einer Hydroxylgruppe in der C-4'-Position wird die Ringspaltung allerdings beschleunigt. [Rice-Evans, 2000]

Die entstehenden phenolischen Säuren werden weiteren Reaktionen wie β -Oxidation, Demethylierung oder Dehydroxylierung unterworfen, bevor sie resorbiert und mit dem Urin ausgeschieden werden. [Hollmann, 1997]

Flavonoidglykoside können aber auch aktiv über den Na^+ -abhängigen D-Glukose-Cotransporter SGLT1 transportiert werden und gehen als solche in die Blutbahn über. [Sesink et al., 2001] Studien an Ileostomie-Patienten, die oral Quercetinglykoside über Zwiebeln zuführten, deuten darauf hin, dass bestimmte Flavonolglykoside über den aktiven Transport des SGLT1 im Dünndarm absorbiert werden. [Hollman et al., 1995; Watzl & Rechkemmer, 2001]

Auch an Studien mit Caco-2-Zellen konnte nachgewiesen werden, dass das Quercetin-4'- β -Glukosid (Abbildung 1.5) ein Substrat für SGLT1 ist. Die Absorption der Flavonoidglukoside durch die apikale Membran scheint durch ein Gleichgewicht zwischen der Aufnahme durch SGLT1 und dem Efflux durch MRP2 geregelt zu sein. [Walgren et al., 2000]

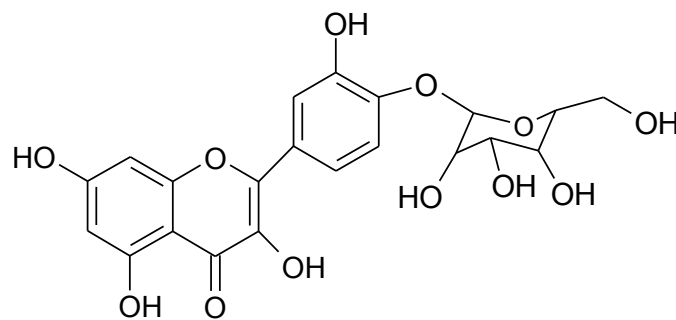


Abbildung 0.5 Strukturformel von Quercetin-4'- β -Glukosid

Nach der Resorption werden die Flavonoide an Albumin gebunden und über die Pfortader in die Leber transportiert. Die Leber ist das Hauptorgan, in dem der Metabolismus stattfindet, allerdings spielen auch die Nieren und die Darmmukosa eine Rolle beim weiteren Metabolismus.

In Abbildung 1.6 sind die möglichen Wege aufgenommener Polyphenole im Körper vereinfacht dargestellt.

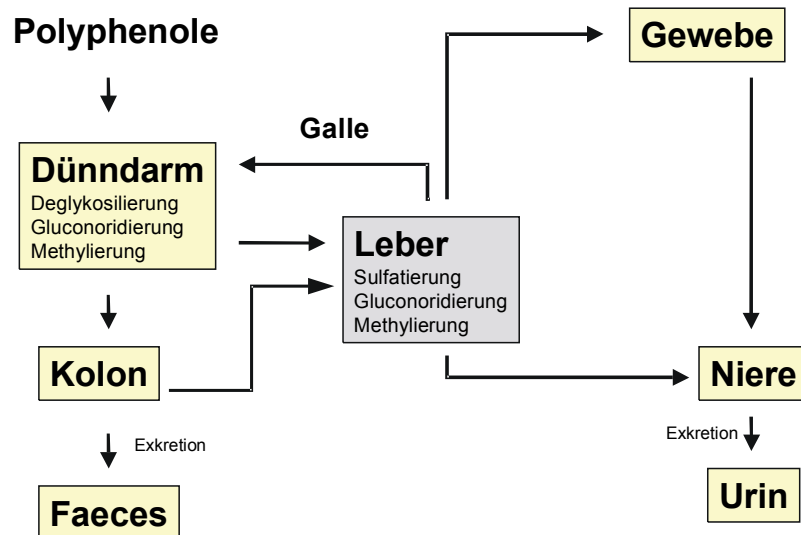


Abbildung 0.6 Metabolismus von Flavonoidglykosiden [modifiziert nach Rice-Evans, 2000]

Die maximale Flavonoidkonzentration im Plasma nach dem Verzehr von Lebensmitteln liegt bei 1-2 μM . In der Leber unterliegen sie dann Phase I und II Reaktionen wie Hydroxylierung, Demethylierung und Konjugationen wodurch die Hydrophilie erhöht und somit die Elimination über den Urin erleichtert wird. [Aherne & O'Brien, 2002, Watzl & Rechkemmer 2001, Williamson 2000]

Die im Plasma an Albumine gebundenen Polyphenole durchlaufen über die Galle den enterohepatischen Kreislauf, wo sie im Dickdarm erneut bakteriellen Enzymen ausgesetzt sind und reabsorbiert werden. Dies führt zu einer verlängerten Anwesenheit der Polyphenole im Körper. [Manach, 2004]

In Abbildung 1.7 ist der Metabolismus, den der Flavonoide durchlaufen, in einem vereinfachten Modell dargestellt.

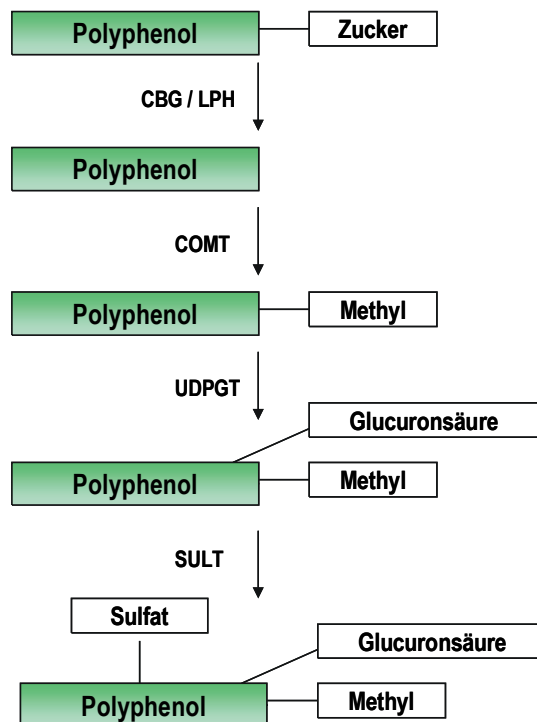


Abbildung 0.7 Metabolismus von Polyphenolen [modifiziert nach Scalbert & Williamson, 2000].
 CBG:cytosolische- β -Glucosidase; LPH: Lactase-Phloridzin-Hydrolase; COMT: Catechol-o-methyltransferase; UDPGT: UDP-Glucuronosyltransferase; SULT: Sulfotransferasen

Antioxidative Eigenschaften, Tumor-protective und immunmodulatorische Wirkung

Flavonoide wirken sowohl in lipophilen als auch in hydrophilen Systemen als Antioxidantien. Flavonole, eine Gruppe der Flavonoide, zu denen das Quercetin gehört, besitzen ein höheres Redoxpotential als Ascorbat und können daher auch Ascorbylradikale oxidieren. Für die antioxidative Wirkung sind *ortho*-ständige Hydroxylgruppen am B-Ring sowie die Doppelbindung in 2,3-Position und eine 3-Hydroxylgruppe verantwortlich, durch die Flavonoide durch die Abgabe der Wasserstoffionen reaktive Sauerstoffspezies abfangen können (siehe Abbildung 1.8).

[Rice-Evans, 1996] [Lotito, 2004]

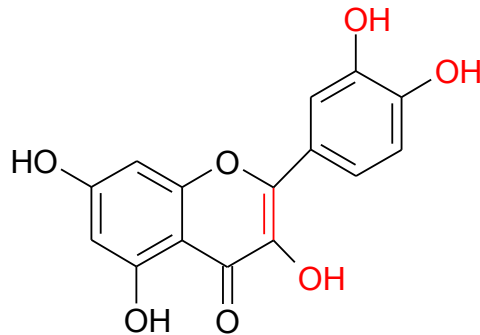


Abbildung 0.8 antioxidatives Potential von Quercetin

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) entstehen im Organismus hauptsächlich bei der in den Mitochondrien ablaufenden Atmungskette. Hierbei wird der Organismus mit einer schädlichen Form des Sauerstoffs, dem Superoxidanionradikal, konfrontiert. Als Folge chemischer Umsetzungen im Organismus entstehen aus dem Superoxid weitere ROS beispielsweise Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und das Hydroxylradikal ($\cdot OH$). Durch das Abfangen der Radikale durch Flavonoide entstehen Phenoxyintermediate, die relativ stabil sind und mit weiteren freien Radikalen reagieren können [Rice-Evans, 1996]. Eine weitere wichtige Eigenschaft des antioxidativen Potentials von Flavonoiden besteht in der Fähigkeit, Metalle wie Eisen- und Kupferionen, die die Autoxidation ungesättigter Lipide durch Fenton- und Haber-Weiss-Reaktionen beschleunigen können, zu chelatisieren [Thompson, 1976].

Quercetin und andere Flavonoide können mit intrazellulären Antioxidantien wie z.B. Gluthationperoxidase interagieren und möglicherweise deren antioxidative Fähigkeit erhöhen. Auch die Fähigkeit einiger Flavonoide zur Enzyminduktion spielt in antioxidativen Prozessen eine Rolle [Kuo, 1999].

Epidemiologische Studien weisen auf eine negative Korrelation zwischen der Flavonidaufnahme und dem Risiko für verschiedenste Krankheiten hin. So liegt die Mortalitätsrate an koronaren Herz-/Kreislauferkrankungen (KHK) in Frankreich niedriger als beispielsweise in Großbritannien, den USA oder Deutschland, obwohl die Aufnahme an gesättigten Fettsäuren sowie die Serumcholesterinwerte in allen Ländern vergleichbar sind. Der Schutz vor KHK wird auf den höheren Obst- und Gemüseverzehr sowie den Rotweinkonsum in Frankreich, das heißt die höhere Aufnahme an Polyphenolen zurückgeführt (French Paradoxon). [Renaud, 1992] Als Grund für diese negative Korrelation wird auch die antioxidativen Eigenschaften von Polyphenolen angeführt. Durch ihre Fähigkeit ROS abfangen zu können und die

Lipoproteine (besonders LDL) vor Oxidation zu schützen, kann es zu einem verminderten Risiko von KHK kommen. [Watzl & Rechkemmer 2001]

Aufgrund ihrer Redoxaktivität können Flavonoide auch DNA-Schäden verhindern. In vitro konnten in verschiedenen Zellen, in denen durch H₂O₂-Behandlung DNA-Schäden induziert wurden, durch zusätzliche Zugabe von Flavonoiden signifikante protektive Effekte festgestellt werden. [Johnson, 2000]

In Tierexperimenten wurde eine antikanzerogene Wirkung von Flavonoiden gegenüber Brust-, Dickdarm-, Magen-, sowie Lungenkrebs festgestellt. [Boyer, 2004] Da der Krebsentstehung multifaktorielle Prozesse zu Grunde liegen, werden verschiedene Mechanismen diskutiert, wie Flavonoide protektiv eingreifen können, wie z. B. die Modulation von Cytochrom-P450 abhängigen Monooxygenasen (z.B. Quercetin als Ah-Rezeptor Antagonist), die Induktion von Phase II Enzymen oder auch die Induktion von Apoptose. [Stibirova, 2000] [Marian, 1999]

Einige Flavonoide besitzen die Fähigkeit am Östrogenrezeptor zu binden und damit dessen Aktivität zu modulieren. Flavonoide mit antiöstrogenem Effekt gelten auch als potentielle Krebstherapeutika gegenüber Brust- und Prostatakrebsformen. [Stibirova, 2002] Beobachtungen in vitro und in vivo deuten auf eine entzündungshemmende Wirkung von Flavonoiden hin. In vitro blockieren verschiedene Flavonoide die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine, wie Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF α) und Interleukin-6 (IL-6). [Pagonis, 1986]

Flavonide zeigen auch eine antivirale Wirkung. In vitro zeigt Quercetin Wirksamkeit gegen Herpes simplex Typ1- und Tollwut-Viren. Dieser Effekt beruht möglicherweise darauf, dass Quercetin virale Proteine bindet oder die Nukleinsäuresynthese beeinflusst. Für Methylquercetin wurde eine Blockade der Replikation des Poliovirus auf RNA-Ebene nachgewiesen. [Formica, 1995]

Toxizität

Es gibt keine Hinweise auf toxische Effekte durch Flavonoide beim Menschen. Obwohl für einige Flavonoide, insbesondere Quercetin, mutagene Wirkungen im Ames-Test belegt sind, sprechen Tierversuche nicht für eine kanzerogene Wirkung. [Middleton, 1994]

Aufgrund der geringen Resorptionsrate der Flavonoide können jedoch keine hohen Plasmakonzentrationen erreicht werden, so dass Flavonoide, die in vitro mutagen und zytotoxisch wirken, über die Nahrung in so hohen Konzentrationen nicht erreicht werden können. Gefahr kann eventuell durch Nahrungsergänzungsmittel ausgehen, in denen hohe Tagesdosen empfohlen werden. Hohe Flavonoidkonzentrationen in Flavonidsupplementen während der Schwangerschaft stehen im Verdacht, das Leukämie-Risiko bei Kleinkindern zu erhöhen (Mechanismus wahrscheinlich über Gene, die an der Lymphozytendifferenzierung beteiligt sind). [Linseisen, 1997] Klinisch bedeutsam sind Flavonoidinteraktionen mit dem für den Metabolismus von Medikamenten wichtigen Enzym CYP3A4. Naringenin, das beispielsweise in Grapefruitsaft enthalten ist, kann durch die Hemmung des Enzyms den Abbau von Medikamenten verzögern. [Hodek, 2002]

Polyphenole in Apfel und Apfelsaft

In der frischen Frucht beträgt der Anteil an Polyphenolen etwa 0,01-1% des Frischgewichtes, wobei Mostäpfel einen bis zu zehnmal höheren Gesamtpolyphenolgehalt aufweisen als Tafeläpfel. [Herrmann, 1973]

Von den verschiedenen Klassen an pflanzlichen Polyphenolen finden sich im Apfel die Hydroxycimtsäurederivate, Flavonole, Dihydrochalkone, monomere Flavan-3-ole, Procyanidine und Anthocyane. In Tabelle 1.3 sind die bisher für Äpfel bekannten Polyphenole und ihre bisher beschriebenen Gehalte in der frischen Frucht aufgeführt.

Nachgewiesene Polyphenole	Gehalte in mg/kg Frischgewicht
Hydroxyzimtsäurederivate	
Chlorogensäure (5-Caffeoyl-L(-)-chinasäure)	62-385
Kryptochlorogensäure (4-Caffeoyl-L(-)-chinasäure)	0-12
4-Coumaroyl-L(-)-chinasäure	Spuren-32
5-Coumaroyl-L(-)-chinasäure	Spuren-9
Caffeoylglucose	0-6
Coumaroylglucose	1-19
Feruloylglucose	0-9
Flavonole	
Quercetin-3-galaktosid (Hyperosid)	5-39
Quercetin-3-glucosid (Isoquercitrin)	3-16
Quercetin-3-rutinosid (Rutin)	1-10
Quercetin-3-arabinosid (Avicularin)	8-25
Quercetin-3-rhamnosid (Quercitrin)	3-19
Quercetin-3-xylosid	4-10
Dihydrochalkone	
Phloridzin (Phloretin-2'-glucosid)	10-158
Phloretin-2'-xylosylglucosid	11-230
Flavan-3-ole	
(+)-Catechine	Spuren-27
(-)-Epicatechin	2-129
Procyanidine	
B1	0,07-0,42 mg/Apfel
B2	0,67-2,50 mg/Apfel
B5	0,06-0,22 mg/Apfel
C1	0,33-1,29 mg/Apfel
Diverse Polymere	nicht bestimmt
Σ Procyanidine	1420-3240
Anthocyane	
Cyanidin-3-galaktosid	0,1-8 mg/g Apfelschale
Cyanidin-3-xylosid	nicht bestimmt
Cyanidin-3-arabinosid	nicht bestimmt
Cyanidin-3-glucosid	nicht bestimmt
acylierte Cyanidin-3-glykoside	nicht bestimmt
Σ Cyanidin-3-glykoside	1 mg/g Apfelschale

Tabelle 0.3 Gehalt an Polyphenolen in der frischen Apfelfrucht [Risch & Hermann, 1988, Wald & Galensa, 1989]

Die Hydroxyzimtsäurederivate findet man hauptsächlich im Fruchtfleisch, die Flavonole und Anthocyane in der Schale, die Hydrochalkone in den Kernen und monomere Flavan-3-ole und die Procyanidine in Fruchtfleisch und Schale. Dabei sind die Konzentrationen an Polyphenolen in Schalen und Kernen erheblich höher als im Fruchtfleisch.

Das Polyphenolmuster und die Polyphenolgehalte von Apfelsaft unterscheiden sich von denen des Apfels. Schlecht wasserlösliche Polyphenole, wie Quercetin-3-glykoside, Phloridzin und höher polymere Procyanidine gehen unvollständig in den Saft über und verbleiben im Trester. In Abhängigkeit von Rohware und Herstellungsverfahren kann Apfelsaft verschiedene Mengen an Polyphenolen enthalten. Schols et. al (1991) fanden bei der Entsaftung von unbehandelter Maische, kalt enzymierter Maische (20°C, 1h) und warm enzymierter Maische (45°C, 4h) erhebliche Unterschiede in der Ausbeute an Polyphenolen im Saft. Die höchste Ausbeute wies der Saft der warm enzymierten Maische, die geringste Ausbeute der Saft der kalt enzymierten Maische auf, während der Saft der unbehandelten Maische etwa in der Mitte lag. Im Polyphenolmuster zeigten sich deutliche Unterschiede beim Saft aus warm enzymierter Maische, wobei insbesondere die Gehalte an Phloridzin, Epicatechin und Catechin, das in den anderen beiden Säften nicht nachweisbar war, stark erhöht waren. Allerdings war auch eine steigende Bitterkeit und Adstringenz in der Sensorik des Saftes warm enzymierter Maische vorhanden.

Eine Diffusionsextraktion von Apfelsaft unter Zusatz von warmem Wasser erhöht den Gehalt an Quercetin-3-glykosiden und den des Phloridzins, da diese in kaltem Wasser schlecht wasserlöslich sind. Eine direkte Pasteurisation des frischen Presssaftes unterbindet zwar eine weitere enzymatische Oxidation der Polyphenole im Saft durch Inaktivierung fruchteigener Enzyme, kann aber auch wegen des längeren Herstellungsprozesses zum Verlust von Polyphenolen führen. [Spanos, 1990] Die Zusammensetzung des in der Arbeit verwendeten Apfelsaftextraktes zeigt Tabelle 1.4.

Substanz	Mittelwert [mg/g]
Procyanidin B1	2,9
Chlorogensäure	171,8
3-Coumaroyl-Chinasäure	16,0
5-Coumaroyl-Chinasäure	7,0
Procyanidin B2	16,0
Kaffeesäure	102,7
Epicatechin	11,8
4- Coumaroyl-Chinasäure	72,4
Phloretin-2'-xyloglucosid 01	16,6
Phloretin-2'-xyloglucosid 02	9,4
Phloretin-2'-xyloglucosid	42,7
Phloridzin	34,7
Quercetin-3-rutinosid	1,8
Quercetin-3-galactosid	0,9
Quercetin-3-glucosid	1,4
Quercetin-3-rhamnosid	3,2

Tabelle 0.4 Zusammensetzung der polyphenolischen Komponenten des AS02

Fremdstoffmetabolismus

Der Organismus nimmt über die Nahrung viele Fremdstoffe auf, kommt also auch mit potentiell toxischen Fremdstoffen in Kontakt. Der Organismus ist in der Lage, sich mit einer Vielzahl von Lebensmittelkontaminanten und oral verabreichten Pharmaka auseinander zu setzen und durch verschiedene Mechanismen Einfluss auf deren Resorption und Metabolismus zu nehmen. Diese Reaktionen sind in drei Phasen gegliedert.

Ein Hauptorgan der Biotransformation ist die Leber. Hier werden bei der Metabolisierung von Xenobiotika die Moleküle funktioneller Gruppen, insbesondere Hydroxylgruppen, (Phase I) eingeführt. Dies geschieht durch Cytochrom P450-

Enzyme oder Epoxidhydrolasen, was bei den Stoffen meist eine Erhöhung der Polarität und eine Verringerung der biologischen Aktivität oder Toxizität zur Folge hat. In manchen Fällen, beispielweise bei der Bildung von Epoxiden, werden die Fremdstoffe erst durch die Metabolisierung biologisch aktiv.

Diese sogenannten Primärmetabolite werden häufig durch Konjugationreaktionen (Phase II) in Sekundärmetabolite umgewandelt, wodurch ihre Löslichkeit im Wasser und damit ihre Ausscheidbarkeit erhöht wird. Bedeutende Enzymfamilien sind die **Gluthation-S-Transferasen** (GSH), die **UDP-Glucuronosyltransferasen** (UDPGT), die **Sulfotransferasen** (SULT) und die **N-Acetyltransferasen** (NAT).

Unter der Phase III versteht man den Transport der Metabolite aus der Zelle heraus, was durch die ABC-Exportpumpen wie dem P-Glykoprotein oder MRP1, 2 und 3 geschieht.

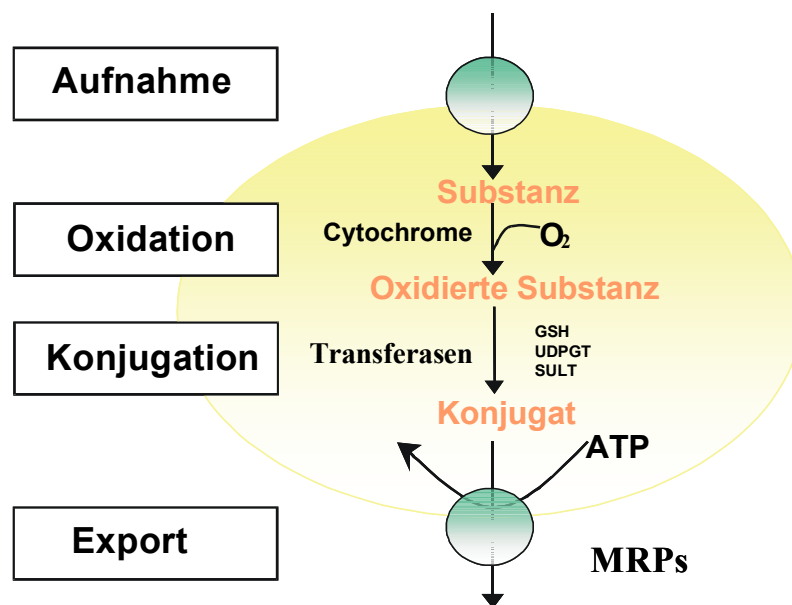


Abbildung 0.9 Aufnahme, Biotransformation und MRP-vermittelter Export endogener Substanzen, Wirkstoffe und Karzinogene (modifiziert nach König, 1999)

Das Cytochrom P450-System

Das Cytochrom P450-System katalysiert die Hydroxylierung von zelleigenen Verbindungen in verschiedenen Biosynthesewegen. Cytochrome P450 findet man nicht nur im Endoplasmatischen Retikulum, sondern auch in Mitochondrienmembranen und in der Plasmamembran von Prokaryonten. Das Cytochrom P450-System, das hauptsächlich im endoplasmatischen Retikulum der Leber und des Dünndarms lokalisiert sind, besitzt auch eine Bedeutung für die Entgiftung fremder Substanzen (xenobiotischer Verbindungen) durch den oxidativen Stoffwechsel. Zum Beispiel erhöht die Hydroxylierung von Phenobarbital dessen Löslichkeit und erleichtert seine Ausscheidung. Ebenso werden polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe vom P450-System hydroxyliert.

Der Name leitet sich davon ab, dass das Cytochrom im reduzierten Zustand und nach Begasung mit CO ein Differenzspektrum mit einem Absorptionsmaximum bei 450 nm zeigt. [Marquart & Schäfer 2004]

Zu den katalytischen Umsetzungen gehören Hydroxylierungen, Epoxidierungen, Desaminierungen, Dehalogenierungen u.a. auch Reduktionen sind bekannt. Zur Reduktion werden $\text{NADPH} \cdot \text{H}^+$ und O_2 benötigt, wobei ein Sauerstoffatom auf das Substrat übertragen, das andere zu Wasser reduziert wird (Monooxygenase-Reaktion). In manchen Fällen führt der oxidative Angriff zur Entstehung sehr reaktiver elektrophiler Verbindungen, die mit DNA interagieren können und als Karzinogene wirken. [Eisenbrand & Metzler, 2002]

Das Cytochrom P450-System zeichnet sich durch eine außerordentlich breite Substratspezifität aus. Nicht nur ein bestimmtes Cytochrom kann an der Metabolisierung zahlreicher Verbindungen beteiligt sein, sondern auch eine bestimmte Verbindung kann durch mehrere Cytochrome umgesetzt werden.

Die Gene für die einzelnen P450-Spezies bilden eine Gen-Superfamilie mit derzeit 20 Gen-Familien. Die Gene werden als Stamm *CYP* bezeichnet, die Familien durch Anhängen von Zahlen charakterisiert (*CYP1*, *CYP2* etc.). Xenobiotika können die Transkription von *CYP*-Genen induzieren. [Marquart & Schäfer 2004]

CYP 1A1

Das Organ mit der höchsten *CYP*-Expression ist die Leber. *CYP*-Enzyme findet man aber im allgemeinen in Organen, die Portale für Fremdstoffe darstellen, nämlich in den Schleimhäuten der Atemwege, der Lunge und des Gastrointestinaltraktes. Jedes Gewebe besitzt dabei eine andere Zusammensetzung der *CYP*-Enzyme, in Zellen des Dickdarms wurden z.B. *CYP1A1*, *CYP1A2*, *CYP1B1*, *CYP2J2*, *CYP3A4* und *CYP3A5* gefunden, wobei die Subfamilie *CYP3A* überwiegt.

Das menschliche Cytochrom P450 1A1 spielt eine wichtige Rolle bei der metabolischen Aktivierung von Xenobiotika, denn es ist in der Lage hoch giftige Komponenten wie polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAKs) in ihre karzinogenen Derivate zu oxidieren. In diesem Zusammenhang wird *CYP1A1* vor allem eine Rolle bei der Entstehung von Lungenkrebs zu geschrieben. [Marquart & Schäfer 2004]

Die Induktion von *CYP1A1*-Enzymen korreliert mit einer erhöhten Transkription des für das Enzym *CYP1A1* codierenden Gens. Vermittelt wird dieser Mechanismus durch Regulatorproteine (Transkriptionsfaktoren), die direkt an der DNA angreifen. Hierzu tragen die Gene einen speziellen Kontrollbereich, der als Promoter bezeichnet wird und Bindungsstellen (Kontrollelemente) für Regulatorproteine enthält. Die Wirksamkeit dieser Proteine wird u.a. durch Metabolite gesteuert. Die *CYP1A1*-Gen-Transkription erfolgt nach einem Mechanismus, der eine Ligand-abhängige Heterodimerisation zwischen zwei Helix-Schleife-Helix-Proteinen (Ah-Rezeptor und ARNT) involviert, eine Interaktion des Heterodimers mit einem auf das Xenobiotikum ansprechenden Enhancer (Verstärker) und der Übertragung des Induktionssignals vom Enhancer auf den *CYP1A1*-Promoter, was mit einer Änderung in der Chromatin-Struktur einhergeht.

Bekannte Induktoren für *CYP1A1* sind **3-Methylcholanthren** (3-MC) und, in stärkerem Maße, **2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin** (TCDD).

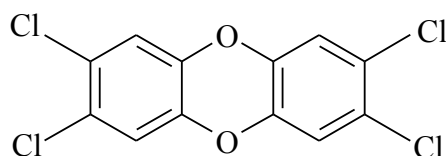


Abbildung 0.10 Strukturformel von 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD)

TCDD besitzt bereits in geringen Dosen eine äußerst hohe Bindungsaffinität zum Ah-Rezeptor. Die Position der Chlorsubstituenten des TCDDs macht es gegenüber enzymatischen Oxidationen inert. Daraus folgt, dass TCDD in den Zellen eine sehr lange Verweildauer besitzt und kontinuierlich Enzyminduktion hervorruft. Der Mechanismus der *CYP1A1*-Induktion durch TCDD basiert darauf, dass der lipophile Induktor wie TCDD in die Zelle passiv diffundiert und am AhR bindet, der sich durch die Bindung von hsp90 (*heat shock protein* mit 90kD) in der entsprechenden Konfiguration befindet. Sobald der AhR einen Liganden bindet, wird das hsp90 vom AhR abgespalten und der mit dem Liganden verbundene AhR transloziert in einem bislang unbekanntem Mechanismus in den Zellkern, wo er mit dem ARNT (*Ah receptor nuclear translocator*)-Rezeptor heterodimerisiert. Dieser Komplex stellt wiederum einen *xenobiotic-responsive elements* (XRE)-bindenden Transkriptionsfaktor dar. Wahrscheinlich spielt bei der Heterodimerisierung und/oder der XRE-Bindung die Phosphorylierung mittels Proteinkinasen eine Rolle. AhR/ARNT-Heterodimere binden an den XRE-Seiten des Enhancers an der DNA, während Transkriptionsfaktoren generell an der *CYP1A1*-Promotorregion binden. Am Promoter bildet sich ein Initiationskomplex, der die Transkription aktiviert. [Whitlock, 1996, Kennedy, 1995]

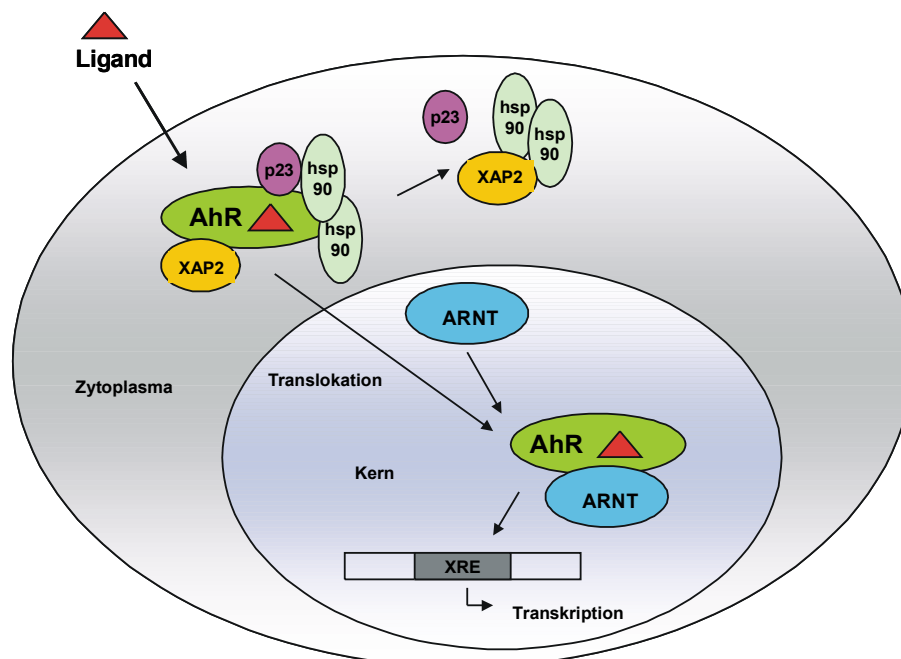


Abbildung 0.11 Ah-Rezeptor-Signaltransduktionsweg

Die ABC-Transportproteine im Gastrointestinaltrakt

Neben einer enzymatischen Beeinflussung der Resorption von Fremdstoffen ist es denkbar, dass bestimmte transmembrane Transportproteine eine Aufnahme dieser Fremdstoffe in der Weise vermindern, indem sie entsprechende Substanzen direkt oder nach der Metabolisierung wieder aus der Zelle heraus, d.h. zurück ins Darmlumen, transportieren. Ein besonderes Augenmerk gilt bei diesem Prozess der Familie der ABC-Transporter. ABC steht für *'ATP Binding Cassette'*, ein strukturelles Merkmal, das allen Vertretern dieser Familie gemein ist.

Die *ATP-Binding Cassette* (ABC) Transporter-Superfamilie stellt die größte Familie von Transmembran-Transportproteinen dar. Die Superfamilie umfasst über 100 verschiedene Proteine, die von Bakterien über Pflanzen bis hin zu Säugetieren in den unterschiedlichsten Spezies auftauchen. Bis heute sind 48 menschliche ABC-Proteine identifiziert worden, die man mit Hilfe von phylogenetischen Analysen in sieben Subfamilien unterteilt [Higgins, 1992; Dean et al., 2001].

ABC-Transporter sind an einer großen Anzahl von energieabhängigen Transportprozessen durch intrazelluläre Membranen oder über die äußere Zellmembran hinweg beteiligt. Beispiele für die vielfältigen Substrate sind Phospholipide, Ionen, Peptide, Steroide, Polysaccharide, Aminosäuren, organische Anionen, medizinische Wirkstoffe und andere Xenobiotika [Leslie, 2001a; Borst, 1999; Cole & Deeley, 1998; Hipfner, 1999a; Higgins, 1992; Klein, 1999].

P-Glykoprotein wird für das Phänomen der „*Multiple Drug Resistance*“ (MDR) von verschiedenen Tumortypen verantwortlich gemacht. Es verhindert die für die Wirkung nötige Akkumulation verschiedener Cytostatika in den Krebszellen in der Weise, dass es diese Stoffe nach Eintritt in die Zelle wieder hinaustransportiert. [Gottesmann, 1993] P-Glykoprotein weist ein breites Substratspektrum auf, das Substanzen unterschiedlicher Struktur und Wirkungsweise mit einbezieht. Es ist aber nicht nur in Tumorzellen zu finden, sondern auch in verschiedenen Organen physiologisch exprimiert.

Verschiedene MRPs werden ebenfalls von einer großen Anzahl von Organen wie der Dünndarmschleimhaut aber auch in Tumorzellen exprimiert. MRP1, MRP2 und MRP3 fungieren als Transporter von organischen Anionen. So befördern sie anionische Chemotherapeutika wie z.B. Methotrexat und neutrale Substanzen, die

mit anionischen Liganden wie Glutathion (GSH), Glucuronsäure oder Sulfat konjugiert sind. Aber auch eine Reihe von neutralen organischen Substanzen, von denen keine Konjugate mit anionischen Liganden bekannt sind, können in Gegenwart von GSH transportiert werden.

MRP4 und MRP5 sind dazu in der Lage, Nucleoside zu transportieren und können so eine Resistenz gegenüber manchen HIV-Therapeutika hervorrufen. Gezeigt ist dies für 9-(2-Phosphonylmethoxyethyl)adenin (PMEA), einen potenten Inhibitor der HIV-Reversen Transkriptase und anderer viraler DNA-Polymerasen [Schuetz et al., 1999].

Die Funktion von MRP6 ist bisher noch unklar. Es konnte lediglich gezeigt werden, dass das MRP6 in der Ratte BQ123 (Antagonist des Endothelin-Rezeptors) transportiert [Madon et al., 2000].

Auch die erst kürzlich identifizierten Proteine MRP7 [Hopper et al., 2001], MRP8 [Bera, 2001] und MRP9 [Bera, 2002] sind funktionell noch nicht charakterisiert.

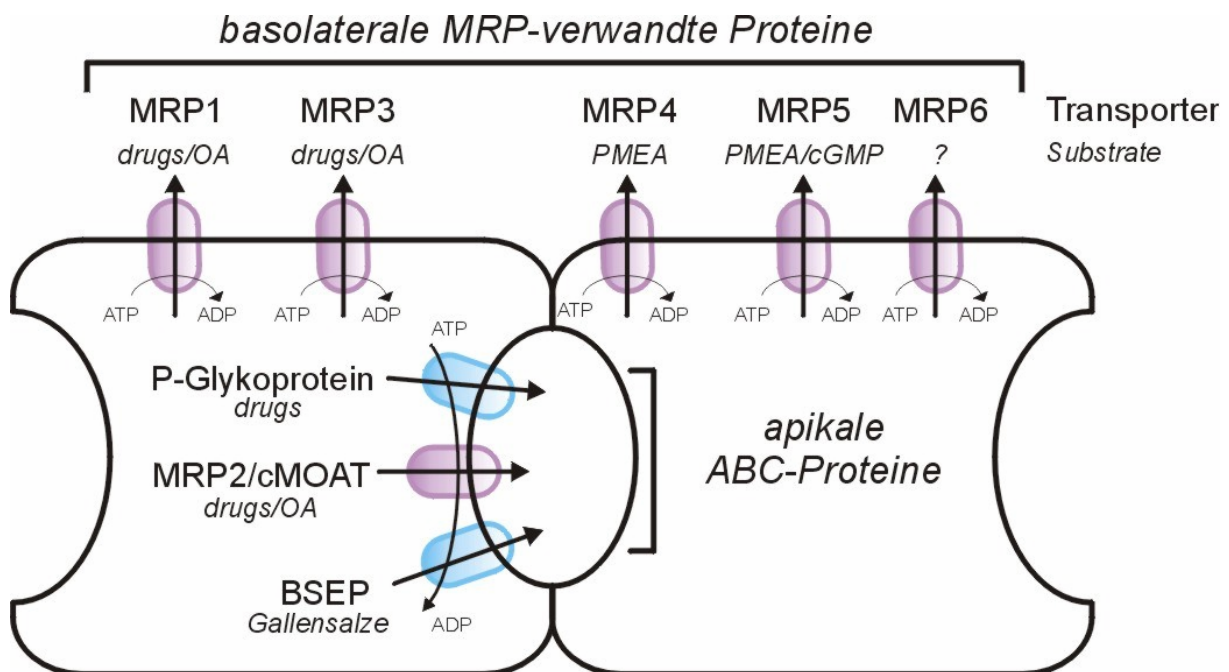


Abbildung 0.12 Lokalisation MRP-verwandter Proteine in polarisierten Zellen [Conrad, 2002; modifiziert nach Cole und Deeley, 2001] OA: organische Anionen; BSEP: bile salt export pump; PMEA: 9-(2-Phosphonylmethoxyethyl)adenin

Bezeichnung	Lokalisation	Transport
--------------------	---------------------	------------------

MRP1	Lunge, Testis, Niere, (in Leber gering)	GS-X, LTC4
MRP2 (cMOAT)	Leber Niere, Magen	GS-X, glukuronisiertes Bilirubin und anorg. Anionen
MRP3	Leber, Niere, Magen, Nebennieren, Pankreas, Prostata	GS-X
MRP4	Prostata, Lunge, ubiquitär	Nukleosid-Analoga (?)
MRP5	Muskel, Herz, Gehirn	cAMP, cGMP, GS-X, Nukleosid-Analoga (?)
MRP6	Leber, Niere	BQ123
MRP7	?	?

Tabelle 0.5 Überblick über die MRP-Transporterfamilie [Borst, 1999; Leslie, 2001]

Gemeinsame Strukturmerkmale aller ABC-Transporter sind zwei Typen struktureller Domänen: hydrophobe, membrandurchspannende Domänen (MSD) und hydrophile, cytosolische Nucleotidbindungsdomänen (NBD). Typische eukaryontische ABC-Transporter bestehen aus zwei MSDs und zwei NBDs, die in Paaren angeordnet sind (MSD–NBD oder NBD–MSD) und entweder als eine Einheit oder als zwei separate Polypeptide exprimiert werden [Higgins, 1992].

Es wird allgemein davon ausgegangen, dass bei den meisten ABC-Transportern die Bindung und anschließende Hydrolyse von ATP an den cytosolischen NBDs die Energie für den Substrattransport bereitstellt [Higgins, 1992; Hipfner, 1999a].

Diese Domänen sind sehr unterschiedlich zwischen einzelnen Mitgliedern der Superfamilie und zeigen üblicherweise eine Sequenzidentität von 30-40% in einer Kernregion von ca. 200 Aminosäuren. Die NBDs der ABC-Superfamilie teilen zwei Konsensus-Motive, die „Walker A“ und „Walker B“ genannt werden, mit vielen anderen Nucleotid-bindenden Proteinen. Diese beiden Regionen scheinen entscheidend für die ATPase-Funktion der ABC-Transporter zu sein [Walker, 1982; Schneider & Hunke, 1998]. Charakteristisch für die ABC-Transporter ist das sogenannte C-Motiv (oder *active transport family*-Signatur): eine 14 Aminosäure lange Sequenz, die zwischen den Walker A- und B-Motiven lokalisiert ist, deren exakte Funktion aber noch nicht bekannt ist [Higgins, 1992].

Im Gegensatz zu den NBDs sind die MSDs der verschiedenen ABC-Transporter sehr divergent. Die meisten von ihnen besitzen vier oder sechs membrandurchspannende Helices (*transmembrane helices*; TM). Dass sich die Sequenzen der MSDs der einzelnen Transporter so sehr unterscheiden, legte den Schluss nahe, dass sie eine wichtige Rolle im Hinblick auf die unterschiedliche Substratspezifität spielen [Ueda, 1997; Akabas, 1997; Hrycyna, 1998].

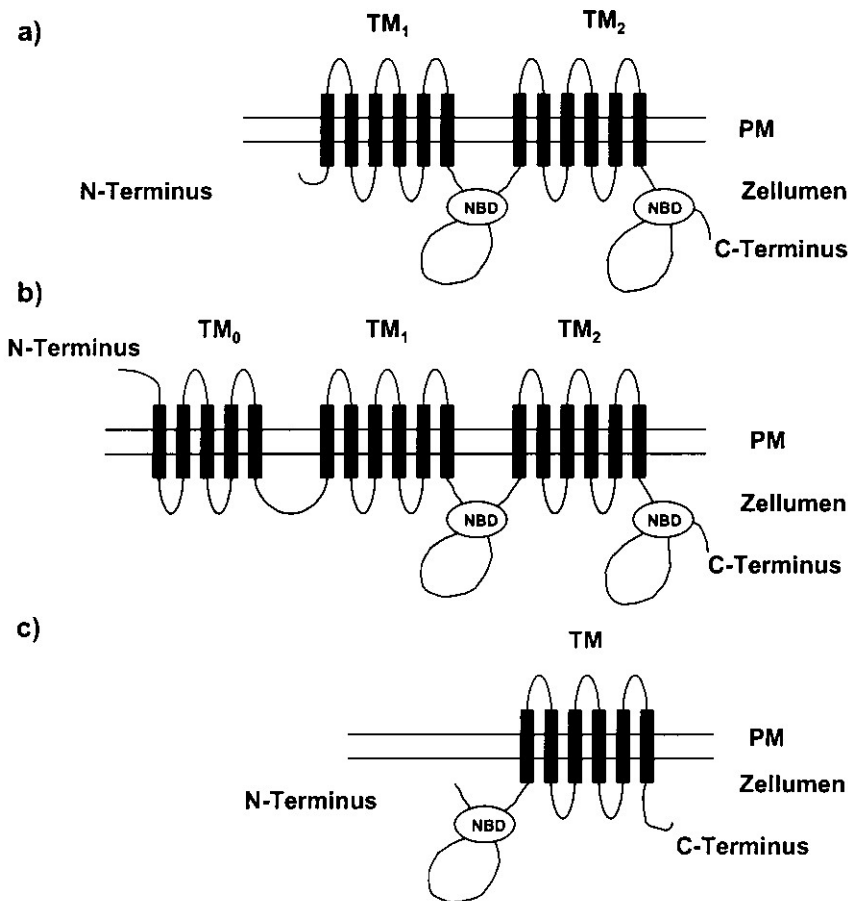


Abbildung 0.13 Membrantopologie von ABC-Transportern in der Plasmamembran (PM)
[Gottesmann, 2002]

- a) zwei Transmembrandomänen (TM₁ und TM₂) und zwei nukleotidbindende Domänen (NBD) z.B. MDR1
- b) drei Transmembrandomänen (TM₀, TM₁ und TM₂) und zwei nukleotidbindende Domänen (NBD) z.B. MRP1, MRP2
- c) zwei Transmembrandomänen (TM) und eine NBD z.B. BSEP

Klinische Mehrfachresistenz

Die Mehrfachresistenz (multidrug resistance, MDR) maligner Zellen gegenüber den eingesetzten, strukturell nicht miteinander verwandten Chemotherapeutika ist ein Phänomen, welches bei der Behandlung von Infektionen und insbesondere von Tumoren eine wesentliche Rolle spielt [Ling, 1997; Hotta, 1999; Potocnik, 2001; Teodori, 2002]. Es sind zwei Arten von Resistenzen bekannt. Zum einen die intrinsische und zum anderen die erworbene Form. Beide Resistenzformen führen zur Unwirksamkeit eines breiten Spektrums an verschiedenen Substanzklassen und damit zu einem Misserfolg der Chemotherapie [Bellamy, 1996]. Dennoch unterscheiden sich diese beiden Formen: bei der intrinsischen MDR führt bereits die erste Chemotherapie nicht zum gewünschten Erfolg, während es bei der erworbenen MDR zunächst zu einer Wirkung der ersten Chemotherapie kommt. Später kommt es aber zu einem Rückfall und die Tumorzellen sind dann resistent gegenüber den Stoffen der ersten Behandlung [Teodori, 2002; Chin, 1993; Bosch & Croop, 1996; Chin, 1990].

An der klinischen Mehrfachresistenz sind mehrere Prozesse beteiligt. Bei der klassischen MDR kommt es zu einem verstärkten Efflux der eingesetzten Medikamente oder deren Metaboliten aus den Targetzellen, so dass die intrazelluläre Konzentration der zytotoxischen Stoffe verringert wird. Dies geht mit einer Überexpression von Membrantransportproteinen wie Pgp einher, welche als ATP-abhängige Effluxpumpen wirken, die Substrate aus den Zellen exportieren. [Schrenk, 1994]

An diesem Prozess sind vor allem P-Glycoprotein und das multidrug resistance-associated protein (MRP1) beteiligt, welche zur ABC (ATP binding cassette)-Superfamilie gehören. [Gottesman & Pastan, 1993]

Weitere Resistenzmechanismen sind eine erhöhte Detoxifikation der Chemotherapeutika durch Phase II-Enzyme, insbesondere Glutathion [Peters & Roelofs, 1992; Meijer, 1992], Veränderungen der Medikamente an der Targetzelle oder Veränderung des Zielortes [Pommier, 1986] sowie Hemmung der Apoptose (Zelltod) durch Veränderungen in der Signalkette (vor allem p53) und verstärkte Expression von DNA-Reparatursystemen [Hickmann, 1996]. Es sind weitere Resistenzmechanismen bekannt, die hier aber nicht aufgeführt werden.

Klassischerweise versteht man unter "Multidrug resistance" den aktiven Efflux oder Transport über eine Pumpe von Xenobiotika via Transmembranproteine [Wang, 2001]

Neben ihrer Rolle in der Resistenz von Krebszellen besitzen diese Proteine auch verschiedene physiologische Funktionen, da sie ebenfalls in vielen wichtigen Nichttumor-Geweben exprimiert werden [Teodori, 2002].

Es konnten einige Arzneimitteln gefunden werden, welche in der Lage sind, die Effekte von Pgp und MRP1 auf die Ausbildung der MDR rückgängig zu machen. Diese Stoffe werden als "Chemosensitizer" bezeichnet. Zu diesen Stoffen gehört z.B. Tamoxifen [Hotta, 1999; Teodori, 2002], Verapamil, Progesteron und Cyclosporin A [Ling, 1997; Bosch & Croop, 1996].

MRP2

Die komplette *MRP2*-cDNA wurde 1996 aus der Leber von Wistar-Ratten kloniert. Die cDNA des Menschen, des Kaninchens, der Maus und des Hundes folgten kurze Zeit später, und es stellte sich heraus, dass die fünf Orthologe untereinander einen hohen Grad an Aminosäure-Identität zeigen (77-83%) [Ito, 2001a; Taniguchi, 1996; van Kuijck, 1996; Fritz, 2000].

Die genomische Struktur von *MRP2* weist eine bemerkenswerte Ähnlichkeit zu der von *MRP1* auf, was schon durch die Anzahl und Größe der Exons und den hohen Anteil an Klasse 0-Introns impliziert wird. Genauere Untersuchungen belegten, dass die Gene 21 identische Spleiss-Stellen besitzen. Von diesem Gesichtspunkt aus sind *MRP1* und *MRP2* sehr eng verwandt, auch wenn die beiden Proteine nur eine Aminosäure-Identität von 48% und eine Aminosäure -Ähnlichkeit von 68% aufweisen. Der höchste Grad an Übereinstimmung findet sich im Carboxyterminus und in den NBDs [Tsuji, 1999; Grant, 1997; Jedlitschky, 1997; Büchler, 1996].

Im Gegensatz zu *MRP1* wird *MRP2* nicht ubiquitär exprimiert, sondern nur in einigen Geweben. Die höchsten Gehalte findet man in der Leber, aber auch im Dünndarm und dem proximalen Tubulus der Niere lässt es sich nachweisen [Paulusma, 1996; Büchler, 1996; Schaub, 1997]. In neueren Studien wird die Expression von *MRP2* auch in der Plazenta, dem Gehirn und der Gallenblase beschrieben [St. Pierre, 2000; Kusuhura & Sugiyama, 2002; Rost, 2001].

MRP2 ist das Einzige unter den ABC-Proteinen, das ausschließlich in der apikalen Membran polarisierter Zellen exprimiert wird. Da *MRP2* vor allem in Hepatocyten, Nierenepithelien und Darmenterocyten gebildet wird, ist es gut geeignet, eine Rolle in der Elimination von amphiphilen organischen Anionen und Xenobiotika in die Galle und ins Lumen zu spielen [Renes, 2000; Ito, 2001a].

Im Allgemeinen werden amphiphile organische Anionen mit relativ hohem Molekulargewicht durch Metabolisierung und/ oder biliäre Exkretion aus der Leber eliminiert, während kleine und hydrophile organische Anionen in den Urin ausgeschieden werden [Kusuhura & Sugiyama, 2000]. Biochemische und genetische Studien haben noch lange vor der Entdeckung von MRP1 gezeigt, dass es einen Transporter von organischen Anionen in der kanalikulären Membran geben muss. Dieser wurde als *canalicular multispecific organic anion transporter* (cMOAT) bezeichnet. Später wurde die Ähnlichkeit zu MRP1 erkannt und cMOAT deshalb MRP2 oder auch cMRP (canalicular MRP) benannt.

Versuche mit den natürlichen *mrp2*-defizienten Rattenstämmen EHBR (Eisai hyperbilirubinemic), konnten zum Verständnis der Transporteigenschaften von MRP2 entscheidend beitragen. Diese Ratten weisen eine verminderte biliäre Ausscheidung von Bilirubin-Glucuroniden, sulfatierten Gallensalzen, GSH-Konjugaten und GSH auf und leiden an Hyperbilirubinämie [Paulusma, 1996; Ito, 1997; Mikami, 1986].

Auch beim Menschen gibt es eine Erbkrankheit, die durch Mutationen des *MRP2*-Gens hervorgerufen wird: Patienten, die am autosomal-rezessiv vererbten Dubin-Johnson-Syndrom leiden, exprimieren kein MRP2. Dadurch ist die Sekretion von Mono- und Biglucuronosyl-Bilirubin und anderen anionischen Konjugaten in die Galle gestört, was sich in Hyperbilirubinämie und Ablagerung eines schwarzen Pigments in der Leber äußert [Paulusma, 1997; Tsuji, 1997; Keitel, 2000].

In der Niere wird MRP2 apikal im proximalen Tubulus exprimiert. Hier ist es vermutlich für den Transport von konjugierten organischen Anionen in den Urin zuständig [Schaub et al., 1999].

MRP2 ist dazu in der Lage, das heterozyklische aromatische Amin 1-Methyl-6-phenyl-1*H*-imidazo[4,5-*b*]pyridin-2-amin (PhIP) zu transportieren. Es konnte gezeigt werden, dass die MRP2-vermittelte intestinale Ausscheidung von PhIP die orale Bioverfügbarkeit dieses Karzinogens deutlich senkt. Der Transport durch MRP2 könnte auch die Absorption vieler anderer Xenobiotika regulieren [Dietrich, 2001a & 2001b].

Darüber hinaus ist MRP2 ebenso wie MRP1 in der Lage, sowohl GSH als auch GSSG zu transportieren, d.h. auch ihm könnte eine Rolle bei der Aufrechterhaltung des zellulären Redoxstatus zukommen [Leslie, 2001a].

MRP2 kann zudem zur Mehrfachresistenz von Krebszellen beitragen. So ist in 95% aller Nierenkarzinome MRP2 detektierbar und auch in Tumorzellen aus Lunge, Magen, Colorektum und Leber konnte es nachgewiesen werden [König, 1999]. MRP2

vermittelt unter anderem Resistenz gegen die Chemotherapeutika Cisplatin, Etoposid, Doxorubicin, Epirubicin und Vincristin. Da es bisher keine Hinweise darauf gibt, dass MRP1 Cisplatin transportiert, stellt dies möglicherweise einen funktionellen Unterschied der beiden Proteine dar [Chen, 1999].

Caco 2 Zellen als *in vitro* Modell

Im Dünndarm findet die eigentliche Verdauung und die Aufnahme der Nahrungsbestandteile und somit auch der Pharmaka und Xenobiotika statt. Die Nährstoffe werden durch Enzyme der Bauchspeicheldrüse (*Pankreas*) zu resorbierbaren Fragmenten abgebaut. Diese werden über die Zotten aufgenommen, gelangen ins Blut und werden über Venen der Pfortader und schließlich der Leber zugeführt. Durch Misch- und Transportbewegungen wandert der Speisebrei durch den Dünndarm hindurch in den Dickdarm (*Intestinum crassum*) [Faller, 1999].

Funktionsträger der vielfältigen Aufgaben des Intestinaltrakts bei Verdauung, Resorption, als immunbiologische Kontaktfläche und als größtes endokrines Organ sind die unterschiedlichen Zelltypen, die seine innere Oberfläche auskleiden. Neben den dominierenden Saumzellen, den Enterocyten, zählen dazu undifferenzierte Kryptenzellen, Zwischenzellen, Becherzellen, Paneth-Zellen, M-Zellen, eine Vielzahl verschiedener entero-endokriner Zellen und epithelassoziierte Zellen, wie intraepitheliale Lymphocyten [Rehner & Daniel, 1999].

Die dichtstehenden Zotten sind von einem einreihigen Zylinderepithel besetzt, dessen Oberfläche einen Bürstensaum trägt. Zwischen diesen Resorptionszellen (Enterozyten) sind zahlreiche schleimproduzierende Becherzellen eingestreut. Zwischen den Zotten ragen kurze Drüsenschläuche (Lieberkühnsche Krypten) in die Tiefe der Schleimhaut, deren Epithel am Grunde zahlreiche Zellen enthält [Mörke, 1989].

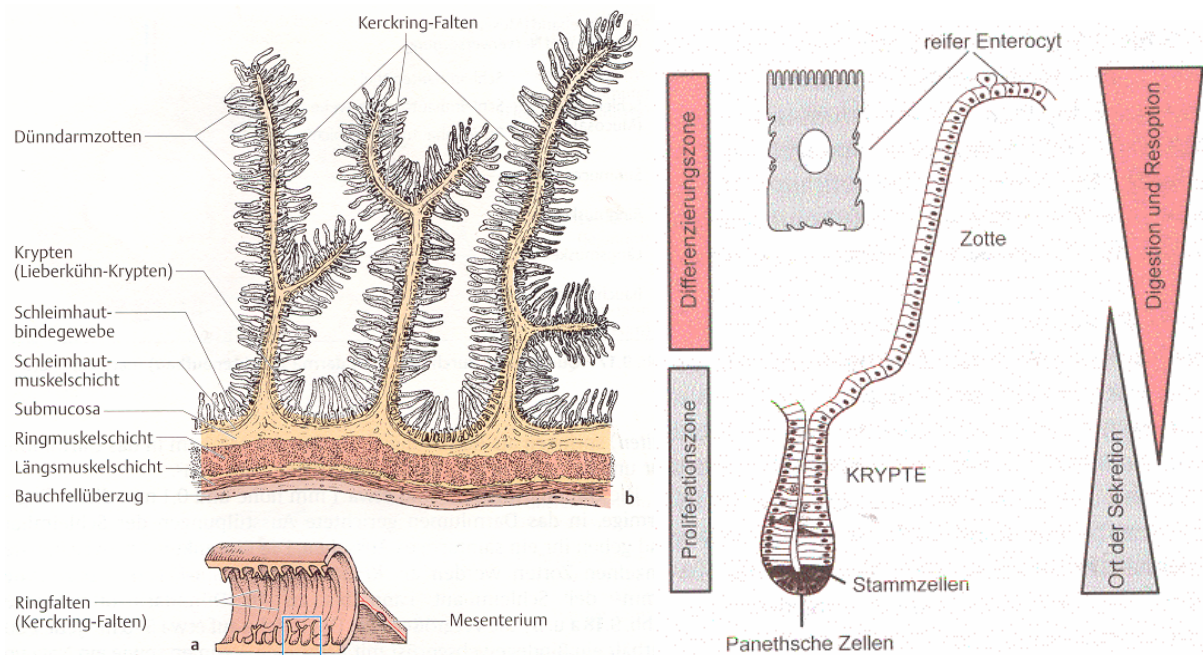


Abbildung 0.14 Längsschnitt durch das Jejunum (Schema) [Faller, 1999] und funktionelle Kompartimentierung der Sekretions- sowie der Digestions- und Resorptionsvorgänge entlang der Krypten-Zottenachse im Dünndarm [Rehner & Daniel, 1999]

Das Dünndarmepithel ist ein außerordentlich dynamisches Gewebe, welches einen ständigen Umbau erfährt. Aus der Kryptenregion, der Proliferationszone des Epithels, erneuert sich die Mucosaoberfläche in ca. 3-6 Tagen vollständig. Aus Stammzellen bzw. multipotenten Kryptenzellen entstehen durch Teilung die neuen Zellen, die in Richtung Zottenspitze wandern und dabei ein umfangreiches Differenzierungsprogramm mit zunehmender Ausprägung der phänotypischen Eigenschaften durchlaufen.

Caco-2-Zellen stellen eine permanente humane Zelllinie dar, welche ihren Ursprung in einem Adenokarzinom des Kolons eines 72-jährigen kaukasischen Mannes hat. Sie werden vor allem wegen ihrer Ähnlichkeit mit Dünndarmenterozyten als *in vitro*-Modell genutzt. Ihre Besonderheit beruht hierbei darauf, dass sie während der Kultivierung über 3 Wochen einen ausdifferenzieren Monolayer bilden, welche typische Charakteristika der humanen Dünndarmmukosa aufweisen [Chantret 1988].

Differenzierte Caco-2-Zellen zeigen eine für Dünndarmenterozyten typische morphologische Polarisierung mit ausgeprägtem Bürstensaum und der Ausbildung von *Tight Junctions*. Ferner exprimieren sie Enzyme, wie die Sucrase Isomaltase, die

Aminopeptidase und die alkalische Phosphatase, die für Dünndarmzellen typisch sind [Pinto, 1983].

Die Messung des elektrischen Widerstandes oder auch die Expression der oben genannten Leitenzyme können zur Beurteilung der Differenzierung der Caco-2-Zellen herangezogen werden. Die Proliferationsphase dauert 9 Tage nach Aussaat an, anschließend beginnt die Differenzierungsphase, in der bis zum 15. Tag ein ständiger Anstieg der Enzymaktivitäten zu verzeichnen ist [Pinto, 1983]. Während dieser Differenzierungsphase exprimieren die Zellen wichtige Exportpumpen der ABC-Transporterfamilie. An der apikalen Seite wird unter anderem das P-Glykoprotein, MRP1 und MRP2 exprimiert. Hunter et al. (1993) konnten mit radioaktiv markiertem P-Glykoprotein-Substrat zeigen, dass Vinblastinsulfat einem lumenseitig gerichteten Transport über Caco-2-Monolayer unterliegt. Die Expression des P-Glykoprotein ist dabei wie auch die Leitenzyme von dem Differenzierungsgrad der Zellen abhängig. Der Monolayer weist nach 3 Wochen Kultivierungsdauer die höchsten Expressionsraten für den ABC-Transporter auf [Hirohashi, 2000] [Gutmann, 1999].

Caco-2-Zellen exprimieren auch fremdstoffmetabolisierende Enzyme der Phase I und II. Von den Cytochrome P450-Enzymen ist das CYP1A1 vorhanden, welches induzierbar ist, und CYP1B1. CYP1A2 konnte dagegen nicht nachgewiesen werden [Rosenberg, 1993] [Lampen, 1998].

Desweiteren konnten eine Reihe von konjugierenden Enzymen der Phase II nachgewiesen werden. Es konnten unter anderem die drei UDP-Glucuronosyltransferasen UGT1A6, UGT1A9 und UGT2B7, die über den Ah-Rezeptormechanismus induziert werden können, nachgewiesen werden [Muenzel, 1999]. Die Aktivität der Glutathion-S-Transferasen sowie der Phenol-Sulfotransferase (SULT1A1) konnte in den intestinalen Zellen gemessen werden. [Peters, 1989]

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Caco-2-Zellen ein geeignetes *in vitro*-Modell für experimentelle Untersuchungen zur Interaktion von Metabolismus und Transport im menschlichen Dünndarm darstellen.

Ziel der Arbeit

Das Netzwerk „Rolle von Nahrungsbestandteilen bei der Entstehung chronischer Darmerkrankungen und Möglichkeiten ihrer Prävention durch die Ernährung“ des Bundesministeriums für Bildung und Forschung (BMBF) untersucht die Einflüsse von Inhaltsstoffen des Apfels auf die Darmgesundheit. Polyphenolen/Flavonoiden oder schwer abbaubaren Kohlenhydraten wird aufgrund einer Vielzahl von Studien eine Schutzwirkung gegenüber Krebserkrankungen zugesprochen. Zum Teil können solche Stoffe reaktive kanzerogene Zwischenstufen abfangen oder die Expression und Aktivität von protektiven Enzymsystemen fördern oder von giftigen Systemen hemmen [Marquardt & Schäfer, 2004, Phillips, 2003].

Die genaue biologische Wirkung der Nahrungskomponenten und der humantherapeutische Nutzen ist aber weitgehend ungeklärt. Deshalb wurden in dieser Arbeit Flavonoide des Apfels auf die Wirkung des Fremdstoffmetabolismus im Kolon untersucht.

In Vorversuchen wurden bereits CYP1A2, 1B1, 3A4, MDR1 und MRP1 an Caco2-Zellen im Northern Blot auf Induktion durch AS02 und ausgewählte Einzelkomponenten getestet, es konnte keine Induktion festgestellt werden. Deshalb wurden in dieser Arbeit MRP2 und CYP1A1 ausgewählt, da diese im Vorversuch einen Effekt zeigten.

Alle Versuche wurden mit der Caco-2-Zelllinie durchgeführt. Bei den getesteten Flavonoiden handelt es sich um den Apfelsaftextrakt aus dem Jahr 2002 (AS02) der Forschungsanstalt Geisenheim und um die isolierten Flavonoide Quercetin, Rutin, Phloretin und Phloridzin.

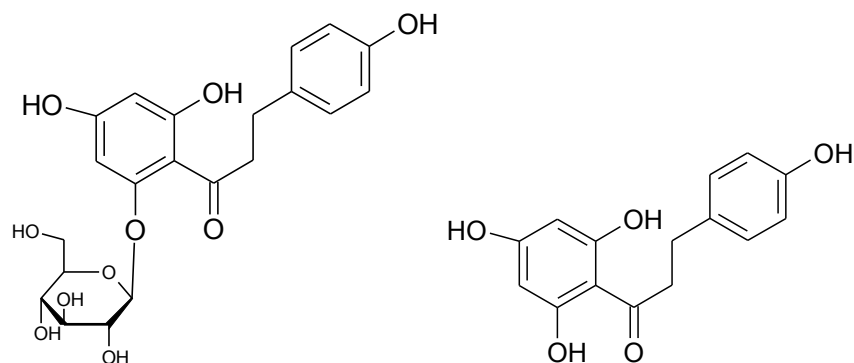


Abbildung 0.1 Strukturformel von Phloridzin und Phloretin

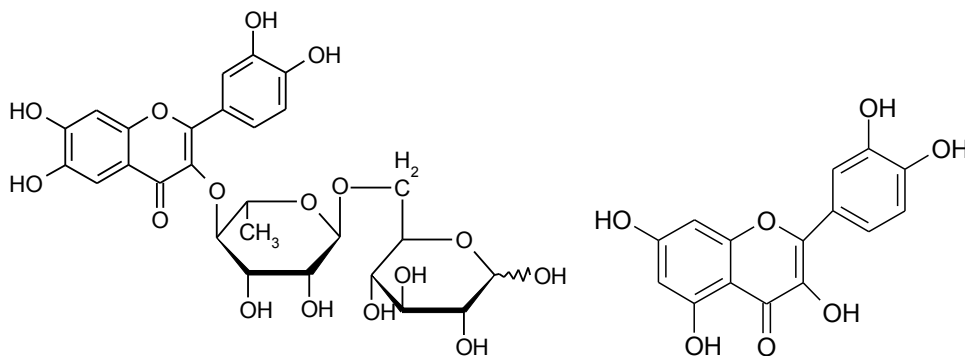


Abbildung 0.2 Strukturformel von Rutin und Quercetin

Diese Arbeit verfolgte deshalb folgende Fragestellungen:

- I.) Untersuchung des Apfelsaftextraktes AS02 und der Flavonoide auf zytotoxische Wirkung mittels MTT- und modifiziertem Alamar BlueTM-Test. Der Einfluss des Zusatzes von Natriumascorbat und α -Tocopherol im Medium als Oxidationsschutz auf die Flavonoide wird parallel dazu untersucht.
- II.) Untersuchung der Inhibition bzw. Induktion der Caco-2-Zellen von Cytochrome P450 CYP1A1, auf RNA bzw. Proteinebene mit Hilfe der Real-Time PCR und des Western Blots durch den Extrakt und die Flavonoide
- III.) Untersuchung der 7-Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD)-Aktivität nach Behandlung der Zellen mit AS02 und den Flavonoiden
- IV.) Untersuchung der Caco-2-Zellen auf die Induktion des ABC-Transporters MRP2, auf RNA bzw. Proteinebene mit Hilfe der Real-Time PCR und des Western Blots durch die Substanzen
- V.) Gerichteter Transport der Flavonoide im Caco-2-Transportmodell

Material und Methoden

Zelllinie

Caco-2-Zellen stellen eine permanente humane Zelllinie dar, welche ihren Ursprung in einem Adenokarzinom des Kolons eines 72-jährigen kaukasischen Mannes hat. Sie werden vor allem wegen ihrer Ähnlichkeit mit Dünndarmenterozyten als *in vitro*-Modell genutzt. Ihre Besonderheit beruht hierbei darauf, dass sie während der Kultivierung über 3 Wochen einen ausdifferenzierten Monolayer bilden, welche typische Charakteristika der humanen Dünndarmmukosa aufweisen [Chantret 1988]. Die Zellen wurden von Boehringer/Biberach zur Verfügung gestellt.

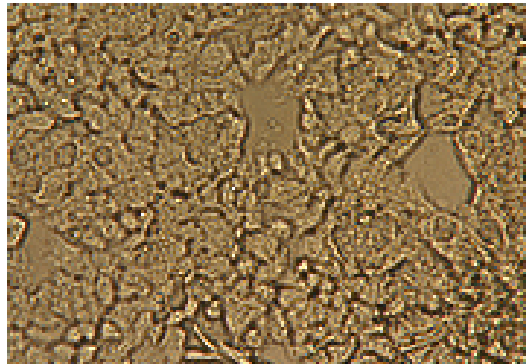


Abbildung 0.1 Caco-2-Zellen

Chemikalien und Reagenzien

Chemikalien/Reagenzien	Hersteller, Ort
Acetonitril für HPLC	Roth, Karlsruhe
Acrylamid/Bisacrylamidlösung (37,5:1)	
RotiphoreseGel 30, wässrige Acrylamidstamm- Lösung mit 0,8% Bisacrylamid	Roth, Karlsruhe
Agarose zur DNA/RNA-Elektrophorese	Peqlab, Erlangen
Amidoschwarz (Naphtholblauschwarz)	AppliChem, Darmstadt

Chemikalien/Reagenzien	Hersteller, Ort
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Merck, Darmstadt
Ampicillin	Sigma, Steinheim
Apfelsaftextrakt 2002 (AS02)	Forschungsanstalt, Geisenheim
Aprotinin	AppliChem, Darmstadt
Bacto-Agar	Difco, Detroit, USA
Bacto-Trypton	Difco, Detroit, USA
Bakterienstamm XL 10-Gold	Stratagene, Heidelberg
BioRad Kaleidoskope Prestained Standards Marker	BioRad, München
Bovine Serum Albumin (BSA)	ICN Biomedicals Inc., Aurora, Ohio (USA)
Bradford Farbreagenz	BioRad, München
Bromphenolblau	AppliChem, Darmstadt
n-Butanol	Merck, Darmstadt
Coomassie Brillant Blau	AppliChem, Darmstadt
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma, Steinheim
di-Kaliumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Dimethylformamid (DMF)	Acros Organics, New Jersey (USA)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, Steinheim
di-Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Merck, Darmstadt
Dithiothreitol (DTT)	AppliChem, Darmstadt
DNA-Ladder (1kb)	Peqlab, Erlangen
Dual-Luciferase™ Reporter Assay System	Promega, Mannheim
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Roth, Karlsruhe
7-Ethoxyresorufin (Na-Salz)	Sigma, Steinheim
Ethidiumbromid-Lösung 1%	Roth, Karlsruhe
Ethoxyresorufin	Merck, Darmstadt
Ethylendiammintetraacetat (EDTA)	Sigma, Steinheim
Fluorescamin	AppliChem, Darmstadt
Gen Elute™ Maxiprep Kit	Sigma, Steinheim
Glucose	Merck, Darmstadt

Chemikalien/Reagenzien	Hersteller, Ort
Glycerin	Merck, Darmstadt
Glycin	Roth, Karlsruhe
Guanidiniumthiocyanat	Merck, Darmstadt
Isopropanol	Merck, Darmstadt
IQ™ SYBR Green Supermix	BioRad, München
IScript™ cDNA Synthesis Kit	BioRad, München
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck, Darmstadt
Leupeptin	AppliChem, Darmstadt
Magermilchpulver, sprühgetrocknet	Spinnrad, Gelsenkirchen
Magnesiumchlorid-Hexahydrat (MgCl ₂ · 6H ₂ O)	Roth, Karlsruhe
β-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
Methanol	Merck, Darmstadt
Natriumazid (NaN ₃)	Sigma, Steinheim
Natriumcarbonat (Na ₂ CO ₃)	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva, Heidelberg
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Merck, Darmstadt
Di-Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Riedel-de-Haen, Seelze
Nikotinamidadenindinucleotidphosphat (NADPH)	AppliChem, Darmstadt
Oligonukleotide für PCR	MWGBiotech, Erbsenberg
PCR-H ₂ O Ampuwa	Fresenius, Bad Homburg
Pepstatin	AppliChem, Darmstadt
Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF)	AppliChem, Darmstadt
Phloretin	Sigma, Steinheim
Phlorizin	Sigma, Steinheim
PVDF-Membran	Millipore Corporation, Neu-Isenburg/Bedford
Quercetin-Dihydrat	ICN Biomedicals Inc., Aurora, Ohio (USA)
Resazurin (Na-Salz)	Sigma, Steinheim
Resorufin	Sigma, Steinheim

<i>Chemikalien/Reagenzien</i>	<i>Hersteller, Ort</i>
Rutin Hydrate	Sigma, Steinheim
Natriumsulfat (SDS)	AppliChem, Darmstadt
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma, Steinheim
Tris	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma, Steinheim
Tween [®] -20	Roth, Karlsruhe
Western Lightning [™] Chemiluminescence Reagent	Perkin Elmer Life Sciences, München
Yeast-Extrakt	Difco, Detroit (USA)
Whatmanpaper 3MM (Gel-Blotting Papiere)	Roth, Karlsruhe

Tabelle 0.1 Auflistung der verwendeten Chemikalien und Reagenzien

Medien und Zusätze

Dulbelcco's Modified Eagle Medium (DMEM)	PAA Laboratories, Cölbe
Fötale Kälberserum (FKS)	PAA Laboratories, Cölbe
Nicht essentielle Aminosäuren (100x)	PAA Laboratories, Cölbe
Natriumascorbat	Sigma, Steinheim
Penicillin/Streptomycin (100x) (10000 Units Penicillin, 10 mg/ml Streptomycin)	PAA Laboratories, Cölbe
DL- α -Tocopherol	Roth, Karlsruhe
Trypsin /EDTA (1x):	PAA Laboratories, Cölbe
0,5 g Trypsin (1:250)/L	
0,2 g EDTA /L in PBS (1x)	

Kulturmedium für Caco 2-Zellen:

FCS (10%)	50 ml
Penicillin/Streptomycin (1%)	5 ml
Nicht essentielle Aminosäuren (100x)	5 ml
DMEM-Fertiglösung	ad 500 ml
Lagerung:4°C	

Kulturmedium für Caco 2-Zellen mit Oxidationsschutz:

FCS (10%)	50 ml
Penicillin/Streptomycin (1%)	5 ml
Nicht essentielle Aminosäuren (100x)	5 ml
DL- α -Tocopherol [0,05 mM]	2,2 ml
Natriumascorbat [0,25 mM]	5 ml
DMEM-Fertiglösung	ad 500 ml
Lagerung:4°C	

Einfriermedium für Caco 2-Zellen:

FCS (10%)	88%
DMSO	12%

Kulturmedium für Bakterienkulturen (2YT-Medium):

Bacto-Trypton	10 g
NaCl	10 g
Yeast-Extrakt	5 g
H ₂ O bidest.	ad 1l

Autoklavieren, vor Verwendung Ampicillin-Lösung zugeben (Endkonzentration 100µg/ml)

Apfelsaftextrakt und Polyphenole

Zusammensetzung des Apfelsaftextraktes AS02 (aus dem Jahr 2002)

<i>Substanz</i>	<i>Mittelwert [mg/g]</i>
Procyanidin B1	2,9
Chlorogensäure	171,8
3-Coumaroyl-Chinasäure	16,0
5-Coumaroyl-Chinasäure	7,0
Procyanidin B2	16,0
Kaffeesäure	102,7
Epicatechin	11,8
4- Coumaroyl-Chinasäure	72,4
Phloretin glykosid 01	16,6
Phloretin glykosid 02	9,4
Phloretin-2'-xyloglucosid	42,7
Phloridzin	34,7
Quercetin-3-rutinosid	1,8
Quercetin-3-galactosid	0,9

<i>Substanz</i>	<i>Mittelwert [mg/g]</i>
Quercetin-3-glucosid	1,4
Quercetin-3-rhamnosid	3,2

Tabelle 0.2 Zusammensetzung der polyphenolischen Komponenten von AS02

Stammlösungen

AS02 [100 mM] (bezogen auf Phloridzin)	in Ethanol
Phloretin [100 mM]	in Ethanol
Phloridzin [100 mM]	in Ethanol
Quercetin [100 mM]	in DMSO
Rutin [100 mM]	in DMSO

Lösungen und Puffer

Natriumascorbat [25,2 mM] 44 mg/10 ml DMEM-Medium

Phosphat-gepufferte Saline (PBS)

NaCl [137 mM]	8,0 g
KCl [2,7 mM]	0,2 g
KH ₂ PO ₄ [1,5 mM]	0,2 g
Na ₂ HPO ₄ [6,5 mM]	0,923 g
CaCl ₂ • 2H ₂ O [0,9 mM]	0,132 g
MgCl ₂ • 6H ₂ O [0,5mM]	0,1 g
H ₂ O	ad 1l

pH 7,4

Lagerung: Raumtemperatur (sterilfiltriert)

DL- α -Tocopherol [11,6 mM] 49,96 mg/10 ml Ethanol

Lagerung: 4°C, vor Lichteinfluss schützen

Resazurin-Reagenzien

NaCl/Pi-Puffer

KH₂PO₄ [1mM] 0,144 g

NaCl [150 mM] 9 g

Na₂HPO₄ [3,7 mM] 0,528 g

H₂O bidest. ad 1l

Lagerung: 4°C

Resazurin- Stammlösung

Resazurin 110,5 mg

Dimethylformamid (DMF) 1 ml

Lagerung: 4°C

Resazurin-Arbeitslösung [440 μ M]

Resazurin-Stammlösung 100 μ l

NaCl/Pi-Puffer ad 100 ml

Lagerung: 4°C, vor Lichteinfluss schützen

Resazurin-Messlösung

Resazurin-Arbeitslösung 1 Teil

Kulturmedium, serumfrei 10 Teile

Vor Gebrauch: frisch ansetzen, vor Lichteinfluss schützen

Ethoxyresorufin-*O*-Deethylase (EROD)-Aktivität

BSA-Eichlösung:

BSA 2 mg/ml NaPi-Puffer
Lagerung: in 1 ml Aliquots bei -20°C

7-Ethoxyresorufin [1,05 mM]: 253 µg/ml Methanol
Lagerung: -20°C

Fluorescamin-Stop-Lösung:
Fluorescamin 150 µg/ml Acetonitril
Lagerung: 4°C, abgedunkelt

NADPH
Na₄-NADPH [13,4 mM] 11,2 mg/ml NaPi-Puffer
Lagerung: -20°C

Na-Phosphat (NaPi)-Puffer [50 mM]:
Na₂HPO₄ * 2 H₂O [47,4 mM] 8,437 g
NaH₂PO₄ * H₂O [2,6 mM] 359 mg
H₂O bidest. ad 1l
pH 8,0
Lagerung: 4°C, abgedunkelt

PBS (siehe 3.2.3 Resazurinreagenzien)

Resorufin-Eichlösung:
Na-Resorufin [140 µM] 33 mg/l Methanol
Lagerung: 4°C

Proteinisolierung aus Zelllinien

Aprotinin [100 mM] 1 mg/ml H₂O
Lagerung: -20°C

DTT-Lösung [100 mM]

DTT	154 mg
H ₂ O bidest.	10 ml
Lagerung: -20°C	

Leupeptin

Lagerung: -20°C	1 mg/ml H ₂ O
-----------------	--------------------------

Pepstatin A

Lagerung: -20°C	1 mg/ml EtOH
-----------------	--------------

PMSF-Lösung [100 mM]

PMSF	174 mg
Ethanol	10 ml
Lagerung:	-20°C

Schwellpuffer

Tris/HCl	10 mM
NaCl	10 mM
MgCl ₂ · 6H ₂ O	1,5 mM
NaN ₃	0,05%
H ₂ O bidest.	ad 1l

pH 7,4

Sterilfiltration

Lagerung: 4°C

Vor Gebrauch: 1% DTT, 1% PMSF, 1% Aprotinin, 1% Pepstatin und 1% Leupeptin zusetzen.

Solubilisierungspuffer

Tris/HCl	20 mM
NaCl	150 mM
EDTA	1 mM
TritonX-100	1%

NaN₃ 0,05%

pH 7,4

sterilfiltrieren

Lagerung: 4°C

Vor Gebrauch: 1% DTT, 1% PMSF 1% Aprotinin, 1% Pepstatin und 1% Leupeptin
zusetzten.

Lowry A

Natriumcarbonat 2% 50 ml

Natrium-Kalium-Tartrat 2,7 % 500 µl

Kupfersulfat 1 % 500 µl

Lowry B

H₂O bidest 2,5 ml

Folin-Ciocalteus-Phenolreagenz 2,5 ml

Proteindetektion mittels Western Blot (semi dry)

Amidoschwarz-Färbelösung

Amidoschwarz 0,1% (v/v)

Isopropanol 25% (v/v)

Essigsäure 10% (v/v)

alternativ:

Amidoschwarz 0,1g

Methanol:Eisessig: H₂O (40:10:50) 100 ml

Anodenpuffer I

Tris [300 mM] 18,15 g

Methanol p.A. (10%) 50 ml

dd H₂O ad 500 ml

pH 10,4

Anodenpuffer II

Tris [25 mM]	1,5 g
Methanol p.A. (10%)	50 ml
dd H ₂ O	ad 500 ml
pH 10,4	

Blockierlösung

Magermilchpulver	4% (v/v)
in TBS/Tween-Puffer (TBS-T)	

Bradford-Farbreagenz (zur Proteinbestimmung)

Bradford Fertig-Farbreagenz (BioRad) 1:5 mit bidest. Wasser verdünnen

Coomassie-Blue-Lösung

Coomassie Brillant Blue	0,25 g
Methanol:H ₂ O (1:1)	90 ml
Eisessig	10 ml

Coomassie-Blue-Destain-Lösung

Wasser	600 ml
Ethanol	300 ml
Essigsäure	100 ml

Kathodenpuffer

Glycin	1,5 g
Tris	1,5 g
Methanol p.A.	100 ml
10% SDS	250 µl
dd H ₂ O	ad 500 ml
pH 9,4	

Lade-Puffer (3x Lämmli-Puffer)

1,0 M Tris pH 6,8	2 ml
Glycerin	1,6 ml
SDS	1,6 g
Bromphenolblau	1 ml
H ₂ O bidest.	9,07 ml

Lagerung: in 1 ml-Aliquots bei -20°C

erst vor Gebrauch:

β-Mercaptoethanol	118 µl
-------------------	--------

Lagerung: bei Raumtemperatur bis zu einer Woche, anschließend erneute
β-Mercaptoethanol-Zugabe

Poylacrylamidgel-Elektrophorese-Puffer (20x) (5l-Ansatz)

Tris	30 g
Glycin	144 g
SDS-Lösung (10%)	50 ml
H ₂ O bidest.	ad 5 l

pH 8,3

Lagerung: Raumtemperatur

SDS-Polyacrylamid-Gele für CYP1A1:

Sammelgel (4%, 6 ml)

H ₂ O bidest.	4,1 ml
30% Acrylamid-Mix	1,0 ml
1 M Tris (pH 6,8)	0,75 ml
SDS (10%)	0,06 ml
APS (10%)	0,06 ml
TEMED	6 µl

Trenngel (10%, 20 ml)

H ₂ O bidest.	7,9 ml
30% Acrylamid-Mix	6,7
1,5 M Tris (pH 8,8)	5 ml
SDS (10%)	0,2 ml
APS (10%)	0,2 ml
TEMED	8 µl

Stripping-Puffer (pro Membran)

1,0 M Tris/HCl (pH 7,4)	1,25 ml
SDS-Lösung (10%)	2 ml
β-Mercaptoethanol	142 µl
H ₂ O bidest.	ad 20 ml

TBS (Tris Buffered Saline)

Tris	140 mM
NaCl	10 mM
H ₂ O bidest.	ad 2 l

pH 7,4
Lagerung: Raumtemperatur

Tris-Puffer

1,5 M pH 8,8	18,2 g Tris/100 ml H ₂ O
0,5 M pH 6,8	6,1 g Tris/100 ml H ₂ O
1,0 M pH 6,8 und 7,4	12,1 g Tris/100 ml H ₂ O

Waschpuffer 20x TBS-Tween-Puffer (TBS-T) (2l-Ansatz)

Tris	48,4 g
NaCl	350 g
Tween-20 (0,05%)	20 ml
H ₂ O bidest.	ad 2 l

pH 7,4

Lagerung: Raumtemperatur

Western Lightning™ Chemiluminescence Reagent

1:1 Enhanced Luminol Reagent : Oxidizing Reagent

Proteindetektion mittels Western Blot (Tank Blot)

20 x TBS-T:

Tris 48,4 g

NaCl 350 g

Tween 20 20 ml

pH 7,5

auf 2 Liter mit H₂O bidest. auffüllen

Raumtemperatur

PAGE-Elektrophoresepuffer (5 Liter):

Tris 30 g

Glycin 144 g

10 %iges SDS 50 ml

pH 8,3 (stimmt normalerweise)

Raumtemperatur

Lämmli-Puffer:

Siehe semi dry Blot

10 x Transfer Puffer:

Glycin 1,92 M

Tris 250 mM

in H₂O bidest.

bei 4 °C lagern

1 x Transfer Puffer:

10 x Puffer 200 ml

H ₂ O bidest.	1400 ml
Methanol	400 ml

bei 4 °C lagern

Amidoschwarz:

Siehe semi dry Blot

SDS-Polyacrylamid-Gele für MRP2:

Sammelgel (6%, 10 ml)

H ₂ O bidest.	5,3 ml
30% Acrylamid-Mix	2,0 ml
1 M Tris (pH 6,8)	2,5 ml
SDS (10%)	0,1 ml
APS (10%)	0,1 ml
TEMED	5 µl

Trenngel (8%, 20 ml)

H ₂ O bidest.	7,05 ml
30% Acrylamid-Mix	4,0 ml
1,5 M Tris (pH 8,8)	3,75 ml
SDS (10%)	0,15 ml
APS (10%)	0,05 ml
TEMED	5 µl

Protein-Marker: Kaleidoskope Prestained Standards (BioRad)

<i>Protein</i>	<i>Farbe</i>	<i>Molekulargewicht (kDa)</i>
Myosin	Blau	197,704
β-Galactosidase	Magenta	126,37
Bovine Serum Albumin (BSA)	Grün	81,111
Carbonanhydrase	Violett	40,286
Sojabohnentrypsininhibitor	Orange	31,273
Lysozym	Rot	17,091
Aprotinin	Blau	6,778

Tabelle 0.3 Auflistung der Proteinmarker im Kaleidoskope Prestained Standard

Antikörper

Primärantikörper

CYP1A1 (H-70): sc-20772, rabbit polyclonal IgG

200 µl/ml, Santa Cruz Biotechnology, Inc.

Der Primärantikörper ist ein aus dem Kaninchen polyklonierter Antikörper, der gegen CYP1A1 menschlichen Ursprungs gerichtet ist. Er ist einsetzbar zur Detektion von CYP1A1 aus der Maus, der Ratte und dem Menschen.

Zur Detektion im Western-Blot wird der Antikörper in einer Verdünnung von 1:1000 in TBS-T eingesetzt. Die Lagerung erfolgt bei 4°C.

MRP2: M2III-6

200 µl/ml, Alexis Biochemicals

M₂III-6 ist ein MRP2-spezifischer IgG_{2a} monoklonaler Antikörper und wurde aus einem bakteriellen Fusionsprotein gewonnen, welches den 202 Aminosäuren umfassenden Carboxyterminus des Ratten-MRP2 enthält. M₂III-6 erkennt ein internes Epitop des menschlichen und Ratten-MRP2; er zeigt keine Kreuzreaktion mit humanem MDR1, MRP1, MRP3 oder MRP5.

Der Antikörper wird in einer Verdünnung von 1:100 eingesetzt und bei 4 °C gelagert.
(Paulusma et al., 1996; Kool et al, 1997)

Sekundärantikörper:

Anti-CYP1A1 : sc-2004, goat anti-rabbit IgG-horse redich peroxidase (HRP)
200 µg/ 0,5 µl

Beim Sekundärantikörper handelt es sich um einen aus der Ziege klonierten Antikörper, der gegen das IgG aus dem Kaninchen gerichtet ist. Der Antikörper hat eine Meerrettich-Peroxidase (HRP) gekoppelt, mit der er über Chemolumineszenz detektierbar wird. Zur Detektion im Western-Blot wird dieser in einer Verdünnung von 1:2000 in TBS-T eingesetzt. Die Lagerung erfolgt bei 4°C.

Anti-MRP2 : goat anti-mouse IgG-horse redich peroxidase (H+L)

Bei diesem Sekundärantikörper handelt es sich um einen Meerrettich-Peroxidase gekoppelten Ziege-Anti-Maus-Antikörper. Der Fc-spezifische Antikörper ImmunoPure® Goat Anti-Mouse IgG (H+L) Peroxidase Conjugated (Pierce, Edmonton, Kanada) wird zur Detektion im Western-Blot in einer Verdünnung von 1 : 25 000 eingesetzt. Die Lagerung erfolgt bei 4°C.

RNA-Isolierung (Chomczynski)

GT-Lösung:

Guanidiniumthiocyanat	4 M
Natriumcitrat Dihydrat	25 mM
Natriumlaurylsarcosin	0,5 % in ddH ₂ O

bei ca. 65 °C lösen

unmittelbar vor Verwendung 0,1 M β-Mercaptoethanol zugeben

DEPC-Wasser:

Diethylpyrocarbonat	0,1 % (v/v)
---------------------	-------------

in ddH₂O, 1 h rühren und dann 24 h stehen lassen

autoklavieren

Transfektion von Plasmiden

PBS (siehe 3.2.3 Resazurinreagenzien)

HBS-Puffer (2x):

HEPES	50 mM
NaCl	280 mM
Na ₂ HPO ₄ • 2 H ₂ O	1,5 mM
pH 7,4	
Lagerung: Raumtemperatur	

Transportversuche

HTP₄-Puffer:

NaCl	128,13 mM
KCl	5,36 mM
MgSO ₄	1 mM
CaCl ₂	1,8 mM
NaHCO ₃	4,17 mM
Na ₂ HPO ₄ • 7H ₂ O	1,19 mM
Na ₂ HPO ₄ • H ₂ O	0,41 mM
HEPES	15 mM
Glucose	20 mM

pH 7,2

Lagerung: -4°C

High performance liquid chromatography (HPLC)

Um die im Transportversuch erhaltenen Proben zu vermessen, wurden in der HPLC 2 Gradienten eingesetzt.

Analysebedingungen

Säule: Luna 5 μ C18 (2) 250x4,6mm von Phenomenex

Schleife: 25 μ l

Flow: 1,2 ml/min

Detektion bei 360 und 280 nm

Fließmittel: A: Wasser/Essigsäure 98:2 (v/v)

B: Wasser/Acetonitril/Essigsäure 500:500:5

	Gradient A			Gradient B	
	A%	B%		A%	B%
0	90	10	0	90	10
30	45	55	10	45	55
45	0	100	20	0	100
50	90	10	22	90	10
53	100	0	23	0	100
56	90	10	24	90	10
60	90	10	26	0	100
			28	90	10

Tabelle 0.4 Gradientenprogramme

Quercetin : Gradient B, 360 nm

Rutin : Gradient A, 360 nm

Phloretin : Gradient B, 280 nm

Phloridzin : Gradient A, 280 nm

Geräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Autoklav	Varioklav Typ 500	H &P Labortechnik, München
Bakterienbrutschrank	Köttermann® 2737	Köttermann Labortechnik, Uetze, Hönigsen
Bakterienschüttler	TH 30/SM 30	Johanna Otto GmbH, Hechingen
Biofreezer	MDF-U6086S	Sanyo
Bakterienfilter	Celluloseacetat (0,45 µm)	Sartorius, Göttingen
Biofreezer	MDF-U6086S	Sanyo, München
Brutschrank	Heraeus B 5060 E CO ₂	Hereaus, Hanau
Chemolumineszenzdetektor	Lumilmager	Boehringer, Mannheim
Cups und Gefäße	1,5 ml Cups	Greiner bio-one, Frickenhausen
	1,5 ml UZ-Cups	Beckman, Palo Alto, CA
	15 und 50 ml Falkons	Greiner bio-one, Frickenhausen
Elektronischer Schüttler	Elmi Shaker S4	ELMI Ltd., Riga (Lettland)
Fluoreszenzspektrometer	Perkin-Elmer LS-5B	Perkin-Elmer, Überlingen
Luminometer	Lumat LB 9507	Berthold, Bad Wildbad
Mikroskop	Axiovert	Zeiss, Jena
NanoDrop	Agilent Technologies	Kisher, Steinfurt
Netzgeräte für Western Blot	Biometra Power Pack 25	Biometra, Göttingen
	BioRad Power Pac 300	BioRad, München
pH-Meter	P300 pH Meter	Beckman, München
Plattenreader	Fluoroscan Ascent FL	Labsystems

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Pipetten	Eppendorf Research Einmalpipetten (steril) 5, 10, 25 ml	Eppendorf Wesseling- Berzdorf Roth, Karlsruhe
SDS-PAGE Glasplatten	Mini-Protean II cell inner/outer glass plate	BioRad, München
Sterilbank	BSB 4A	Gelaire Flow Laboratories, Meckenheim
Thermocycler	GeneAmp PCR Sytem 9700 ICycler Genius	Perkin Elmer, Licoln (USA) BioRad, München Techne, Cambridge (UK)
Ultraschallnadelsonde	Labsonic 2000	Braun, Reutlingen
Vortex	Relax 2000	Heidolph, Frankfurt a.M.
Waagen	Sartorius BP 210 S (max. 210g d=0,1 mg) Sartorius BP 410 S (max. 410g d=0,001mg)	Sartorius, Göttingen
Wasserbad	GFL 1083	Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel
Western Blot Gelkammern	MINI PROTEAN II™	BioRad, München
Western Blot Transfer- Gerät	Hoeffer TE 77	Amersham Bioscience, San Francisco (USA)
Zentrifugen	Microfuge R Centrifuge Beckman GS-6R Centrifuge Beckman J2-21 Optima™ TL Ultracentrifuge Sorvall Discovery 90SE Sigma Laborzentrifuge 1K15	Beckman, München Beckman, München Beckman, München Beckman, München Kendro, Langenselbold Sigma, Steinheim

Tabelle 0.5 Auflistung der verwendeten Geräte und ihre Typenbezeichnung

Computerprogramme

Ascent Software for Fluoroscan 2.6 FL

GraphPad®InStat Version 3.0 for Windows

LumiAnalyst 3.1

Microsoft® Office XP

(Excel, Word)

Origin 6.0

TINA 2.0

Ascent Software

GraphPad Software Inc.

Boehringer, Mannheim

Microsoft Corporation

Microcal, Northampton, MA

Methoden

Zellbiologische Methoden

Kultivierung und Passagierung der Caco-2-Zellen

Die Caco-2-Zellen werden unter sterilen Bedingungen in Kulturflaschen im Brutschrank bei 37°C, 8 Vol% CO₂ und einer Luftfeuchtigkeit von 95% gehalten. Um Kontaminationen mit Prokaryonten zu vermeiden, werden alle Kulturmedien mit den Antibiotika Penicillin und Streptomycin versetzt.

Die Zellen werden als Monolayerkulturen für die einzelnen Versuche in Petrischalen oder Kulturflaschen kultiviert. Da von den Zellen Bestandteile des Wachstumsmediums verbraucht und Stoffwechselprodukte der Zellen in das Medium abgegeben werden, ist es nötig, in regelmäßigen Abständen das Medium zu wechseln. Dabei wird das verbrauchte Medium verworfen. Durch Spülen mit PBS werden Stoffwechselproduktreste entfernt, anschließend wird neues Medium auf die Zellen gegeben.

Wenn die Zellen in der Kultur zu dicht gewachsen sind, muss man die Zellen subkultivieren (passagieren). Um Zellen passagieren zu können, muss man sie erst vom Boden der Kulturflaschen ablösen. Dies geschieht mit einer Enzymlösung, die imstande ist, Gewebe verschiedenster Art und Herkunft in Einzelzellen zu zerlegen. Die meistgebrauchten Enzympräparationen enthalten neben Trypsin noch andere proteolytische Enzyme wie Chymotrypsin, Collagenase und Elastase. [Lindl, 1987]

Da FKS die Enzyme inaktiviert, ist es notwendig, dass das Medium vorher gründlich entfernt wird. Dazu wird zweimal mit PBS gespült und dann die Trypsinlösung auf die Zellen gegeben. Nach einer Einwirkzeit von wenigen Minuten lösen sich die Zellen von der Kulturflasche ab und der Trypsinierungsvorgang muss abgestoppt werden. Das geschieht durch Zugabe von FKS-haltigem Medium.

Nach dem Abtrypsinieren der Zellen werden die Zellen vereinzelt, 1:1 mit Trypanblau gemischt und auf eine Neubauer-Zählkammer gegeben. Die Zellen werden unter dem Mikroskop ausgezählt, wobei ein Feld (4x4) der Zählkammer einem Volumen von 0,1µl Zellsuspension entspricht.

Einfrieren der Zellen

Zur längerfristigen Lagerung können Zellen eingefroren werden. Dazu wird 1 ml der durch Abtryspinieren gewonnenen Zellsuspension mit 10% DMSO in Kryoröhrchen versetzt und sofort bei -20°C eingefroren. Nach 24 h wird die Zellsuspension bei -80°C weitergekühlt und ggf. für eine längere Lagerung in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

Auftauen von Zellen

Zur Inkulturnahme werden die Zellen so schnell wie möglich aufgetaut. Anschließend werden sie mit 10 ml DMEM-FKS-Medium verdünnt und bei 4°C 10min mit 1000 g zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und die Zellen erneut in Medium aufgenommen, vereinzelt und wieder in Kulturflaschen ausgesät. Nach 24h erfolgt ein Mediumwechsel.

Zellzahl- und Vitalitätsbestimmung

Die Zellzahlbestimmung erfolgt lichtmikroskopisch in einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer bei 10-facher Vergrößerung. Hierzu wird die Zellsuspension 1:100 in Waschpuffer verdünnt (990 µl Puffer + 10 µl Zellsuspension). Es werden 3 Felder mit jeweils 16 Kleinstquadraten ausgezählt und die Anzahl der Zellen pro Milliliter Suspension nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Zellzahl/ml} = \frac{\text{GZ} \times 80 \times 1000 \times \text{Vf}}{16}$$

GZ : durchschnittlich ausgezählte Gesamtzellzahl
80; 16 : Faktoren der Zählkammer
1000 : Umrechnungsfaktor von µl auf ml
Vf : Verdünnungsfaktor der Zellsuspension (100)

Die Bestimmung der Zellvitalität erfolgt mit dem Trypanblau-Ausschlußtest. Bei lichtmikroskopischer Betrachtung können tote Zellen durch Eindringen des blauen Farbstoffes von den ungefärbten lebenden Zellen unterschieden werden.

Hierzu wurde ein Aliquot einer 1:100 Verdünnung mit Trypanblau-Lösung im Verhältnis 1:1 versetzt. Der Quotient aus der Anzahl lebender Zellen und der Gesamtzellzahl bildet den Vitalitätsfaktor, mit dessen Hilfe durch Multiplikation mit der Zellzahl/ml die Anzahl lebender Zellen pro Milliliter Zellsuspension berechnet werden kann.

$$\text{Vitalitätsfaktor} = \frac{\text{Anzahl lebender Zellen}}{\text{Gesamtzellzahl}}$$

$$\text{Lebendzellzahl/ml} = \text{Zellzahl/ml} \times \text{Vitalitätsfaktor}$$

Kultivierung und Zellbehandlung

Die Zellen werden wie in nachfolgender Tabelle dargestellt in den verschiedenen Plattentypen kultiviert.

Plattentyp	Zellzahl	Medium	Medienwechsel nach
6 Well	100 000/ Well	2 ml/Well	2h
12 Well	500 000/ Well	1 ml/Well	2h
48 Well	100 000/ Well	500 µl/Well	2h
96 Well	50 000/ Well	200 µl/Well	2h
60 mm	1,5 Mio/ Platte	3 ml/Well	5h

Tabelle 0.6 Zellkulturbedingungen für Caco-2-Zellen

Die benötigte Gesamtmenge an Medium und Zellsuspension wird zusammenpipettiert und unter ständigem Schwenken auf die verschiedenen Plattentypen ausgesät. Die Zellbehandlung erfolgt immer 24 h nach Aussaat der Zellen. Die Platten sind zu diesem Zeitpunkt halbkonfluent, um nach der Inkubationszeit von 48h konfluente Platten zu erhalten.

Die zu inkubierenden Substanzen sind in Ethanol und DMSO angesetzt und werden im Inkubationsmedium bei einer Konzentration von 0,1% gehalten, um zytotoxische Effekte durch die Lösungsmittel auszuschließen. Die Negativ- bzw. Positivkontrollen werden unter gleichen Bedingungen gehalten. Als Negativkontrollen dienen nur mit dem Lösungsmittel behandelte Zellen, als Positivkontrolle dient bei den Zytotoxizitätsversuchen SDS (1%), bei den Transportversuchen Testosteron und in allen anderen Versuchen TCDD in einer Konzentration von 10^{-9} M.

Zellernte

EROD-Assay

Nach der Inkubation wird das Medium entfernt und 2x mit eiskalter Saline gewaschen. Pro Platte wird 1 ml eiskalter Tris/Sucrose-Puffer zugegeben. Der Zellrasen wird abgeschabt und in ein Eppendorf-Cup überführt. Nach Zentrifugation bei 4°C und 4000 g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das verbleibende Pellet in 800 µl Tris/Sucrose-Puffer resuspendiert und mittels Ultraschall für 10 sec homogenisiert. Nach Zentrifugation bei 4°C und 5000 g für 10 min wird der Überstand in UZ-Eppendorf-Cups überführt und es erfolgt eine Zentrifugation bei 4°C bei 17 500 g für 30 min. Der Überstand wird verworfen und die Pellets in 100 µl Tris/Sucrose-Puffer aufgenommen. Nach Homogenisierung werden die Lösungen bei -80°C gelagert.

Mikrosomengewinnung für den Western Blot

Die Proteinisolierung wird vollständig auf Eis durchgeführt. Zum Lösen der Zellen und Zerstörung der Zellmembranen wird Schwellpuffer verwendet, der die Proteasen-Inhibitoren Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF, Serin-Protease), Aprotinin (Serin-Protease) und Leupeptin (Cystein-Protease) enthält.

Zunächst wird das Medium abgesaugt und die 60 mm -Kulturschalen mit 0,9%-iger NaCl-Lösung gewaschen. Anschließend wird auf jede Schale 600 µl Schwellpuffer pipettiert, die Zellen mit einem Zellschaber abgekratzt und in gekühlte Eppendorf-Cups mit Schnappdeckel überführt. Danach wird bei 4000 g und 4 °C für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das erhaltene Zellpellet mit 800 µl Schwellpuffer resuspendiert. Zum Aufschließen der Zellen wird die Zellsuspension kurz (etwa 10 sec) mit einer Ultraschall-Sonde (50 W) beschallt. Die Suspension wird erneut zentrifugiert (5000 g, 4°C, 10 min.) und die überstehende Flüssigkeit in Ultrazentrifugen-Eppendorf-Cups überführt. Die Proben werden ultrazentrifugiert (100 000 g, 4°C, 30 min.) und das entstandene Pellet in 25 µl Solubilisierungspuffer (enthält PMSF, Aprotinin und Leupeptin) mit Hilfe der Ultraschall-Sonde homogenisiert. Die Aufbewahrung erfolgt bei –80 °C.

Bestimmung des Proteingehaltes

Methode nach Bradford

Die Proteinbestimmung wird in einer 96-Well-Platte durchgeführt. Zum Erstellen einer Kalibriergeraden wird eine 5 mg/ml BSA-Stammlösung so mit bidestilliertem Wasser verdünnt, dass die Konzentrationen von 0 bis 15 µg Protein/well abgedeckt werden. Zu jeder Konzentration wird eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Von der zu bestimmenden Proteinsuspension wird jeweils 3 µl Probe mit 60 µl bidest. Wasser verdünnt. 20 µl der so entstandenen Proteinprobe wird zur Dreifachbestimmung in 3 Wells aufgeteilt. Nun wird in jedes Well 200 µl einer 1:5 Verdünnung Bio-Rad Protein Assay Farbstoffkonzentrat : bidest. Wasser pipettiert und bei Raumtemperatur 20 min inkubiert. Am Platten-Reader wird danach die Absorption der Lösungen photometrisch bei 570 nm bestimmt. Aus den Absorptionen der Kalibrierlösungen wird mittels Regression eine Gerade erstellt, die für die Proben erhaltenen Werte eingesetzt und somit ihr Proteingehalt bestimmt.

µg Protein/well	µl 0,5 mg/ml BSA	µl H₂O
0	0	100

1	10	90
2	20	80
4	40	60
6	60	40
8	80	20
10	100	0
15	12 µl aus 5 mg/ml Standardlösung	68 µl aus 5 mg/ml Standardlösung

Tabelle 0.7 Pipettierschema

Methode nach Lowry

Diese Methode beruht auf der sogenannte Biuret-Reaktion, bei der die Cu^{2+} -Ionen der Lowry A-Lösung in alkalischer Lösung mit den Peptidbindungen der Proteine eine dem Biuret-Komplex ähnliche Verbindung eingehen. Der erhaltene Kupfer(II)-Protein-Komplex reduziert Molybdat(VI) bzw. Wolframat(VI) des in der Lowry B-Lösung enthaltenen Folin-Reagenzes zu Molybdat(IV) bzw. Wolframat(IV), während die Cu^{2+} -Ionen des Komplexes zu Cu^+ -Ionen übergehen. Es bildet sich ein instabiler blauer Komplex, der als Maß für die Proteinkonzentration dient.

Bei dieser Proteinbestimmung werden 5 µl Proteinlysate mit 95 µl H_2O bidest. verdünnt, die Blindprobe besteht aus 100 µl H_2O bidest. Es werden nun 100 µl 1M NaOH und 1 ml Lowry A-Lösung zugegeben und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zusatz von 100 µl Lowry B-Lösung werden weitere 30 min inkubiert. Photometrische Messung der Extinktion des gebildeten Farbkomplexes erfolgt bei 720 nm und ermöglicht die Bestimmung der Proteinkonzentration anhand folgender Gleichung:

$$\text{Proteinkonzentration } [\mu\text{g}/\mu\text{l}] = \frac{\Delta E \cdot 75 \cdot Vf}{0,1}$$

mit ΔE : gemessene Extinktion
 V_f : Verdünnungsfaktor

Dem Leerwert wird über die Autozerofunktion des Gerätes der Wert 0 zugewiesen.
Es wird jeweils eine Doppelbestimmung durchgeführt.

RNA-Isolierung

Die RNA-Isolierung aus den Caco-2-Zellen erfolgt nach der Methode von Chomczynski und Sacchi mittels Phenol-Chloroform-Extraktion [Chomczynski und Sacchi, 1987].

Die konfluenten Platten werden auf Eis zunächst zweimal mit kalter, steriler 0,9%iger Saline gewaschen. Dann wird jede Platte (60 mm) für 1 min mit 500 μ l GT-Lösung inkubiert und die Zellen von gleich behandelten Platten abgeschabt und in einem Eppendorf-Cup vereinigt. Nach Zugabe von 500 μ l Phenol, 200 μ l 2 M Natriumacetat (pH 4,0) und 100 μ l Chloroform:Isoamylalkohol (49:1) werden die Proben geschüttelt und für 20 min auf Eis belassen und anschließend für 30 min bei 5000 rpm (4000 g; Beckman J2-21) und 4 °C zentrifugiert. Die obere Phase wird in 3 ml Isopropanol überführt und die Probe nach Schütteln mindestens 1 h bei –80 °C gefällt. Danach erfolgte eine zweite Zentrifugation für 30 min bei 5000 rpm (4000 g) und 4 °C. Der erhaltene Überstand wird abgegossen und das Pellet in 300 μ l GT-Lösung aufgenommen und in ein Eppendorf-Cup überführt. Auf die Zugabe von 300 μ l Isopropanol folgt ein zweiter Fällungsschritt von mindestens 1 h bei –80 °C. Das durch 10-minütige Zentrifugation bei 14 000 rpm (17500 g) und 4 °C gewonnene Pellet wurde mit 100 μ l 70 % Ethanol versetzt, worauf eine erneute Zentrifugation von 10 min bei 14 000 rpm und 4 °C erfolgt. Anschließend wird der Überstand abgegossen, die Restflüssigkeit abpipettiert und das Eppendorf-Cup an den Rändern mit einem sterilen Wattestäbchen getrocknet. Das RNA-Pellet wird in einer geeigneten Menge (20-40 μ l) DEPC-Wasser aufgenommen und bei –20 °C gelagert. Die Konzentrationsbestimmung erfolgt mittels NanoDrop.

Molekularbiologische Methoden

Zytotoxizitätstests

Die Zytotoxizität der Flavonoide in Caco2-Zellen (ATCC: HTB 37) wird mit einem auf Tetrazolium basierenden Mikroplatten Assay ermittelt (MTT-Test). Dieser kolorimetrische Test, welcher von Mosmann 1983 entwickelt wurde, beruht auf der reduktiven Spaltung des Tetrazoliumrings von 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-Tetrazolium-Bromid (MTT) vor allem durch Reduktaseaktivitäten aktiver Mitochondrien. [Mosmann, 1983] Dies resultiert in einem Farbwechsel von einem schwach gelben zu einem intensiv violetten Formazanprodukt. Da diese Reaktion nur in lebenden Zellen stattfindet, kann durch die photometrische Bestimmung der Farbintensität auf die Anzahl lebender Zellen in einer Population geschlossen werden.

Der Alamar BlueTM –Test kann zur Messung der Zellproliferation als auch zur Messung zytotoxischer Effekte herangezogen werden. Wie auch die Reduktion der Tetrazoliumsalze beim MTT-Test beruht diese Methode auf dem Reduktionsstatus der Zelle.

Bei proliferierenden Zellen sind die Verhältnisse von NADPH/NADP⁺, FADH/FAD, FMNH/FMN und NADH/NAD⁺ im Gegensatz zu nicht-proliferierenden Zellen erhöht. Alamar BlueTM kann durch diese metabolischen Intermediate reduziert werden. Somit kann Alamar BlueTM an Stelle von molekularem Sauerstoff als Elektronenakzeptor auftreten [Biosource, 2000]

Durch die Reduktion von Alamar BlueTM kommt es zu einer messbaren Farbveränderung. Die oxidierte, blaue, nicht fluoreszierende Form (Resazurin) geht dabei in die reduzierte, pinkfarbene, fluoreszierende Form (Resorufin) über.

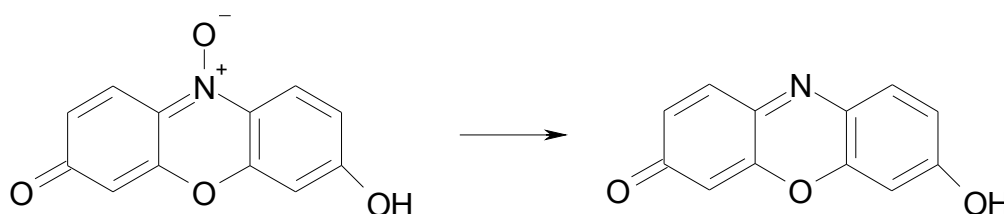


Abbildung 0.2 Resazurin und Resorufin

Man kann die Reduktion photospektrometrisch oder fluorimetrisch messen, wobei letztere Methode empfindlicher ist. Die Fluoreszenz wird bei einer Anregungswellenlänge von 544nm und einer Emissionswellenlänge von 590nm aufgezeichnet.

Bestimmung der 7-Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD)-Aktivität

Zum Nachweis der CYP1A-Aktivität wird die durch dieses Isoenzym katalysierte 7-Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) -Aktivität herangezogen. Die Reaktion beruht auf der oxidativen Dealkylierung von 7-Ethoxyresorufin (ER) zu Resorufin in Gegenwart von $\text{NADPH} + \text{H}^+$ (Nikotinamid-Adenindinukleoid-Phosphat). [Burke *et al.*, 1985].

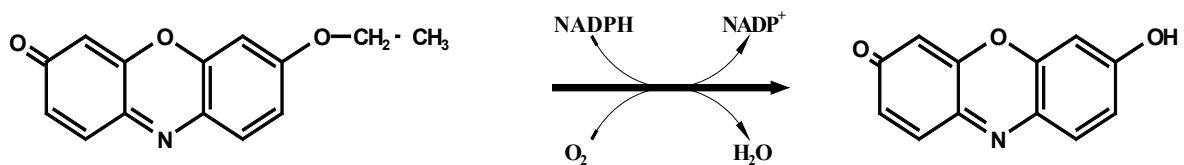


Abbildung 0.3 Oxidative Dealkylierung von 7-Ethoxyresorufin zu Resorufin

Durch Generierung eines kontinuierlich regenerierenden Redoxsystems ist die gebildete Resorufinmenge der Menge an CYP1A proportional.

Damit die EROD-Aktivität auf die Anzahl der Zellen oder den Mikrosomengehalt bezogen werden kann, wird parallel dazu die Proteinmenge fluorimetrisch bestimmt. Hierfür wird Fluorescamin (FC) verwendet. Durch die Bindung primärer Aminosäuren von Proteinen erhält man eine fluorimetrisch aktive Verbindung (Abb.3.4).

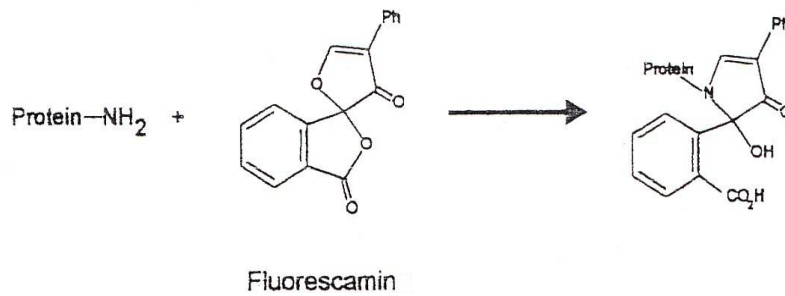


Abbildung 0.4 Reaktion von Fluorescamin mit Proteinen

Durchführung für Mikrosomen

Die von Kennedy et. al. entwickelte Methode ermöglicht eine gleichzeitige Bestimmung der EROD-Aktivität und des Proteingehaltes im Well-Format an einem Fluoreszenz-Plattenreader. [Kennedy, 1994 und 1995]

Die Bestimmung der spezifischen EROD-Aktivität erfolgt modifiziert nach Kennedy et. al. (1994) auf einer 96-Well-Platte anhand einer Resorufin (Res)-Kalibriergeraden. Parallel zur Messung der Resorufingehalte der Proben wird eine Fluorescamin (FC)-Messung durchgeführt und mit Hilfe einer BSA-Kalibriergeradengeraden der Proteingehalt der Probe bestimmt. Die Mikrosomen werden nach der Isolierung auf eine 96 Well-Platte in den vorgelegten NaPi-Puffer pipettiert. Anschließend erfolgt eine 30 minütige Präinkubation im Dunkeln bei 37°C mit den zu untersuchenden Substanzen.

	NaP _i - Puffer [μl]	ER [μl]	NADPH [μl]	BSA [μl]	Res [μl]	FC [μl]
Blank	85	30	-	-	-	90
Standard 1	70	30	15	-	-	90
Standard 2 20 μg Protein/Well 7 pmol Res/Well	63,5	30	15	5,9	0,6	90
Standard 3 40 μg Protein/Well 28 pmol Res/Well	56	30	15	11,7	2,3	90
Standard 4 60 μg Protein/Well 84 pmol/Well	45,4	30	15	17,6	7,0	90
Standard 5 80 μg Protein/Well 133 pmol/Well	35,5	30	15	23,4	11,1	90
Standard 6 100 μg Protein/Well 175 pmol/Well	26,1	30	15	29,3	14,6	90
Probe	70	30	15	-	-	90

Tabelle 0.8 Pipettierschema zur Bestimmung der EROD-Aktivität 96-Well

Der Reaktionsstart mit NADPH erfolgt im Gerät über Zugabe der Lösung durch einen Dispenser. Die Inkubationszeit bei 37°C beträgt 8 min. Danach wird ebenfalls über einen Dispenser die Fluorescamin-Stopplösung zugegeben.

Die Messung der Resorufin-Fluoreszenz erfolgt bei einer Exzitationswellenlänge (Ex) von 544 nm und einer Emissionswellenlänge (Em) von 590 nm, die Werte für Fluorescamin wurden bei den Wellenlängen 390 nm (Ex) und 460 nm (Em) ermittelt.

Aus den Blanks wurde der Mittelwert der Resorufin-Fluoreszenz gebildet und von den Fluoreszenzwerten der gemessenen Mikrosomen abgezogen. Die Blanks erfassen die CYP-unabhängigen Zerfälle von 7-ER.

Die spezifische EROD-Aktivität wird folgendermaßen berechnet:

$$\text{spezifische Aktivität [pmol Resorufin/min x mg Protein]} = \frac{\text{pmol Resorufin pro Well}}{8 \text{ min x mg Protein pro Well}}$$

Durchführung in Lebendzellen

Die Zellen werden auf 48-Well-Platten ausgesät und nach der 48h-Inkubationszeit mit den Substanzen wird das Medium abgesaugt, die Platten dreimal mit PBS gespült und bei -20°C eingefroren. Durch wiederholtes Auftauen und wieder Einfrieren werden die Zellen gecrackt. Vor der Messung werden anhand des in Tab. 3.5 gezeigten Pipettierschemas die 48-Well-Platten mit NaPi-Puffer und Ethoxyresorufin-Lösung befüllt.

	NaP_i- Puffer [μl]	ER [μl]	NADPH [μl]	BSA [μl]	Res [μl]	FC [μl]
Blank	150	50	-	-	-	150
Standard 1	125	50	25	-	-	150
Standard 2 20 μg Protein/Well 7 pmol Res/Well	114	50	25	10	1	150
Standard 3 40 μg Protein/Well 28 pmol Res/Well	101	50	25	20	4	150
Standard 4 60 μg Protein/Well 84 pmol/Well	83	50	25	30	12	150
Standard 5 80 μg Protein/Well 133 pmol/Well	66	50	25	40	19	150
Standard 6 100 μg Protein/Well 175 pmol/Well	50	50	25	50	25	150
Probe	125	50	25	-	-	150

Tabelle 0.9 Pipettierschema zur Bestimmung der EROD-Aktivität 48-Well

Die Substanzen werden 10 min bei 37 °C vorinkubiert. Der Reaktionsstart erfolgt durch Zugabe von NADPH über einen Dispenser. Die Inkubationszeit beträgt 8 min bei 37 °C. Durch Zugabe der Fluorescamin-Lösung über Dispenser wird die Reaktion anschließend gestoppt.

Die spezifische EROD-Aktivität wird analog zu der Berechnung in Mikrosomen durchgeführt.

Real Time PCR

Bei der Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR) handelt es sich um eine Methode zur gezielten Vervielfältigung eines spezifischen DNA-Fragments. Sie basiert darauf, dass drei Reaktionsschritte vielfach wiederholt ablaufen: Der Reaktionsansatz mit Doppelstrang-DNA mit der gesuchten Sequenz als Matrize wird bei 95°C denaturiert und in die beiden Einzelstränge aufgespalten. Bei Abkühlen auf die Schmelztemperatur des Primers hybridisieren die im Überschuss zugesetzten Primer (synthetische Oligonucleotide mit zum Anfang und Ende des gesuchten DNA-Abschnitts komplementären Sequenzen) mit den komplementären Basen-Sequenzen auf der Matrizen-DNA, so dass die doppelsträngige DNA nicht reassoziieren kann. Der gesuchte DNA-Abschnitt ist nun durch die beiden Primer genau umgrenzt. Beim dritten Reaktionsschritt wird die Temperatur auf das Optimum der hitzestabilen DNA-Polymerase aus *Thermus aquaticus* gebracht (72°C). Ausgehend von den Primern baut die Polymerase Kopien der Ausgangs-DNA auf, wobei die Länge der zu duplizierenden DNA durch den Abstand zwischen den Primern bestimmt ist. Wird das Gemisch erneut auf 95°C erhitzt, so denaturiert die neugebildete Doppelstrang-DNA, der Prozess wird neu durchlaufen [Falbe und Regitz, 1995].

RT-PCR

Bei der RT-PCR handelt es sich um eine Methode zur Amplifikation von RNA. Hierzu muss die RNA zunächst in DNA umgeschrieben werden, da die Ausgangs-RNA nicht direkt als Matrize von der Taq-Polymerase genutzt werden kann. Dies geschieht mit Hilfe von Enzymen, die als Reverse Transkriptasen (RTasen) bezeichnet werden. Dem Reaktionsansatz wird ein Oligo-dT-Primer, eine Nukleotidabfolge von 15 dTs, zugesetzt, welcher spezifisch an den poly(A)-Schwanz von mRNA bindet, wodurch diese in cDNA umgeschrieben wird. [Lottspeich und Zorbas, 1998]

Reagenz	Volumen [μ l]
RNA (100 ng/ μ l)	x
PCR-H ₂ O	10-x
Anchored oligo dT	1
Random Primer	1
dNTP mix	2
5x First Strand Synthesis Buffer	4
Reverse IT	1
DTT (100mM)	1
Endvolumen	20

Tabelle 0.10 Bedingungen für die Reverse Transkription

Vorgang	Primer-Annealing	reverse Transkription	Enzymdenaturierung
Temperatur [$^{\circ}$ C]	23	42	95
Zeit [min]	10	60	5

Tabelle 0.11 Thermocycler-Programm RT-PCR

Die durch die Reverse Transkription gewonnene cDNA wird mittels einer PCR amplifiziert. Die beiden interessierenden Gene werden in verschiedenen Experimenten gemessen, wobei bei jeder Messung das Housekeeping Gen hGAPDH mitgeführt wird. Für die Real Time PCR Reaktion wird pro Durchgang je ein Mastermix für das jeweilige Gen, in dem die entsprechenden, vorher validierten, sense- und antisense Primer zugesetzt werden, angesetzt. In einem PCR-Cup werden Mastermix und die cDNA zu einem Endvolumen von 25 µl hinzupipettiert. Die Mastermix-Ansätze sind in Tabelle 3.11 zusammengestellt, die verwendeten Primer für die Enzyme MRP2 und CYP1A1 [Grube, 2004], sowie das Housekeeping Gen hGAPDH [Kim, 2004] sind in Tabelle 3.12 aufgeführt.

Reagenz	Mastermix hMRP2/hGAPDH [µl]	Mastermix hCYP1A1/hGAPDH [µl]	Mastermix Blank [µl]
SYBR Green	12,5	12,5	12,5
Primer sense (10µM)	1	1	1
Primer antisense (10µM)	1	1	1
Nuklease freies H ₂ O	7,5	8	10,5
Endvolumen	22	22,5	25
cDNA	3	2,5	

Tabelle 0.12 PCR-Bedingungen

Verwendete Primer:

hMRP2-Primer 5'-CTG GGA ACA TGA TTC GGA AGC-3'

(forward): (bp 101)
hMRP2-Primer 5'-GAG GAT TTC CCA GAG CCG AC-3'
(reverse): (bp 101)
hCYP1A1-Primer 5'-CCA TCC CCC ACA GCA CAA CAA GA-3'
(forward): (bp 122)
hCYP1A1-Primer 5'-CAG ATG GGT TGA CCC ATA GCT TCT-3'
(reverse): (bp 122)
hGAPDH-Primer 5'-TGC ACC ACC AAC TGC TTA GC-3'
(forward): (bp 86)
hGAPDH-Primer 5'-GGC ATG GAC TGT GGT CAT GAG-3'
(reverse): (bp 86)

Schritt	Zyklus	Temperatur [°C]	Zeit [min]
1	1x	95	15
2	40x	95	1
		54 für hMRP2	1
		52 für hCYP1A1	
		72	1
3	1x	95	1
4	1x	55	1
5	80x	55 (+0,5 nach jedem Zyklus)	0,1
6	1x	4	∞

Tabelle 0.13 Thermocycler-Programm

Primervalidierung

Um die PCR-Effizienz bestimmen zu können, müssen die Primer zunächst validiert werden. Dazu wird eine Verdünnungsreihe mit einer cDNA einer Positivkontrolle, im Falle von CYP1A1 beispielsweise DNA aus mit TCDD inkubierten Zellen, hergestellt. Dabei wird die cDNA (100 ng/µl) bis zu einer Verdünnung von 1:10 000 verwendet.

Aus der Verdünnungsreihe erhält man eine Standardkurve, in der die Menge an cDNA gegen die Zykluszahl logarithmisch aufgetragen werden. Aus dieser Kurve wird die Effizienz der Primer ermittelt, die optimalerweise bei 100% liegen sollte, was in der Praxis allerdings so gut wie nie erreicht wird. [Pfaffl, 2004]

Quantifizierungskurve

Bei der PCR handelt sich um eine exponentielle Amplifikation, d.h. in jedem Zyklus wird die Menge des gesuchten Gens verdoppelt. Zur quantitativen Analyse wird eine Quantifizierungskurve erstellt. Die PCR-Produkte werden durch Fluoreszenz detektiert, indem SYBR Green dem Ausgangsprodukt als fluoreszierender Farbstoff zugesetzt wird. Dieser interkaliert mit der dsDNA und steigert dabei seinen Fluoreszenzfaktor. [Wilhelm & Pingoud, 2003]

Dadurch wird eine lineare Korrelation der Amplifikationskonzentration mit der Fluoreszenzintensität erzeugt, was eine Quantifizierung über alle Zyklen ermöglicht. Um Artefaktbildung auszuschließen, die dadurch entstehen kann, dass SYBR Green unspezifisch bindet, wird eine Schmelzkurve nach jedem Experiment erstellt. Diese besteht aus der Initialphase, in der noch keine Produktakkumulierung gemessen wird, über eine anschließende exponentielle Phase erreicht man gegen Ende eine Sättigungs-Phase. In der exponentiellen Phase erfolgt die Quantifizierung. [Becker-Follmann & Baas, 2004]

Als Maß für die Quantifizierung werden sogenannte Crossing Points (CPs) herangezogen. Sie entsprechen der Anzahl der Zyklen, die benötigt werden, um ein konstant definiertes Fluoreszenzniveau zu erreichen, das heißt an diesen Punkten befindet sich überall die gleiche an Menge an neu synthetisierter DNA. [Pfaffl, 2004]

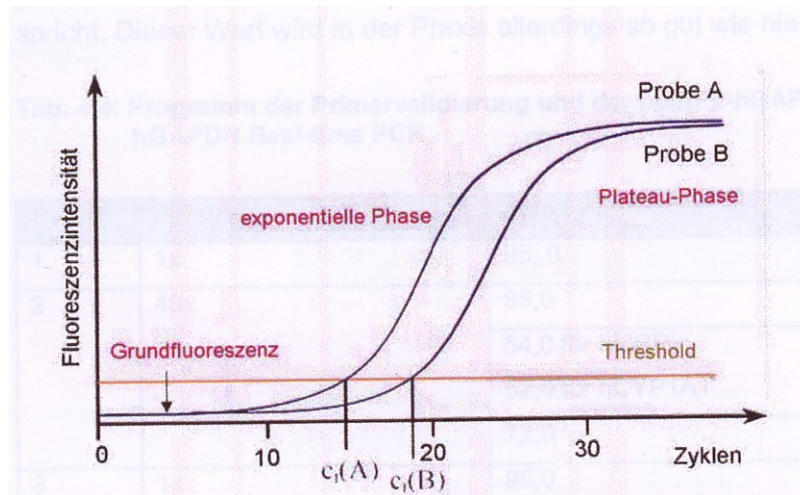


Abbildung 0.5 Schematische Darstellung eines Real-Time PCR-Experimentes [nach Becker-Follmann & Baas, 2004]

Auswertung der Real Time PCR

Zur Auswertung der PCR wird das sogenannte Quantifizierungsmodell nach Pfaffl herangezogen, das zur Zeit als genaueste Methode angesehen wird. Die Ratio der relativen Expression des Zielgens berechnet sich aus den Effizienzen und der CP Abweichung der Probe gegen die Kontrolle und wird im Verhältnis zum Referenzgen nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Ratio} = \frac{(E_{\text{Zielgen}})^{dCP_{\text{Zielgen}}(MW_{\text{Kontrolle}}-MW_{\text{Probe}})}}{(E_{\text{Referenzgen}})^{dCP_{\text{Referenzgen}}(MW_{\text{Kontrolle}}-MW_{\text{Probe}})}}$$

Als Referenzgen dient hier GAPDH (Glycerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenase), die in den Zellen vorhanden und stabil ist und nicht reguliert wird.

Western Blot Analyse

Bei der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wandern Proteine durch ein stark vernetztes Polyacrylamid-Gel. Dieses wird kurz vor Gebrauch aus Monomeren hergestellt, wobei die Porengröße so gewählt wird, dass die Poren klein genug sind, die Wanderung der gesuchten Proteine zu verzögern. Die Proteine befinden sich in einem Medium, welches das starke, negativ geladene Detergenz SDS (Natriumdodecylsulfat) sowie das Reduktionsmittel Mercaptoethanol enthält, so dass S-S-Brücken gelöst werden und die Proteine als gestreckte Polypeptidketten vorliegen. Alle Proteine wandern nun durch die assoziierten SDS-Moleküle zur Kathode; die Wanderungsgeschwindigkeit wird allein durch die Molekülgröße bestimmt [Alberts et al., 1995].

Bei der diskontinuierlichen Gelelektrophorese werden zwei Gele unterschiedlicher Gerdichte und unterschiedlichen pH-Werts übereinander polymerisiert. Dadurch resultieren schärfere Banden.

Nach der elektrophoretischen Auftrennung werden die immer noch negativ geladenen Proteine auf eine **Polyvinylidendifluorid** (PVDF)-Membran, die zwischen Gel und Anode gelegt wird, transferiert. Die Membran besitzt Poren, die kleine Moleküle passieren lassen und den Stromfluss ermöglichen, jedoch große Moleküle wie die Proteine zurückhalten. Die Proteine bleiben durch hydrophobe Wechselwirkungen dauerhaft an der Membran haften.

Auf der Membran sind die Proteine nun für Antikörper zugänglich, was zur Detektion genutzt werden kann.

Zunächst wird verhindert, dass der Antikörper in unspezifischer Weise auf der Membran bindet, was ein hohes Hintergrundsignal zur Folge hätte, indem unspezifische Bindungsstellen mit einer Blockierungslösung abdeckt werden. Dann kann die Membran mit einem für das Protein spezifischen Primär-Antikörper inkubiert werden. Dieser wiederum wird mit einem Sekundär-Antikörper gekoppelt. Um das Ergebnis dieses Vorgangs sichtbar zu machen, ist an den Sekundär-Antikörper ein Enzym chemisch gekoppelt. Die Inkubation der Western Blot-Membran mit dem Substrat dieses Enzyms ermöglicht die Enzymreaktion selektiv an den Stellen, wo Antikörper und damit Protein gebunden ist. Durch Chemolumineszenz, die mit Hilfe eines Röntgenfilms sichtbar gemacht werden kann, ist es somit möglich, spezifisch an den Stellen des Proteins eine Bande zu detektieren.

Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung der Proteine erfolgt durch diskontinuierliche Gelelektrophorese mit Trenn- und Sammelgel (Rezepturen siehe 3.2.7 und 3.2.8)

Für den Gellauf wird die durch die vorangegangene Proteinbestimmung ermittelte Proteinmenge (25 µg/µl) mit bidestilliertem Wasser auf 9 µl aufgefüllt, so dass gleiche Mengen an Protein erreicht werden. Anschließend wird die Probe mit 7 µl 3× Lämmli-Puffer versetzt. Die Gele wurden mit 3 µl Marker (SDS-Page Standards Low Range, Bio Rad) und dem gesamten Probenansatz beladen. Die Elektrophorese erfolgt zunächst bei 75 V, bis die Proteine das Trenngel erreicht haben und wird dann bei 150 V fortgesetzt, bis die Bromphenolblau-Lauffront das Gelende erreicht hat.

Semi dry blot

Das Proteingemisch, das mittels SDS-PAGE aufgetrennt worden ist, wird nun elektrophoretisch auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran übertragen, weil die Detektion mittels Antikörper empfindlicher ist. Der Transfer der Proteine aus dem Gel auf die Membran, die sich durch eine hohe Proteinbindungsaffinität auszeichnet, wird als Western-Blot bezeichnet. Als Transfertechnik wird ein Semi dry-Blotting gewählt, da es sich bei CYP1A1 eher um ein kleines Protein handelt (58 kDa). Die Blotting-Apparatur besteht aus zwei horizontalen Graphitplatten. Dazwischen werden Gel und Membran, die wiederum zwischen mit Puffer getränkten Filterpapieren gebettet sind, gelegt. Durch diesen Aufbau entsteht ein Ionengradient, der den Proteintransfer erleichtert.

Auf der Anodenplatte beginnend, sieht der Aufbau wie folgt aus:

1. Anode mit Anodenpuffer I benetzt
2. Filterpapier in Anodenpuffer I äquilibriert
3. zwei Filterpapiere in Anodenpuffer II äquilibriert
4. Membran, die in Methanol gespült und in Anodenpuffer II äquilibriert wurde
5. Gel in Kathodenpuffer äquilibriert
6. drei Filterpapiere in Kathodenpuffer äquilibriert

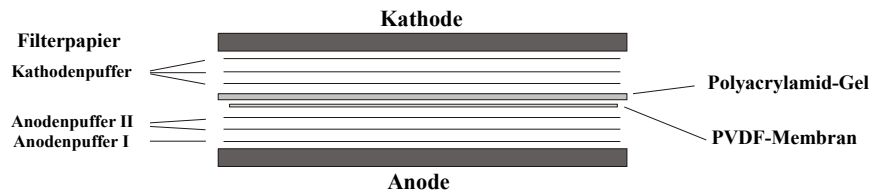


Abbildung 0.6 Schematische Darstellung des Proteintransfers mit dem ‚semi-dry-Blotting‘

Der Blot wurde 60 min bei 50 mA/Gel durchgeführt.

Tank Blot

Das SDS-Gel wird nach der Elektrophorese für 10 Minuten im vorgekühlten Transferpuffer getränkt, bevor es luftblasenfrei auf der verwendeten PVDF-Transfermembran (Immobilon™-P, Millipore) platziert wird. Diese wird zuvor für 10 Sekunden in Methanol geschwenkt, dann für 30 Sekunden in Aqua bidest. gewaschen und anschließend für mindestens 10 Minuten im Transferpuffer äquilibriert. Die Platzierung des Systems in einer Blot-Kassette ermöglicht einen engen und stabilen Kontakt zwischen Gel und Membran, welcher durch in Transferpuffer eingeweichte Filterpapiere und Fiberpads noch verbessert wird. Eventuell vorhandene Luftblasen werden vor dem Blotten aus dem System entfernt. Das Blotten selbst erfolgt unter Verwendung eines internen (Kühlakku) und externen Kühlsystems (Eisbad), um einer Erwärmung des Puffers und einem Anschwellen der Gele vorzubeugen [Dunbar, 1994], bei konstanten 100 V über 1 h und 15 min (Mini Protean II™, BioRad).

Von der Kathodenseite beginnend, sieht der Aufbau wie folgt aus:

1. Fiberpad
2. zwei Filterpapiere
3. Gel
4. Membran
5. zwei Filterpapiere
6. Fiberpad

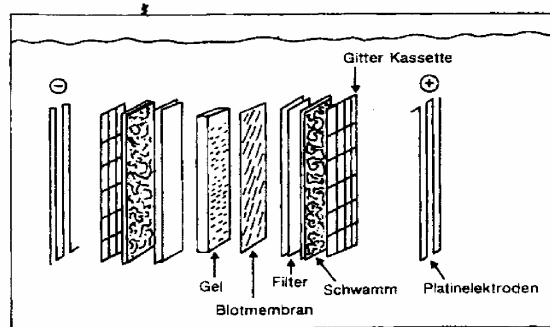


Abbildung 0.7 Schematische Darstellung des Proteintransfers mit dem ‚Tank-Blotting‘

Immunoblot

Nach abgeschlossenem Transfer, wird die Membran zweimal 5 min mit TBS-T gewaschen und für 4 h in eine 4 %ige Magermilchlösung gelegt, um die unbesetzten Bindungsstellen zu blockieren. Danach wird die Membran dreimal 5 min mit TBS-T gewaschen. Über Nacht wird nun der entsprechende Primärantikörper aufgetragen. Daran schießt sich erneut ein Waschvorgang an, bevor der Sekundärantikörper für 1 h aufgetragen wird. Beide Antikörper sind gegen Ratte gerichtet und mit Meerrettich-Peroxidase (HRP) gekoppelt, was eine Detektion mittels Chemilumineszenz ermöglicht. Die Detektion erfolgt unter Verwendung des ECL Renaissance-Chemiluminescence Blotting Substrate-Kits (Perkin Elmer) [Durrant, 1990 ; Rosewell und White, 1978].

Die Membran wird noch dreimal 5 min mit TBS-T gewaschen, bevor die Detektion am Lumi Imager erfolgt.

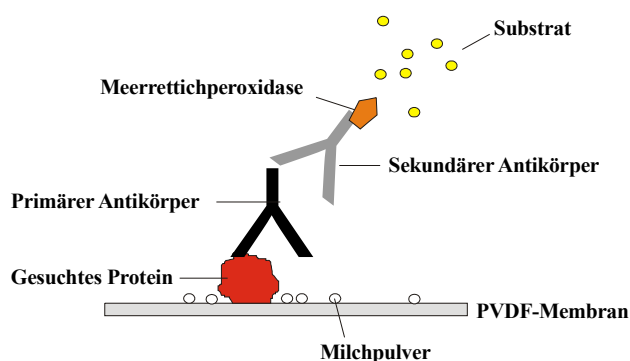


Abbildung 0.8 Schematische Darstellung des Immunoblots

Die Bandenintensitäten wurden mit Hilfe der Software TINA 2.0 quantifiziert.

Strippen von Membranen

Die Membran wird nach beendetem Western-Blot 4 x 5 Minuten in TBS-T gewaschen und dann für 30 Minuten bei 52 °C (Wasserbad) in 20 ml Stripping-Puffer gestrippt. Anschließend wird die Membran 6 x 5 Minuten in 1 x TBS-T gewaschen und dann einer ECL-Detektion unterworfen, um sicherzustellen, dass das ursprüngliche Signal vollständig beseitigt ist. Nach erneutem Waschen von 4 x 5 Minuten in 1 x TBS-T ist die Membran zu einem erneuten Immuno-Blot, beginnend mit dem Blockierschritt, bereit (vgl. 3.3.2.4.4).

Transfektion der Caco-2-Zellen mit einem Reportergenplasmid

Die Transfektion erfolgte mittels der Calciumphosphat-Kopräzipitationsmethode in Anlehnung an eine Vorschrift der Firma Promega [Doyle, 1996].

Herstellung Kalziumchlorid-kompetenter Bakterien

Zur Gewinnung Kalziumchlorid-kompetenter Bakterien werden XL-10 Gold-Zellen aus dem `QuikChange™ XL Site-Directed Mutagenesis Kit' von Stratagene verwendet. 145 µl Zellsuspension werden in 5 ml 2YT-Medium (ohne Antibiotikum) über Nacht bei 37 °C und ca. 160 rpm inkubiert. 1 ml dieser Vorkultur wird in 500 ml frisch autoklaviertes 2YT-Medium überführt und solange inkubiert, bis eine Extinktion bei 600 nm von 0,5 OD erreicht ist. Die Kulturen werden bei 4 °C und 1200g (Beckman J2-21) 5 min zentrifugiert. Das Pellet wird in 50 ml kalter 0,1 M CaCl₂-

Lösung resuspendiert. Nach 20-minütiger Inkubation auf Eis wird wie vorher beschrieben zentrifugiert, der Überstand abdekantiert und die Bakterien in 5 ml kalter 0,1 M CaCl₂-Lösung und 6 ml 40 % Glycerin resuspendiert und Aliquote hergestellt. Die Lagerung erfolgt bei –80°C.

Transformation eines Reportergenplasmids in kompetente Zellen

Bei Verwendung CaCl₂-kompetenter Bakterien wie den XL-10 Gold-Zellen wird die Transformation wie folgt durchgeführt:

10 ng Plasmid oder 10 µl Ligationsansatz werden mit 100 µl kompetenter Zellen vermischt und nach Zugabe von 900 µl 0,1 M CaCl₂-Lösung für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock bei 42 °C für 1 min wird der Ansatz 2-3 min auf Eis gehalten, bevor bei 6000 rpm (3200 g; Microfuge[®] R Centrifuge) zentrifugiert wird. In 300 µl 2YT-Medium wird das Pellet resuspendiert. Nach Inkubation der Zellsuspension bei 37 °C für 10 min im Bakterienschüttler, werden die Zellen mit einem ausgeglühten Drigalski-Spatel auf Antibiotika-haltigen LB-Agarplatten ausgestrichen. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Es wachsen hierbei nur Kolonien, die das Antibiotikaresistenz-vermittelnde Plasmid enthalten.

Gewinnung der Plasmide

Plasmidhaltige Kolonien, die das gewünschte Insert enthalten, werden mit einer sterilen Pipettenspitze gepickt und in 5 ml Antibiotika-haltiges LB-Medium transferiert. Der Ansatz wird bei 37 °C und 200 rpm über Nacht im Schikanekolben im Bakterienschüttler inkubiert. Anschließend erfolgt die Plasmidisolierung mit dem Gen Elute[™] Endotoxin-free Plasmid Maxiprep Kit (Sigma, Deisenhofen) wobei bei der Isolierung gemäß den Vorgaben des Herstellers vorgegangen wird.

Zur Lagerung plasmidhaltiger Bakterien werden Glycerinstocks aus der Vorkultur hergestellt, wobei 225 µl Glycerin und 1 ml der Vorkultur gut gemischt bei -80°C gelagert werden.

Die Quantifizierung der Plasmid-DNA erfolgt durch simultane Extinktionsmessung bei 260 und 280 nm.

Durchführung der Transfektion

Der verwendete pGL3-Enhancer-Vektor (Promega) enthält ein modifiziertes firefly Luciferase Gen (luc^+), vor dem eine `multiple cloning site` (MCS) lokalisiert ist. Zusätzlich vermittelt dieser Vektor eine Ampicillin-Resistenz und enthält einen SV40-Enhancer, um die Wirkung einer insertierten Promotor-Sequenz zu verstärken (s. Abbildung).

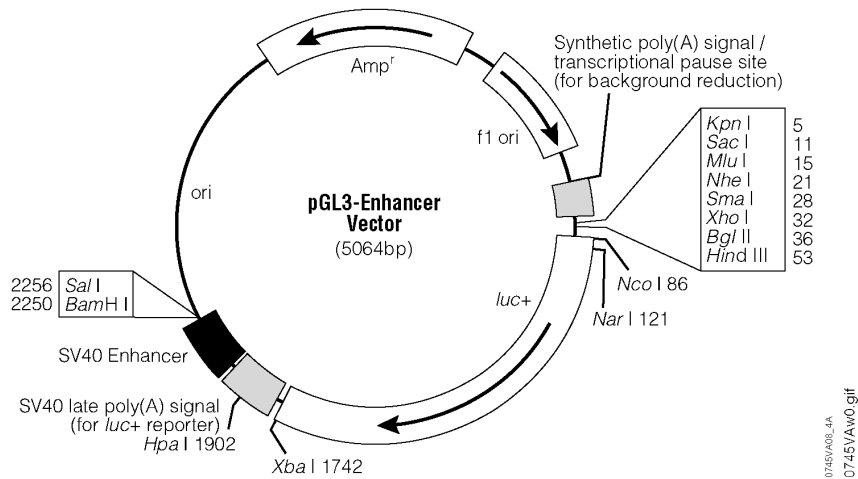


Abbildung 0.9 Plasmid-Karte von pGL3-Enhancer (Promega)

Neben dem Reportergenplasmid, welches eine `firefly' (*Photinus pyralis*) Luciferase exprimiert, wird zur internen Kontrolle und Standardisierung das Ampicillin-Resistenz vermittelnde Plasmid pRL-SV40 (Promega), das das Enzym `renilla' (*Renilla reniformis*) Luciferase konstitutiv unter Kontrolle eines SV40-Promotors exprimiert, kotransfiziert. Das Mengenverhältnis der beiden Plasmide bei der Transfektion wird so gewählt, dass die luminometrisch bestimmbare Aktivitäten von Reportergen-Produkt und Kontrollgen-Produkt etwa die gleiche Größenordnung aufweisen.

Einen Tag vor der Transfektion werden 6-Well-Platten in Kulturmedium gleichmäßig ausgesät (ca. 100 000 Zellen/Well). Jeder Versuchsansatz (Reportergen-Konstrukt bzw. Behandlungsreagenz) wird als Duplikat durchgeführt.

Für einen Transfektionsansatz werden jeweils gleiche Volumina an Plasmid-Lösung und 2x HBS-Puffer in separaten sterilen 50 ml-Röhrchen vorgelegt, wobei das Volumen für eine Platte je 500 µl beträgt.

Für einen Transfektionsansatz (eine Platte) setzte sich die Plasmid-Lösung wie folgt zusammen:

2 M CaCl ₂ -Lösung (autoklaviert)	37 µl
Reportergen-Konstrukt	5 µg
Kontrollplasmid pRL-SV40	1 µg
Aqua bidest. (autoklaviert)	ad 300 µl

Die vorbereitete Plasmid-Lösung wird langsam (tropfenweise) in den HBS-Puffer einpipettiert, während dieser ständig gevortext wird. Dadurch bildet sich ein fein verteiltes Kalziumphosphat-DNA-Kopräzipitat. Nach 30-minütiger Inkubation der Ansätze bei Raumtemperatur werden je 500 µl dieser Lösung tropfenweise auf eine Platte pipettiert. Danach werden die Platten für 7 h im Brutschrank inkubiert und anschließend das Medium gewechselt (2,5 ml). Zu diesem Zeitpunkt erfolgt auch die Behandlung der Zellen mit den zu untersuchenden Substanzen. Nach 48-stündiger Inkubation im Brutschrank erfolgt die Zellernte.

Reportergen-Assay

Die unterschiedlichen Enzymstrukturen und Substratansprüche der firefly Luciferase des Reportergens und der Renilla Luciferase des Kontrollplamids machen ihre Bestimmung nacheinander in einem Reaktionsansatz unter Verwendung des 'Dual-Luciferase[®] Reporter Assay System' (Promega) möglich.

Zunächst wird durch Zusatz eines Reaktionsmixes (Luciferase Reagent II) Luciferin durch die firefly Luciferase in einer ATP, Mg²⁺ und O₂ abhängigen Reaktion unter Lichtemission oxidiert. Nach der Messung dieser Lichtemission wird die firefly Luciferase-abhängige Reaktion durch Zugabe des Stop&Glo[®] Reagenz blockiert und gleichzeitig die Renilla Luciferase aktiviert. Hierbei wird Coelenterazin unter Lichtemission oxidiert. Die Vorgänge sind in Abbildung 3.10 dargestellt.

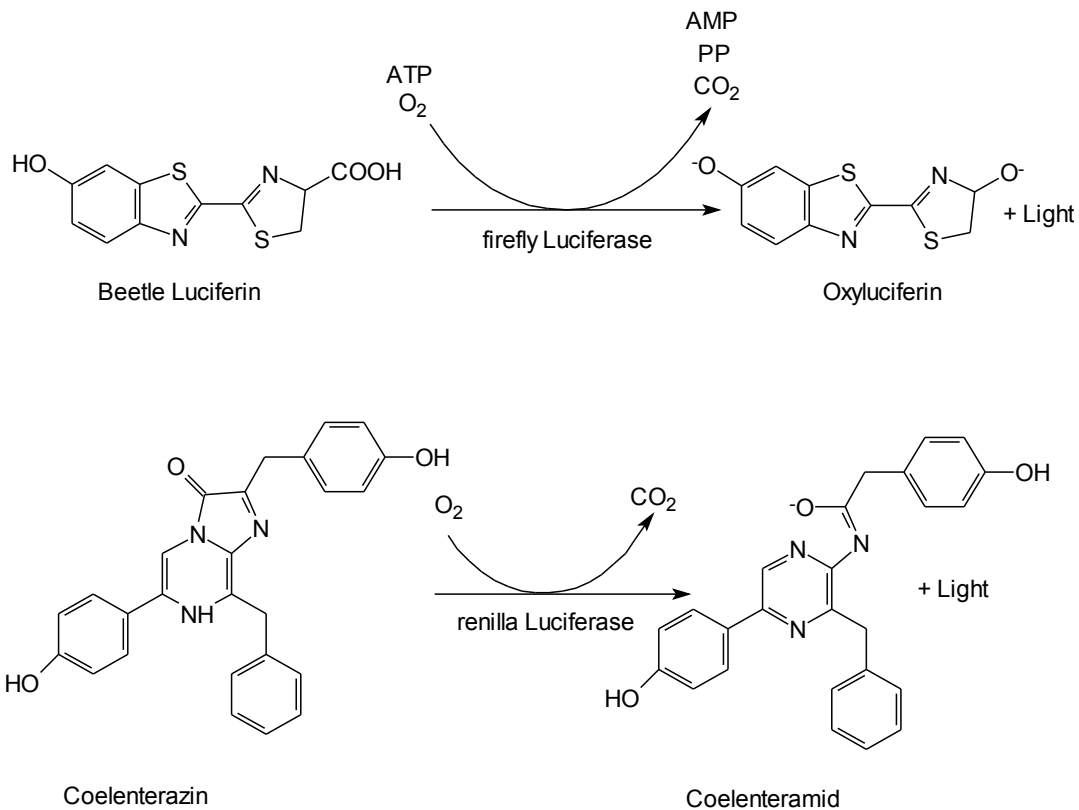


Abbildung 0.10 Luciferase-Reaktionen (modifiziert nach Technical Manual: 'Dual-Luciferase[®] Reporter Assay System'; Promega, Mannheim)

Nach der Inkubationszeit wird das Medium entfernt und die Zellen 2x mit kaltem PBS-Puffer gewaschen. Die Zellyse erfolgte durch Zugabe von 300 µl 1x Passive Lysis Buffer (Promega) pro Platte. Die Zellen wurden mit Einmal-Zellschabern von der Platte abgenommen und die Lysate bei 13 000 rpm (10 000 g) (Microfuge[®] R Centrifuge) für eine Minute zentrifugiert.

Je 20 µl der Überstände in einem Luminometerröhrchen (Sarstedt) vorgelegt. Durch Vermischen mit 95 µl Luciferase Assay Reagent II wurde die Lichtemission (Reporter-Gen-Aktivität) ermöglicht und sofort in einem Luminometer mit einer Messzeit von 10 sec gemessen. Anschließend wurden 95 µl Stop&Glo[®] Reagenz zupipettiert und die Lichtemission in gleicher Weise umgehend gemessen (Kontrollgen-Aktivität).

Zur Auswertung der Messergebnisse wurden die Reporter-Gen-Aktivitäten jedes Lysats auf die zugehörige Kontrollgen-Aktivität durch Quotientenbildung normiert.

Transportversuche

Die Transportstudien werden am bipolaren Caco2-Zellsystem durchgeführt. Dabei werden die Zellen auf permeablen Carbonatmembranen kultiviert und wachsen zu konfluenten Monolayern heran, die die charakteristischen Eigenschaften von transportierenden, polarisierten Epithelien besitzen. Für die Nutzung der Caco2-Monolayer als Permeabilitätsmodell werden die Zellen in 12mm Transwell-Kammern (Corning Costar) mit Polycarbonatmembranen (Porendurchmesser 3µm) 19-21 Tage unter den gleichen Bedingungen wie die üblichen Caco2-Kulturen in der elektrischen Widerstand (TEER) bestimmt.

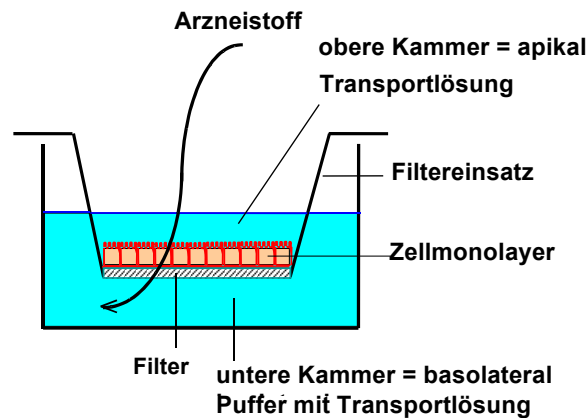


Abbildung 0.11 Modell des Transportversuches

Es werden sowohl auf der apikalen als auch auf der basolateralen Seite jeweils nach 60 und 120 Minuten Proben genommen. Dazu wird in apikal-basolateraler-Richtung 600 µl Transportlösung (HTP₄-Puffer + Substanz) in die vom Medium befreiten Filter gegeben und in die Platte 1,5 ml Receiverlösung (HTP₄-Puffer + 0,02% BSA) vorgelegt. Nach einer 25 minütigen Vorinkubation wird aus dem Filter 100 µl als Wiederfindungswert entnommen. Nach 60 min im Schüttelwasserbad bei 37°C werden die Filter in eine neue Platte gesetzt, in der schon Receiverlösung (HTP₄-Puffer + 0,02% BSA) vorgelegt ist, und wieder 60 min inkubiert. Aus der 60er und 120er Platte werden jeweils aus der unteren Kammer 500 µl Lösung zum Vermessen entnommen. Nach 120 min wird aus der apikalen Seite noch einmal 100 µl entnommen.

In basolateral-apikaler-Richtung wird die Transportlösung in die untere Kammer vorgelegt (1,6 ml) und auf die Filter jeweils 500 µl Receiverlösung gegeben. Auch hier wird nach einer 25 minütigen Vorinkubation 100 µl aus der unteren Kammer entnommen. Nach 60 bzw 120 min werden jeweils aus dem Filter 300 µl entnommen und auf die Filter wieder neue Receiverlösung gegeben. Nach 120 min wird auch hier wieder 100 µl aus der unteren Kammer entnommen.

Man kann dann den Permeabilitätskoeffizienten wie folgt berechnen:

$$P_{app} = \frac{V_{res} * \Delta c_{res}}{A * C_{t_0, don} * \Delta t}$$

mit	V_{res}	Volumen im Receiverkompartiment
	$\Delta c_{res}/\Delta t$	Änderung der Konzentration im Receiverkompartiment über die Zeit
	A	Fläche des Filters (hier 1cm ²)
	$C_{t_0, don}$	Konzentration der Substanz zum Zeitpunkt 0

Statistische Auswertung

Zur statistischen Auswertung wurde von allen Daten der Mittelwert und die Standardabweichung bestimmt. Die Überprüfung der Ergebnisse auf Signifikanz erfolgte mit Hilfe des Softwareprogramms ,InStat 3' und wurden mit One-way ANOVA und Dunnett's post test zur Überprüfung der Signifikanz herangezogen. Die Irrtumswahrscheinlichkeiten der gefundenen Signifikanzen sind in den Abbildungen angegeben.

Ergebnisse und Diskussion

Zytotoxizitätsuntersuchungen

Für die Transportstudien und die Untersuchungen am Fremdstoffmetabolismus war es notwendig Vorversuche durchzuführen. Deshalb wurden in Inkubationsvorversuchen die zu untersuchenden Substanzen mittels MTT-Test und Alamar-Blue™-Test auf ihre Cytotoxizität überprüft. Bei jeder Messreihe wurde die Lösungsmittelkontrolle mitgeführt, auf die die Vitalität der behandelten Zellen bezogen wurden. Die Positivkontrolle ist SDS in einer Konzentration von 0,1% im Zellmedium. Diese zeigte bei jedem Experiment eine Vitalität von 0%.

Die Ergebnisse sind als Prozent der Lösungsmittelkontrolle dargestellt.

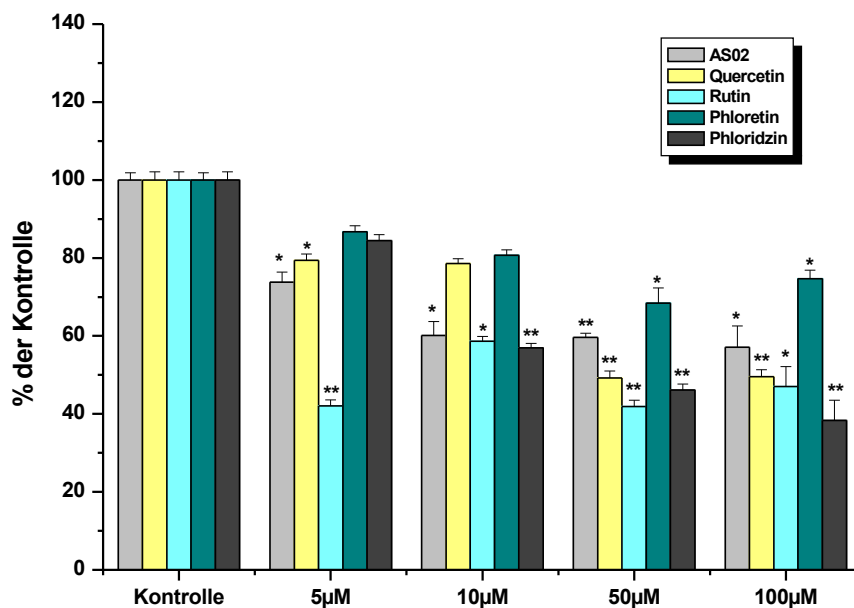


Abbildung 0.1 Vitalität von Caco-2-Zellen nach 1h Inkubation im MTT-Test
Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unabhängigen Experimenten; * signifikant ($p \leq 0.05$); ** sehr signifikant ($p \leq 0.01$) one-way-ANOVA mit Dunnett's post-test. AS02 dargestellt als Phloridzin-Äquivalent

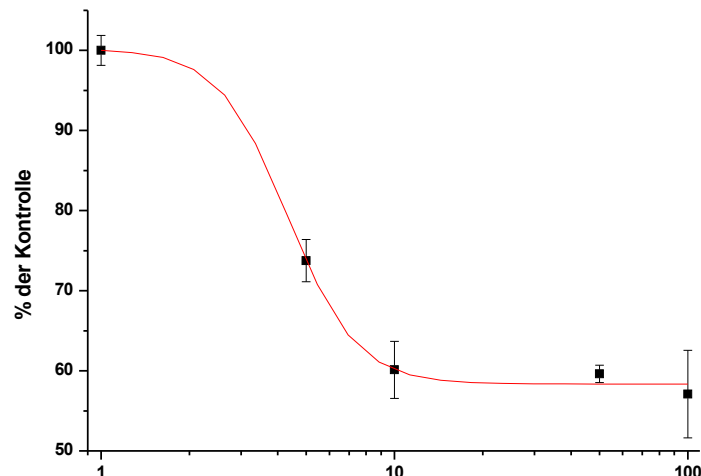


Abbildung 0.2 Vitalität von Caco-2-Zellen nach 1h Inkubation mit AS02
 Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten, sigmoide Fittung zur Ermittlung des LC_{50} -Wertes

In Abbildung 4.2 ist exemplarisch für alle untersuchten Substanzen eine Dosis-Wirkungs-Kurve dargestellt. Alle LC_{50} -Werte wurden auf diese Weise ermittelt. Diese liegen bei:

<i>Substanz</i>	LC_{50} [μM]
Apfelsaftextrakt	53 ± 2
Quercetin	26 ± 2
Rutin	7 ± 1
Phloridzin	47 ± 3
Phloretin	> 100

Tabelle 0.1 LC_{50} -Werte der Substanzen im MTT-Test

Die zu untersuchenden Substanzen zeigen alle einen signifikant zytotoxischen Effekt auf die Caco-2-Zellen teilweise schon in geringen Konzentrationen. Bei Rutin zeigt sich schon ab einer Konzentration von $5\mu M$ ein signifikanter Effekt, der sich bei Phloridzin und Apfelsaftextrakt 02 bei $10\mu M$ deutlich zeigt. Die beiden Aglyka Quercetin und Phloretin zeigen bei diesen niedrigen Konzentrationen noch keinen signifikanten zytotoxischen Effekt.

Es lässt sich im MTT-Test folgende Reihenfolge in der Zytotoxizität der Stoffe festlegen: Rutin>Phloridzin>AS02>Quercetin>Phloretin. Der Extrakt AS02 liegt in der Mitte der anderen Substanzen, die auch alle in verschiedenen Anteilen darin enthalten sind. Die Phloretinglykoside und Phloridzin haben dabei einen sehr großen Anteil an AS02 und erklären, warum der AS02 in seinen Effekt zwischen Phloridzin und Phloretin liegen.

Die durch den Alamar-Blue™-Test ermittelten Daten bestätigen die zytotoxischen Effekte, aber nicht in dem Maße wie die Daten im MTT-Test. Die Effekte sind wesentlich schwächer.

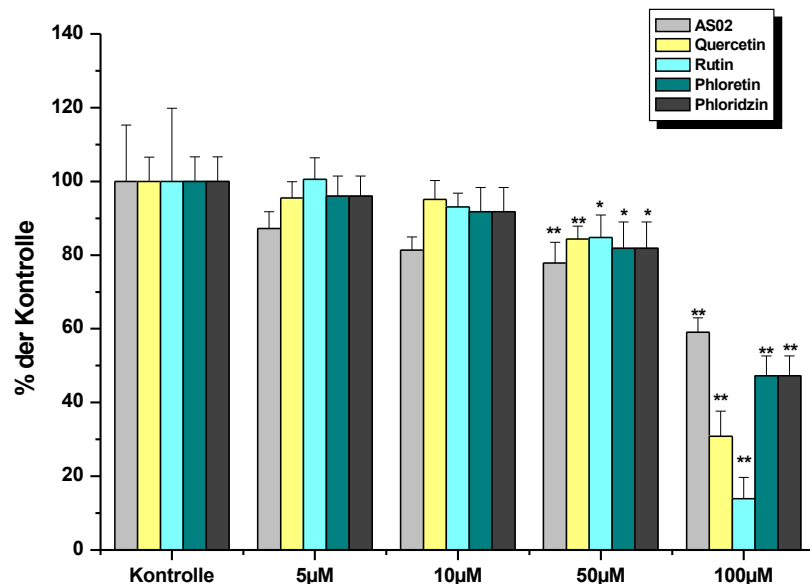


Abbildung 0.3 Vitalität von Caco-2-Zellen nach 48h Inkubation im Alamar-Blue™-Test

Die Werte sind angegeben in Prozent zur Lösungsmittelkontrolle. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unabhängigen Experimenten; * signifikant ($p \leq 0.05$); ** sehr signifikant ($p \leq 0.01$) one-way- ANOVA mit Dunnett's post-test. AS02 dargestellt als Phloridzin-Äquivalent

Die LC₅₀-Werte liegen hier bei :

Substanz	LC ₅₀ [μ M]
Apfelsaftextrakt	≥ 100
Quercetin	89 ± 6
Rutin	78 ± 4
Phloridzin	≥ 100
Phloretin	≥ 100

Tabelle 0.2 EC₅₀-Werte der Substanzen im Alamar-Blue™-Test

Im Alamar-Blue™-Test sind Quercetin und Rutin die Substanzen, mit dem stärksten zytotoxischen Effekt. Im Gegensatz zum MTT-Test wird hier ein anderer Endpunkt betrachtet, wodurch die Unterschiede erklärbar sind. Im MTT-Test ist der betrachtete Parameter die Lebensfähigkeit der Zellen durch die mitochondriale Dehydrogenase, beim Alamar-Blue™-Test wird mit Resazurin die metabolische Aktivität der Zellen gemessen.

Der zytotoxische Effekt ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass die Flavonoide sehr leicht zu Catecholen und Chinonen oxidieren können, die ihrerseits zu Polymeren weiterreagieren können. Es findet bevorzugt eine Oxidation an der 3'- und 4'-Position des B-Ringes statt. Die Oxidationsreaktion ist in Abbildung 4.4 exemplarisch für Quercetin (R₁=H) und Rutin (R₁=Rutinose) dargestellt.

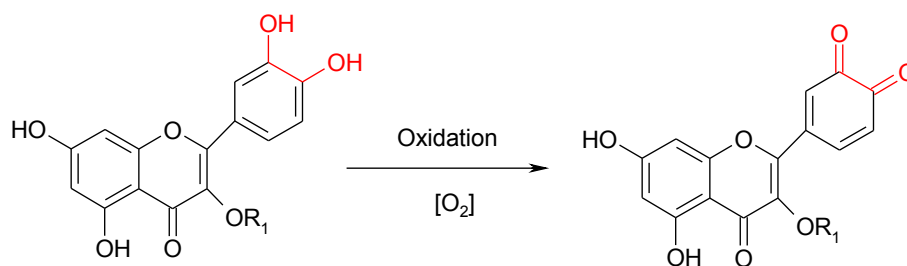


Abbildung 0.4 Chatecholbildung bei Flavonoiden

In Abbildung 4.5 ist die weitere Reaktion der entstandenen Oxidationsprodukte bis hin zu den Polymeren vereinfacht dargestellt.

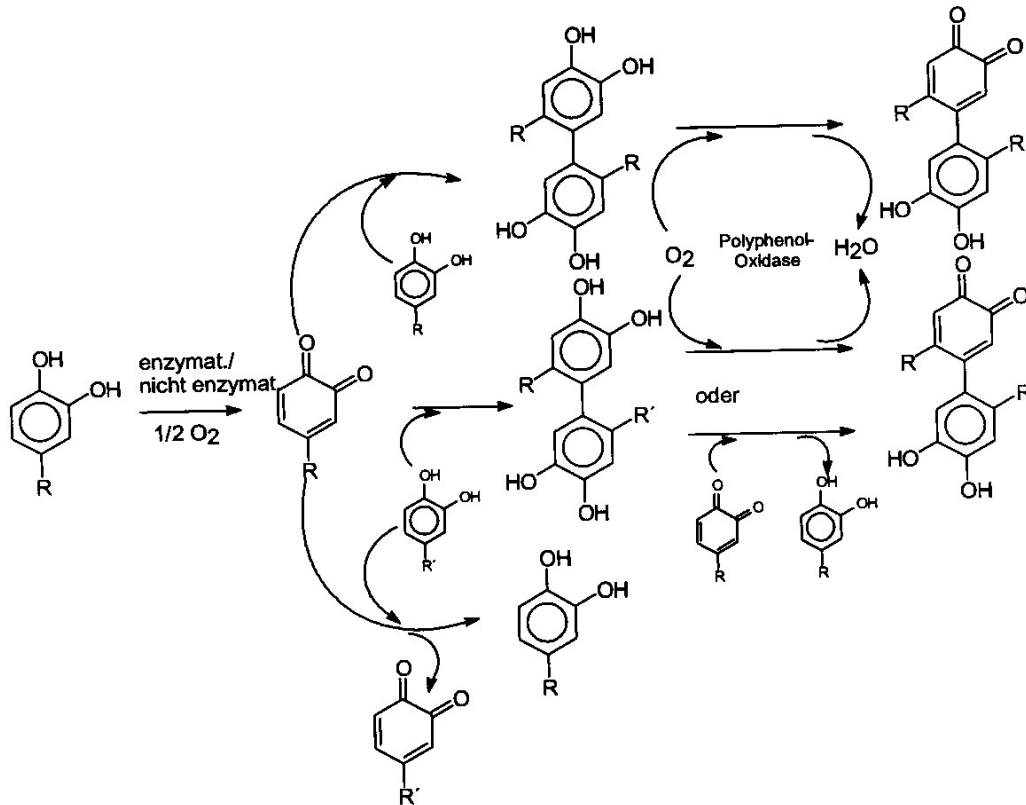


Abbildung 0.5 Polymerbildung durch Chinone

Diese Polymere lagern sich an die Membran der Zellen an, was sich an gelb-braunen Belägen auf den Zellen zeigt. Die Zellen verkleben dadurch oder bilden Aggregate und sterben letztendlich ab. Eine Relevanz dieser Befunde für die in vivo-Situation erscheint aufgrund der micro-aeroben Verhältnisse im Kolon eher gering.

Um diese störenden Effekte auf den Fremdstoffmetabolismus auszuschließen wurde in weiteren Versuchen untersucht, ob der Zusatz von Na-Ascorbat und α -Tocopherol den Caco-2-Zellen einen Schutz vor der Oxidation bietet. Dem Medium wurde Na-Ascorbat (0,25mM) und α -Tocopherol (0,05mM) zusätzlich zu den Polyphenolen zugesetzt und anschließend im Zytotoxizitätsassay untersucht.

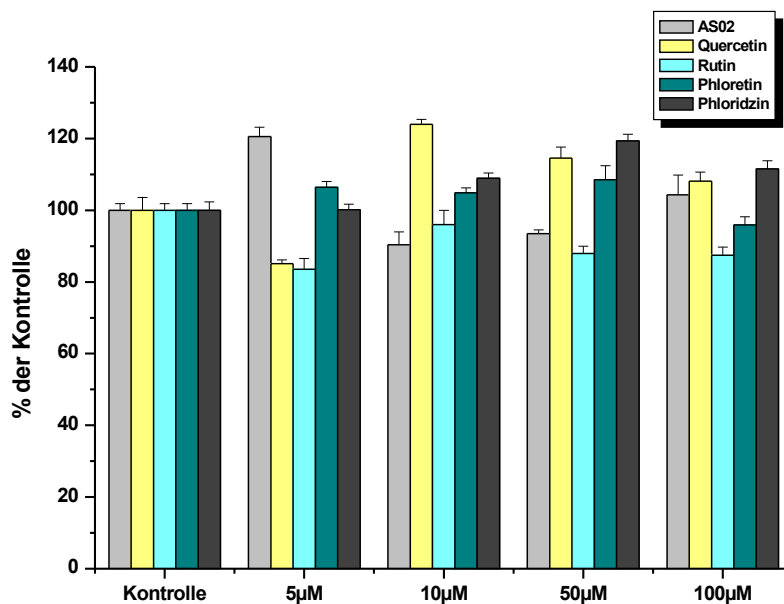


Abbildung 0.6 Vitalität von Caco-2-Zellen nach 48h Inkubation im Alamar-Blue™-Test

Die Werte sind angegeben in Prozent zur Lösungsmittelkontrolle. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unabhängigen Experimenten; * signifikant ($p \leq 0.05$); ** sehr signifikant ($p \leq 0.01$) one-way- ANOVA mit Dunnett's post-test. AS02 dargestellt als Phloridzin-Äquivalent

Der vorher aufgetretene cytotoxische Effekt konnte durch den Zusatz des Oxidationsschutzes bei allen Substanzen und auch beim Apfelsaftextrakt vermieden werden.

Deshalb wurde in allen anderen Versuchen Na-Ascorbat und α -Tocopherol als Oxidationsschutz zugesetzt, um die Versuchsbedingungen den Bedingungen im Kolon näher zu kommen und die Polymerbildung zu unterdrücken, die bei RNA und Proteinisolierungen störend wirkt.

Da bei der Herstellung von Apfelsaft auch Vitamin C zugesetzt wird, wurde hier eine Konzentration als Oxidationsschutz zugesetzt, die im natürlichen Apfelsaft so auch vorkommt und den natürlichen Bedingungen damit näher kommt.

Induktion bzw. Inhibition des Cytochrom P450 1A1

Induktion in der Real-Time PCR

Mittels Real-Time PCR sollte die Expression der mRNA der Enzyme in den Caco-2-Zellen verifiziert werden. Die Erfassung der Produktbildung erfolgt simultan während der Reaktion durch Fluoreszenzmessung und der darüber ermittelten C_t -Werte. Der C_t -Wert ist der Zyklus, bei dem die Amplifikationskurve den Fluoreszenzschwellenwert übersteigt. Für eine Quantifizierung ist die Effizienz der PCR-Reaktion von großer Bedeutung. Die Validierung der Primerpaare erfolgt wie in Kapitel 3.3.2.3.2 beschrieben. Eine nach der Beendigung der PCR erfolgte Schmelzpunktanalyse ermöglicht die Überprüfung der Spezifität der Produkte. Nebenprodukte und unspezifische Produkte verursachen Peaks durch Verschiebung der Schmelztemperatur. Es konnte bei der Schmelzkurvenanalyse in den einzelnen Versuchen keine Nebenprodukte quantifiziert werden.

Die Validierung der Primerpaare für CYP1A1 und das housekeeping Gen GAPDH zeigten eine Effizienz von 102,3 bzw. 103,1% und lagen damit im erwarteten Bereich. Die Steigungen der Validierungsgerade sind in der halblogarithmischen Darstellung parallel, so dass die gewählten Primer für die Reaktion eingesetzt werden konnten.

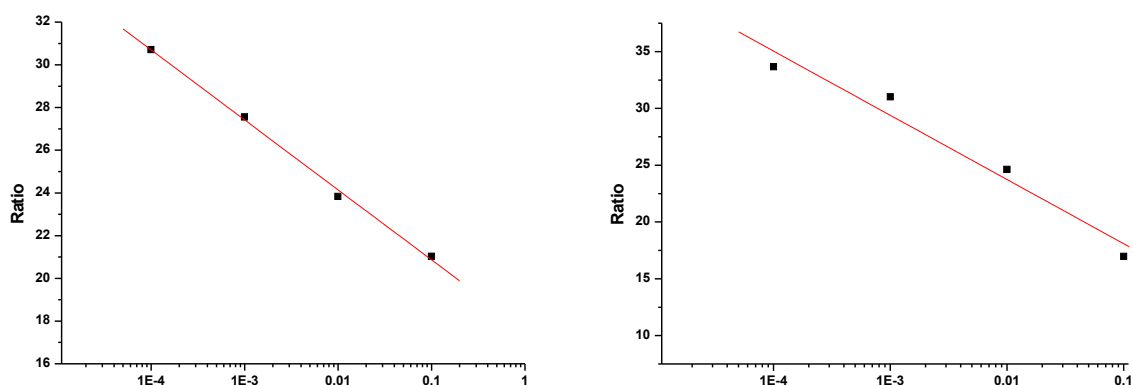


Abbildung 0.7 Validierung der Primerpaare für die Enzyme CYP1A1 und GAPDH, halblogarithmische Darstellung

Die Caco-2-Zellen wurden wie beschrieben 48h mit dem Apfelsaftextrakt und den einzelnen Flavonoiden inkubiert und anschließend nach der Zellernte RNA isoliert. Diese RNA wurde einer RT-Reaktion unterworfen und die daraus erhaltenen cDNA wurde in der Real-Time PCR eingesetzt. Die Auswertung der Daten erfolgte über die ΔC_T -Methode nach Pfaffl.

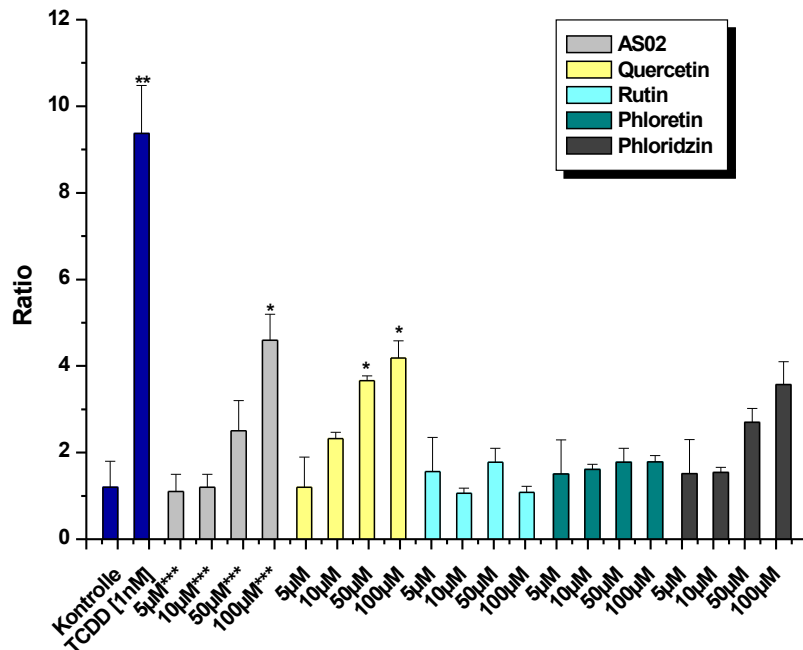


Abbildung 0.8 relative Expression in der Real Time PCR nach 48 h Inkubation

Die Werte sind angegeben in Prozent zur Lösungsmittelkontrolle. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unabhängigen Experimenten; * signifikant ($p \leq 0.05$); ** sehr signifikant ($p \leq 0.01$) one-way- ANOVA mit Dunnett's post-test. *** dargestellt als Phloridzin-Äquivalent

Man erkennt deutlich eine signifikante Induktion durch AS02 (bezogen auf Phloridzin) und Quercetin zeigen eine leichte signifikante Induktion bei steigender Konzentration. Phloridzin zeigt einen leichten induktiven Effekt in der höchsten Konzentration, der aber nicht signifikant ist. Die beiden anderen getesteten Einzelsubstanzen zeigten keinen Effekt. Im Gegensatz zur TCDD-Positivkontrolle sind aber alle Effekte sehr gering.

Die Induktion von CYP1A1 könnte darauf beruhen, dass Phloridzin und Quercetin Liganden des Ah-Rezeptors sind. Für Dibenzoylmethan ist eine solche Bindung an den Ah-Rezeptor beschrieben. [MacDonald et al., Cancer Res. 2001] Phloridzin zeigt eine

Strukturverwandschaft zu Dibenzoylmethan. Abbildung 4.9 soll diese Strukturverwandschaft verdeutlichen.

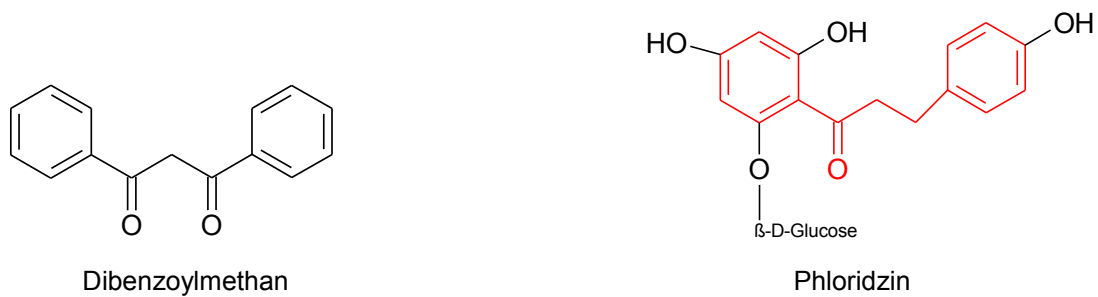


Abbildung 0.9 Strukturverwandschaft von Dibenzoylmethan und Phloridzin

Induktion in der Western Blot Analyse

Zur Untersuchung der CYP1A1-Expression in den Caco-2-Zellen auf Proteinebene nach Inkubation mit den Testsubstanzen wird der CYP1A1-Gehalt mittels Western-Blot bestimmt. Als Positivkontrolle dienten mit TCDD [10^{-9} M] behandelte Caco-2-Zellen. Als Kontrolle, auf die die densitometrische Auswertung bezogen ist, dienten mit Lösungsmittel behandelte Zellen.

Im nachfolgenden ist für jede Substanz ein repräsentativer Blot dargestellt.

AS02:



Konzentration [μ M] K T 5 10 50 100

Quercetin:



Konzentration [μM] K 10 50 100 T

Rutin:



Konzentration [μM] K T 10 50 100

Phloretin:



Konzentration [μM] K T 10 50 100

Phloridzin:



Konzentration [μM] K T 100 50 10

Abbildung 0.10 Western Blot von CYP1A1 aus Caco-2-Zellen nach 48h Inkubation mit AS02 und den Polyphenolen

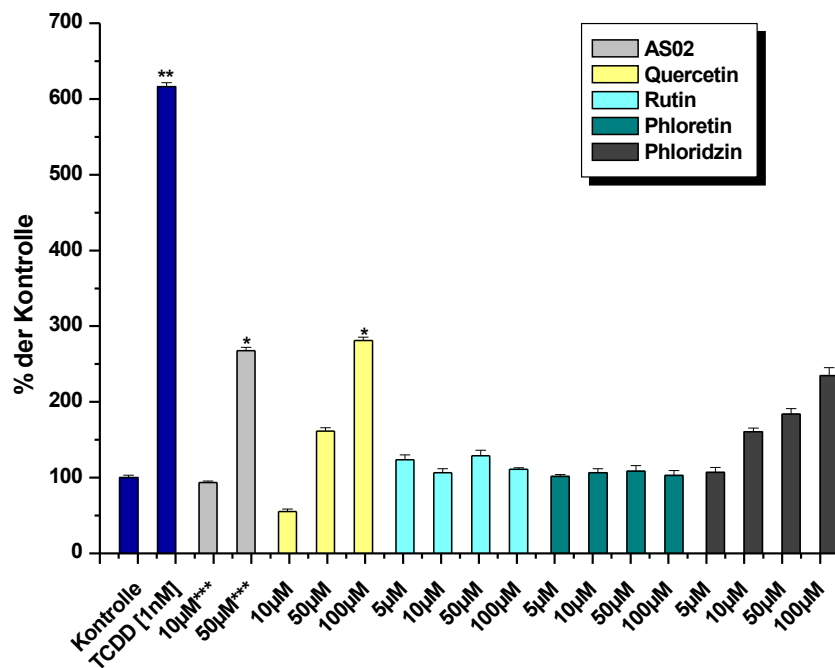


Abbildung 0.11 Western Blot von CYP1A1 aus Caco-2-Zellen nach 48h Inkubation mit AS02 und den Polyphenolen

TCDD [10^{-9} M] dient als Positivkontrolle. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unabhängigen Experimenten; * signifikant ($p \leq 0.05$); ** sehr signifikant ($p \leq 0.01$) one-way- ANOVA mit Dunnett's post-test. *** dargestellt als Phloridzin-Äquivalent

Außer für die Positivkontrolle ist nur bei dem Apfelsaftextrakt und Quercetin ein signifikanter Effekt zu sehen. Bei Phloridzin ist auch ein konzentrationsabhängiger induktiver Effekt zu beobachten, der allerdings nicht signifikant und schwächer ist. Im Vergleich zur TCDD-Positivkontrolle sind diese Effekte vernachlässigbar klein. Diese Beobachtung korreliert mit der CYP1A1 mRNA Expression. Allerdings ist der Induktionseffekt auf Proteinebene schwächer ausgeprägt als auf mRNA Ebene.

Man kann davon ausgehen, dass aufgrund der inhibitorischen Fähigkeiten der Flavonoide Quercetin und Phloretin nur noch ein geringer Anteil immunochemisch reaktiven CYP1A1 Proteins in den Zellen vorhanden ist und deshalb nicht mehr detektiert werden kann. Desweiteren spielt auch der Zeitverlauf der transkriptionellen Aktivierung eine entscheidende Rolle für die Bewertung der dieser Ergebnisse, d. h. möglicherweise entspricht das Ende der Inkubation nach 48h und die Zellernte nach dieser Zeit nicht der maximalen Proteinexpression.

Der induktive Effekt könnte auf einer Aktivierung des AhR-Signalweges liegen. Um diesen Vermutungen zu bestätigen, wurde in einem Westernblot, der aus Zellen, die mit verschiedenen Konzentrationen an TCDD 48h behandelt wurden, überprüft, ob die Caco-2-Zellen einen Ah-Rezeptor besitzen. Als Antikörper wurde hier ein goat polyclonal IgG für den Ah-Rezeptor eingesetzt.

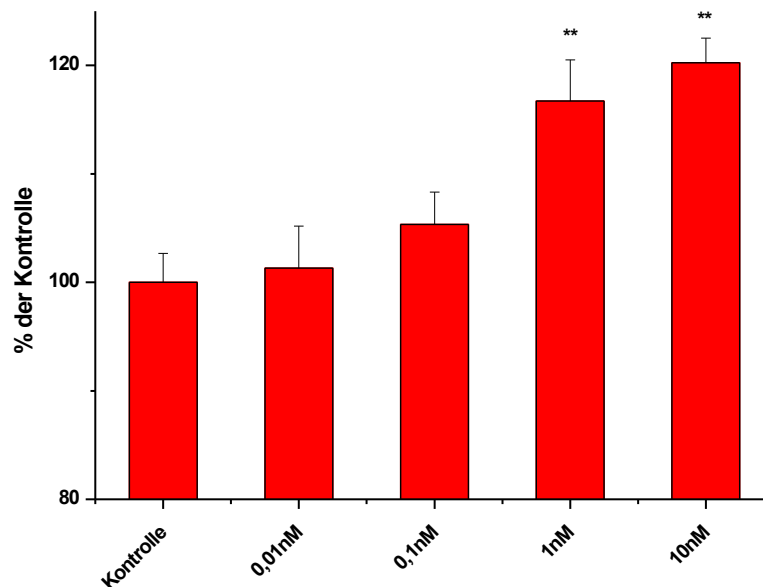


Abbildung 0.12 Western Blot des Ah-Rezeptors aus Caco-2-Zellen nach 48h Inkubation TCDD

Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unabhängigen Experimenten; * signifikant ($p \leq 0.05$); ** sehr signifikant ($p \leq 0.01$) one-way- ANOVA mit Dunnett's post-test.

Wie man in Abbildung 4.12 deutlich sieht, besitzen die Zellen einen Ah-Rezeptor, der sich mit steigender Konzentration an TCDD in den Zellen induzieren läßt.

In anschließenden Reporterassays, in denen die Zellen mit dem Reporterplasmid pGL3-XRE und einem Kontrollplasmid mittels Kalziumphosphatmethode transfiziert wurden, zeigten die Zellen keine signifikante Änderung der Reporteraktivität. Dies könnte allerdings darauf beruhen, dass bereits auf mRNA und Proteinebene nur sehr leichte induktive Effekte zu sehen waren. TCDD, das auch hier als Positivkontrolle diente, zeigte eine deutlich signifikante Veränderung der Reporteraktivität.

Inhibition des CYP1A1 mittels der Real-Time PCR

Mittels Real-Time PCR wurde auch die Inhibition durch die einzelnen Substanzen und den Apfelsaftextrakt nach 48h verifiziert werden. Die einzelnen Zellen wurden dafür mit TCDD [10^{-9} M] und den Substanzen koinkubiert und nach 48h die RNA isoliert. Nach der RT-Reaktion wurde die erhaltene cDNA in der Real Time PCR eingesetzt.

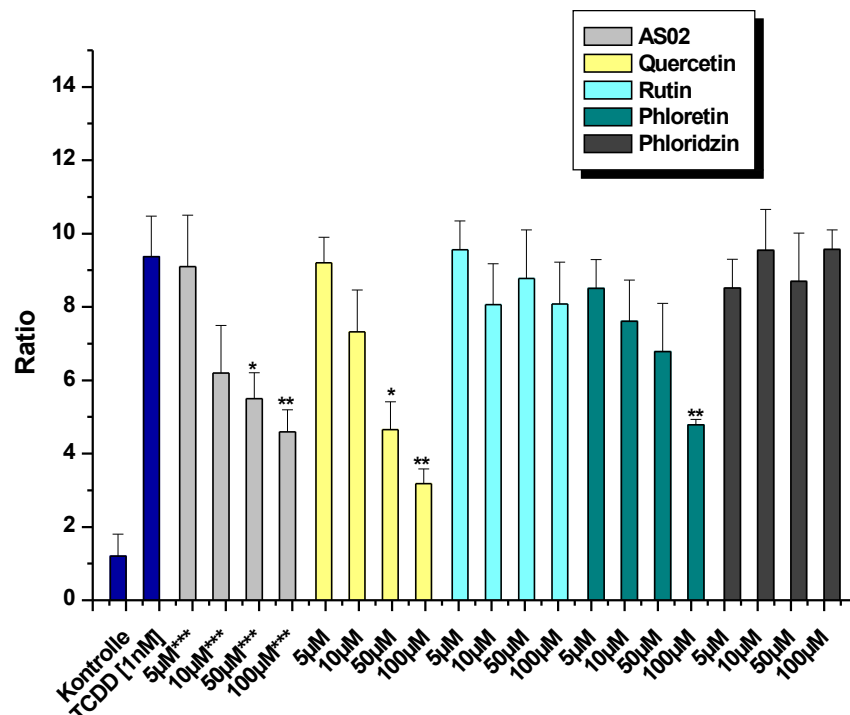


Abbildung 0.13 relative Expression von CYP1A1 in der Real Time PCR nach 48h Inkubation

Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unabhängigen Experimenten; * signifikant ($p \leq 0.05$); ** sehr signifikant ($p \leq 0.01$) one-way- ANOVA mit Dunnett's post-test. *** dargestellt als Phloridzin-Äquivalent

Man erkennt in Abbildung 4.13 deutlich eine konzentrationsabhängige, signifikante Hemmung durch die Aglyka Quercetin und Phloretin und durch den Apfelsaftextrakt AS02. Die Glykoside Rutin und Phloridzin zeigten hier keine inhibitorischen Effekte. Quercetin, Phloretin und AS02 zeigten sich als so starke Antagonisten, sie konnten das durch TCDD induzierte CYP1A1-Enzym auf mRNA-Ebene um bis zu 50% reduzieren.

Für Quercetin ist diese antagonistische Wirkung auf den Ah-Rezeptor schon beschrieben [Sibirova, 2000; Marian, 1999]. Diese inhibitorischen Fähigkeit wird als ein Mechanismus diskutiert, wie Flavonoide protektiv in den Mechanismus der Krebsentstehung eingreifen können.

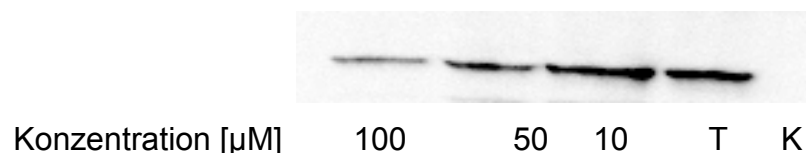
Da Quercetin und verschiedene Quercetinglykoside auch im AS02 enthalten sind, erklärt das den Effekt, der beim Apfelsaftextrakt zu sehen ist. Phloretin, das auch ein Aglykon ist, verhält sich wahrscheinlich in der Zelle ähnlich wie Quercetin.

Für Rutin und Phloridzin kann weder eine Hemmung noch eine Induktion nach TCDD [10^{-9} M] -induzierter CYP1A1-Expression detektiert werden, was offensichtlich auf der Tatsache beruht, dass Rutin und Phloridzin wegen ihrer Hydrophilie schlecht in die Zellen aufgenommen werden können.

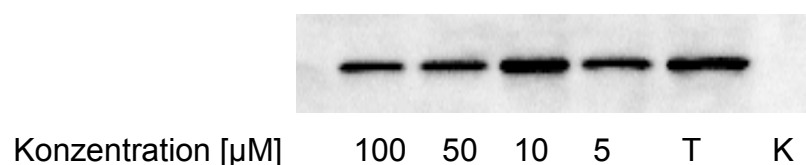
Inhibition des CYP1A1 in der Western-Blot-Analyse

Zur Untersuchung der CYP1A1-Expression in den Caco-2-Zellen nach Koinkubation mit den Testsubstanzen und TCDD [10^{-9} M] wird der CYP1A1-Gehalt auf Proteinebene mittels Western-Blot bestimmt. Als Positivkontrolle dienten mit TCDD [10^{-9} M] behandelte Caco-2-Zellen. Eine Lösungsmittelkontrolle (K) wurde mitgeführt. Im nachfolgenden ist für jede Substanz ein repräsentativer Blot dargestellt.

AS02:



Quercetin:



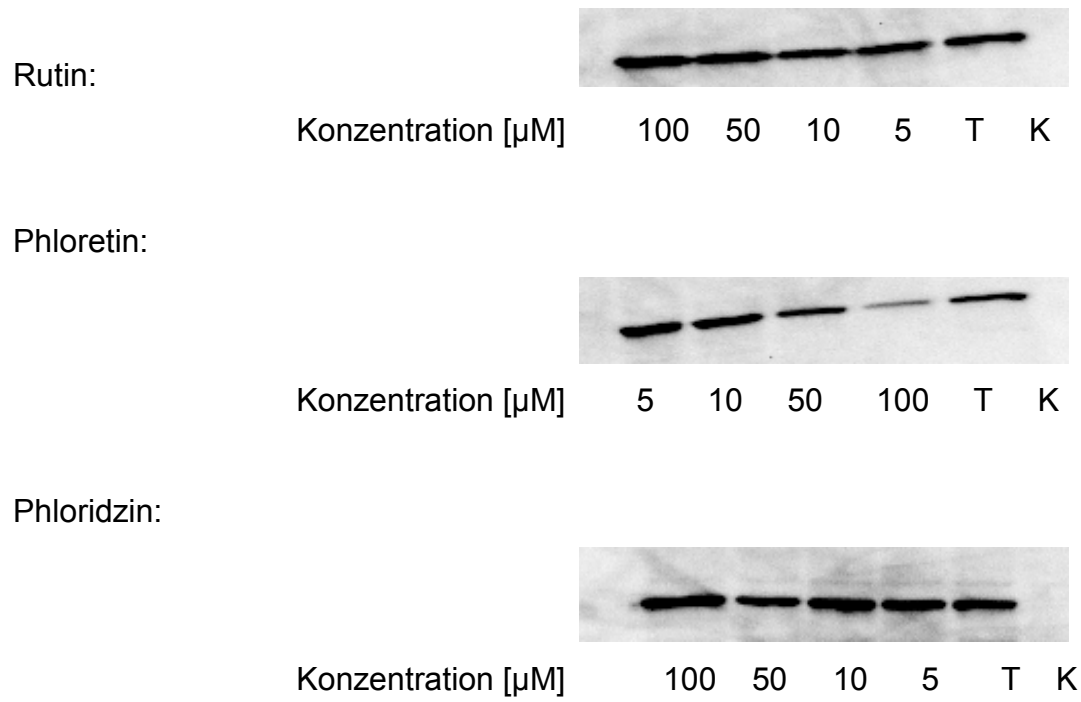


Abbildung 0.14 Western Blot von CYP1A1 aus Caco-2-Zellen nach 48h Koinkubation mit den Flavonoiden und TCDD [10^{-9} M]

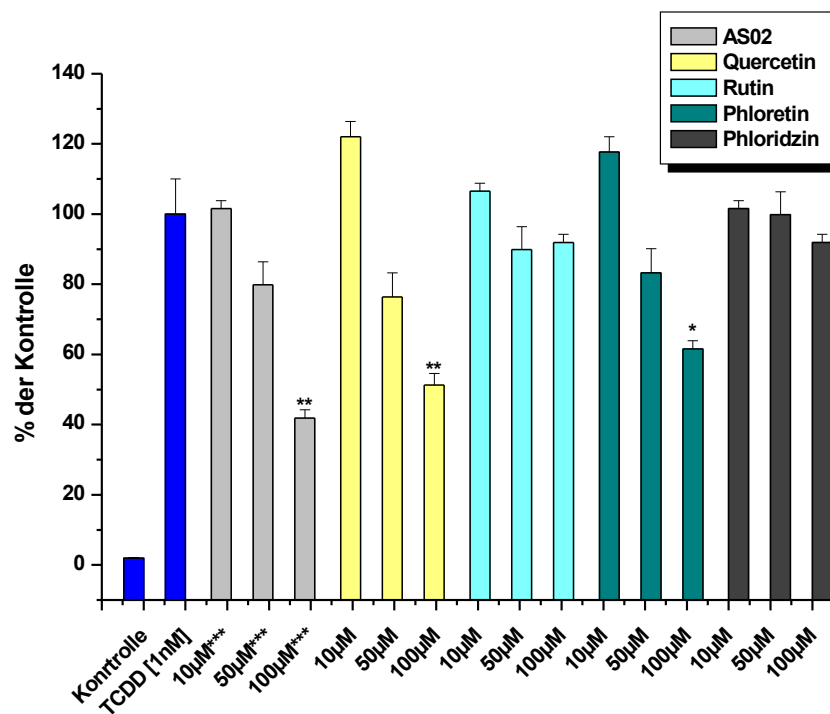


Abbildung 0.15 Hemmung von CYP1A1 in Caco-2-Zellen nach 48h Koinkubation mit TCDD und den Einzelsubstanzen im Western Blot

TCDD [1nM] dient als Positivkontrolle. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unabhängigen Experimenten; * signifikant ($p \leq 0.05$); ** sehr signifikant ($p \leq 0.01$) one-way- ANOVA mit Dunnett's post-test. *** dargestellt als Phloridzin-Äquivalent

Bei Koinkubation der Zellen mit den einzelnen Testsubstanzen und TCDD [1 nM] verursachen AS02, Quercetin und Phloretin eine dosisabhängige Abnahme der durch TCDD [1 nM]-induzierten CYP1A1-Expression. Während Phloretin nur eine schwache Hemmung der CYP1A1-Gehalte um etwa 30-40% bezogen auf die TCDD-Kontrolle zeigt, führt schon eine Inkubation der Zellen von 50 µM Quercetin und AS02 zu einer Inhibition von 20%. Bei einer Konzentration von 100µM zeigen der AS02 und Quercetin einen signifikanten Effekt von 50-60%. Für Rutin und Phloridzin kann eine Hemmung noch eine Induktion nach TCDD [1 nM]-induzierter CYP1A1-Expression detektiert werden.

Die auf Proteinebene ermittelten Werte korrelieren mit denen auf mRNA Ebene. Der inhibitorische Effekt könnte auf einer Hemmung des AhR-Signalweges liegen, deshalb wurde im folgenden ein Reporterassay durchgeführt, mit den pGL3-XRE-

Vektor durchgeführt, um die Reporterogenaktivität nach Behandlung mit den Substanzen zu messen.

Reporterogen-Assay

Die Caco-2-Zellen wurden mit dem XRE abhängigen Reporterogenplasmid pGL3-XRE und dem Kontrollplasmid SV-40 mittels Kalziumphosphatmethode transfiziert. Anschließend wurden die Zellen mit den Substanzen und TCDD [10^{-9} M] 48h koinkubiert. Nach luminometrischer Bestimmung der Luciferase-Aktivitäten für das Reporterogen- und Kontrollplasmid wurde die relative Reporterogenaktivität in Bezug zur Lösungsmittelkontrolle bestimmt. Als Positivkontrolle dienten mit TCDD [10^{-9} M] behandelte Caco-2-Zellen. Die Aktivität des pGL3-Promotorplasmids ohne Insert wurde ebenfalls bestimmt und lag im Bereich unbehandelter Zellen. Die Werte aus Diagramm 4.16 sind als % der TCDD-Positivkontrolle dargestellt.

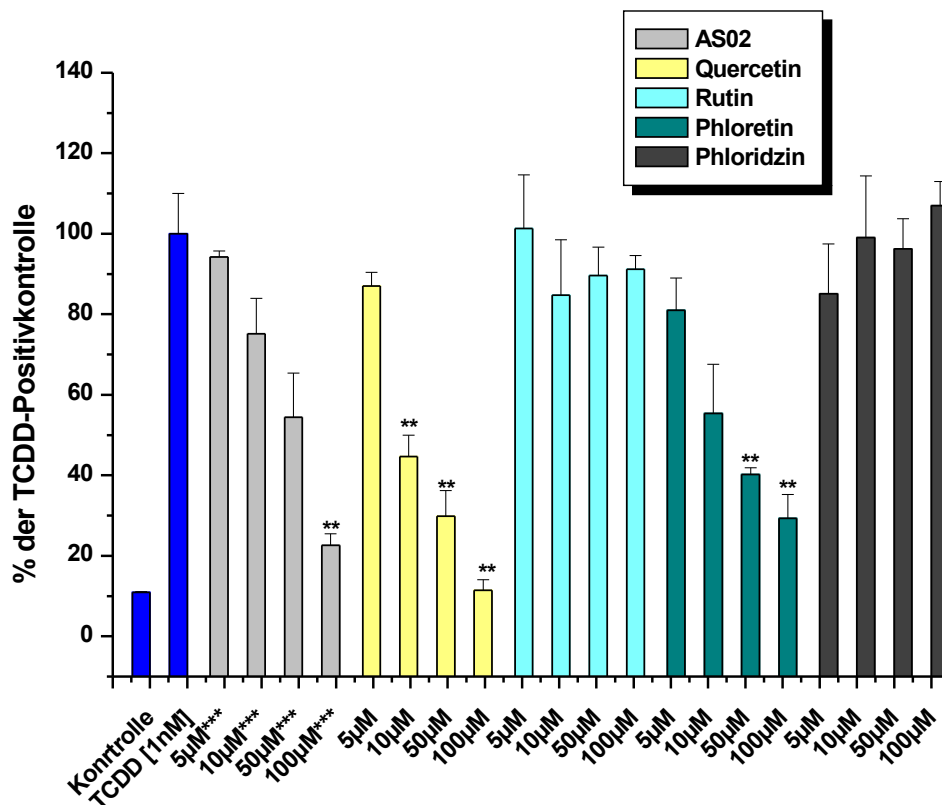


Abbildung 0.16 Reporteragenassay aus Caco-2-Zellen nach 48h Inkubation TCDD und den Substanzen

TCDD [10^{-9} M] dient als Positivkontrolle. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unabhängigen Experimenten; * signifikant ($p \leq 0.05$); ** sehr signifikant ($p \leq 0.01$). One-way- ANOVA mit Dunnett's post-test. *** dargestellt als Phloridzin-Äquivalent

AS02, Quercetin und Phloretin zeigen eine deutlich signifikante Hemmung der Reporteragenaktivität um bis zu 80%. Quercetin zeigte sich hier als stärkster Antagonist, der schon in einer Konzentration von 10µM um 55% die Reporteragenaktivität im Vergleich zu TCDD hemmt. Die drei Substanzen hemmen an einer Stelle des Ah-Rezeptorsignalweges. Dabei könnte es zu Interaktionen mit dem Proteinkomplex AhR, des aktivierten AhR/ARNT-Komplexes oder dessen DNA kommen.

Untersuchung der 7-Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD)-Aktivität

Die CYP1A-vermittelte EROD-Aktivität von CYP1A-Isoenzymen ist eine weitläufig etablierte Methode zur Bestimmung des induktiven Potentials von Ah-Rezeptor-Agonisten. [Leece et al., 1985]

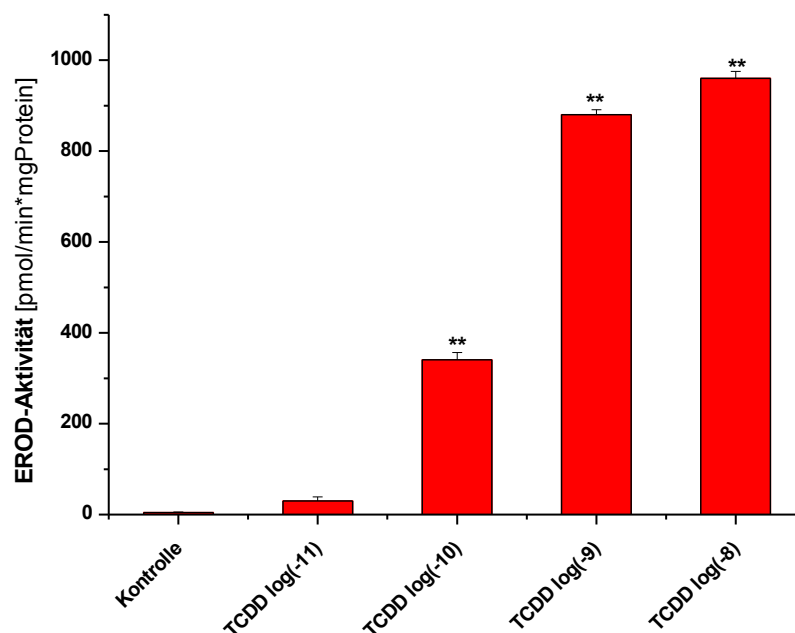


Abbildung 0.17 EROD-Aktivität in Caco-2-Zellen nach 48h Inkubation mit TCDD in Lebendzellen

Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unabhängigen Experimenten; * signifikant ($p \leq 0.05$); ** sehr signifikant ($p \leq 0.01$) one-way- ANOVA mit Dunnett's post-test.

Das Abbildung 4.17 zeigt einen deutlich signifikanten Anstieg der EROD-Aktivität mit zunehmender TCDD-Konzentration. Zur Bestimmung der CYP1A1-Induktion wurde die durch dieses Isoenzym katalysierte 7-Ethoxyresorufin-O-deethylase-Aktivität hernagezogen. Die Reaktion beruht auf der oxidativen Dealkylierung von 7-Ethoxyresorufin zu Resorufin in Gegenwart von NADPH. Um die Aktivität auf die Proteinmenge beziehen zu können, wurde diese parallel mit Fluorescamin gemessen. In Abbildung 4.18 wurden die Caco-2-Zellen 48h mit AS02 und den Einzelsubstanzen behandelt. Danach wurden die Zellen durch mehrmaliges Einfrieren ge-crackt und dann die Aktivität im EROD-Assay bestimmt.

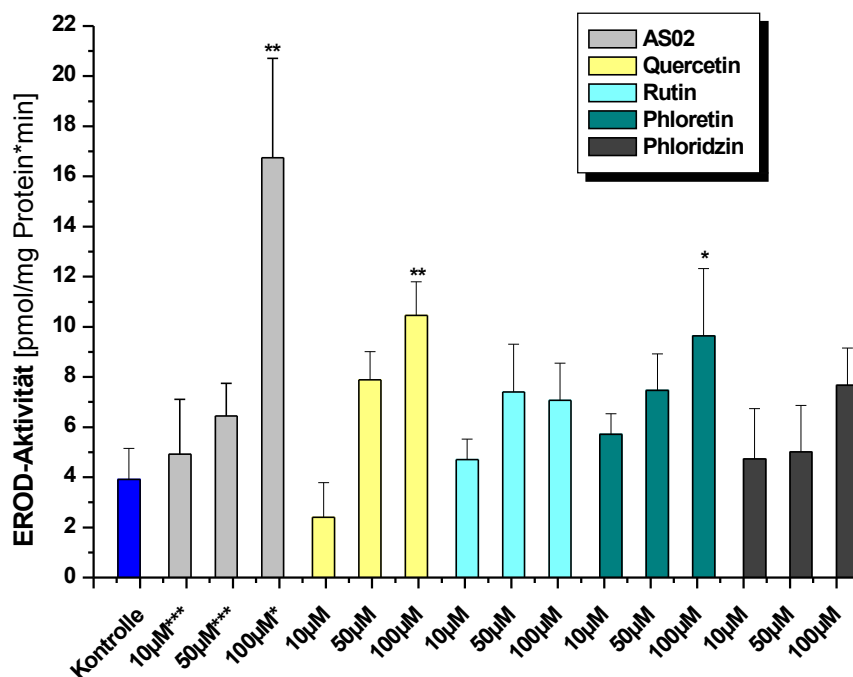


Abbildung 0.18 EROD-Aktivität in Caco-2-Zellen nach 48h Inkubation mit den Flavonoiden

TCDD [10^{-9} M] dient als Positivkontrolle. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unabhängigen Experimenten; * signifikant ($p \leq 0.05$); ** sehr signifikant ($p \leq 0.01$) one-way- ANOVA mit Dunnett's post-test. *** dargestellt als Phloridzin-Äquivalent

Die CYP1A1-Enzymaktivität wird von Apfelsaftextrakt AS02, Quercetin und Phloridzin signifikant bei 100µM erhöht. Während Quercetin und Phloridzin die Aktivität im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle auf das doppelte bzw. AS02 auf das vierfache erhöht, ist das im Vergleich zu TCDD, das die EROD-Aktivität auf das über 200fache steigert, wie auch schon auf RNA und Proteinebene verschwindend gering und vernachlässigbar. Um zu prüfen, ob die Substanzen auch in Mikrosomen, d.h. im Protein selber, die Aktivität ändern können, wurde die EROD-Aktivität in Mikrosomen gemessen, die nach der Isolation für 30min mit den Substanzen inkubiert wurden.

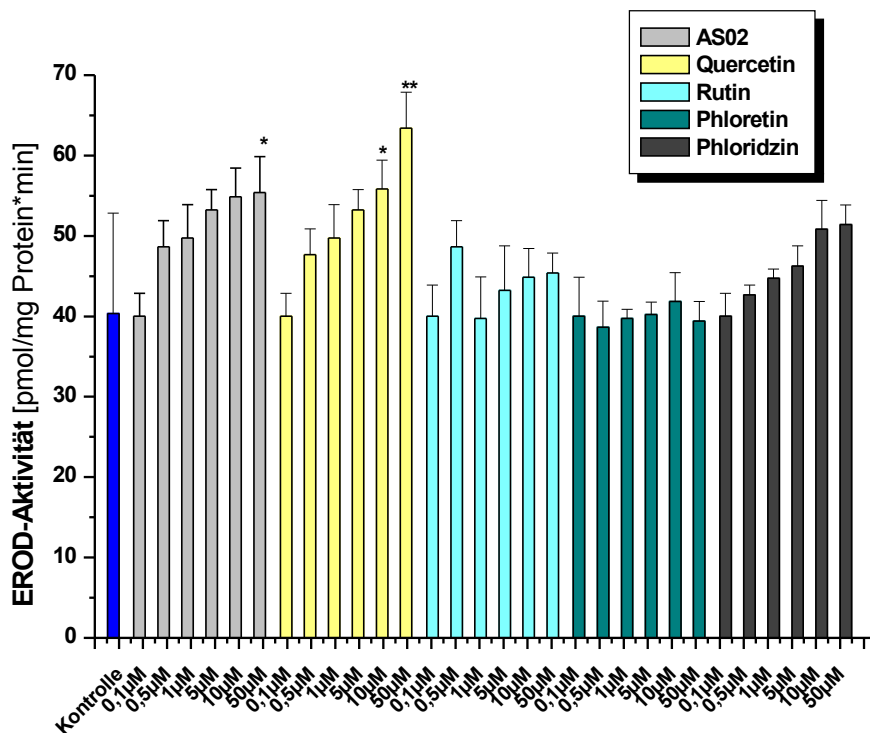


Abbildung 0.19 EROD-Aktivität in Mikrosomen nach Inkubation mit den Flavonoiden und AS02

Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unabhängigen Experimenten; * signifikant ($p \leq 0.05$); ** sehr signifikant ($p \leq 0.01$) one-way-ANOVA mit Dunnett's post-test. *** dargestellt als Phloridzin-Äquivalent

Die in Abbildung 4.19 dargestellten Daten korrelieren mit der EROD-Aktivität in Lebendzellen. Auch hier ist die Erhöhung bei AS02, Quercetin und Phloridzin zu sehen, wobei diese wiederum in viel niedrigeren Bereichen als die TCDD-Positivkontrolle liegen.

Um auch die antagonistische Wirkung der Substanzen zu überprüfen wurden die Caco-2-Zellen für 48h mit den Flavonoiden und TCDD koninkubiert und dann die EROD-Aktivität nach dem Cracken der Zellen gemessen.

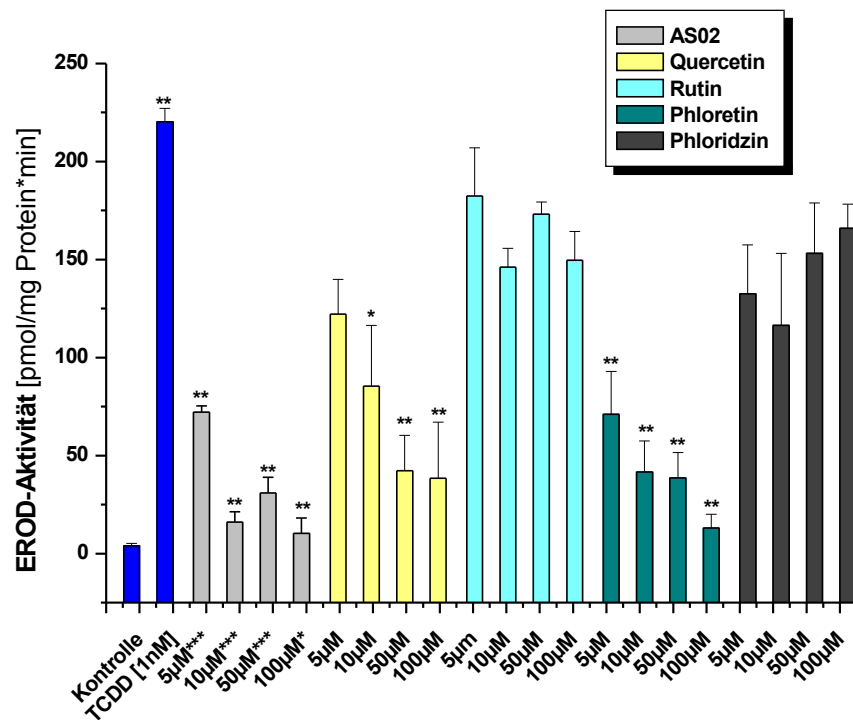


Abbildung 0.20 EROD-Aktivität in Caco-2-Zellen nach 48h Inkubation mit den Flavonoiden und TCDD

TCDD [$10^{-9}M$] dient als Positivkontrolle. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unabhängigen Experimenten; * signifikant ($p \leq 0.05$); ** sehr signifikant ($p \leq 0.01$) one-way- ANOVA mit Dunnett's post-test. *** dargestellt als Phloridzin-Äquivalent

Die EROD-Aktivität wird durch den Apfelsaftextrakt AS02 und die Aglyka Quercetin und Phloretin schon in den niedrigsten Konzentrationen von $5\mu M$ 50-60% gehemmt, was in höheren Flavonoidkonzentrationen auf bis zu 90% gesenkt wird. Die Aktivität des CYP1A1 bestätigt die starke antagonistische Wirkung, die man bereits zuvor auf RNA- und Proteinebene sehen konnte.

Auch hier wurde wieder die EROD-Aktivität in Mikrosomen gemessen, die vor der Isolation 48h mit TCDD behandelt wurden und nach der Gewinnung 30min mit den Substanzen behandelt wurden.

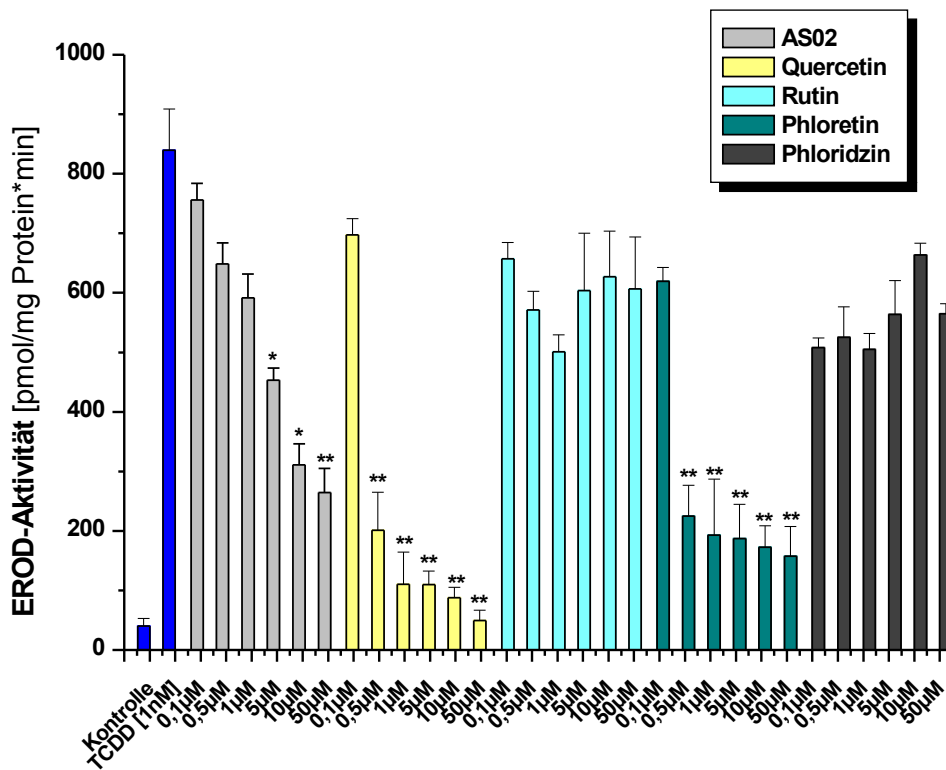


Abbildung 0.21 EROD-Aktivität in Mikrosomen nach Inkubation mit den Flavonoiden und TCDD

TCDD [$10^{-9}M$] dient als Positivkontrolle. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unabhängigen Experimenten; * signifikant ($p \leq 0.05$); ** sehr signifikant ($p \leq 0.01$) one-way- ANOVA mit Dunnett's post-test. *** dargestellt als Phloridzin-Äquivalent

Auch hier ist eine signifikante Hemmung der durch TCDD induzierten Expression von CYP1A1 zu sehen. Quercetin kann hier die Induktion sogar um 99% bei einer Konzentration von 50µM zurückdrängen. Der Apfelsaftextrakt und Phloretin zeigen sich wieder als starke Antagonisten. Tabelle 4.3 zeigt die EC_{50} -Werte der hemmenden Wirkung bei der EROD-Aktivität der Substanzen in Mikrosomen und Lebendzellen dargestellt.

<i>Substanz</i>	<i>EC₅₀ [µM] in Lebendzellen</i>	<i>EC₅₀ [µM] in Mikrosomen</i>
Apfelsaftextrakt	4 ± 0,8	3,5 ± 0,5
Quercetin	9,2 ± 1,2	0,3 ± 0,1
Rutin	nicht bestimmt	nicht bestimmt
Phloridzin	nicht bestimmt	nicht bestimmt
Phloretin	4,2 ± 0,9	0,5 ± 0,08

Tabelle 0.3 EC₅₀-Werte in Mikrosomen und Lebendzellen in der EROD-Aktivität

Der EC₅₀-Wert von Quercetin und Phloretin in Mikrosomen liegt deutlich unterhalb des EC₅₀-wertes in Lebendzellen, d.h. sie wirken schon auf die Aktivität des Proteins bereits in geringeren Konzentrationen als auf die Lebendzellen. Beim Apfelsaftextrakt AS02 ist dieser Effekt auch zu erkennen, allerdings nicht so ausgeprägt wie bei den Aglyka. Dies beruht darauf, dass in einem Fall die ganze Zelle untersucht wird und einmal das isolierte, viel empfindlichere Protein.

Quercetin, Phloretin und der Apfelsaftextrakt AS02 erweisen sich als starke Antagonisten. Damit können Flavonoide des Apfels die metabolische Aktivierung chemischer Kanzerogene wie z. B. Benzo[a]pyren oder heterocyclischer, aromatischer Amine hemmen und eventuell auf diese Weise zur Verminderung des Darmkrebsrisikos beitragen.

Untersuchung der Caco-2-Zellen auf die Induktion des ABC-Transporters MRP2

Induktion in der Real-Time PCR

Außer dem Enzym CYP1A1 sollte auch die Expression des ABC-Transporters MRP2 untersucht werden. Wie auch schon bei CYP1A1 wurde zuerst die Expression auf RNA-Ebene untersucht. Hierzu wurden die Primerpaare für MRP2 und GAPDH als interner Standard validiert. Die Effizienz des Primerpaares für MRP2 lag bei 98,7%, die von GAPDH bei 103,1%. Die Validierungskurven lagen in halblogarithmischer Darstellung parallel (Abbildung 4.22), so dass die gewählten Primer für die Reaktion eingesetzt werden konnten.

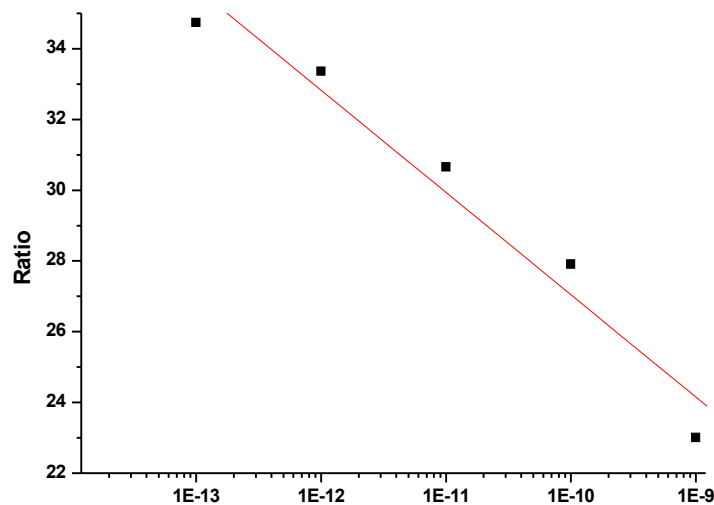


Abbildung 0.22 Validierung der Primerpaare für das Enzym MRP2, halblogarithmische Darstellung

Die Caco-2-Zellen wurden 48h mit dem Apfelsaftextrakt AS02 und den Einzelsubstanzen inkubiert und anschließend die RNA isoliert. Nach der RT-Reaktion wurde die gewonnene cDNA in der Real Time PCR eingesetzt.

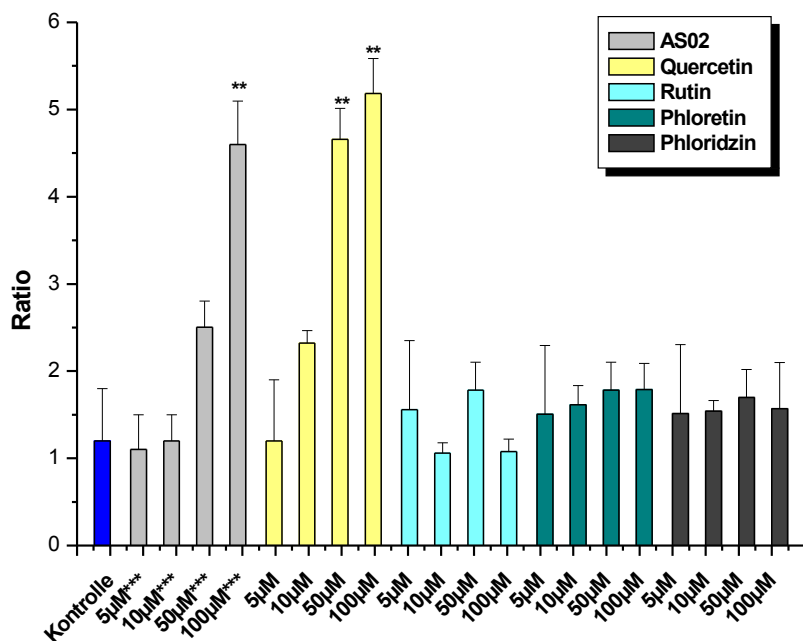


Abbildung 0.23 Induktion von MRP2 in Caco-2-Zellen nach 48h Inkubation in der RT-PCR

Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unabhängigen Experimenten; * signifikant ($p \leq 0.05$); ** sehr signifikant ($p \leq 0.01$) one-way-ANOVA mit Dunnett's post-test. *** dargestellt als Phloridzin-Äquivalent

In Abbildung 4.23 sieht man eine deutliche Induktion des AS02 und des Aglykon Quercetin schon in einer Konzentration von 50µM. Die anderen Substanzen zeigen auf MRP2 keine Wirkung, sie liegen alle im Bereich der Lösungsmittelkontrolle.

Induktion in der Western-Blot-Analyse

Zur Untersuchung der MRP2-Expression in den Caco-2-Zellen nach der Inkubation mit den Testsubstanzen wurde der MRP2-Gehalt auf Proteinebene mittels Western-Blot bestimmt. Eine Lösungsmittelkontrolle (K) wurde mitgeführt.

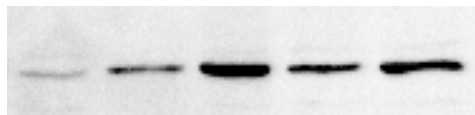
Im nachfolgenden ist für den Apfelsaftextrakt 02 und Quercetin ein repräsentativer Blot dargestellt. Da sich bei den anderen Substanzen in den Blots keinen Effekt zeigte, sind diese hier nicht dargestellt.

Quercetin:



Konzentration [μM] K L 10 50 100

AS02:



Konzentration [μM] K 5 10 50 100

Abbildung 0.24 Western Blot von MRP2 aus Caco-2-Zellen nach 48h Inkubation mit AS02 und Quercetin

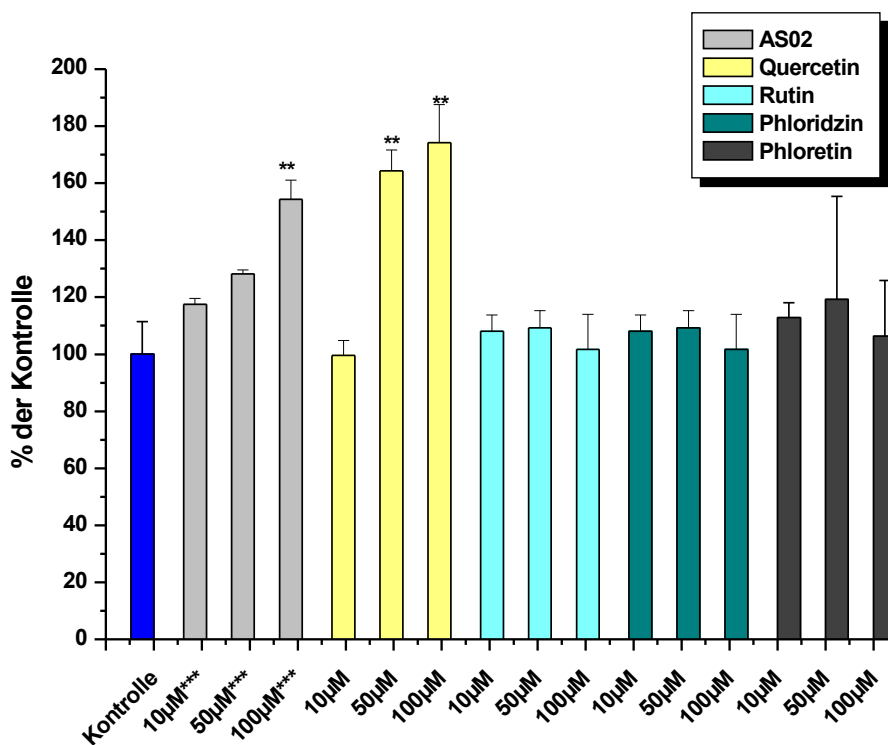


Abbildung 0.25 Western Blot von MRP2 aus Caco-2-Zellen nach 48h Inkubation

Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unabhängigen Experimenten; * signifikant ($p \leq 0.05$); ** sehr signifikant ($p \leq 0.01$) one-way-ANOVA mit Dunnett's post-test. *** dargestellt als Phloridzin-Äquivalent

Die in der Real Time PCR gewonnen Ergebnisse konnten auf Proteinebene bestätigt werden. Auch hier zeigte sich ein konzentrationsabhängiger signifikanter Anstieg bei AS02 und Quercetin.

Diese Induktion könnte an der Aktivierung des ARE liegen. Beim sogenannten **Antioxidant Response Element (ARE)** handelt es sich um ein 1990 unabhängig voneinander in den regulatorischen Sequenzen der Ratten- und der Mäuse-GST entdecktes Element [Rushmore, 1990; Friling, 1990], das vermutlich bei der monofunktionalen Induktion Fremdstoff-metabolisierender Enzyme eine zentrale Rolle spielt. ARE kann durch redox-aktive Substanzen aktiviert werden und kann die Induktion von Enzymen wie die NADPH Chinonoxidoreduktase, GSH, UGT1A6 und auch MRP2 bewirken. Der Mechanismus läuft dabei über einen Keap1-Nrf2-Komplex, der durch die Einwirkung von redox-aktive Substanzen Keap1 abspaltet und nun als aktives Nrf2 vorliegt. Das aktive Nrf2 kann an ARE binden und es bildet sich ein Initiationskomplex, der die Transkription aktiviert.

Die Induktion von MRP2 beruht wahrscheinlich auf der Redox-Aktivität der 3',4'-Catechol-Struktur des Quercetins. Die Wirkung des Apfelsaftextraktes könnte an dem im Extrakt enthaltenen Quercetin und seinen Glykosiden, die durch die LPH in der Zelle in Quercetin gespalten werden können, liegen. Die Induktion des MRP2-Transporters hat einen Einfluß auf die intestinale Entgiftung und die Verteilung von Xenobiotika in den Darmkrebszellen. Zellschädigende Stoffe können so schneller aus der Zelle herausgeschleust werden und können nicht mehr toxisch wirken, ein chemopräventativer Effekt tritt ein.

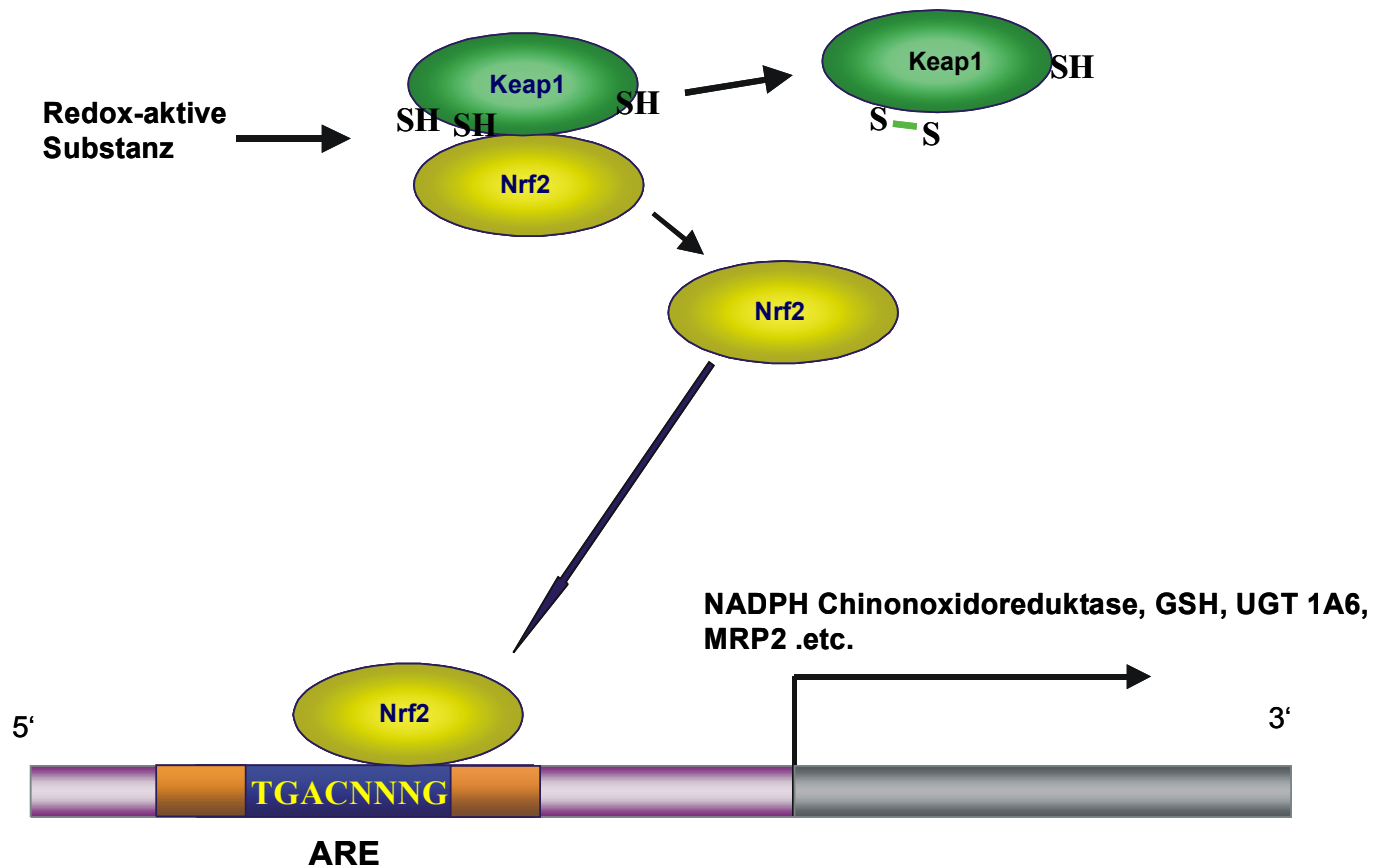


Abbildung 0.26 Aktivierung des ARE

Gerichteter Transport der Flavonoide im Caco2-Transportmodell

Die Transportstudien wurden mit Hilfe des Caco2-Modellsystems durchgeführt. Bei der Kultivierung auf Carbonatmembranen wachsen die Zellen zu Monolayern heran, die die charakteristischen Eigenschaften von transportierenden, polarisierten Epithelien besitzen wie zum Beispiel die Ausbildung von Domen. Für die Nutzung der Caco2-Monolayer als Permeabilitätsmodell wurden die Zellen in 12mm Transwell-Kammern der Firma Corning Costar mit Polycarbonatmembranen (Porendurchmesser 3µm) 19-21 Tage unter den gleichen Bedingungen wie die Caco2 Kulturen kultiviert. Um die Konfluenz und gleiche Beschaffenheit der Monolayer zu gewährleisten wurde der elektrische Widerstand bestimmt.

Dieser lag bei allen Monolayern bei einem Wert von 390 ± 11 Ohm. Die folgende Tabelle zeigt die verschiedenen den Permeabilitätskoeffizienten (Papp) der sowohl in apikal-basolateral (ap-bas) als auch in basolateral-apikal (bas-ap) gemessenen wurde. Die Daten wurden mit Hilfe der HPLC gemessen, AS02 wurde nicht mitgeführt, da er aus einem komplexen Gemisch, vieler Flavonoide besteht. Als Positivkontrolle diente Testosteron, das sehr gut transportiert wird.

Substanz	Papp [nm/min]
Quercetin	640 ± 9
Rutin	nicht bestimmbar
Phloretin	$98 \pm 5,7$
Phloridzin	$24 \pm 4,5$

Tabelle 0.4 Permeabilitätskoeffizienten für die einzelnen Substanzen

Bei den Substanzen war eine erleichterte Diffusion oder ein aktiver Transport nicht zu erwarten, was durch die Papp-Werte bestätigt wird (Stoffen, die gut transportiert werden ($Papp < 1E^{-5}$)). Quercetin gelangt wohl durch passive Diffusion in die Zellen, genau wie Phloretin, wobei Quercetin besser in die Zellen diffundiert. Phloridzin gelangt noch schlechter in die Zellen hinein, allerdings kann man im UV-Spektrum eindeutig sehen, dass der Zucker des Phloridzins abgespalten wird, es entsteht aber kein Phloretin als Aglykon, sondern ein Phloretin-ähnlicher Stoff.

Es könnte sich um ein Glucuronid handeln oder es könnte eine Methoxygruppe eingeführt sein, was allerdings mit dieser Methode nicht näher bestimmt werden konnte, da kein Massenspektrometer an die HPLC gekoppelt war.



Abbildung 0.27 UV-Spektrum von Phloridzin und dem Phloretin-ähnlichen Stoff

Rutin konnte immer nur in dem Kompartiment bestimmt werden, indem es zugegeben war, in der Receiverlösung konnte es nicht mehr bestimmt werden. Dies könnte auch die starken zytotoxischen Effekte von Rutin erklären. Während alle anderen Substanzen in die Zelle gelangen können, verbleibt es im Medium und kann zu Chinonen oxidieren und somit die Zelle schädigen. Rutin hat wegen des Disaccharides keine Affinität zur LPH oder zu dem Glucosetransporter SGLT1 und kann deshalb von der Zelle nicht verwertet werden.

Die Aglyka gelangen am besten in die Zelle, wo sie unter anderem ihre starken antagonistischen Effekte in Bezug auf CYP1A1 bewirken können. Aus den gemessenen Daten kann folgender Vorschlag für den Mechanismus der Aufnahme und Ausscheidung in den Caco2-Zellen dargestellt werden:

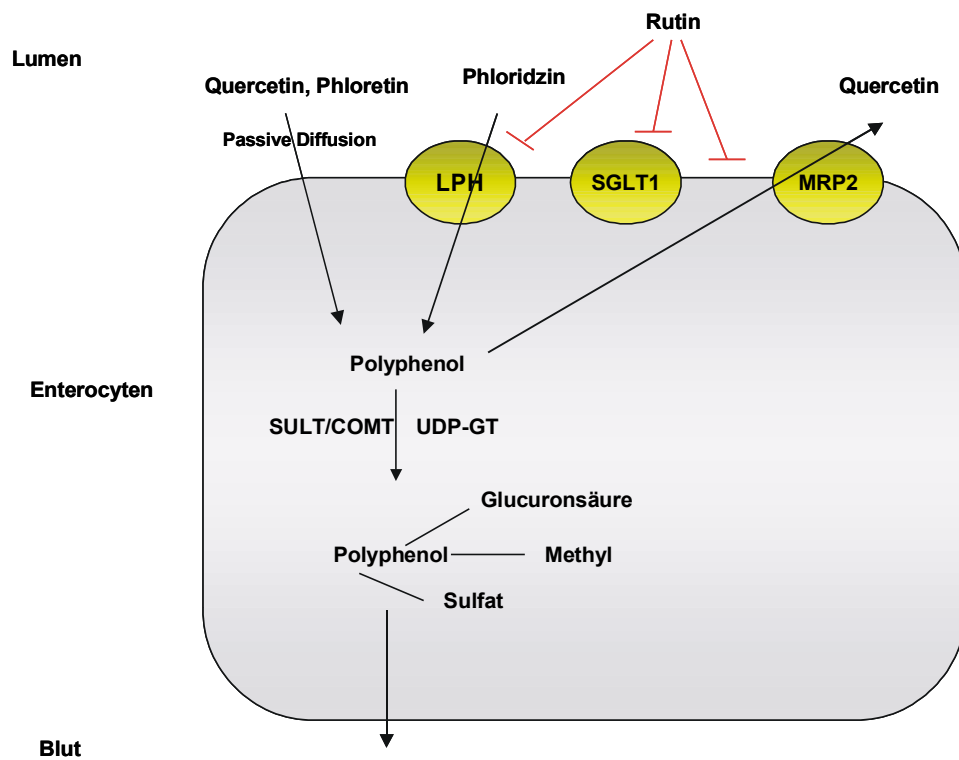


Abbildung 0.28 möglicher Mechanismus der Aufnahme der Stoffe in die Enterocyten

Zusammenfassung

In Tierexperimenten wurde eine antikanzerogene Wirkung von Flavonoiden gegenüber Brust-, Dickdarm-, Magen, sowie Lungenkrebs festgestellt. [Boyer, 2004] Da der Krebsentstehung multifaktorielle Prozesse zu Grunde liegen, werden verschiedene Mechanismen diskutiert wie Flavonoide protektiv eingreifen können, wie z. B. die Modulation von Cytochrom-P450 abhängigen Monooxygenasen (z.B. Quercetin als Ah-Rezeptor Antagonist), die Induktion von Phase II Enzymen oder auch die Induktion von Apoptose. [Stibirova, 2000] [Marian, 1999]

Die genaue biologische Wirkung der Nahrungskomponenten und der humantherapeutische Nutzen ist aber weitgehend ungeklärt. Deshalb wurden in dieser Arbeit Flavonoide des Apfels auf die Wirkung des Fremdstoffmetabolismus im Kolon untersucht.

Ziel dieser Arbeit war es Apfelsaftextrakt, der aus Äpfeln 2002 gewonnen wurde und ausgewählte Flavonoide, die in diesem Apfelsaft vorkommen auf ihre Wirkung auf den Fremdstoffmetabolismus und ihre Aufnahme in die Enterozyten zu untersuchen.

In den Zytotoxizitätsassays MTT-Test und Alamar-BlueTM-Test zeigten sowohl der Apfelsaftextrakt als auch die einzelnen Substanzen einen signifikanten, konzentrationsabhängigen Effekt. Vor allem das Disaccharid Rutin zeigt schon in geringen Konzentrationen starke zytotoxische Effekte. Diese könnte daran liegen, dass Rutin wie in den Transportassays gesehen sehr schlecht in die Zellen gelangt und deshalb im Medium stärker oxidiert werden kann, als die anderen Stoffe. Die Zytotoxizität der anderen Stoffe ist zurückzuführen auf die Chinonbildung der Stoffe im Medium und deren Polymerbildung, was die Zellen in ihrer Funktion erheblich beeinträchtigt. Eine Relevanz dieser Befunde für die in vivo-Situation erscheint aufgrund der micro-aeroben Verhältnisse im Kolon aber eher gering.

Durch zugesetzte Antioxidantien konnten die zytotoxischen Effekte aufgehoben werden. Da bei der Herstellung von Apfelsaft auch Vitamin C zugesetzt wird, wurde hier eine Konzentration als Oxidationsschutz zugesetzt, die im natürlichen Apfelsaft so auch vorkommt und den natürlichen Bedingungen damit näher kommt.

Das Enzym CYP1A1 wurde durch den Apfelsaftextrakt und die Flavonoide Quercetin

und Phloridzin leicht induziert. Dieser Effekt konnte auf mRNA, Proteinebene und bei der Aktivitätsmessung beobachtet werden. Diese Effekte sind im Vergleich zum

potenten Induktor TCDD sehr gering, so dass diese für die in vivo-Situation nicht von belang sind. Sehr viel größer als die agonistische ist die antagonistische Wirkung von den Aglyka Quercetin, Phloretin und auch vom Apfelsaftextrakt. Diese Effekte konnten auch auf mRNA, Proteinebene und bei der Aktivitätsmessung des Enzyms gemessen werden. Quercetin zeigte sich als so starker Inhibitor, es konnte die TCDD-induzierte CYP1A1-Aktivität sogar um 99% bei einer Konzentration von 50µM im EROD-Assay zurückdrängen. In weiteren Messungen im Reporterassay zeigte sich, dass die drei Stoffe an einer Stelle des Ah-Rezeptorsignalweges angreifen. Dabei könnte es zu Interaktionen mit dem Proteinkomplex AhR, des aktivierten AhR/ARNT-Komplexes oder dessen DNA kommen, wodurch die Flavonoide protektiv in die Krebsentstehung eingreifen können.

Quercetin, Phloretin und der Apfelsaftextrakt AS02 erweisen sich als starke Antagonisten. Damit können Flavonoide des Apfels die metabolische Aktivierung chemischer Kanzerogene wie z. B. Benzo[a]pyren oder heterocyclischer, aromatischer Amine hemmen und eventuell auf diese Weise zur Verminderung des Darmkrebsrisikos beitragen.

Die ABC-Transporter spielen eine wichtige Rolle bei der Multidrug Resistance und sind Objekt vieler Untersuchungen des Transports von Medikamenten und toxischen Stoffen durch die intestinale Barriere [Lampen, 2004].

Interaktionen zwischen Flavonoiden und Fremdstofftransportern werden als möglicher Mechanismus diskutiert, der von großer Relevanz für den Einsatz von Flavonoiden als krebopräventive Stoffe. Mehrere Flavonoide wurden in den letzten Jahren gefunden, die den MRP-vermittelten Stofftransport in Tumorzellen modulieren können [Hooijberg, 1997].

MRP2 ist ein weiteres Enzym, welches im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden. Es kann durch Quercetin und den Apfelsaftextrakt signifikant und konzentrationsabhängig in der Real Time PCR und auch im Western Blot induziert werden. Diese Induktion könnte an der Aktivierung des sogenannten Antioxidant Response Element liegen. ARE kann durch redox-aktive Substanzen aktiviert werden und kann die Induktion von Enzymen wie die NADPH Chinonoxidoreduktase, GSH, UGT1A6 und auch MRP2 bewirken. Die Induktion von MRP2 beruht wahrscheinlich auf der Redox-Aktivität der 3',4'-Catechol-Struktur des Quercetins. Die Wirkung des Apfelsaftextraktes könnte an dem im Extrakt enthaltenen Quercetin und seinen

Glykosiden, die durch die LPH und Glukosidasen in der Zelle in Quercetin gespalten werden können, liegen.

Die Induktion des MRP2-Transporters hat einen Einfluß auf die intestinale Entgiftung und die Verteilung von Xenobiotika in den Darmkrebszellen. Zellschädigende Stoffe können so schneller aus der Zelle herausgeschleust werden und können nicht mehr toxisch wirken, ein chemopräventativer Effekt tritt ein.

In Transportassays sollte die Aufnahme der Polyphenole in die Zellen untersucht werden. Bei den Substanzen war eine erleichterte Diffusion oder ein aktiver Transport nicht zu erwarten, was durch die Papp-Werte bestätigt wird. Quercetin gelangt wohl durch passive Diffusion in die Zellen, genau wie Phloretin, wobei Quercetin besser in die Zellen gelangt. Phloridzin gelangt schlechter in die Zellen hinein, allerdings kann man im UV-Spektrum eindeutig sehen, dass der Zucker des Phloridzins abgespalten wird, es entsteht aber kein Phloretin als Aglykon, sondern ein Phloretin-ähnlicher Stoff. Es könnte sich um ein Glucoronid handeln oder es könnte eine Methoxygruppe eingeführt sein, was allerdings mit dieser Methode nicht näher bestimmt werden konnte, sondern mit einer HPLC-MS.

Rutin hat wegen des Disaccharides keine Affinität zur LPH oder zu dem Glucosetransporter SGLT1 und gelangt deshalb nur sehr schlecht bis gar nicht in die Zelle. Die Aglyka gelangen am besten in die Zelle, wo sie unter anderem ihre starken antagonistischen Effekte in Bezug auf CYP1A1 bewirken können.

Bei all den positiven Effekten des Apfelsaftextraktes und ihren Polyphenolen sollte bei den *in vitro* Daten allerdings kritisch betrachtet werden, dass Flavonoide eine geringe Resorptionsrate im Körper haben, keine hohe Plasmakonzentration erreicht wird und ein humantherapeutischer Nutzen oft schwer zu belegen ist. Deshalb sind weitere Bestätigungen *in vivo* notwendig.

Die Ergebnisse dieser Arbeit geben allerdings erste Hinweise auf die Wirksamkeit von sekundären Pflanzenstoffen im Zellsystem, weshalb eine Testung *in vivo* sinnvoll ist, damit fundierte auf den Menschen beziehbare Aussagen gegenüber einer Schutzwirkung gegenüber Krebserkrankungen und Darmerkrankungen getroffen werden können.

Literaturverzeichnis

Akabas, M.H., Cheung, M., Guinamard, R. (1997): Probing the structural and functional domains of the CFTR chloride channel. *J Bioenerg Biomembr.* 5: 453-63.

Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J.D. (1995): Molekularbiologie der Zelle. S. 195-199, VCH Weinheim; 3. Auflage

Aherne, S.A. and O'Brien, N. M. (2002): Dietary Flavonols: Chemistry, Food Content, and Metabolism. *Nutrition* 18 (1):75-81

Andrews AT. (1986): Electrophoresis, theory, techniques, and biochemical and clinical applications. *Clarendon Press*, Oxford

Anzenbacher P, Anzenbacherová E. (2001): Cytochromes P450 and metabolism of xenobiotics. *Cell Mol Life Sci*, 58: 737-747

Artursson, I. (1990): Epithelial Transport of Drugs in Cell Culture. A Model for Studying the Passive Diffusion of Drugs over Intestinal Absorptive (Caco-2) Cells; *Journal of Pharmaceutical Sciences*, Vol. 79 No.6,

Ashida, H. (2000): Suppressive effects of flavonoids on dioxin toxicity. *Biofactors* 12: 201.

Ayrton A, Morgan P (2001): Role of transport proteins in drug absorption, distribution and excretion. *Xenobiotica* 31: 469-497.

Badawi AF, Cavalieri EL, Rogan EG. (2001). Role of human cytochrome P450 1A1, 1A2, 1B1, and 3A4 in the 2-, 4-, and 16alpha-hydroxylation of 17beta-estradiol. *Metabolism*, 50 (9): 1001-1003

Baumgart, A. (2004): Untersuchung zur Wirkung natürlicher Liganden des 'aryl hydrocarbon' – Rezeptors (AhR), Technische Universität Kaiserslautern.

Becker-Follmann, J., Baas, D. (2004): PCR-Eine Methode, drei Schritte. *Biospektrum* 1: 86-90

Bera TK, Lee S, Salvatore G, Pastan I (2001): MRP8, a new member of ABC transporter superfamily, identified by EST database mining and gene prediction program, is highly expressed in breast cancer. *Mol. Med.* 7: 509-516.

Bera TK, Iavarone C, Kumar V, Lee S, Lee B, Pastan I (2002): MRP9, an unusual truncated member of the ABC transporter superfamily, is highly expressed in breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99:6997-7002

Bertalanffy FD, Nagy KP (1961): Mitotic activity and renewal rate of the epithelial cells of human duodenum. *Acta Anat* 45: 362-370.

Bertilsson PM, Olsson P, Magnusson K-E. (2001): Cytokines influence mRNA expression of cytochrome P450 3A4 and MDR1 in intestinal cells. *J Pharm Sci*, 90 (5): 638-646

Borst P, Evers R, Kool M, Wijnholds J (1999): The multidrug resistance protein family. *Biochimica et Biophysica Acta* 1461: 347-357.

Borst P, Evers R, Kool M, Wijnholds J (2000): A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins. *J. Natl. Cancer Inst.* 92: 1295-302

Borst P, Zelcer N, van Helvoort A. (2000): ABC transporters in lipid transport. *Biochim Biophys Acta*, 1486: 128-144

Bosch I, Croop J. (1996): P-glycoprotein multidrug resistance and cancer. *Biochim Biophys Acta*, 1288: F37-F54

Boyer, J., Brown, D. and Lui, R.H. (2004): Uptake of Quercetin and Quercetin 3-Glucoside from Whole Onion and Apple Peel Extracts by Caco-2 Cell Monolayers. *J. Agric. Food Chem.*, 52: 7172-7179.

Braunstein EM, Quiao XT, Madison B, Pinson K, Dunbar L, Gumucio DL. (2002): Villin: A marker for development of the epithelial pyloric border. *Dev Dyn*, 224: 90-102

Burt RK, Thorgeirsson SS. (1988): Coinduction of MDR-1 Multidrug-Resistance and Cytochrome P-450 Genes in Rat Liver by Xenobiotics. *J Natl Cancer Inst*, 80 (17): 1383-1386

Büchler M, König J, Brom M, Kartenbeck J, Spring H, Horie T, Keppler D (1996): cDNA cloning of the hepatocyte canalicular isoform of the multidrug resistance protein, cMrp, reveals a novel conjugate export pump deficient in hyperbilirubinemic mutant rats. *J. Biol. Chem.* 271: 15091-15098

Caldwell J, Marsh MV (1982): Metabolism of drugs by the gastrointestinal tract. In: *Clinical Pharmacology and Therapeutics: Presystemic Drug Elimination* (George CF, Shand DG, Renwick AG eds) S. 29-42, Butterworths London

Cao J, Huang L, Liu Y, Hoffman T, Stieger B, Meier PJ, Vore M (2001): Differential regulation of hepatic bile salt and organic anion transporters in pregnant and postpartum rats and the role of prolactin. *Hepatology* 33:140–147.

Chaudhary PM, Roninson I. (1993): Induction of multidrug resistance in human cells by transient exposure in different chemotherapeutic drugs. *J Natl Cancer Inst*, 85 (8): 632-639

Chen ZS, Kawabe T, Ono M, Aoki S, Sumizawa T, Furukawa T, Uchiumi T, Wada M, Kuwano M, Akiyama SI (1999): Effect of multidrug resistance-reversing agents on transporting activity of human canalicular multispecific organic anion transporter. *Mol. Pharmacol.* 56: 1219-1228.

Chen C, Chin JE, Ueda K, Clark DP, Pastan I, Gottesman MM, Roninson IB. (1986): Internal duplication and homology with bacterial transport proteins in the *mdr1* (P-glycoprotein) gene from multidrug-resistant human cells. *Cell*, 47: 381-389

Cherrington NJ, Hartley DP, Li N, Johnson DR, Klaassen CD (2002): Organ Distribution of Multidrug Resistance Proteins 1, 2, and 3 (Mrp 1, 2, and 3) mRNA and Hepatic Induction of Mrp3 by Constitutive Androstane Receptor Activators in Rats. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 300: 97-104.

Chin KV, Pastan I, Gottesman MM. (1993): Function and regulation of the human multidrug resistance gene. *Adv Cancer Res*, 60: 157-180

Chin KV, Tanaka S, Darlington G, Pastan I, Gottesman MM. (1990): Heat shock and arsenite increases expression of the multidrug resistance (MDR1) gene in human renal carcinoma cells. *J Biol Chem*, 265 (1): 221-226

Ciolino, H.P., Daschner, P.J., Yeh, G.C. (1999): Dietary flavonols quercetin and kaempferol are ligands of the aryl hydrocarbon receptor that affect CYP1A1 transcription differentially. *Biochem.J.* 340: 715-722.

Cole SPC, Bhardwaj G, Gerlach JH, Mackie JE, Grant CE, Almquist KC, Stewart AJ, Kurz EU, Duncan AMV, Deeley RG (1992): Overexpression of a transporter gene in multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science* 258: 1650-1654.

Cole SPC, Deeley RG (1998): Multidrug resistance mediated by the ATP-binding cassette transporter protein MRP. *Bio Essays* 20: 931-940.

Cole SPC, Deeley RG (2001): Multidrug Resistance II - MRP and Related Proteins. In: Bertino JR und Scotto KW (eds.). *Encyclopedia of Cancer* 2nd ed. Academic Press San Diego, California

Conrad S, Viertelhaus A, Orzechowski A, Hoogstraate J, Gjellan K, Schrenk D, Kauffmann H-M (2001): Sequencing and tissue distribution of the canine MRP2 gene compared with MRP1 and MDR1. *Toxicology* 156: 81-91.

Conrad S (2002): Aufklärung genetischer Faktoren für die Variabilität von Expression und Funktion der membranständigen humanen ABCC-Transporter MRP1 und MRP2. Dissertation. Fachbereich Chemie, Fachrichtung Lebensmittelchemie und Umwelttoxikologie, Universität Kaiserslautern

Cooper T. Biochemische Arbeitsmethoden, *de Gruyter, Berlin • New York*, 1980

Crespy, V. et al. (2001): Comparison of the Intestinal Absorption of Quercetin, Phloretin and Their Glucosides in Rats. *J. Nutrition* 131: 2109-2114.

Courtois A, Payen L, Guillouzo A, Fardel O (1999a): Up-regulation of multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2) expression in rat hepatocytes by dexamethasone. *FEBS Lett.* 459: 381-385.

Courtois A, Payen L, Le Ferrec E et al. (2002): Differential regulation of multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2) and cytochromes P450 B1/2 and 3A1/2 in phenobarbital-treated hepatocytes. *Biochem Pharmacol.* 63: 33-341.

Creamer B (1967): The turnover of the epithelium of the small intestine. *Br Med Bull* 23: 226-230.

Crespy, V. et al. (2002): Bioavailability of Phloretin and Phloridzin in Rats. *J. Nutrition* 132: 3227-3230-

Cui Y, König J, Buchholz U, Spring H, Leier I, Keppler D (1999): Drug resistance and ATP-dependent conjugate transport mediated by the apical multidrug resistance protein, MRP2, permanently expressed in human and canine cells. *Mol. Pharmacol.* 55: 929-937.

Dean M, Allikmets R. (1995): Evolution of ATP-binding cassette transporter genes. *Curr Opin Genet Dev*, 5: 779-785

Dean M, Allikmets R. (2001): Complete Characterization of the Human ABC Gene Family. *J Bioenerg Biomembr*, 33 (6): 475-479

Dean M, Hamon Y, Chimini G. (2001): The human ATP-binding cassette (ABC) transporter family. *J Lipid Res*, 42: 1007-1017

Dietrich CG, de Waart DR, Ottenhoff R, Bootsma AH, van Gennip AH, Elferink RP (2001a): 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[4,5b]pyridine. *Carcinogenesis* 22: 805-811.

Dietrich CG, de Waart DR, Ottenhoff R, Schoots IG, Elferink RP (2001b): Increased bioavailability of the food-derived carcinogen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5b]pyridine in MRP2-deficient rats. *Mol Pharmacol.* 59: 974-980.

DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH.

Donato M.T., Castell J.V., Gómez-Lechón M.J. (1992): A rapid and sensitive method for measuring monooxygenase activities in hepatocytes cultured in 96-well plates, I. *Tiss. Meth.* 14:, 153-158.

Doostdar, H., Burke, M.D. and Mayer, R.T. (2000): Bioflavonoids: selective substrates and inhibitors for cytochrome P450 CYP1A and CYP1B1. *Toxicology* 144: 31-38.

Doyle, W.A.; Burke, J.F., Chovnick, A., Dutton, F.L., Whittle, J.R.; Bray, R.C. (1996): Properties of xanthine dehydrogenase variants from rosy mutant strains of *Drosophila melanogaster* and their relevance to the enzyme's structure and mechanism. *Eur J Biochem.* 239(3):782-95.

Dufour, C., Dangles, O. (2004): Flavonoid-serum albumin complexation: determination of binding constants and binding sites by fluorescence spectroscopy *Biochimica et Biophysica Acta* 1721: 164-173.

Dunbar BS. Protein Blotting: A Practical Approach, *Oxford University Press*, 1994

Durrant I (1990): Light-based detection for biomolecules. *Nature* 346: 297.

Eberhard, M., Lee, C., Liu, R.H. (2000): Antioxidant activity of fresh apples. *Nature*. 405: 903-904

Eisenbrand G, Metzler M. Toxikologie für Naturwissenschaftler und Mediziner: Stoffe, Mechanismen, Prüfverfahren. *Thieme, Stuttgart · New York*, 1.Auflage korrigierter Nachdruck, 2001

Ellis SW, Ching MS, Watson PF, Henderson CJ, Simula AP, Lennard MS, Tucker GT, Woods HF. 1992. Catalytic activities of human debrisoquine 4-hydroxylase cytochrome P450 (CYP2D6) expressed in yeast. *Biochem Pharmacol*, 44 (4): 617-620

Eneroth A, Astrom E, Hoogstraate J, Schrenk D, Conrad S, Kauffmann HM, Gjellan K. 2001. Evaluation of a vincristine resistant Caco-2 cell line for use in a calcein AM extrusion screening assay for P-glycoprotein interaction. *Eur J Pharm Sci*, 12 (3): 205-214

Falbe, J., Regitz, M. (1995): Römpp Chemie Lexikon auf CD-Rom. Version 1.0
Georg Thieme Verlag Stuttgart, 9. Auflage

Faller A. Der Körper des Menschen, Einführung in Bau und Funktion. *Thieme, Stuttgart · New York*, 13.Auflage, 1999

Ferrary E, Cohen-Tannoudji M, Pehau-Arnaudet G, Lapillonne A, Athman R, Ruiz T, Boulouha L, El Marjou F, Doye A, Fontaine JJ, Antony C, Babinet C, Louvard D, Jaisser F, Robine S. 1999. In vivo, Villin is required for Ca²⁺-dependent F-actin disruption in intestinal brush borders. *J Cell Biol*, 146: 819-829

Finnström N, Bjelfman C, Söderström TG, Smith G, Egevad L, Norlén BJ, Wolf CR, Rane A. 2001. Detection of cytochrome P450 mRNA transcripts in prostate samples by RT-PCR. *Eur J Clin Invest*, 31: 880-886

Finnström N, Thörn M, Lööf L, Rane A. 2001 a. Independent patterns of cytochrome P₄₅₀ gene expression in liver and blood in patients with suspected liver disease. *Eur J Clin Pharmacol*, 57: 403-409

Flens MJ, Izquierdo MA, Scheffer GL et al (1994): Immunohistochemical detection of the multidrug resistance-associated protein MRP in human multidrug resistant tumor cells by monoclonal antibodies. *Cancer Res* 54: 4557-4563.

Flens MJ, Zaman GJR, van der Valk P, Izquierdo MA, Schroeijers AB, Scheffer GL, van der Groep P, de Haas M, Meijer CJLM, Scheper RJ (1996): Tissue Distribution of the Multidrug Resistance Protein. *American Journal of Pathology* 148: 1237-1247.

Fojo AT, Lebo R, Shimizu N, Chin JE, Roninson IB, Merlino GT, Gottesman MM, Pastan I. (1986). Localization of multidrug resistance-associated DNA sequences to human chromosome 7. *Somat Cell Molec Genet*, 12: 415-420

Fojo AT, Ueda K, Slamon DJ, Poplack DG, Gottesman MM, Pastan I. (1987). Expression of a multidrug-resistance gene in human tumors and tissues. *Proc Natl Acad Sci USA*, 84: 265-269

Forkmann, G. (1993): Biosynthesis of flavonoids. *Polyphenolic phenomena*, Scalbert A (Ed.), INRA Editions, Paris, 65-71

Formica, J.V., Regelson, W. (1995): Review of the biology of Quercetin and related bioflavonoids. *Food Chem Toxicol.* 33(12):1061-80.

Friling, R.S.; Bensimon, A., Tichauer, Y., Daniel, V. (1990): Xenobiotic-inducible expression of murine glutathione S-transferase Ya subunit gene is controlled by an electrophile-responsive element. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87(16):6258-62.

Fromm MF, Kauffmann HM, Fritz P, Burk O, Kroemer HK, Warzok RW, Eichelbaum M, Siegmund W, Schrenk D. 2000. The Effect of Rifampin Treatment on Intestinal Expression of Human MRP Transporters. *Am J Pathol*, 157: 1575-1580

Gant TW, Schrenk D, Silverman JA, Thorgeirsson SS. 1994. Requirement for metabolic activation of acetylaminofluorene to induce multidrug gene expression. *Environ Health Perspect*, 102: 209-212

Gerk PM, Vore M (2002): Regulation of Expression of the Multidrug Resistance-Associated Protein 2 (MRP2) and Its Role in Drug Disposition. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 302: 407-415.

Glaeser H, Drescher S, van der Kuip H, Behrens C, Geick A, Burk O, Dent J, Somogyi A, von Richter O, Griese EU, Eichelbaum M, Fromm MF. 2002. Shed human enterocytes as a tool for the study of expression and function of intestinal drug-metabolizing enzymes and transporters. *Clin Pharmacol Ther*, 71 (3):131-140

Gonzalez FJ, Gelboin HV. 1994. Role of human cytochromes P450 in the metabolic activation of chemical carcinogens and toxins. *Drug Metab Rev*, 26(1&2): 165-183

Gottesmann MM, Pastan I. 1993. Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. *Annu Rev Biochem*, 62: 385-427

Gotoh Y, Suzuki H, Kinoshita S, Hirohashi T, Kato Y, Sugiyama Y (2000): Involvement of an Organic Anion Transporter (Canalicular Multispecific Organic Anion Transporter/ Multidrug Resistance-Associated Protein 2) in Gastrointestinal Secretion of Glutathione Conjugates in Rats. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 292: 433-439.

Grant CE, Valdimarsson G, Hipfner DR, Almquist KC, Cole SPC, Deeley RG. 1994. Overexpression of multidrug resistance-associated protein (MRP) increases resistance to natural product drugs. *Cancer Res*, 54: 357-361

Grant CE, Kurz EU, Cole SPC, Deeley RG (1997): Analysis of the Intron-Exon Organization of the Human Multidrug-Resistance Protein Gene (MRP) and Alternative Splicing of Its mRNA. *Genomics*. 45: 368-378.

Gross, G.G. (1992): Enzymes in the Biosynthesis of hydrolysable tannins. *Plant Polyphenols*, Plenum Press, 43-60

Grube, M., Meyer zu Schwabedissen, H., Draber, K., Präger, D., Möritz, K.U., Linnemann, K., Fusch, C., Jedlitschky, G., Kroemer, H.K. (2004): Expression, Localization and Function of the Carnitine Transporter OCTN2 in Human Placenta. *Drug Metabolism and Disposition*. 33: 31-36

Hames BD, Rickwood D. (1990): Gel Electrophoresis of Proteins: A Practical Approach, Second Edition, *Oxford University Press*

Hao XY, Bergh J, Brodin O, Hellman U, Mannervik B. (1994.) Acquired resistance to cisplatin and doxorubicin in a small lung cancer cell line is correlated to elevated expression of glutathione-linked detoxification enzymes. *Carcinogenesis*, 15: 1167-1173

Heijn M, Hooijberg JH, Scheffer GL, Szabo G, Westerhoff HV, Lankelma J (1997): Anthracyclines modulate multidrug resistance protein (MRP) mediated organic anion transport. *Biochim. Biophys. Acta* 1326, 12-22.

Hermann, K. (1973): Die phenolischen Inhaltsstoffe des Obstes. *Lebensm. Unters. Forsch.* 151: 41-51

Hickmann JA. (1996): Apoptosis and chemotherapy resistance. *Eur J Cancer*, 32A: 921-926

Higgins CF. 1992. ABC-transporters – from microorganisma to man. *Ann Rev Cell Biol*, 8: 67-113

Hipfner DR, Mao Q, Qiu W, Leslie EM, Gao M, Deeley RG, Cole SPC (1999b): Monoclonal antibodies that inhibit the transport function of the 190-kDa multidrug resistance protein, MRP. Localization of their epitopes to the nucleotide-binding domains of the protein. *J. Biol. Chem.* 274: 15420-15426.

Ho, Burton, Conradi and Barsuhn (1995): A Biophysical Model of Passive and Polarized Active Processes in Caco-2-Cells: Approaches to Uncoupling Apical and Basolateral Membrane Events in the Intact Cell; *Journal of Pharmaceutical Sciences*, Vol. 84 No.1, 21-26,

Hodek, P., Trefil, P., Stibirova, M. (2002): Flavonoids-potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes P450. *Chem Biol Interact.* 22;139(1):1-21.

Hollman et al. (1995): Absorption od dietary quercetin glycosides and quercetin in healthy ileostomy volunteers. *Am. J. Clin.Nutr.* 62: 1276-1282.

Hollman, P.C.H. and Katan M.B. (1999): Health Effects and Bioavailability of Dietary Flavonols. *Free Radical Res.* 31: 75-80

Hoojberg, J.H., Broxtermann, H.J., Heijn, M., Fles, D.L.A... Lankelma, J., Pinedo, H.M. (1997): Modulation by (iso)flavonoidsof the ATPase activity of the multidrug resistance protein. *FEBS Letters.* 413: 344-348

Hopper E, Belinsky MG, Zeng H, Tosolini A, Testa JR, Kruh GD (2001): Analysis of the structure and expression pattern of MRP7 (ABCC10), a new member of the MRP subfamily. *Cancer Lett.* 162: 181-191.

Hotta T, Tanimura H, Iwahashi M, Tani M, Tsunoda T, Noguchi K, Mizobata S, Arii K, Terasawa H, Nakamori M, Yamaue H. (1999): P-glycoprotein-expressing tumor cells

are resistant to anticancer drugs in human gastrointestinal cancer. *Surg Today Jpn J Surg*, 29: 591-596

Hrycyna, C.A., Airan, L.E., Germann, U.A., Ambudkar, S.V., Pastan, I., Gottesmann, M.M. (1998): Structural flexibility of the linker region of human P-glycoprotein permits ATP hydrolysis and drug transport. *Biochemistry*. 29;37(39):13660-73.

Huang L, Smit JW, Meijer DK, Vore M (2000): Mrp2 is essential for estradiol-17 β (β -D-glucuronide)-induced cholestasis in rats. *Hepatology* 32: 66-72.

Ito K, Oleschuk CJ, Westlake CJ, Vasa M, Deeley RG, Cole SPC (2001a): Mutation of Trp1254 in the Multispecific Organic Anion Transporter, Multidrug Resistance Protein 2 (MRP2) (ABCC2), Alters Substrate Specificity and Results in Loss of Methotrexate Transport Activity. *J. Biol. Chem.* 276: 38108-38114.

Ito S, Ieiri I, Tanabe M, Suzuki A, Higuchi S, Otsubo K (2001b): Polymorphism of the ABC transporter genes, MDR1, MRP1 and MRP2/cMOAT, in healthy Japanese subjects. *Pharmacogenetics* 11: 175–184.

Jedlitschky G, Leier I, Buchholz U, Barnouin K, Kurz G, Keppler G (1996): Transport of glutathione, glucuronate, and sulfate conjugates by the MRP gene-encoded conjugate export pump. *Cancer Res.* 56: 988-994.

Jedlitschky G, Leier I, Buchholz U, Hummel-Eisenbeiss J, Burchell B, Keppler D (1997): ATP-dependent transport of bilirubin glucuronides by the multidrug resistance protein MRP1 and its hepatocyte canalicular isoform MRP2. *Biochem. J.* 327: 305-310.

Johnson, M.K., Loo, G. (2000): Effects of epigallocatechin gallate and quercetin on oxidative damage to cellular DNA. *Mutat Res.* 28;459(3):211-8.

Kast HR, Goodwin B, Tarr PT et al. (2002): Regulation of multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2; ABCC2) by the nuclear receptors PXR, FXR, and CAR. *J. Biol. Chem.* 277: 2908-2915.

Kauffmann H-M, Keppler D, Kartenbeck J, Schrenk D (1997): Induction of cMrp/cMoat gene expression by cisplatin, 2-acetylaminofluorene, or cycloheximide in rat hepatocytes. *Hepatology*. 26: 980-985

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

Kauffmann H-M, Schrenk D (1998): Sequence analysis and functional characterisation of the 5'-flanking region of the rat multidrug resistance protein 2 (mrp2) gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 245: 325-331.

Kauffmann HM, Pfannschmidt S, Zoller H, Benz A, Vorderstemann B, Webster JI, Schrenk D (2002): Influence of redox-active compounds and PXR-activators on human MRP1 and MRP2 gene expression. *Toxicology* 171:137-46

Kawabe T, Chen ZS, Wada M, Uchiumi T, Ono M, Akiyama S, Kuwano M (1999): Enhanced transport of anticancer agents and leukotriene C4 by the human canalicular multispecific organic anion transporter (cMOAT/MRP2). *FEBS Lett.* 456: 327-331.

Keitel V, Kartenbeck J, Nies AT, Spring H, Brom M, Keppler D (2000): Impaired Protein Maturation of the Conjugate Export Pump Multidrug Resistance Protein 2 as a Consequence of a Deletion Mutation in Dubin-Johnson Syndrome. *Hepatology* 32: 1317-1328.

Kennedy S.W., Lorenzen, A., James, C.A. and Collins, B.T. (1992): Ethoxyresorufin-O-deethylase and Porphyrin Analysis in Chicken Embryo Hepatocyte Cultures with a Fluorescence Multiwell Plate Reader. *Analytical Biochemistry* 211: 102-112

Kennedy S.W., Jones, S.P. and Bastien, L.J. (1995): Efficient Analysis of Cytochrome P450 1A Catalytic Activity, Porphyrins and Total Proteins in Chicken

Embryo Hepatocyte Cultures with a Fluorescence Plate Reader. *Analytical Biochemistry* 226: 362-370.

Keppler D, König J (1997): Hepatic canalicular membrane 5: Expression and localization of the conjugate export pump encoded by the MRP2 (cMRP/cMOAT) gene in liver. *FASEB J.* 11: 509-516.

Keppler D, Leier I, Jedlitschky G (1997): Transport of Glutathione Conjugates and Glucuronides by the Multidrug Resistance Proteins MRP1 and MRP2. *Biol. Chem.* 378: 787-791.

Keppler D, Leier I, Jedlitschky G, König J (1998): ATP-dependent transport of glutathione S-conjugates by the multidrug resistance protein MRP1 and its apical isoform MRP2. *Chem-Biol. Interact* 111-112: 153-161.

Kim, H., Hall, P., Smith, M., Kirk, M., Prasain, J.K., Barnes, S., Grubbs, C (2004): Chemoprevention by grape seed extract and genistein in carcinogen-induced mammary cancer in rats is diet dependent. *J Nutr.*;134(12 Suppl):3445S-3452S.

Klein I, Sarkadi B, Váradi A (1999): An inventory of the human ABC proteins. *Biochimica et Biophysica Acta* 1461: 237-262.

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

Kool M, de Haas M, Scheffer GL, Scheper RJ, van Eijk MTJ, Juijn JA, Baas F, Borst P (1997): Analysis of Expression of cMOAT (MRP2), MRP3, MRP4, and MRP5, homologues of the multidrug resistance-associated protein gene (MRP1), in human cancer cell lines. *Cancer Res.* 57: 3537-3547

Koolman J, Röhm KH. Taschenatlas der Biochemie. *Thieme, Stuttgart · New York*, 2.Auflage, 1998

Krishna DR, Klotz U (1994): Extrahepatic metabolism of drugs in humans. *Clin. Pharmacokinet.* 26: 144-160.

Kubitz R, Wettstein M, Warskulat U, Haussinger D (2001): Regulation of the multidrug resistance protein 2 in the rat liver by lipopolysaccharide and dexamethasone. *Gastroenterology* 116: 401-410.

Kusuhura H, Sugiyama Y (2002): Role of transporters in the tissue-selective distribution and elimination of drugs : transporters in the liver, small intestine, brain and kidney. *Journal of Controlled Release* 78: 43-54.

3 Kunz, S. (2004): Untersuchungen zur tumorpromovierenden Wirkung ‚nicht-dioxinartiger‘ polychlorierter Biphenyle in der Rattenleber, Technische Universität Kaiserslautern.

Kuo, J.M., Yeh, D.B., Sun Pan, B. (1999): Rapid photometric assay evaluating antioxidative activity in edible plant material. *J. Agr. Food Chem.* 47: 3206-3209

Lämmli, UK (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.

Lampen, A., Ebert, B., Stumkat, L., Jacob, J., Seidel, A. (2004): 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. et Biophys. Acta.* 1681 : 38-46

Lehnert M (1996): Clinical Multidrug Resistance in Cancer: A Multifunctional Problem. *Eur. J. Cancer* 32A: 912

Lewis DFV. 2002. Molecular modeling of human cytochrome P450-substrate interactions. *Drug Metab Rev*, 34 (1&2): 55-67

Leece, B., Denomme, M.A., Towner, R., Li, S.M. and Safe, S. (1985): Polychlorinated biphenyls: Correlation between *in vivo* and *in vitro* quantitative structure-activity relationships (QSARs). *J. Toxicol. Environ. Health* 16: 379-388.

Leslie, E.M., Mao, Q., Oleschuk, C.J., Deeley, R.G., Cole, S.P. (2001): Modulation of multidrug resistance protein 1 (MRP1/ABCC1) transport and atpase activities by interaction with dietary flavonoids. *Mol Pharmacol.*;59(5):1171-80.

Ling V. 1997. Multidrug resistance: molecular mechanisms and clinical relevance. *Cancer Chemother Pharmacol*, 40: S3-S8

Linseisen, J., Radtke, J., Wolfram, G. (1997): Flavonoidzufuhr Erwachsener in einem bayrischen Teilkollektiv der Nationalen Verzehrsstudie. *Z. Ernährungswissenschaften*. 36: 403-412

Litman T, Druley TE, Stein WD, Bates SE. 2001. From MDR to MXR: new understanding of the multidrug resistance systems, their properties and clinical significance. *Cell Mol Life Sci*, 58: 931-959

Loe DW, Almquist KC, Cole SPC, Deeley RG (1996b): ATP-dependent 17 β -Estradiol-17-(β -D-Glucuronide) Transport by Multidrug Resistance Protein (MRP). *The Journal of Biological Chemistry* 271: 9683-9689.

Loor F, Tiberghien F, Wenandy T, Didier A, Traber R. 2002. Cyclosporins: Structure-Activity Relationships for the Inhibition of the Human *MDR1* P-Glycoprotein ABC-Transporter. *J Med Chem*, 45: 4598-4612

Lotito, S.B., Frei, B. (2004): The increase in human plasma antioxidant capacity after apple consumption is due to the metabolic effect of fructose on urate, not apple-derived antioxidant flavonoids. *Free Radic Biol Med*. 15;37(2):251-8.

Lottspeich F, Zorbas H. Bioanalytik. *Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg*, 1998

Lopez-Lazaro, M. (2002): Flavonoids as Anticancer Agents: Strukture-Aktivty Relationship Study. *Curr. Me. Chem.-Anti-Cancer Agents* 2: 691-714.

Lorenzen, A. and Kennedy S.W. (1993): A Fluorescence-Based Protein Assay for Use with a Microplate Reader. *Analytical Biochemistry* 214: 346-348

Lottspeich, F., Zorbas, H. (1998): Bioanalytik. Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg, Berlin.

MacLennan AL, Orringer MB, Beer DG. (1999): Identification of intestinal-type Barrett's Metaplasia by using the intestine-specific protein villin and esophageal brush cytology. *Mol Carcinog*, 24: 137-143

Madison BB, Dunbar L, Qiao XT, Braunstein K, Braunstein E, Gumucio DL. (2002): *cis* Elements of the Villin Gene Control Expression in Restricted Domains of the Vertical (Crypt) and Horizontal (Duodenum, Cecum) Axes of the Intestine. *J Biol Chem*, 277 (36): 33275-33283

Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Remesy, J.L.(2004): Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.* 79: 727-747

Martínez C, García-Martín E, Pizarro RM, García-Gamito FJ, Agúndez JAG. (2002): Expression of paclitaxel-inactivating CYP3A activity in human colorectal cancer: implications for drug therapy. *Br J Cancer*, 87: 681-686

Marquardt, H., Schäfer, S. (2004): Lehrbuch der Toxikologie. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart. 2. Auflage.

Matsuo, M., Sasaki, N., Saga, K. And Kaneko T. (2005): Cytotoxicity of Flavonoids toward Cultured Normal Human Cells. *Biol. Pharm. Bull.* 28 (2): 253-259

Meijer C, Mulder NH, Timmer-Bosscha H, Sluiter WJ, Meersma GJ, De Vries EG. 1992. Relationship of cellular glutathione to the cytotoxicity and resistance of seven platinum compounds. *Cancer Res*, 52: 6885-6889

Mottino AD, Hoffman T, Jennes L, Cao J, Vore M(2001): Expression of multidrug resistance-associated protein 2 in small intestine from pregnant and postpartum rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 280: G1261–G1273.

Nakamura T, Sakaeda T, Ohmoto N, Tamura T, Aoyama N, Shirakawa T, Kamigaki T, Nakamura T, Kim KI, Kim SR, Kuroda Y, Matsuo M, Kasuga M, Okumura K. 2002. Real-time quantitative polymerase chain reaction for MDR1, MRP1, MRP2, and CYP3A-mRNA levels in Caco-2 cell lines, human duodenal enterocytes, normal colorectal tissues, and colorectal adenocarcinomas. *Drug Metab Dispos*, 30 (1): 4-6

Narasaki F, Oka M, Nakano R, Ikeda K, Fukuda M, Nakamura T, Soda H, Nakagawa M, Kuwano M, Kohno S (1997): Human canalicular multispecific organic anion transporter (cMOAT) is expressed in human lung, gastric, and colorectal cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 240:606-11

Nelson DR, Koymans L, Kamataki T, Stegeman JJ, Feyereisen R, Waxman DJ, Waterman MR, Gotoh O, Coon MJ, Estabrook RW, Gunsalus IC, Nebert DW. 1996. P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics*, 6: 1-42

Nishino J et al. (1999): Transepithelial transport of organic anions across the choroid plexus: possible involvement of organic anion transporter and multidrug resistance-associated protein. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 290: 289-294

Nooter K, Westermann AM, Flens MJ, Zaman GJR, Scheper RJ, van Wingerten KE, Burger H, Oostrum R, Boersma T, Sonneveld P, Gratama JW, Kok T, Eggermont AMM, Bosman FT, Stoter G (1995): Expression of the Multidrug Resistance-associated Protein (*MRP*) Gene in Human Cancers. *Clinical Cancer Research* 1: 1301-1310.

Obach RS, Zhang Q-Y, Dunbar D, Kaminsky LS. (2001): Metabolic characterization of the major human small intestinal cytochrome P450S. *Drug Metab Dispos*, 29 (3): 347-352

Olthof, M.R., Hollman, P.C.H., Vree, T.B., Katan, M.B. (2000): Bioavailabilities of Quercetin-3-glucoside and Quercetin-4'-glucoside Do Not Differ in Humans. *J. Nutrition* 130: 1200-1203

Pagonis, C., Tauber, A.L., Pavlotsky, N., Simons, E.R. (1986) : Flavonoid impairment of neutrophil response. *Biochem Pharmacol.* 15;35(2):237-45.

Paulusma CC, van Geer MA, Evers R, Heijn M, Ottenhoff R, Borst P, Oude Elferink RPJ (1999). Canalicular multispecific organic anion transporter/multidrug resistance protein 2 mediates low-affinity transport of reduced glutathione. *Biochem. J.* 338: 394-401.

Payen L, Courtois A, Loewert M, Guillouzo A, Fardel O (2001): Reactive oxygen species-related induction of multidrug resistance-associated protein 2 expression in primary rat hepatocytes exposed to sulforaphane. *Biochem Biophys Res Commun.* 282: 257-263

Payen L, Sparfel L, Courtois A, Vernhet L, Guillouzo A, Fardel O (2002): The drug efflux pump MRP2 : Regulation of expression in physiopathological situations and by endogenous and exogenous compounds. *Cell Biology and Toxicology* 18: 221-233.

Peters WH, Roelofs HM. (1992): Biochemical characterization of resistance to mitoxantrone and adriamycin in Caco-2 human colon adenocarcinoma cells: a possible role for glutathione S-transferase. *Cancer Res*, 52: 1886-1890

Pfaffl, M.W. (2001): A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29, No. 9 2002-2007

Pfaffl, MW. (2004): Real-Time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA-Quantifizierung. *Biospektrum* 1: 92-95

Phillips, F. (2003): Schützen pflanzliche Lebensmittel vor Krebs? *Angehörige der medizinischen Berufe n° 6* British Nutrition Foundation United Kingdom

Pitot, H.C., and Fouts, J.R. (1964): Hepatomas in tissue culture compared with adapting liver in vivo. *Natl. Cancer Inst. Monogr.* 13: 229.

Pschyrembel Klinisches Wörterbuch, 259.Auflage, de Gruyter, Berlin • New York, 2002

Rappa G, Finch RA, Sartorelli AC, Lorico A (1999): New insights into the biology and pharmacology of the multidrug resistance protein (MRP) from gene knockout models. *Biochem. Pharmacol.* 58: 557-562.

Rehner G, Daniel H: Biochemie der Ernährung. S.289-292, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, 1999.

Renes J, de Vries EGE, Jansen PLM, Müller M (2000a): The (patho)physiological functions of the MRP family. *Drug Resistance Updates* 3: 289-302.

Reuber, M.D. (1961): A transplantable bile-secreting hepatocellular carcinoma in the rat. *J. Natl.Cancer Inst.* 26: 791

Renwick AG, George CF (1989): Metabolism of xenobiotics in the gastro-intestinal tract. In: *Intermediary Xenobiotic Metabolism in Animals: Methodology, Mechanisms and Significance* (Huston DH, Caldwell J, Paulson GD eds) S. 13-40, Taylor and Francais London.

Rice-Evans C. (2001): Flavonoid antioxidants. *Curr Med Chem.* 8(7):797-807.

Rice-Evams, C., Spencer, J.P., Schroeter, H., Rechner, A.R. (2000): Bioavailability of flavonoids and potential bioactive forms in vivo. *Drug Metabol Drug Interact.* 17(1-4):291-310.

Rice-Evams, C., Miller, M.J. (1996): Antioxidant activities of flavonoids as bioactive components of food. *Biochem Soc Trans.*;24(3):790-5.

Roninson IB (editor). 1991. Molecular and cellular biology of multidrug resistance in tumor cells. *Plenum publishing corporation New York*

Rost D, König J, Weiss G, Klar E, Stremmel W, Keppler D (2001): Expression and localization of the multidrug resistance proteins MRP2 and MRP3 in human gallbladder epithelial cells. *Gastroenterology* 121: 1203-1208.

Rushmore, T.H., King, R.G., Paulson, K.E., Pickett, C.B. (1990): Regulation of glutathione S-transferase Ya subunit gene expression: identification of a unique xenobiotic-responsive element controlling inducible expression by planar aromatic compounds. *Proc Natl Acad Sci U S A.*;87(10):3826-30

Scalbert, A., Morand, C., Manach, C., Remesy, C. (2002): Absorption and metabolism of polyphenols in the gut and impact on health. *Biomed Pharmacother.*; 56(6):276-82.

Schaub TP, Kartenbeck J, König J, Vogel O, Witzgall R, Kriz W, Keppler, D (1997): Expression of the conjugate export pump encoded by the *mrp2* gene in the apical membrane of kidney proximal tubules. *J. Am. Soc. Nephrol.* 8: 1213-1221.

Schaub TP, Kartenbeck J, König J, Spring H, Dorsam J, Staehler G, Storkel S, Thon WF, Keppler D (1999): Expression of the MRP2 gene-encoded conjugate export

pump in human kidney proximal tubules and in renal cell carcinoma. *J. Am. Soc. Nephrol.* 10: 1159- 1169.

Schneider E, Hunke S (1998): ATP-binding-cassette (ABC) transport systems: functional and structural aspects of the ATP-hydrolyzing subunits/domains. *FEMS Microbiol. Rev.* 22: 1-20.

Schrenk D, Gant TW, Michalke A, Orzechowski A, Silverman JA, Battula N, Thorgeirsson SS. 1994. Metabolic activation of 2-acetylaminofluorene is required for induction of multidrug resistance gene expression in rat liver cells. *Carcinogenesis*, 15: 2541-2546

Schrenk D. 1994. P-Glykoprotein: ein Mediator der Mehrfachresistenz in Tumorzellen. *Deutsches Ärzteblatt – Ärztliche Mitteilungen (Sonderdruck)*, 91: 1-3

Sikic BI, Fisher GA, Lum BL, Halsey J, Oreskovic LB, Chen G. 1997. Modulation and prevention of multidrug resistance by inhibitors of P-glycoprotein. *Cancer Chemother Pharmacol*, 40: S13-S19

Sesink, A.L.A., O'Leary, K.A. and hallman, P.C.H. (2001): Quercetin Glucuronides but Not Glucosides Are Present in Human Plasma after Consumption of Quercetin-3-Glucoside or Quercetin-4'-Glucoside. *J. Nutr.* 131:1938-1941.

Spanos, G.A., Wrolstad, R.E., Heatherbell, D.A. (1990): Influence of Preprocessing and Storage on the Phenolic Composition of Apple Juice. *J. Agric. Food Chem.* 38: 1572-1579

Spencer, J.P., Abd-el-Mohsen, MM. And Rice-Evans C. (2004): Cellular uptake and metabolism of flavonoids and their metabolites: implications for their bioactivity. *Arch. Biochem. Biophys.*, 423: 148-161.

Sparreboom A, Nooter K. 2000. Does P-glycoprotein play a role in anticancer drug pharmacokinetics?. *Drug Resist Updat*, 3: 357-363

Stöckel B, König J, Nies AT, Cui Y, Brom M, Keppler D (2000): Characterization of the 5'-flanking region of the human multidrug resistance protein 2 (MRP2) gene and its regulation in comparison with the multidrug resistance protein 3 (MRP3) gene. *Eur J Biochem.* 267: 1347-1358.

Stibirova, M., Schmeiser, H.H., Frei, E. (2000): Oxidation of xenobiotics by plant microsomes, a reconstituted cytochrome P450 system and peroxidase: a comparative study. *Phytochemistry.*;54(4):353-62

Suzuki H, Sugiyama Y (1998): Excretion of GSSG and glutathione conjugates mediated by MRP1 and cMOAT/MRP2. *Semin. Liver Dis.* 18: 359-376.

Suzuki H, Sugiyama Y. 2000. Role of metabolic enzymes and efflux transporters in the absorption of drugs from the small intestine. *Eur J Pharm Sci*, 12: 3-12

Szabó D, Keyzer H, Kaiser HE, Molnár J. 2000. Reversal of multidrug resistance in tumor cells. *Anticancer Res*, 20: 4261-4274

Taavitsainen P, Kiukaanniemi K, Pelkonen O. 2000. In vitro inhibition screening of human hepatic P₄₅₀ enzymes by five angiotensin-II receptor antagonists. *Eur J Clin Pharmacol*, 56: 135-140

Taniguchi K, Wada M, Kohno K, Nakamura T, Kawabe T, Kawakami M, Kagotani K, Okumura K, Akiyama S, Kuwano M (1996): A human canalicular multispecific organic anion transporter (cMOAT) gene is overexpressed in cisplatin-resistant human cancer cell lines with decreased drug accumulation. *Cancer Res.* 56: 4124-4129.

Teodori E, Dei S, Scapecchi S, Gualtieri F. 2002. The medicinal chemistry of multidrug resistance (MDR) reversing drugs. *Farmaco*, 57: 385-415

Toh S, Wada M, Uchiumi T, Inokuchi A, Makino Y, Horie Y, Adachi Y, Sakisaka S, Kuwano M (1999): Genomic Structure of the Canalicular Multispecific Organic Anion-Transporter Gene (*MRP2/ cMOAT*) and Mutations in the ATP-Binding-Cassette Region in Dubin-Johnson Syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* 64: 739-746.

Tsujii H, König J, Rost D, Stöckel B, Leuschner U, Keppler D (1999): Exon-Intron Organization of the Human Multidrug Resistance Protein 2 (MRP2) Gene Mutated in Dubin-Johnson Syndrome. *Gastroenterology* 117: 653-660.

Trauner M, Arrese M, Soroka CJ, Ananthanarayanan M, Koeppl TA, Schlosser SF, Suchy FJ, Keppler D, and Boyer JL (1997): The rat canalicular conjugate export pump (Mrp2) is down-regulated in intrahepatic and obstructive cholestasis. *Gastroenterology* 113: 255–264.

Twentyman P, Bagrij T (1998): The influence of glutathione metabolism on multidrug resistance in MRP-overexpressing cells. *Drug Res. Updates.* 1: 121-127.

Ueda, K., Taguchi, Y., Morishima, M. (1997): How does P-glycoprotein recognize its substrates? *Semin Cancer Biol.* 8(3):151-9.

van Aubel RAMH, Koenderink JB, Peters JGP, van Os CH, Russel FGM (1999): Mechanisms and interaction of vinblastine and reduced glutathione transport in membrane vesicles by the rabbit multidrug resistant protein Mrp2 expressed in insect cells. *Mol. Pharmacol.* 56: 714-719.

Vernhet L, Séité M-P, Allain N, Guillouzo A, Fardel O (2001): Arsenic induces expression of the multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2) gene in primary rat and human hepatocytes. *J. Pharm. Exp. Therap.* 298: 234-239

Vore M, Hoffman T, Cao J (2001): Translational regulation of rat hepatic Mrp2. *Hepatology* 34:476A.

Vos TA, Hooiveld GJ, Koning H et al. (1998): Up-regulation of the multidrug resistance genes, Mrp1 and Mdr1b, and downregulation of the organic anion

transporter, Mrp2, and the bile salt transporter, Spgp, in endotoxemic rat liver. *Hepatology* 28: 1637-1644.

Wada M, Toh S, Taniguchi K, Nakamura T, Uchiumi T, Kohno K, Yoshida I et al. (1998): Mutations in the canalicular multispecific organic anion transporter (cMOAT) gene, a novel ABC transporter, in patients with Hyperbilirubinemia II/ Dubin-Johnson syndrome. *Hum Mol Genet* 7: 203-207.

Walker, J.R.L (1982): Studies on the enzymatic browning of apples. II. Properties of apple polyphenoloxidase. *Aust. J. Biol. Sci.* 7, 360

Watkins PB, Wrighton SA, Maurel P, Schuetz EG, Mendez-Picon G, Parker GA, Guzelian PS. 1985. Identification of an inducible form of cytochrome P-450 in human liver. *Proc Natl Acad Sci*, 82: 6310-6314

Watzl, B. und Rechkemmer, G. (2001): Basiswissen aktualisiert: Flavonoide. *Ernährungs-Umschau* 48 (12):498-502.

Watzel, B. und Leitzmann, C. (1999): Bioaktive Substanzen in Lebensmitteln, Hippokrates Verlag

Walgren RA, Karnaky KJ Jr, Lindenmayer GE, Walle T (2000): Efflux of dietary flavonoid quercetin 4'-beta-glucoside across human intestinal Caco-2 cell monolayers by apical multidrug resistance-associated protein-2. *J Pharmacol Exp Ther.* 294:830-836.

Wald, B., Galensa, R. (1989): Nachweis von Fruchtsaftmanipulationen bei Apfel- und Birnensaft. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 188: 107-114

Westermeier, R. (1990): Elektrophorese-Praktikum. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim.

Whitlock, J.P., Okino, S.T., Dong, L., Ko, H.P., Clarke-Katzenberg, R., MA, Q., Li, H. (1996): Cytochromes P450 5: induction of cytochrome P4501A1: a model for analyzing mammalian gene transcription. *FASEB J.*; 10(8):809-18.

Wilhelm, J., Pingoud, A., (2003): Real-time polymerase chain reaction. *Chembiochem*. 7;4(11):1120-8.

Williamson, G., Day, A.J., Plumb, G.W. and Couteau, D. (2000): Human metabolic pathways of dietary flavonoids and cinnamates. *Biochemical Society Transactions* 28 (2):16-22.

Wilson, I. , Orton, T. and F. Pognan, F. (2000): Investigation of the Alamar Blue (resazurin). Biosource Europe, Nivelles Belgium.

www.biosource.com/content/literatureContent/PDFs/alarbluebooklet.pdf

Whyte, J.J., Scmitt, C.J. and Tillitt, D.E. (2004):The H4IIE Cell Bioassay as an Indikator of Dioxin-like Chemicals in Wildlife and the Environment. *Critical Reviews in Toxicology*, 34 (1): 1-83.

Yoshitomi S, Ikemoto K, Takahashi J, Miki H, Namba M, Asahi S. (2001). Establishment of the transformants expressing human cytochrome P450 subtypes in HepG2, and their applications on drug metabolism and toxicology. *Toxicol In Vitro*, 15: 245-256

Zhang QY, Dunbar D, Ostrowska A, Zeisloft S, Yang J, Kaminsky LS. (1999). Characterization of human small intestinal cytochromes P-450. *Drug Metab Dispos*, 27 (7): 804-809

Zeiger, M., Haag, R., Höckel, J., Schrenk, D. and Schmitz, H.-J. (2001): Inducing Effects of Dioxin-like Polychlorinated Biphenyls on CYP1A in the Human Hepatoplastoma Cell Line HepG2, the Rat Hepatoma Cell Line H4IIE, and the Rat Primery Hepatocytes: Comparison of Relative Potencies. *Toxicological Sciences* 63: 65-73.

Zhai, S., Dai, R., Friedman, F.K. and Vestal, R.E. (1998): Comparative inhibition of human cytochromes P450 1A1 and 1A2 by flavonoids. *The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics* 26 (10):989-992.

Veröffentlichungen und Kongressbeiträge aus dieser Arbeit

Pohl C, Emmerlich V, Dietrich H, Will F, Schrenk D (2004) Apple juice extract and certain polyphenols in apple juice act as inducers of CYP1A1 and MRP2.

45. Frühjahrstagung der DGPT, Mainz. Naunyn-Schmiederberg's Archives of Pharmacology

Pohl C, Emmerlich V, Schmitz H-J, Dietrich H, Will F, Schrenk D (2004) Apple juice extract and certain constituents in apple juice induce CYP1A1 and MRP2 in Caco-2 cells. Annual Meeting of the Society of Toxicology, Baltimore, USA. The Toxicologist

Pohl C, Emmerlich V, Schmitz H-J, Dietrich H, Will F, Schrenk D (2004) Apple juice extract and certain polyphenols in apple juice induce drug metabolizing enzymes in human colon cells. 10th International Congress of Toxicology, Tampere, Finland

Pohl C, Emmerlich V, Schmitz H-J, Dietrich H, Will F, Schrenk D (2004) Apple juice extract and certain polyphenols in apple juice induce drug metabolizing enzymes in Caco 2 cells. MDO, Mainz

Pohl C, Emmerlich V, Schmitz H-J, Dietrich H, Will F, Schrenk D (2005) Apple juice extract and certain polyphenols in apple juice act as inducers and inhibitors of CYP1A1. 46. Frühjahrstagung der DGPT, Mainz. Naunyn-Schmiederberg's Archives of Pharmacology

Pohl C, Fery Y., Emmerlich V, Schmitz H-J, Dietrich H, Will F, Schrenk D (2005) Apple juice extract and certain polyphenols in apple juice act as Inhibitors of CYP1A1 in different cell lines. Lebensmittelchemikertagung, Hamburg