

**Wirkung von AhR antagonistischen
Flavonoiden auf die verschiedenen Phasen des
fremdstoffmetabolisierenden Systems:
Aktivierung, Konjugation, Exkretion**

Inaugural-Dissertation

zur

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

vorgelegt von

Hanno Bothe

Düsseldorf

November 2009

Angefertigt am Leibniz Institut für umweltmedizinische Forschung
gGmbH an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

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

Referent: Prof. Dr. Josef Abel

Koreferent: Prof. Dr. Peter Proksch

Tag der mündlichen Prüfung: 18.01.2010

1	Einleitung	7
1.1	<i>Flavonoide</i>	7
1.2	<i>Die Familie der bHLH-PAS Proteine</i>	10
1.3	<i>Der Arylhydrokarbon Rezeptor</i>	12
1.4	<i>Der Arylhydrokarbon Rezeptor Repressor</i>	16
1.5	<i>Der Arylhydrokarbon Rezeptor Nuklear Transporter (ARNT)</i>	18
1.6	<i>Cytochrom P450 1A1</i>	19
1.7	<i>UDP-Glucuronosyltransferasen</i>	20
1.8	<i>Sulfotferasen</i>	23
1.9	<i>ABC Transporter</i>	24
1.10	<i>Zielsetzung</i>	28
2	Material und Methoden	29
2.1	<i>Zellbiologische Methoden</i>	29
2.1.1	<i>Kultivierung von Zellen</i>	29
2.1.2	<i>Belastung von Zellen</i>	29
2.1.3	<i>Zytotoxizitätsversuche</i>	30
2.2	<i>Molekularbiologische Methoden</i>	31
2.2.1	<i>Isolierung von RNA, genomischer DNA und Plasmid DNA</i>	31
2.2.2	<i>Gelelektrophorese von DNA</i>	31
2.2.3	<i>Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren</i>	31
2.2.4	<i>cDNA Synthese</i>	31
2.2.5	<i>Standard PCR</i>	32
2.2.6	<i>Quantitative Real Time PCR (qRT-PCR)</i>	34
2.3	<i>Klonierung der BCRP Promotorfragmente</i>	36
2.3.1	<i>Amplifizierung der BCRP Promotorfragmente</i>	36
2.3.2	<i>Restriktionsverdau der DNA</i>	37
2.3.3	<i>Ligation der DNA Fragmente</i>	37
2.3.4	<i>Transformation</i>	38
2.4	<i>Reportergenversuche</i>	39
2.4.1	<i>Transfektion von Plasmid DNA</i>	39
2.4.2	<i>Analyse der BCRP Promotoraktivität</i>	40
2.5	<i>Enzymaktivitätsstudien</i>	40
2.5.1	<i>Messung der 7-Ethoxyresorufin-O-Deethylaseaktivität (EROD) in Caco2 Zellen</i>	40
2.5.2	<i>Messung der Glucuronosyltransferase (UGT) Aktivität in Caco2 Zellen</i>	41
2.5.3	<i>Messung der Sulfotferase (SULT) Aktivität in Caco2 Zellen</i>	42

2.6	Einfluss von Flavonoiden auf den Export von B(a)P-Metaboliten in Caco2 Zellen	43
2.6.1	Kultivierung von Zellen in Transwell Inserts	43
2.6.2	High Performance Liquid Chromatographie	44
2.6.3	Probenaufbereitung	45
2.6.4	Intrazelluläre Akkumulation von B(a)P-Metaboliten	46
2.6.5	Statistik	47
3	Ergebnisse	48
3.1	Einfluss von Flavonoiden auf die Zellviabilität	48
3.2	Effekte von Flavonoiden auf die Transkription und Aktivität von Enzymen der Phase 1	49
3.2.1	Einfluss von Flavonoiden auf die CYP1A1 mRNA Transkription	49
3.2.2	EROD Aktivität in Caco2 Zellen	51
3.2.3	Einfluss von Flavonoiden auf die EROD Aktivität	54
3.3	Effekte von Flavonoiden auf Transkription und Aktivität von Enzymen der Phase 2	56
3.3.1	Einfluss von Flavonoiden auf die mRNA Expression von UGTs und SULTs	56
3.3.2	Einfluss von Flavonoiden auf die Aktivität von UGTs und SULTs	60
3.4	Einfluss des AhR auf die Phase 3 des Fremdstoffmetabolismus	62
3.4.1	BCRP-mRNA Expression in Caco2 Zellen unter Einfluss von AhR Agonisten	62
3.4.2	mRNA Expression des BCRP in AhR defizienten Zellen	63
3.4.3	Struktur des humanen BCRP Gens und Identifizierung von putativen XREs	64
3.4.4	Identifizierung regulatorischer Bereiche durch Reporter-genversuche	66
3.4.5	Wirkung von AhR antagonistischen Flavonoiden auf die mRNA-Expression des BCRP	67
3.5	Zellulärer Export von konjugiertem B(a)P-Metaboliten	67
3.5.1	Bestimmung und Nachweis von B(a)P-Konjugaten	67
3.5.2	BCRP vermittelter apikaler Transport von konjugiertem B(a)P	69
3.5.3	Hemmung der BCRP Transporteraktivität	72
3.5.4	Einfluss von Flavonoiden auf den Transport von konjugiertem B(a)P	73
3.5.5	Kooperative Untersuchungen mit KO143 und Flavonoiden	77
3.5.6	Wirkung von Flavonoiden auf die intrazelluläre Akkumulation von B(a)P	79
4	Diskussion	80
4.1	Effekt von Flavonoiden auf die Phase 1 des Fremdstoffmetabolismus	80
4.2	Interaktion von Flavonoiden mit der Phase 2 Reaktion	83
4.3	Transkriptionelle Regulation des BCRP und seine Interaktion mit Flavonoiden	86
4.3.1	Rolle des AhR bei transkriptionellen Regulation des BCRP	86
4.3.2	Wirkung von Flavonoiden auf die BCRP mRNA Expression und Aktivität	89
4.3.3	Charakterisierung des BCRP vermittelten Transports von konjugiertem B(a)P	89
4.3.4	Einfluß von Flavonoiden auf den Export von konjugiertem B(a)P	90
4.3.5	Kooperative Effekte von Flavonoiden mit KO143	91

4.3.6	Intrazelluläre Akkumulation von B(a)P durch Flavonoide	92
4.4	<i>Zusammenfassung und Bewertung der Befunde</i>	93
5	Zusammenfassung	94
6	Literaturverzeichnis	95
7	Abkürzungsverzeichnis	114

1 Einleitung

1.1 Flavonoide

Flavonoide sind polyphenolische Sekundärmetabolite, die natürlicherweise in Pflanzen vorkommen. Basierend auf ihrer Struktur werden sie in acht verschiedene Gruppen eingeteilt (siehe Abbildung 1) [1]. Das System der Einteilung basiert auf der Präsenz von Hydroxy-, Carboxy-, und Methylgruppen, sowie dem Vorkommen von zusätzlichen Doppelbindungen im heterozyklischen Ring. Es wurden bisher über 8000 verschiedene Flavonoide klassifiziert [2]. Flavonoide spielen eine Rolle bei Wachstum und Entwicklung von Pflanzen sowie deren Abwehr gegen Mikroorganismen und andere Schädlinge [3]. Viele Verbindungen sind Teil von pflanzlichen Pigmenten und Duftstoffen. In ihrer natürlichen Form kommen sie häufig gebunden an Zucker als Glukoside vor.

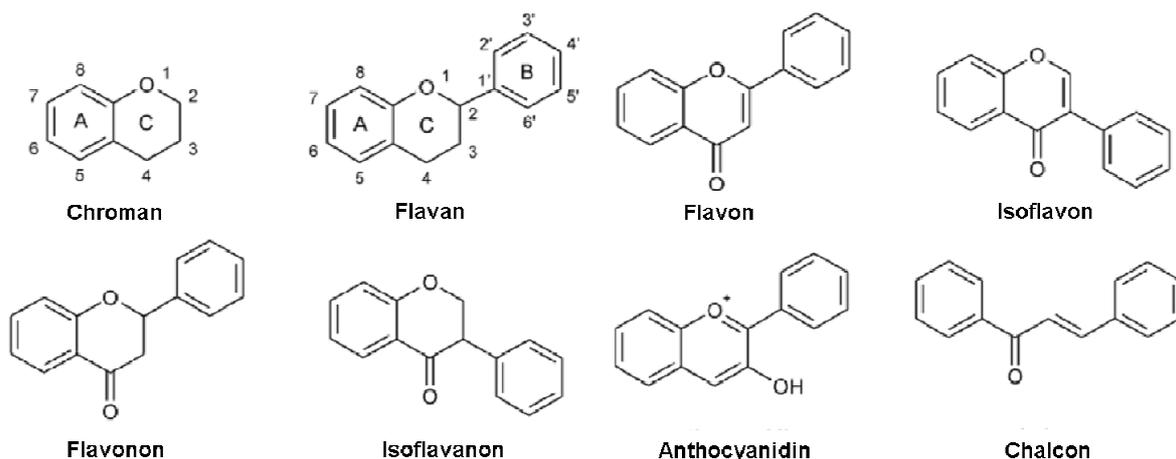


Abbildung 1 Grundstruktur der Flavonoide (Quelle: Hodek *et al.* 2002)

Durch den Verzehr von Gemüse, Früchten und Kräutern nimmt der Mensch jeden Tag etwa 20 bis 100mg Flavonoide auf [4]. Die Bioverfügbarkeit der Flavonoide ist relativ gering und liegt bei maximal 5% [5]. Ob die Resorption im Darm aktiv oder passiv geschieht, ist bisher unzureichend beschrieben, es wurde jedoch gezeigt, dass Quercetin-Glukoside in Caco2 Zellen durch den Natriumabhängigen Glukosetransporter 1 (SGLT1) aufgenommen werden können [6]. Flavonoidreiche Nahrung ist gesundheitsfördernd, da Flavonoide ein großes Spektrum an biochemischen und pharmakologischen Eigenschaften besitzen, die krebsvorbeugend sind. Studien haben gezeigt, dass Flavonoide antioxidatives Potential als Radikalfänger haben und inhibierend wirken auf Enzyme, die Karzinogene aktivieren, oder Transkriptionsfaktoren,

die als Tumorpromotoren wirken [7-9]. Ein bedeutender Mechanismus, der für die chemopräventive Wirkung der Flavonoide verantwortlich ist, beruht auf der Inhibierung von Phase I Enzymen wie dem Cytochrom P450 (CYP). Diese Eigenschaft besitzen auch die in dieser Arbeit verwendeten Flavonoide Luteolin, Baicalein, Fisetin und Epigallocatechin Gallat (EGCG) (siehe Abbildung 2). Luteolin kommt z.B. in Möhren, Sellerie, Petersilie und Pfeffer vor [10]. Baicalein wird vor allem aus der *Scutellaria baicalensis* gewonnen, einer Pflanze die von großer Bedeutung in der traditionellen chinesischen Medizin ist [11]. Fisetin findet sich bevorzugt in Früchten wie z.B. Erdbeeren, Äpfeln und Datteln [12]. EGCG kommt vor allem in grünem Tee vor [13]. Diese Flavonoide inhibieren den Arylhydrokarbon Rezeptor und dadurch die Expression des CYP1A1, durch das vor allem polyzyklische Kohlenwasserstoffe (PAK) zu DNA bindenden Metaboliten aktiviert werden [1;14;15]. Ein weiteres Enzym dieser Familie, das durch Flavonoide inhibiert werden kann, ist CYP2E1, das an der Aktivierung von Vinyl Carbamat oder N-Nitrosodimethylamin beteiligt ist [16;17]. Eine Reihe von Flavonoiden inhibieren Phenol-Sulfotransferasen, die durch Konjugation von Substanzen wie Benzyl-Alkoholen oder N-Hydroxyarylaminen die Bildung von instabilen Metaboliten fördern, die elektrophil sind und kovalent an Nukleinsäuren oder Makromoleküle binden [18-20].

Das Hauptaugenmerk der Industrie liegt auf den potentiell chemopräventiven Eigenschaften der Flavonoide. Eine Substanz, die eine effektive Chemoprävention ermöglicht, muss bestimmte Bedingungen erfüllen [21]: (i) keine toxischen Effekte in normalen und gesunden Zellen, (ii) hohe Wirksamkeit gegen multiple Arten von Krebs, (iii) Applikation muss oral möglich sein, (iv) bekannte Wirkmechanismen, (v) geringe Kosten, (vi) eine breite Akzeptanz innerhalb der Bevölkerung. Da Flavonoide diese Bedingungen zum großen Teil erfüllen, werden sie als wirksame gesundheitsfördernde Nahrungsmittelpräparate in Form von Kapseln verkauft. Diese Kapseln enthalten Extrakte in denen Flavonoide einzeln oder in Kombinationen von bis zu 1g angereichert sind. Das Problem dieser Präparate beruht auf der hohen Dosis, die dadurch aufgenommen wird. Bisher gibt es wenige Studien, die sich mit der Toxizität der Flavonoide beschäftigen, obwohl es Hinweise auf schädigende Eigenschaften gibt. Es konnte gezeigt werden, dass phenolische Substanzen in Gegenwart von Sauerstoff und redoxaktiven Metallen im zellfreien System die Formierung von Sauerstoffradikalen (ROS) katalysieren [22-24]. Das Grüntee catechin EGCG kann die Kanzerogenese von Nitrosamin und Dimethylhydrazin in Ratten erhöhen [25].

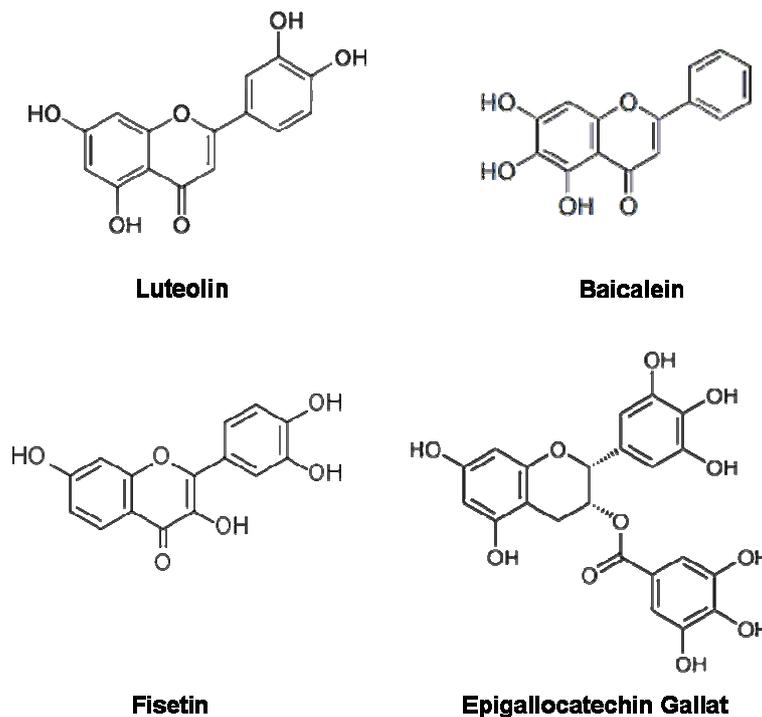


Abbildung 2 Struktur der in dieser Arbeit verwendeten Flavonoide

Ein weiterer toxischer Effekt wird durch den Metabolismus von Flavonoiden durch Peroxidasen verursacht. Peroxidasen sind Hämoproteine, die die Oxidierung von einer Reihe von phenolischen Substanzen durch Wasserstoffperoxid katalysieren [21]. Dabei entstehen Phenoxylradikale, die DNA-Schäden verursachen und die Entwicklung von Krebs fördern können. Solche Aspekte müssen kritisch bei der Verwendung von Flavonoidpräparaten betrachtet werden, da aus kommerziellem Interesse oft nur die positiven Eigenschaften von Flavonoiden angepriesen werden. Darüber hinaus gibt es Hinweise in der Literatur, dass Flavonoide die Replikations- und Reparaturfähigkeit von Zellen beeinflussen können. Eine Möglichkeit, durch die Flavonoide toxisch wirken können, beruht auf der Inhibierung von Topoisomerasen (Topo). Topoisomerasen sind DNA assoziierte Enzyme, die bei der DNA-Replikation und Transkription ein- (Topo 1) und doppelsträngige (Topo 2) DNA zerschneiden und wieder verbinden. Es konnte gezeigt werden, dass polyphenolische Substanzen, darunter Flavone, Isoflavone und Catchine, verhindern können, dass die DNA-Stränge religiert werden, wodurch vermehrt Brüche entstehen und somit das mutagene Risiko erhöht wird [26]. Die Inhibierung der Topoisomerasen resultiert unter anderem in erhöhter Apoptose, verringerter Proliferation und beeinflusst die Differenzierung von Zellen [27-30]. Inwieweit solche Mechanismen zur Toxizität beitragen ist jedoch kontrovers diskutiert. Hohe Flavonoidkonzentrationen führen eher zur Bildung von ROS als zur Inhibierung von Topoisomerasen. Es wird angenommen, dass die Inhibierung von Topoisomerasen eine Rolle bei der Initiierung von Apopto-

se in Tumorzellen spielt. Die Aufnahme von Flavonoiden über die Nahrung in Form von Obst und Gemüse ist mit höchster Wahrscheinlichkeit nicht toxisch. Die Verwendung von Flavonoiden als Nahrungsergänzungsmittel ist jedoch fraglich, da diese hinsichtlich ihres toxischen Potentials unzureichend charakterisiert sind.

Es gibt in der Literatur viele Beobachtungen, dass Flavonoide mit der AhR-Signalkaskade interagieren können, deswegen wird in den folgenden Abschnitten ein Überblick über den AhR und seine verwandten Proteine, sowie über Proteine, die an der AhR-Signalkaskade beteiligt sind, präsentiert.

1.2 Die Familie der bHLH-PAS Proteine

Die basic helix-loop-helix (bHLH) Proteine charakterisieren sich durch ihre DNA-Bindedomäne. Es handelt sich hierbei um eine Klasse von transkriptionell aktiven Regulatoren, die an fundamentalen biologischen Prozessen beteiligt sind, wie z.B. der Zelldeterminierung und Differenzierung, der Aufrechterhaltung des Zellzyklus, der Homöostase und der Antwort auf exogen vermittelten Zellstress [31]. Die bHLH Proteine unterteilen sich wiederum in verschiedene Familien, von denen hier jedoch nur auf die bHLH-PER-ARNT-SIM (bHLH-PAS) eingegangen werden soll. Der in dieser Arbeit untersuchte Arylhydrokarbon Rezeptor ist ein Mitglied der bHLH-PAS Familie. Die an der AhR Signalkaskade beteiligten Proteine gehören ebenfalls zu dieser Klasse. Die Mitglieder der bHLH-PAS Superfamilie stellen eine Reihe von essentiellen Sensormolekülen dar, die es der Zelle bzw. dem Organismus ermöglichen auf umweltbedingte Reize zu reagieren.

Ein charakteristisches Strukturelement der bHLH-PAS Proteine ist die PAS Domäne, benannt nach den ersten drei Proteinen in denen dieses Motiv identifiziert wurde, dem *Drosophila* Period (PER), dem humanen Arylhydrokarbon Rezeptor Nuklear Translokator (ARNT) und dem *Drosophila* Single-minded (SIM) [32]. Der schematische Aufbau ist in Abbildung 3 gezeigt. Die PAS Domäne ist zwischen 260 und 310 Aminosäuren groß und in zwei degenerierte Regionen unterteilt, PAS-A und PAS-B, die von einem Spacer getrennt werden. Mitglieder der bHLH-PAS Proteine wurden in einer Vielzahl von Organismen identifiziert, wie z.B. Mollusken, Arthropoden, Nematoden und zahlreichen Wirbeltieren, darunter auch die Säuger [33].

Signale die über die PAS Domäne vermittelt werden, beeinflussen den Redox-Status, Hypoglykämie, die Sauerstoffbalance, Lichtdetektion in Bakterien und den Fremdstoffmetabolismus [34;35]. Die Signalweiterleitung geschieht über einen Mechanismus bei dem DNA bindende Homo- und Heterodimere gebildet werden. Die funktionellen Bereiche hierfür finden sich primär in der bHLH-Domäne und sekundär in der PAS Domäne. Die basische Region der bHLH-Domäne ist zuständig für den direkten Kontakt mit der DNA, die HLH-Region dient als Kopplungsstelle für die Dimerisierung. Die PAS Domäne unterstützt als sekundäre Dimerisierungsdomäne, die den Interaktionspartner spezifiziert und die Bindung verstärkt.

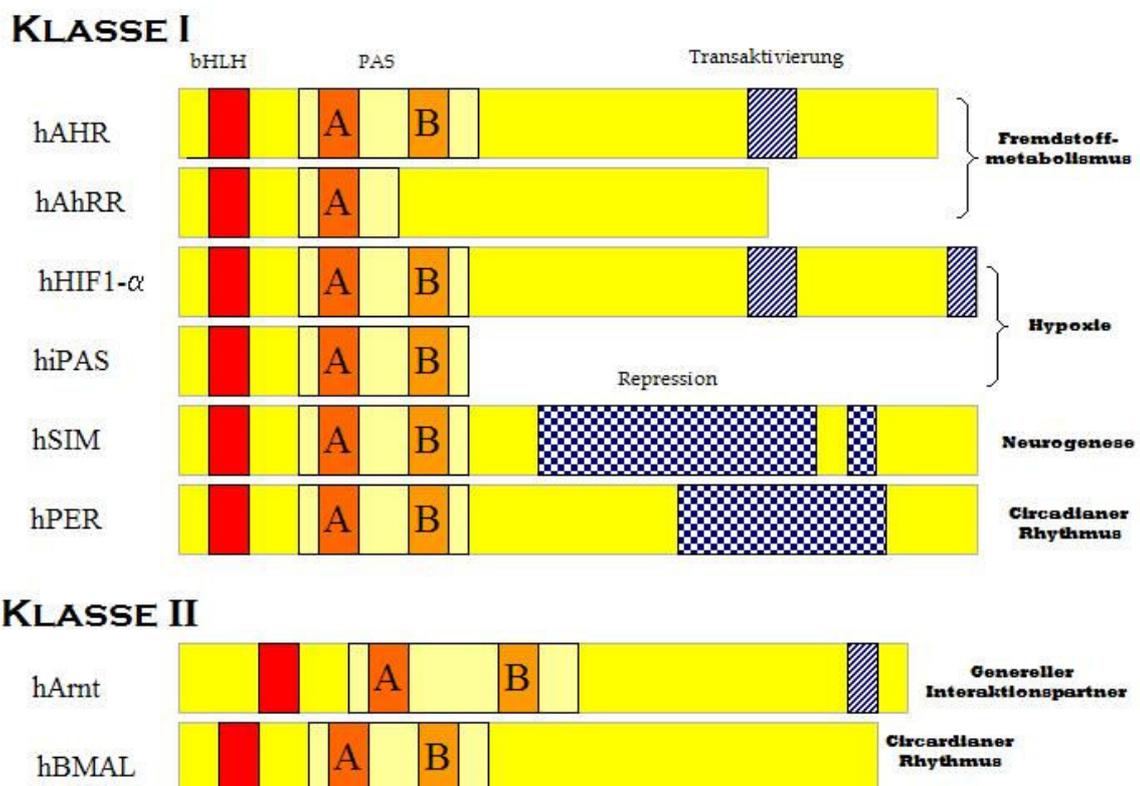


Abbildung 3

Schematischer Aufbau der bHLH-PAS Proteinfamilie

Die bHLH-PAS Proteine werden daher, zur charakteristischeren Unterscheidung von PAS Proteinen, in zwei Klassen unterteilt. Proteine der Klasse 1 können nur Heterodimere mit Proteinen der Klasse 2 bilden. Proteine der Klasse 2 sind obligat für Mitglieder der Klasse I und können Homo- und Heterodimere bilden [36]. Mitglieder der Klasse I sind transkriptionell regulatorische Proteine, die stimulatorische Reize in den Kern weiterleiten. Klasse II Faktoren

sind konstitutiv im Nukleus angesiedelt und notwendig für die DNA-Bindung und darauffolgende Regulation der Transkription.

Wie in Abbildung 3 zu sehen, ist der N-terminale Aufbau der bHLH-PAS Proteine identisch, bei allen Proteinen ist in diesem Bereich die bHLH- und die PAS-Domäne lokalisiert. Das weist daraufhin, dass die bHLH-PAS Proteine einen gemeinsamen Vorgänger hatten [37]. Im Bereich des C-Terminus sind im Verlauf der Evolution Veränderungen entstanden, die repressive oder aktivierende Eigenschaften auf die Genexpression verleihen.

1.3 Der Arylhydrokarbon Rezeptor

Der Arylhydrokarbon Rezeptor (AhR), oder auch Dioxin Rezeptor genannt, ist eines der meist untersuchten Mitglieder der bHLH-PAS-Protein Familie. Die Aktivierung des AhR erfolgt durch Bindung von Liganden, zu denen unter anderem eine Reihe von Umweltchemikalien zählen. Interessanterweise besitzt der AhR als einziges bHLH-PAS-Protein eine Ligandenbindestelle. Diese ist in der PAS-B Region lokalisiert. Der Name des AhR beruht auf der Mitte der fünfziger Jahre gemachten Beobachtung, dass polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK) zur Induktion von mikrosomalen Enzymen, sogenannter aromatische Hydroxylasen, in Mäusen führt. Aufgrund dieser Erkenntnisse wurde die Theorie eines PAK-sensitiven Rezeptors abgeleitet, die letztendlich in seiner Identifizierung durch radioaktiv markiertes Dioxin im Jahre 1976 [38] resultierte. Seither wurden etliche Erkenntnisse über die AhR vermittelte Toxizität von exogenen Fremdstoffen gesammelt.

Zu den potentesten AhR Liganden zählen die polychlorierten Dibenzo-*p*-Dioxine wie zum Beispiel 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-Dioxin (TCDD). Dioxine gehören zur Gruppe der halogenierten aromatischen Kohlenwasserstoffe (HAK), die zusammen mit den polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen (PAK), zu den am besten charakterisierten AhR Agonisten zählen [38-40]. Chronische Exposition gegenüber TCDD führt zu zahlreichen toxischen Reaktionen, wie zum Beispiel starker Gewichtsverlust (Wasting-Syndrome), Thymus-Involution, Immunsuppression, endokrine Disruption und Hepatotoxizität.[41]. In Versuchen mit AhR defizienten-Mäusen konnte die Rolle des AhR bei der Entstehung der genannten Symptome aufgeklärt werden [42-46]. Außerdem wurde nachgewiesen, dass TCDD eine Rolle bei der Tumorgenese und Tumorpromotion spielt [47-49]. Des Weiteren konnte ein konstitutiv aktivierter AhR in Brusttumoren identifiziert werden, der für die reprimierte Expression

des für Tumorentstehung und –promotion kritischen (Proto-Onko-) Gens c-myc verantwortlich ist [50;51]

Die WHO klassifizierte TCDD als humanes Karzinogen aufgrund experimenteller Daten in Tierversuchen, wobei festgestellt wurde, dass die Wirkung AhR vermittelt ist. Grundlage hierfür ist, dass der AhR in Menschen und Tieren konserviert ist. Die meisten Studien zeigen TCDD als nicht genotoxischen Tumorpromotor, der epigenetisch für die Vergrößerung von präneoplastischen Läsionen verantwortlich ist [52]. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die Karzinogenese auch auf anderen Ebenen beeinflusst wird, z.B. durch die antiapoptotische Wirkung von TCDD, wodurch genotoxisch beschädigte Zellen nicht beseitigt werden [53-55]. Diese Wirkung kann auch durch die vorher erwähnten immunsuppressiven Eigenschaften hervorgerufen werden. Das Immunsystem ist ein bekanntes Ziel der Dioxintoxizität. Die B- und T-Zell Antwort, sowie die Resistenz gegenüber viralen und bakteriellen Infektionen wird durch TCDD beeinflusst [56-59]. Thymusinvolution war eine frühe Entdeckung der TCDD vermittelten Toxizität in Nagern [41]. Des Weiteren scheint der AhR eine endogene Rolle bei der Differenzierung des Immunsystems zu spielen. AhR defiziente Mäuse zeigen eine T-Zell Defizienz in der Milz [60]. T-Zellen spielen eine wichtige Rolle bei der Induktion von Apoptose in epigenetisch veränderten Zellen. In humanen Mammakarzinoma MCF7 Zellen, die einen konstitutiv aktiven AhR überexprimieren, wurde gezeigt, dass ihr charakteristisches Wachstum verändert und Filopodien und Lamellopodien gebildet werden. Außerdem zeigen AhR defiziente Fibroblasten beeinträchtigte Tumorigenese im subkutanen Maus Xenograft Model [61]. TCDD verhindert die Schließung der Gaumenspalte in der Maus. Als Ursache wird über eine Apoptosehemmung diskutiert, die die Fusion der Gaumenspalte während der embryonalen Phase blockiert [62]. Während des Entwicklungsprozesses wachsen zwei Platten aus Periderm aufeinander zu. Bei Kontakt wandelt sich das Gewebe von Epithel zu Mesenchym, und die Spalte wird durch Fusionierung der beiden Platten geschlossen. Dioxin verhindert die Umwandlung des Gewebes und die Platten wachsen weiter, wodurch die Gaumenspalte entsteht. Zurzeit beschäftigen sich viele Studien mit der Identifizierung des hier unterliegenden Mechanismus. Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass Zugabe von transforming growth factor β -3 (TGF β -3) in Dioxin exponierten Organkulturen zur Schließung der Gaumenspalte führt.[63]. In AhR defizienten Mäusen sind TGF β -1 und TGF β -3 erhöht, was daraufhin deutet, dass der AhR ein negativer Regulator von TGF β ist. Die physiologische Funktion des AhR bei diesem Prozess bleibt jedoch ungeklärt. Die Signalvermittlung auf umweltschädliche Substanzen ist jedoch nicht die einzige Aufgabe des

AhR. Mit der Zeit wurden weitere Liganden identifiziert, darunter zahlreiche Pflanzeninhaltsstoffe wie zum Beispiel Carotinoide, Rutecarpine, Dibenzoylmethan und Flavonoide [64]. Aber auch Tryptophanderivate bilden eine Gruppe von hoch affinen AhR Liganden. Durch UV-Licht werden Tryptophanmoleküle in 6-Formylindolo[3,2-b]carbazol, das zu den stärksten AhR Agonisten zählt, umgewandelt [65;66]. Aufgrund dessen wird von einigen Wissenschaftlern vermutet, dass Tryptophanmetabolite eine Klasse von endogene AhR Liganden stellen. Die vermutete Existenz von endogenen AhR-Liganden beruht auf Beobachtungen, die an AhR defizienten Tieren gemacht wurden. Diese Mäuse haben bei der Geburt ein reduziertes Lebergewicht. Die Reduktion des Lebergewichtes ist Folge eines persistenten *Ductus Venosus*, der dafür sorgt, dass die Durchblutung der Leber mit Nährstoffen reduziert ist, was in einer Hyperplasie der Leberzellen resultiert [67]. Der Mechanismus der diesem Vorgang unterliegt, ist aber bisher unbekannt, weshalb der AhR immer noch als Orphanrezeptor angesehen wird.

Generell ist der AhR im inaktivem Zustand Teil eines zytosolischen Multiprotein-Komplex (Abbildung 4), der aus einem Dimer des Chaperon HSP90 (Hitze-Schock-Protein), AIP (AhR Interacting Protein) und dem Kochaperon Phosphoprotein 23 (p23) besteht.[68]. HSP90 interagiert mit dem AhR über die PAS und die bHLH Domäne. Die Wechselwirkung mit HSP 90 ist essentiell für die Aktivierung des AhR durch Agonisten. Es konnte gezeigt werden, dass AhR-Monomere eine geringere bzw. gar keine Affinität für Liganden haben [69-71]. Das p23 interagiert und stabilisiert die Konformation des HSP90 [72]. AIP ist vermutlich für den Verbleib des AhR im Zytosol verantwortlich [73;74]. Es stabilisiert den AhR Komplex und schützt vor proteosomalem Abbau. Durch Bindung eines Liganden, ändert der AhR seine Konformation und präsentiert eine nukleäre Lokalisationssequenz (NLS). Der gesamte Komplex wandert daraufhin in den Zellkern, wo der Komplex dissoziiert [75]. Es wird jedoch diskutiert, ob der Komplex erst im Kern oder bereits auf dem Weg dorthin aufgelöst wird. Im Kern bindet der AhR an ARNT [76]. Die Interaktion mit ARNT ist essentiell für die Induzierung der Genexpression. Das AhR/ARNT Dimer erkennt und bindet xenobiotisch responsive Elemente (XRE), eine spezifische DNA-Sequenz. Als Konsensussequenz wurde in 3 unterschiedlichen Promotoren die Basenfolge GCGTG identifiziert [77-79]. Nachdem das AhR/ARNT Dimer an die DNA gebunden hat, werden verschiedene Faktoren rekrutiert, die als klassische Koregulatoren fungieren, oder für die Veränderung der Chromatinstruktur gebraucht werden [80-83]. Nach dem der AhR die Genexpression induziert hat, wird er mithilfe der Kern Export Sequenz (NES) aus dem Kern ins Cytosol transferiert. Dort wird er durch

Ubiquitinasen für den proteasomalen Abbau mit Ubiquitin markiert. Auf diese Weise wird die Aktivität des AhR kontrolliert, die Genexpression bis zum Endgültigen Abbau aller Liganden reguliert [84-86]. Ursprünglich wurden AhR regulierte Gene identifiziert, die Proteine der Phase 1 und 2, vereinzelt auch der Phase 3, kodieren [87]. Sie wurden als AhR Genbatterie zusammengefasst. Die koordinierte Induktion von Genen, die am Metabolismus, der Konjugation und dem Transport von Fremdstoffen beteiligt sind, ermöglicht eine besonders effiziente Detoxifizierung dieser Substanzen [88;89]. Das meist untersuchte Gen dieser Gruppe ist das Cytochrom P450 1A1. Es gilt als klassisches AhR Zielgen, dessen Expression in vielen Studien als Beweis für die AhR Aktivierung angesehen wird. Außerdem wird dem AhR eine Rolle bei antioxidativen Prozessen zugesprochen. [90]. Der eigentliche Transkriptionsfaktor bei diesen Vorgängen ist Nrf2 (NF-E2-related factor 2)[91;92]. In der Promotorregion dieses Gens wurden XRE Sequenzen identifiziert und eine Kreuzregulierung zwischen Nrf2 und AhR nachgewiesen [93;94]. Neben AhR-regulierten Genen die an der Biotransformation beteiligt sind, wurden auch Gene identifiziert die den Zellzyklus kontrollieren [87]. Eine detaillierte Auflistung dieser Gene ist in Tabelle 1 zu sehen. Eine Klassifizierung wurde aufgrund der Identifizierung von putativen XRE Sequenzen durchgeführt.

Tabelle 1: AhR-regulierte Gene

Biotransformation	Zellproliferation und -differenzierung
CYP1A1	p21
CYP1A2	p27
CYP1B1	c-jun
UGT1A1	junD
UGT1A6	Hes-1
GSTA2	IL-2
NQO1	Bax
ALDH3A1	IGFBP
Nrf2	Filaggrin
AhRR	

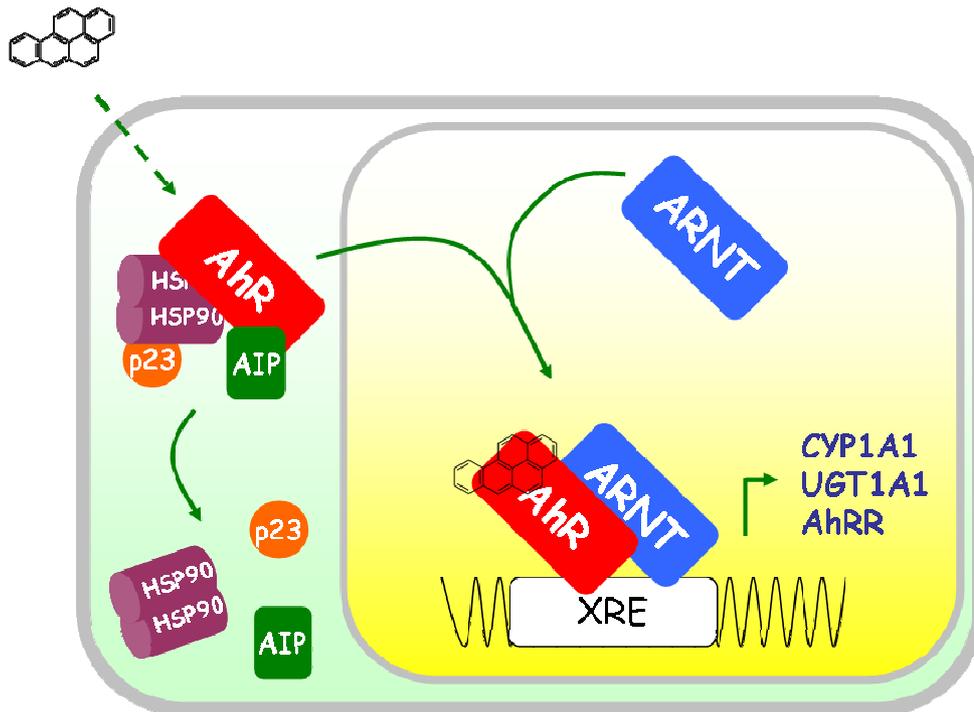


Abbildung 4 Die AhR Signalkaskade: Der AhR ist Teil eines zytosolischen Multiproteinkomplexes, der aus einem HSP90 Dimer, dem p23, sowie dem AIP besteht. Nachdem ein Ligand an den AhR gebunden hat, wandert der Komplex in den Kern. Auf dem Weg dorthin dissoziieren die Partnermoleküle ab. Im Kern bindet der AhR an seinen Bindungspartner ARNT. Dieses Heterodimer erkennt und bindet XRE DNA Sequenzen und induziert die Genexpression von AhR Zielgenen

1.4 Der Arylhydrokarbon Rezeptor Repressor

Der Arylhydrokarbon Rezeptor Repressor ist ein weiteres Mitglied der bHLH-PAS Proteinfamilie, das vor ca. 10 Jahren erstmalig beschrieben wurde [95]. Seine Funktion als Repressor der AhR Aktivität wurde in Luziferase Reportergen Versuchen nachgewiesen. Der AhRR weist hohe Sequenzhomologie in der PAS-A Domäne zum AhR auf. Abweichungen beruhen auf der fehlenden PAS-B Domäne. Dem AhRR fehlt wie den anderen bHLH-PAS Proteinen die Ligandenbindestelle des AhR. Die größten Unterschiede zum AhR treten in der C-terminalen Region auf; hier fehlt die glutaminreiche Transaktivierungsdomäne. Aufgrund dieser Erkenntnisse und der Eigenschaft die CYP1A1 Expression zu inhibieren, wurde postuliert, dass der AhRR als Teil eines negativen Rückkopplungs-Mechanismus innerhalb der AhR Signalkaskade fungiert. Derartige Mechanismen sind in der Familie der bHLH-PAS Proteine verbreitet, z. B. bei Proteinen die am zirkadianen Rhythmus beteiligt sind. Das Gen Clock induziert die Expression seines eigenen Inhibitors, Per [96]. Diese Signalkaskade gilt

als klassisches Beispiel für negative Rückkopplungs-Schleifen. Ein weiteres Beispiel ist die HIF1 α (Hypoxia inducible Factor α) Signalkaskade; hier wird das inhibierende Protein iPAS (inhibitory PAS) induziert, um eine negative Rückkopplung hervorzurufen [97].

Der AhRR ist wie der AhR in der Lage ARNT zu binden, weshalb angenommen wird, dass die repressiven Eigenschaften durch eine Konkurrenz um ARNT und die Verdrängung des AhR aus der XRE-Bindung hervorgerufen werden [98]. HeLa-Zellen, in denen der AhRR konstitutiv hoch exprimiert ist, zeigen keine CYP1A1 Induktion durch AhR Agonisten. Durch transienten AhRR knock out werden diese Zellen wieder responsiv gegenüber AhR Liganden [99;100]. In der gleichen Studie konnte gezeigt werden, dass der AhRR mit Histon Deacetylasen (HDAC) interagiert, die Regulation also möglicherweise auch auf Chromatinebene stattfindet. Der Mechanismus der AhR Rückkopplung scheint jedoch komplexer zu sein und nicht allein AhRR reguliert. Abweichend zu den eben genannten Erkenntnissen wurde gezeigt, dass der AhRR nicht in allen Geweben induziert werden kann [101-104]. In Abbildung 5 ist der Mechanismus abgebildet, wie er in AhRR induzierbaren Zellen bzw. Geweben abläuft.

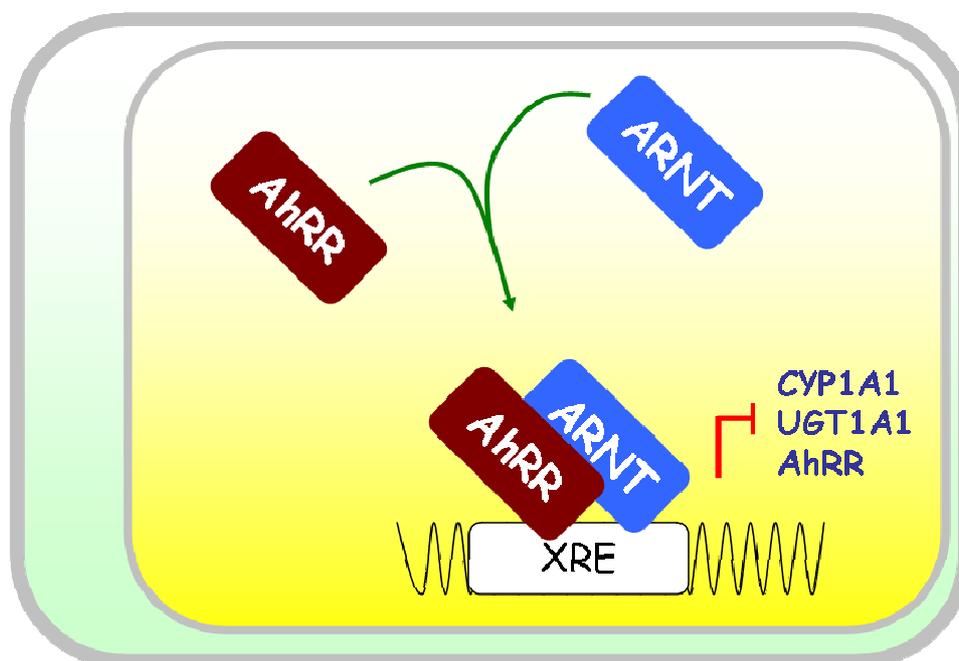


Abbildung 5 Die Rolle des AhRR in der AhR Signalkaskade: Der AhRR ist in der Lage ARNT zu binden. Das Heterodimer bindet an XRE DNA Sequenzen und inhibiert die Expression von AhR Zielgenen.

1.5 Der Arylhydrokarbon Rezeptor Nuklear Transporter (ARNT)

Der AhR Nuklear Transporter agiert als der generelle Interaktionspartner der Mitglieder der bHLH-PAS Familie. Seine Rolle als Partnermolekül für den AhR wurde entdeckt bei Versuchen mit mutanten Hepa 4c Zellen, bei denen der AhR nach der Behandlung mit typischen Agonisten nicht in den Kern wandert [76]. Die Transfektion mit ARNT konnte den Wildtyp Phänotyp wiederherstellen, seitdem ist ARNT als nukleär lokalisiertes Protein bekannt [105]. ARNT besitzt eine N-terminale NLS, die mit den Proteinen des nuklearen Porenkomplexes interagiert und die Translokation in den Zellkern vermittelt [106]. ARNT spielt allerdings nicht nur eine Rolle bei der AhR Signalkaskade, sondern auch bei Hypoxie, ein Zustand bei dem der intrazelluläre Sauerstoffpartialdruck unter 5% fällt. In diesem Zusammenhang ist ARNT auch als Hypoxia inducible factor 1- β (HIF1- β) bekannt, der zusammen mit HIF1- α an Prozessen wie der Wundheilung und der Embryogenese beteiligt ist [107;108].

Die Formierung der Heterodimere mit anderen bHLH-PAS Proteinen wird über die bHLH und die PAS Domäne vermittelt. Außerdem besitzt ARNT eine hochaktive C-terminale Transaktivierungsdomäne die in der Lage ist, andere Koaktivatoren wie CBP/p300 zu rekrutieren [109]. Es wird vermutet, dass die Transaktivierungsdomäne des AhR alleine nicht ausreichend ist um die Genexpression zu starten, und dies nur durch die Interaktion mit ARNT zustande kommt [110]. ARNT ist ein essentieller Faktor, es wurde nachgewiesen, dass ARNT^{-/-} Mausembryos den Tag 10 der Entwicklung nicht überleben [111].

Welche Funktion das ARNT Homodimer hat, konnte bisher nicht gezeigt werden, es wird allerdings vermutet, dass weitere transkriptionelle Aktivitäten durch ARNT reguliert werden. In Studien konnte gezeigt werden, dass ARNT DNA-Motive mit der Sequenz CACGTG, genannt E-Box Motive, binden kann [112]. E-Box Motive sind die generelle Bindestelle von bHLH-PAS Proteinen. Die Rolle des ARNT scheint also ubiquitär zu sein.

Beim Menschen und bei der Maus wurde entdeckt, dass ARNT in zwei Varianten existiert, die durch alternatives Splicing entstehen. Die beiden Varianten unterscheiden sich um 15 zusätzliche Aminosäuren im N-terminalen basischen Bereich des Exon 5 [113].

1.6 Cytochrom P450 1A1

Das Cytochrom P450 1A1 (CYP1A1) ist Mitglied einer Klasse von Hämoproteinen die, wenn Kohlenmonoxid gebunden ist, ein Absorptionsmaximum bei 450nm besitzen. Die zur Phase 1 des Fremdstoffmetabolismus zählenden Cytochrom P450 Enzyme katalysieren die Oxidation von körpereigenen Hormonen und vielen lipophilen Fremdstoffen. Auf diese Weise wird hydrophoben Stoffen eine Hydroxygruppe eingefügt, die in der Phase 2 des Fremdstoffmetabolismus mit hydrophilen Zucker- Sulfat- oder Glutathionresten konjugiert werden [114]. Die Konjugation erhöht die Wasserlöslichkeit der Stoffe, die daraufhin durch aktiven Transport, der auch Phase 3 genannt wird, über den Darm oder die Nieren ausgeschieden werden. Im Verlauf der CYP vermittelten Oxidierung können reaktive Metabolite entstehen, die mutagenes Potential haben und die Entstehung von Krebs fördern. Der Ablauf dieser Reaktion ist in Abbildung 6 anhand des Metabolismus von B(a)P schematisch dargestellt.

Die CYP1A1 Genexpression wird unter anderem als adaptive Antwort auf Fremdstoffe und Hormone induziert und ist Rezeptor abhängig. In der 5'-Enhancer Region des CYP1A1 Gen befinden sich XRE und GRE (glucocorticoid response element) Sequenzen [115]. Die Induktion ist gewebe- und speziesspezifisch und wird durch den AhR reguliert. Der Glucokortikoid Rezeptor (GR) scheint jedoch lediglich verstärkende Wirkung zu haben, da Glucokortikoide alleine keinen Effekt zeigen [116].

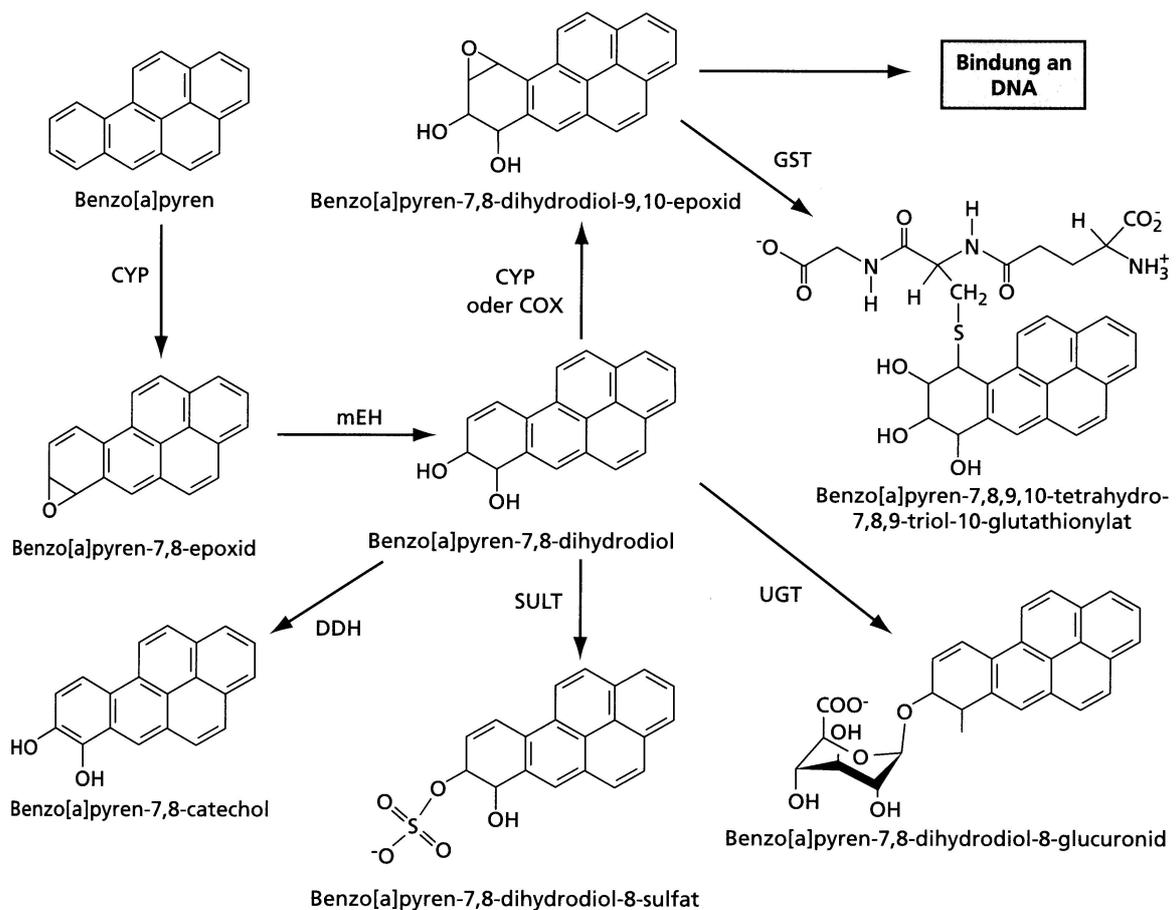


Abbildung 6 Die CYP1A1 vermittelte Aktivierung von B(a)P zum ultimalen Kanzerogen: Das B(a)P-Molekül wird durch CYP1A1 epoxidiert und durch die Epoxidhydrolase zum 7,8-Dihydrodiol überführt. Daraufhin sind zwei Schritte möglich. Schritt 1: Diese Form kann konjugiert werden mit einem Zucker- bzw. Sulfatrest (UGT,SULT), oder durch die Dihydrodiol-Dehydrogenase (DDH) in die 7,8-Catechol Form überführt werden. Dieser Schritt umfasst eine Detoxifizierung. Schritt 2: Durch CYP1A1 oder die Cyclooxygenase (COX) wird eine weitere Epoxidgruppe eingefügt, die in der Lage ist an DNA zu binden, wenn nicht vorher mit Glutathion konjugiert und somit detoxifiziert wird. (Quelle: Marquardt, Schäfer Lehrbuch der Toxikologie)

1.7 UDP-Glucuronosyltransferasen

Die Konjugation von Fremdstoffen mit hydrophilen Gruppen, auch Phase 2 genannt, stellt eine essentielle Reaktion im Fremdstoffmetabolismus dar. Diese Phase wird unter anderem von membrangebundenen UDP-Glucuronosyltransferasen (UGT) vermittelt. Diese Enzyme katalysieren die Konjugation von Uridindiphosphoglucuronsäure (UDP) an funktionelle Gruppen wie Hydroxyl-, Carboxyl-, Amino- oder Sulfurreste (Abbildung 6) und somit die Überführung der jeweiligen Stoffe zum Aglykon. Dieser Schritt erhöht die Polarität der UGT-Substrate und erleichtert deren Ausscheidung über Galle und Harn [117]. Die Konjugation

ermöglicht nicht nur die Eliminierung aus dem Organismus, sie führt auch dazu, dass die Struktur des jeweiligen Stoffes verändert und somit die biologische Aktivität modifiziert wird. Generell sind Aglykone inert, in einigen Fällen behalten sie aber ihre physiologische Aktivität oder steigern sie sogar [118;119]. Die meisten Studien befassen sich mit UGTs und ihrer Rolle bei der Detoxifizierung von Fremdstoffen und anderen exogenen Substanzen wie z.B. Medikamente [120]. Sie tragen entscheidend zum Schutz vor toxischen Nahrungsbestandteilen, Karzinogenen aus Zigarettenrauch und einer Vielzahl von Umweltschadstoffen bei [121-128]. Eine weitere wichtige biologische Funktion haben sie bei der Homöostase von endogenen Stoffen wie z.B. Bilirubin, Steroid- und Thyroidhormonen, sowie Fett und Gallsäuren [129-131].

Zu der Familie der UGTs gehören insgesamt 26 Gene, die sich in zwei Gruppen aufteilen, UGT1 und UGT2. Basierend auf ihrer Sequenz werden sie in drei Unterfamilien aufgeteilt, UGT1A, UGT2A und UGT2B (Abbildung 7). Die Mitglieder der Familie UGT2 kodieren auf unabhängigen Genen [132-134]. Im Gegensatz dazu wird die gesamte UGT1 Familie von einem 210 kb großen Gen auf dem Chromosom 2 kodiert und besteht aus 17 Exons [135-137]. Für das finale Protein wird jedoch nur jeweils eine von dreizehn Exon 1 Sequenzen mit vier nachfolgenden Exons, die in allen Isoenzymen gleich sind, verwendet. UGT Enzyme bestehen aus 527-530 Aminosäuren und haben ein molekulares Gewicht von 50-57 kDA [138]. Das Exon 1 kodiert für die Substratbindedomäne, während die anderen Exons die UDP-Bindedomäne bilden. Die Vielzahl von Substratbindedomänen, die in UGT1 Enzymen durch das Exon 1 zur Verfügung stehen, gewährt eine breite und selektive Substratspezifität.

Es konnte gezeigt werden, dass UGT1A1 und UGT1A6 durch den AhR reguliert werden [139;140]. Das Isoenzym 1A1 ist das Hauptprodukt des UGT1 Genes, dessen wichtigste Aufgabe die Glucuronidierung von Bilirubin ist, dem Abbauprodukt von Hämoglobin. Genetische Veränderungen im UGT1 Genkomplex führen zu schwerer Form der Hyperbilirubinämie, auch bekannt als Crigler-Najjar Krankheit. Die Expression der UGT1A1 wird verhindert; Ursache hierfür sind Punktmutationen und Deletionen im TATA-Motiv des UGT Promotors, das im Wildtyp-Allel aus sechs TA-Wiederholungen besteht [141;142].

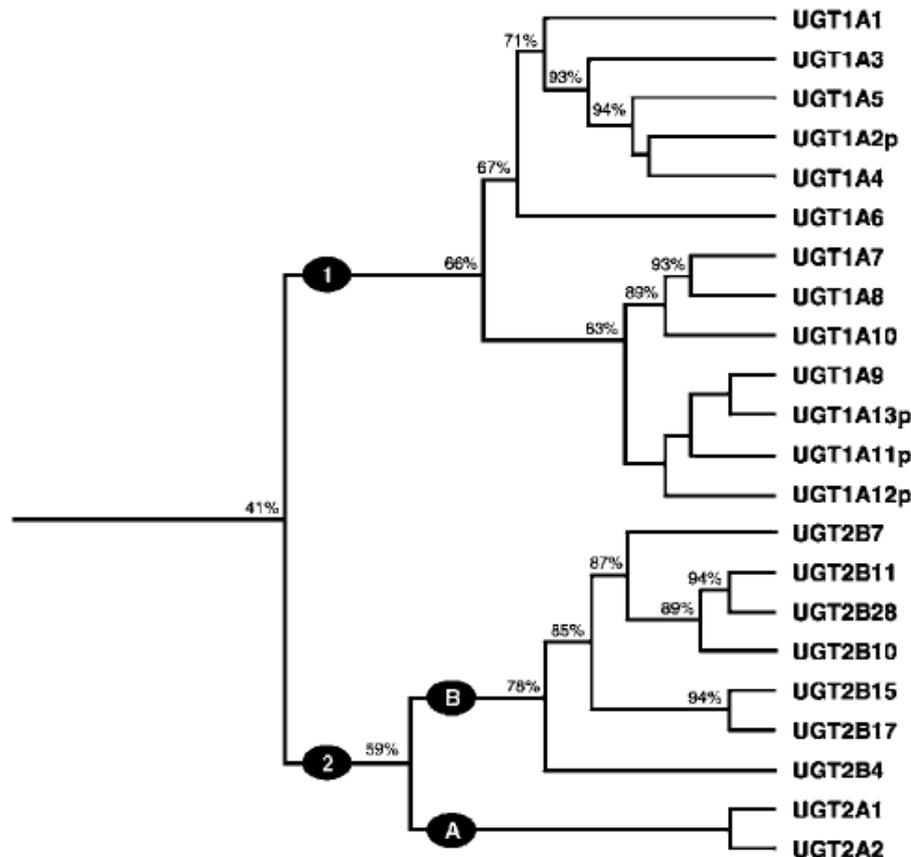


Abbildung 7 Phylogenetischer Stammbaum der UGT Isoenzyme: Enzyme, die weniger als 50% Homologie aufweisen, werden in zwei Familien aufgeteilt. Die Prozentangaben repräsentieren die Homologie zwischen zwei Gruppen oder einzelnen Isoenzymen auf Ebene der Aminosäuren. Pseudogene wurden nicht auf Homologie untersucht. (Quelle: Guillemette 2003)

Bei der schwächeren Form der Hyperbilirubinämie, auch bekannt als Gilbert-Syndrom, besteht das TATA-Motiv aus sieben TA-Wiederholungen, was lediglich zu einer verringerten Promotoraktivität führt [143;144]. Außerdem wird durch das Gilbert-Syndrom die Glucuronidierung von Therapeutika, wie z.B. Paracetamol, beeinflusst, was zu einer längeren Bioverfügbarkeit führt. UGT1A6 ist hauptsächlich für die Glucuronidierung von Phenolen und planaren Arylaminen verantwortlich, spielt aber auch eine Rolle bei der Konjugation von Antidepressiva, Neuroleptika und β -Blockern.

1.8 Sulfotransferasen

Die Sulfotransferasen (SULT) umfassen eine Gruppe von Phase 2 Enzymen, die Konjugation einer großen Anzahl von Molekülen vermitteln. Dazu gehören endogene Substanzen wie z.B. Neurotransmitter und Hormone, aber auch exogene Fremdstoffe. Bei der Konjugation wird eine Sulfatgruppe von dem universalen Donor 3'-Phosphoadenosin,5'-Phosphosulfat (PAPS) auf das Substrat übertragen (siehe Abbildung 6) [145]. PAPS wird durch zwei Enzyme aus anorganischem Sulfat, das über die Nahrung aufgenommen wird und einem Molekül ATP synthetisiert. Bei Säugetieren wird die Synthese von einem bifunktionalen Enzym katalysiert, der PAPS Synthase [146]. Wie bei der Glucuronidierung wird die Polarität der Akzeptormoleküle erhöht und gleichzeitig die biologische Aktivität unterbunden. In manchen Fällen resultiert die Konjugation jedoch in der Generierung von instabilen Sulfokonjugaten, aus denen elektrophile Kationen entstehen, die mit der DNA oder anderen zellulären Nukleophilen reagieren. Dieser Vorgang ist verantwortlich für die Bioaktivierung von Karzinogenen und Mutagenen [147;148].

Basierend auf ihrer zellulären Lokalisation werden Sulfotransferasen in zwei Klassen eingeteilt, zytosolische, die als freie Proteine vorliegen, oder membrangebundene im Golgiapparat. Membrangebundene Sulfotransferasen sind vorwiegend an der posttranslationalen Modifizierung von Makromolekülen, wie z.B. Kohlenhydraten, Fetten und Proteinen beteiligt. Die zytosolischen Sulfotransferasen konjugieren vorwiegend kleine exogene und endogene Substanzen. Aus diesem Grund repräsentieren sie eine relevante Klasse für den Fremdstoffmetabolismus [149]. Zytosolische Sulfotransferasen werden in fünf Familien aufgeteilt. Klasse 1 besitzt eine hohe Spezifität für phenolische Verbindungen, Klasse 2 für Hydroxsteroiden. Sulfotransferasen der Klasse 3 katalysieren die Konjugation von Sulfamaten, für die Klassen 4 und 5 konnten noch keine Substratspezifitäten festgestellt werden [150]. Die Regulation der SULT Expression durch Rezeptoren und deren Aktivatoren ist in vielen Fällen belegt, eine Beteiligung des AhR wird bisher jedoch kontrovers diskutiert. Nach neuesten Erkenntnissen konnte eine Induktion von Isoenzymen, darunter auch die Phenol Sulfotransferase 1A1, durch AhR Agonisten in Mäusen nachgewiesen werden [151;152].

1.9 ABC Transporter

Der vektoriale Transport von Molekülen über Zellmembranen ist essentiell für die Zellphysiologie und beinhaltet Aufnahme von Nahrungsmitteln, Eliminierung von Abfallprodukten, Proteinsekretion und Freilassung von Signalmolekülen. Diese Prozesse werden unter anderem von ABC-Transportern katalysiert. Ihr Name leitet sich aus der ATP-Bindekassette (ABC) ab. Für den Transport wird Energie in Form von ATP benötigt. ABC-Transporter finden sich in allen Organismen, von Bakterien bis hin zu komplexen Lebewesen wie den Säugern, aber auch in Pflanzen [153]. Es wurden mittlerweile 28 verschiedene Transporter in *Saccharomyces* identifiziert, 58 in *Caenorhabditis*, 51 in *Drosophila*, 129 in *Arabidopsis* und 69 in *E.coli*.. Im Menschen wurden bisher 48 verschiedene ABC-Transporter identifiziert. Außerdem ist eine Reihe von nicht funktionellen Polymorphismen bekannt, die Ursache einiger Augen- und Leberdefekte sind, weil spezifische Liganden wie Farbpigmente oder Gallsalze nicht mehr über Membranen transportiert werden können [154;155]. Fast alle bisher beschriebenen ABC-Transporter vermitteln den Export von Molekülen aus der Zelle bzw. dem Zytosol. Eine Ausnahme bilden einige bakterielle Transporter, die in das Zytosol transportieren, wofür allerdings ein weiteres extrazelluläres Protein benötigt wird.

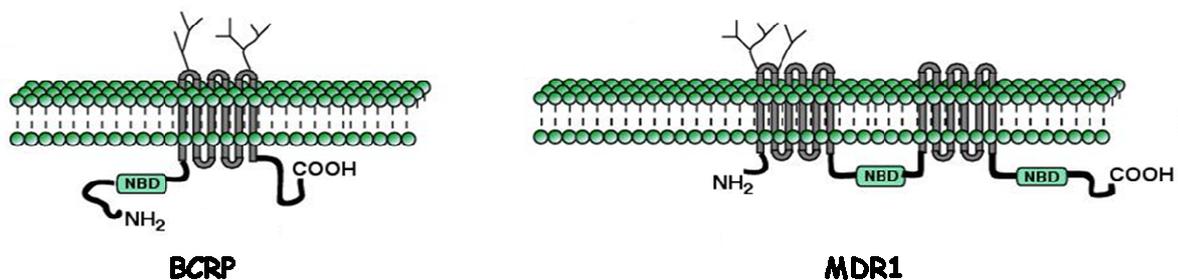


Abbildung 8 Schematischer Aufbau der ABC-Transporter: ABC-Transporter besitzen 4 funktionelle Domänen, zwei Transmembran- und zwei Nukleotidbindedomänen (NBD). Volltransporter wie Multiple Drug Resistance 1 (MDR1 oder p-Glykoprotein) besitzen alle Domänen in einer Peptidkette. Halbtransporter wie Breast Cancer Resistance Proteine (BCRP) müssen dimerisieren, um ein funktionelles Protein mit vier Domänen zu bilden.

Funktionelle ABC-Transporter bestehen aus vier Kerndomänen, zwei Nukleotidbindedomänen (NBD) und zwei Transmembrandomänen (TMD) (siehe Abbildung 8) [156]. Die TMDs bestehen aus membranüberspannenden α -Helices, die den Kanal für die zu transportierenden Substrate bilden. Im Verlaufe der Evolution sind innerhalb der TMD genetische Aberrationen aufgetreten, die zur Veränderung der Substratspezifität geführt haben [157]. Die Sequenz der NBD dagegen ist in Prokaryoten und Eukaryoten konserviert [158]. Der Ablauf des Trans-

portvorganges ist bisher nicht genau bekannt, es wird jedoch davon ausgegangen, dass im Allgemeinen der Prozess durch die Substratbindung ausgelöst wird. In Abbildung 9 ist das ATP-Switch Modell [159] dargestellt, das diesen Vorgang beschreibt. Die TMDs formen einen Zylinder, in dem die Substratbindestelle nach außen orientiert ist. Durch die Bindung des Substrats wird die Affinität der NBDs für ATP erhöht und die Aktivierungsenergie für die Schließung des NBD-Dimers herabgesetzt. Das geschlossene NBD-Dimer verursacht eine Konformationsänderung der TMDs, woraufhin die Substratbindestelle in die Innenseite des Kanals orientiert wird. Durch die Konformationsänderung wird die Affinität der Substratbindestelle herabgesetzt und das Substrat entlassen. Durch Hydrolyse der ATP-Moleküle wird das Dimer wieder in die Ausgangsformation überführt.

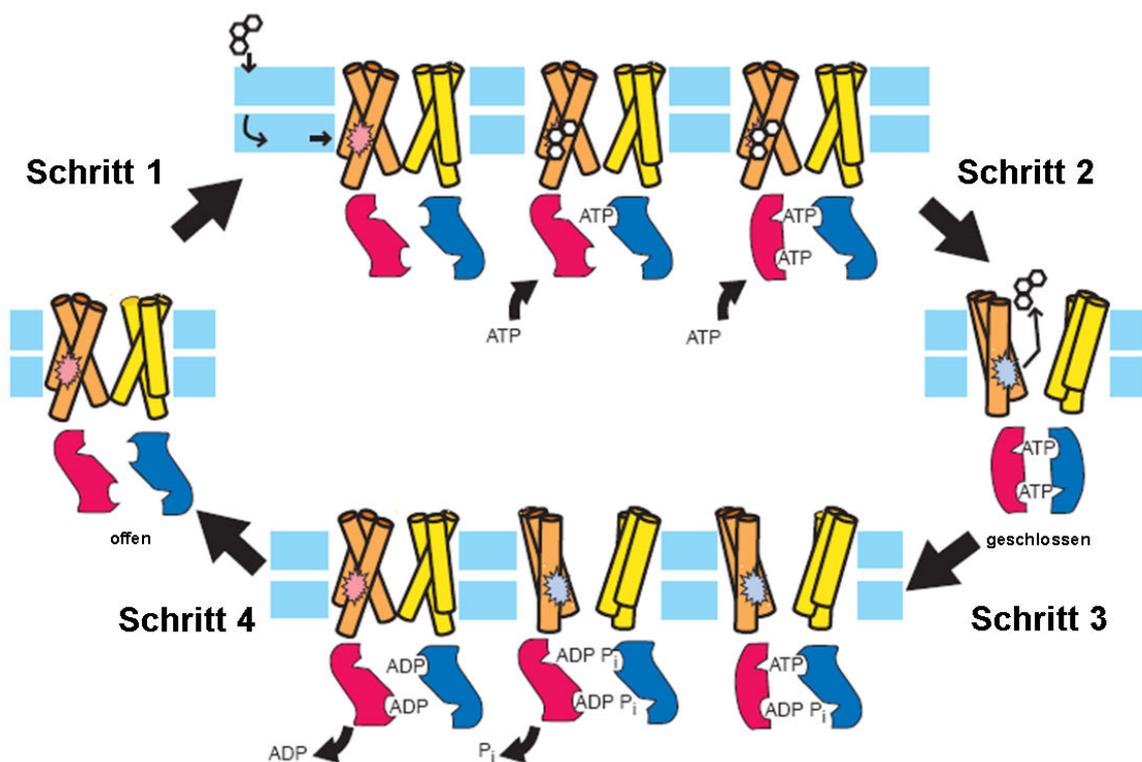


Abbildung 9: Das ATP-Switch Modell: Durch Substratbindung wird die Affinität der NBDs (rot und blau) für ATP herabgesetzt. Durch Bindung der ATP-Moleküle dimerisieren die NBDs, was eine Konformationsänderung der TMDs (orange und gelb) verursacht. Die Substratbindestelle wird dadurch in den Kanal orientiert und die Substrataffinität herabgesetzt, was zur Freisetzung des Substrats führt. Durch Hydrolyse der ATP-Moleküle wird das Dimer wieder in die Ausgangsformation überführt. Quelle: Higgins & Linton (2004)

Eine wichtige Funktion kommt den ABC-Transportern in Geweben zu, die Barrieren darstellen, z.B. dem Darm, der Blut-Hirn-Schranke und der Plazenta. Sie limitieren die Aufnahme von Fremdstoffen und schützen somit den Organismus vor äußeren Einflüssen [160]. Auf-

grund dieser Eigenschaften teilen sie eine wichtige Rolle bei der Ausscheidung von Fremdstoffen, auch als Phase 3 bezeichnet, die unter anderem über den AhR Signalweg abgebaut werden [161]. Die unidirektionale Orientierung der ABC-Transporter in sezernierenden Epithelien wie Niere, Leber oder Darm ermöglicht eine effiziente und zielgerichtete Eliminierung von Fremdstoffen und endogenen Abbauprodukten.

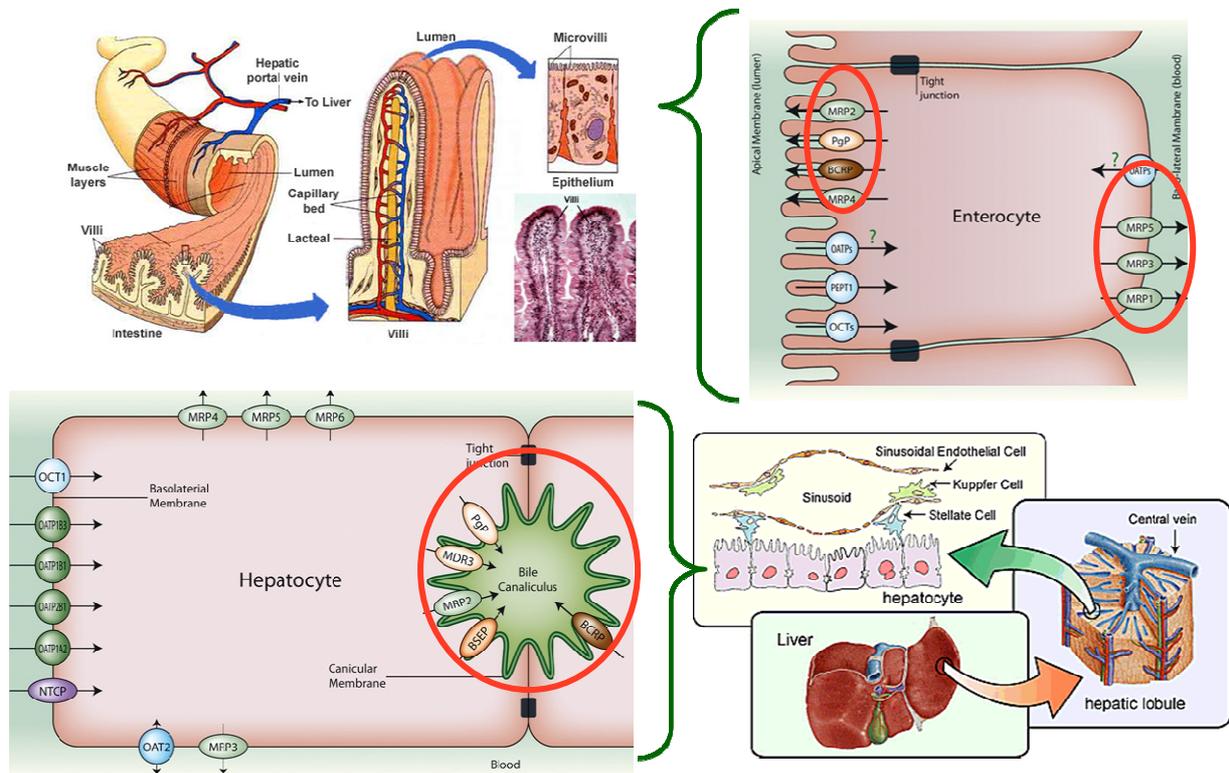


Abbildung 10 Zelluläre Lokalisation von ABC-Transportern in Darm und Leber: In den Enterozyten des Darmpithel (oberes Bild) ist der Expressionsort (rot markiert) begrenzt auf die zum Lumen gerichtete apikale Membran, oder auf die basolaterale Membran die zur Lymphbahn führt. In den Hepatozyten der Leber (unteres Bild) ist der Expressionsort ebenfalls limitiert, z.B auf die kanalikuläre Membran die den Gallengang auskleidet (rot markiert). Quelle: N.A. Campbell, Biologie; www.Solvobiotech.com.

ABC-Transporter tragen nicht nur zur Elimination von Fremdstoffen bei, sondern können durch ihre Aktivität auch die Wirkung von Medikamenten beeinflussen. Sie limitieren die Akkumulation ihrer Substrate und können auf diese Weise die Resistenz von pathogenen Bakterien gegen Antibiotika oder Tumorzellen gegen Zytostatika vermitteln. Sie sind daher von großer Relevanz in der Krebstherapie. In vielen Tumoren sind ABC-Transporter überexprimiert, was die Toleranz gegenüber Chemotherapeutika zusätzlich fördert. Dieser Mechanismus ist als klinische Medikamentenresistenz (MDR) bekannt. Jährlich sterben viele Menschen, weil aufgrund der MDR die Therapie fehlschlägt. Das Ziel vieler Studien ist es, Adju-

vantien für die Chemotherapie zu entwickeln, um die Dosierung herabsetzen zu können und die Verträglichkeit zu erhöhen. Diese Stoffe dürfen keine Toxizität zeigen, müssen im gleichen Maße bioverfügbar sein wie Zytostatika und gleichzeitig die MDR unterdrücken. Flavonoide können die Aktivität von ABC-Transportern inhibieren und sind daher im Mittelpunkt einiger pharmakologischer Studien. Es konnte gezeigt werden, dass Flavonoide die intrazelluläre Akkumulation des Zytostatikum Daunorubicin, durch Inhibierung des p-Glykoprotein, erhöhen [162]. Weitere ABC-Transporter, die an der MDR beteiligt sind und durch Flavonoide inhibiert werden können sind MRP1, MRP2 und BCRP [163;164]. In BCRP überexprimierenden MCF-7 und MX100 Zellen, wird durch Flavonoide die intrazelluläre Akkumulation von BCRP-Substraten erhöht. In MRP1 und MRP2 transfizierten MDCKII Zellen wurde der Efflux von dem Zytostatikum Vincristin durch Flavonoide inhibiert und die Zellen somit für Vincristin sensibilisiert. Dies sind einige Beispiele für die positiven pharmakologischen Wirkungen von Flavonoiden.

1.10 Zielsetzung

Flavonoide werden heute als besondere, gesundheitsfördernde Stoffe von der Nahrungsmittelindustrie angepriesen. Die tägliche Aufnahme solcher Präparate kann ein Vielfaches der Zufuhr betragen, die durch den Verzehr von Obst oder Gemüse erreicht wird. Ein Problem ist, dass die volle Bandbreite der potentiellen toxischen Eigenschaften nicht bekannt ist, so dass neben den positiven Effekten auch adverse Effekte auf den menschlichen Organismus auftreten können. Deshalb sollte in dieser Arbeit die Wirkungen von ausgewählten Flavonoiden auf die verschiedenen Phasen des Fremdstoffmetabolismus ermittelt werden.

Im einzelnen wurden folgende Fragestellungen untersucht:

1. Welchen Effekt haben antagonistische Flavonoide auf die AhR regulierte Transkription und Aktivität von Enzymen der Phase 1- und 2-Reaktion des Fremdstoffmetabolismus?
2. Kann die AhR Signalkaskade die transkriptionelle Regulation des ABC-Transporters BCRP modulieren und inwieweit beeinflussen Flavonoide den Transport von Fremdstoffmetaboliten?
3. Welche Konsequenzen ergeben sich bei einer Flavonoid-modulierten Hemmung des Fremdstoffwechsels für die Kinetik von Xenobiotika?

Als Zellmodell für den Darm diente die Kolonkarzinomzelllinie Caco2. Die gewonnenen *in vitro* Befunde sollen Aufschluss über die biologischen Effekte von Flavonoiden als Nahrungsergänzungsmittel bringen.

2 Material und Methoden

Allgemeines

Die verwendeten Chemikalien besaßen p.a. Qualität. Lösemittel für die chemische Analyse wurden ausschließlich in HPLC-grade Qualität verwendet. Wenn nicht anders vermerkt, wurden diese von den Firmen Sigma-Aldrich (München), Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Invitrogen (Karlsruhe) oder Fluka (Neu-Ulm) bezogen. Medien, Puffer und andere Lösungen wurden mit Reinstwasser angesetzt, welches über eine Millipore-Anlage (Schwalbach) aufbereitet worden war. Lösungen für Arbeiten mit mRNA wurden mit DEPC-Wasser angesetzt.

2.1 Zellbiologische Methoden

2.1.1 Kultivierung von Zellen

Caco2 Zellen sind eine adhären wachsende immortalisierte epitheliale Kolonkarzinom Zelllinie. Für die Kultur der Caco2 Zellen wurde RPMI 1640 mit L-Glutamin, 10% FCS (v/v), 40 U/ml Penicillin/Streptomycin (A/A) und 5% NaCO₃ (v/v) verwendet. HaCat Zellen sind adhären wachsende immortalisierte Keratinozyten. Die Kultur der HaCat Zellen erfolgte in DMEM Medium, 10% FCS, 40 U/ml A/A und 2mM Glutamin. Das Medium für stabil transfigierte AhR knock-out HaCaT Zellen enthielt zusätzlich 0,54mg/ml Gentamycin. Die Zellen wurden jeweils unter Standardbedingungen, bei 37°C und 5% CO₂ in einem Hera Cell 150 Inkubator kultiviert. Alle drei Tage wurde das Nährmedium gewechselt. Bei Erreichen von 90% Konfluenz wurden die Zellen passagiert. Die Zellen wurden dazu mit PBS (40 U/ml A/A) gewaschen und anschließend mit 2ml Trypsin (PAA, Cölbe) für 5min bei 37°C inkubiert. Die abgedauten Zellen wurden in 8ml Nährmedium aufgenommen und auf neue Gewebekulturflaschen verteilt.

2.1.2 Belastung von Zellen

Die Belastung der Zellen erfolgte in Vollmedium. Die Substanzen sind in den entsprechenden Konzentrationen, die für die Belastungen der Zellen verwendet wurden in Tabelle 2 aufgeführt. Gelöst wurden die Substanzen in DMSO enthaltendem Medium. Die Endkonzentration an DMSO betrug jeweils 0,2%. Die Tabelle 3 zeigt eine Übersicht der angewandten Versuche, Zelltypen, Kammersysteme, Zellzahl und Differenzierungszeit. Durch die Differenzierungszeit wurde gesichert, dass die Zellen, falls notwendig für den Versuch, eine apikal-basolaterale Orientierung ausbilden konnten.

Tabelle 2 Liste der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Substanzen

Substanz	Endkonzentration
B(a)P (Sigma-Aldrich, München)	1 µM
3MC (Sigma-Aldrich, München)	1 µM
KO143 (Tocris bioscience, Bristol, UK)	5 µM
B(a)P-3-OH (Sigma-Aldrich, München)	1 µM, 5 µM, 10 µM
Luteolin (Sigma-Aldrich, München)	5 µM, 15 µM, 25 µM, 50 µM
Baicalein (Sigma-Aldrich, München)	5 µM, 15 µM, 25 µM, 50 µM
Fisetin (Sigma-Aldrich, München)	5 µM, 15 µM, 25 µM, 50 µM
EGCG (Alexis, Lörrach)	5 µM, 15 µM, 25 µM, 50 µM
7-Ethoxyresorufin (Sigma-Aldrich, München)	2,5 µM
Dicumarol (Sigma-Aldrich, München)	10 µM
MNF (Symrise, Holzminden)	25 µM

Tabelle 3

Versuch	Zelltyp	Kammersystem	Zellzahl	Differenzierungszeit
Genexpression	HaCaT	6-Well Kammer	2*10 ⁵	semikonfluent
	Caco2	12-Well Kammer	1*10 ⁵	10 Tage
LDH-Versuch	Caco2	6-Well Kammer	2*10 ⁵	10 Tage
Reportergenanalysen	Caco2	6-Well Kammer	2*10 ⁵	semikonfluent
EROD Aktivität	Caco2	48-Well Kammer	0,5*10 ⁵	10 Tage
UGT Aktivität	Caco2	48-Well Kammer	0,5*10 ⁵	10 Tage
SULT Aktivität	Caco2	6-Well Kammer	2*10 ⁵	10 Tage
Transportanalysen	Caco2	Transwell Kammern	2*10 ⁵	21 Tage
Akkumulation von B(a)P	Caco2	6-Well Kammer	2*10 ⁵	10 Tage

2.1.3 Zytotoxizitätsversuche

Für die Abschätzung des zytotoxischen Potentials der in dieser Arbeit verwendeten Substanzen wurden Versuche zur Membranintegrität der Zellen durchgeführt. Eine verringerte Membranintegrität wird durch den vermehrten Efflux der Laktatdehydrogenase (LDH) angezeigt. Die Belastung der Zellen erfolgte für 24h. Zu den entsprechenden Zeitpunkten wurden 100 µl Medium entnommen und die Aktivität der LDH mit dem CytoTox-ONE Kit (Promega, Mannheim) bestimmt. Dabei wurde nach Herstellerangaben verfahren.

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Isolierung von RNA, genomischer DNA und Plasmid DNA

Die Aufreinigung von RNA, genomischer DNA und Plasmid-DNA erfolgte mit Hilfe kommerziell erhältlicher Kits. Für die Isolierung der Gesamt-RNA aus Zellkulturen wurde das gold RNA kit (Peqlab, Erlangen, Deutschland) verwendet. Zusätzlich wurde die Aufreinigung mit einem DNase I (Qiagen, Hilden) Verdau kombiniert. Zur Gewinnung genomischer DNA aus humanen Zellen wurde das QIAamp DNA Kit (Qiagen, Hilden) verwendet. Für die Plasmid Isolierung aus *Escherichia coli* wurde das Plasmid High Speed mini bzw. midi Kit (Qiagen, Hilden) verwendet. Alle Arbeitsschritte erfolgten gemäß den Angaben des Herstellers.

2.2.2 Gelelektrophorese von DNA

Die Auftrennung von genomischer bzw. Plasmid-DNA erfolgte mit Hilfe von Ethidiumbromid haltigen Agarosegelen. Für die Gelelektrophorese wurden 1% (w/v) Agarosegele in 1x TBE Puffer angesetzt. Die Proben wurden vor dem Auftragen mit 6x Bromphenol-Blau/Xylencyanol enthaltenden Ladepuffer beschwert. Je nach Größe der zu erwartenden Fragmente wurde die Elektrophorese bei 100V - 140V Gesamtspannung oder 5V - 7V/cm² Gel-änge für 30-60min durchgeführt. Die Identifizierung und Größenbestimmung der einzelnen Fragmente erfolgte anhand von 100bp- und 1kb Markern (beide Peqlab, Erlangen). Die Visualisierung der Banden wurde mit Hilfe eines Fluor-S-max (Biorad, München) durchgeführt.

2.2.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von RNA, DNA und Plasmid-DNA wurde an einem Genequant Spektrophotometer (Pharmacia Biotech, Freiburg) gemessen. Für die Messung wurde von jeder Probe eine 1:20 Verdünnung mit DEPC Wasser in UV-Küvetten angesetzt.

2.2.4 cDNA Synthese

Bei der cDNA Synthese wird einsträngige mRNA durch Reverse Transkriptase in komplementäre DNA umgeschrieben, die anschließend für quantitative Analysen verwendet werden kann. Heutzutage wird hauptsächlich M-MLV- (*Moloney-Murine-Leukemia-Virus*) Reverse Transkriptase eingesetzt, im Gegensatz zur früher verwendeten AMV- (*Avian-Myoblastosis-*

Virus) Reverse Transkriptase. Der Vorteil der M-MLV-RT ist, dass sie im Gegensatz zur AMV-RT keine DNA abhängige DNA-Polymerase Aktivität besitzt.

Die Reverse Transkription von mRNA-Molekülen wurde standardmäßig mit M-MLV-RT durchgeführt. Pro Reaktionsansatz wurde 1µg RNA eingesetzt. Die RT erfolgte in zwei Schritten. Initial erfolgte die Anlagerung der oligo-dT Primer an die DNA bei 65°C für 5min. Anschließend wurde der RT-Mix hinzupipettiert und die RT bei 37°C für 52min durchgeführt. Nach diesem Schritt erfolgte die Inaktivierung der RT bei 70°C für 15min. Der einzelne Reaktionsansatz war wie folgt:

Annealing-Mix (20µl):

RNA 1µg	Xµl
H ₂ O	ad 15,5µl
oligo dT(15) Primer 80mM	2,5µl
dNTPs	2µl

RT-Mix (20µl):

H ₂ O	5µl
RNA-Guard 30U/µl	1µl
5x RT-Puffer	8µl
DTT 0,1M	4µl
M-MLV RT 200U/µl	2µl

2.2.5 Standard PCR

Bei der Polymerasekettenreaktion (PCR) werden gezielt DNA Sequenzen *in vitro* amplifiziert. Die Polymerase benötigt für die Amplifizierung von komplementärer DNA ein freies 3'OH Ende. Dieses wird bei der *in vitro* PCR von komplementären Primern, 10 bis 20 Basen große Oligonukleotide, zur Verfügung gestellt. Da genomische DNA bzw. cDNA oder Plasmid-DNA im Doppelstrang vorliegt, muss die DNA denaturiert werden bei 95°C. Durch die Verwendung von thermostabilen Polymerasen wie der *Thermophilus aquaticus* (Taq) Polymerase ist es möglich, die PCR in einem Ansatz durchzuführen. Die PCR findet in drei

Schritten statt, initial wird die DNA bei 95°C denaturiert, gefolgt von der Anlagerung der Primer bei einer Temperatur die idealerweise 5°C unter der Schmelztemperatur (T_M) liegt. Die Elongation der Primer findet bei dem Temperaturoptimum des jeweiligen Enzyms statt, im Falle der Taq-Polymerase bei 72°C. Die entstandenen DNA-Fragmente dienen im nächsten Zyklus wieder als Matritze, wodurch die Amplifizierung der Fragmente exponentiell ansteigt. Der Nachteil der Taq-Polymerase ist, dass sie keine „Proof-Reading“-Aktivität besitzt, also Fehler bei der Basenpaarung nicht korrigieren kann. Daher eignet sich dieses Enzym nicht für die Amplifizierung von Promotorelementen die z.B. für Reportergenversuche verwendet werden. Als Alternative bietet sich dazu die *Pyrococcus woesei* (PWO) Polymerase an, die durch ihre 5'Exonukleaseaktivität die Inserierung falscher Basen auf ein Minimum reduziert. Das Temperaturoptimum der PWO liegt bei 68°C. Die Wahrscheinlichkeit einer falschen Inserierung liegt für die Taq-Polymerase bei 1:1000, hingegen für die PWO-Polymerase bei 1:10000. Der Nachteil der PWO ist die geringere Ausbeute aufgrund niedrigerer Aktivität. Die PCR-Reaktionen wurden in einem TRIO-Thermoblock (Biometra, Göttingen) oder dem Robocycler Gradient (Stratagene, La Jolla, USA) durchgeführt.

Taq-PCR: Für die Etablierung von Primern und die Standardsynthese für die qRT-PCR wurde Taq-Polymerase (Qiagen, Hilden) verwendet.

Template	X μ l
Primer FP 4 μ M	2,5 μ l
Primer RP 4 μ M	2,5 μ l
10x PCR Reaktionspuffer	2,5 μ l
dNTPs 10mM	1 μ l
Taq-Polymerase 5U/ μ l	0,3 μ l
Wasser	ad 25 μ l

PWO-PCR: Für die Klonierung von Promotorfragmenten aus genomischer DNA wurde PWO-Polymerase (Peqlab, Erlangen) verwendet.

Template	X μ l
Primer FP 4 μ M	2,5 μ l
Primer RP 4 μ M	2,5 μ l
10x PCR Reaktionspuffer	2,5 μ l
dNTPs 10mM	1 μ l
Pwo-Polymerase 2U/ μ l	2 μ l
Wasser	ad 25 μ l

2.2.6 Quantitative Real Time PCR (qRT-PCR)

Bei der qRT-PCR ist es möglich die Amplifizierung der DNA Fragmente in Echtzeit zu verfolgen. Ermöglicht wird dies durch Zugabe eines Farbstoffes, der in doppelsträngige DNA interkaliert. Da bei der PCR die Amplifizierung der DNA Fragmente exponentiell abläuft, korreliert die Fluoreszenz des Farbstoffes mit der Menge der im Ansatz enthaltenen DNA. Durch die Hilfe von DNA-Standards ist es möglich die Fluoreszenz in die entsprechende Molekülmenge umzurechnen. In dieser Arbeit wurde SensiMix PLUS SYBR (Quantace, London) als Detektionsfarbstoff verwendet. Die PCR Reaktion wird wie sonst üblich in PCR-Maschinen durchgeführt, die zusätzlich über eine UV-Lampe und eine CCD-Kamera verfügen. Das Prinzip der Reaktion ist, dass der Farbstoff angeregt wird und die Fluoreszenz dann detektiert wird. Die PCR Reaktionen wurden mit einem Rotor Gene Q (Qiagen, Hilden) durchgeführt. Das Gerät misst nach jedem PCR Zyklus die Fluoreszenz und berechnet durch die Rotor-Gene Q Series Software 1.7 den Übergang der Reaktion in die exponentielle Phase, auch Crossing Point genannt. Die Reaktionen wurden wie folgt angesetzt.

qRT-PCR Ansatz: Die cDNA aus 2.2.4 wurde vor der Verwendung 1:3 verdünnt.

SensiMix PLUS SYBR	7,5µl
Primer FP 4µM	1µl
Primer RP 4µM	1µl
cDNA	3µl
Wasser	ad 15µl

Primer für die qRT-PCR:

β-Actin	FP 5'-CCCCAGGCACCAGGGCGTGAT-3'
[165]	RP 5'-GGTCATCTTCTCGCGGTTGGCCTTGGGGT-3'
Produktlänge: 263bp	Annealing Temperatur: 60°C
CYP1A1	FP 5'-TAGACACTGATCTGGCTGCAG-3'
[166]	RP 5'-GGGAAGGCTCCATCAGCATC-3'
Produktlänge: 150bp	Annealing Temperatur: 60°C

UGT1A1	FP 5'-CCTTTGCCTCAGAATTCCTTC-3'
	RP 5'-ATTGATCCCAAAGAGAAAACCAC-3'
Produktlänge: 231bp	Annealing Temperatur: 64°C
UGT1A6	FP 5'-ATGAGATTGTAGTGGTGGTGC-3'
	RP 5'-CCTTAAAGAAGTTCAGGGTGT-3'
Produktlänge: 260bp	Annealing Temperatur: 60°C
SULT1A1	FP 5'-CATGGTCGGAAGTGCCT-3'
[167]	RP 5'-TTCGGGTTCTCCTTCATGTC-3'
Produktlänge: 150bp	Annealing Temperatur: 60°C
BCRP	FP 5'-CAGGTCTGTTGGTCAATCTCACA-3'
[168]	RP 5'-TCCATATCGTGGAATGCTGAAG-3'
Produktlänge: 76bp	Annealing Temperatur: 60°C

2.3 Klonierung der BCRP Promotorfragmente

2.3.1 Amplifizierung der BCRP Promotorfragmente

Die DNA-Sequenz des 5'-Aufwärtsbereich des BCRP Gen (Acc.no.: AC022718) wurde aus der Datenbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI, Bethesda, USA, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) entnommen. Für die Generierung der BCRP Promotorfragmente wurden 3 Bereiche in der 5' untranslatierten Region des BCRP Gen durch PWO Polymerase (siehe 2.2.5) amplifiziert, in denen durch manuelle Sequenzanalyse putative XRE-Sequenzen identifiziert wurden (Abbildung 11). Dafür wurden spezielle Primer generiert, die zusätzlich Restriktionsschnittstellen enthielten. An den beiden Enden wurden unterschiedliche Schnittstellen erzeugt. Dadurch wird gewährleistet, dass die 5'-3' Orientierung bei der Inse-rierung in den *pGL3-basic* Vektor (Promega, Mannheim) beibehalten wird.

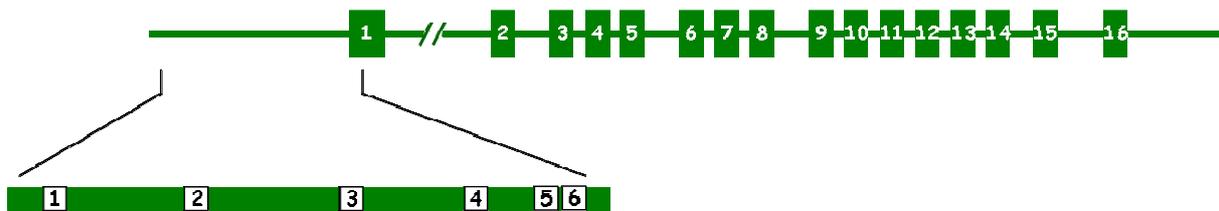


Abbildung 11 Schematischer Aufbau des BCRP Gen: Im 5'untranlatierten Bereich wurden 6 putative XRE Sequenzen (weiß) identifiziert.

Primersequenzen

BCRP XRE1	FP 5'-GTGGTACCTTCTTTGCAGGAGCCATTCT-3' <i>KpnI</i>
(-4735 – 4354)	RP 5'-GTCTCGAGGCCAAGAGGACAAGCCATAA-3' <i>XhoI</i>
Produktlänge: 381bp	Annealing Temperatur: 67°C
BCRP XRE2	FP 5'-GTGGTACCCAGGCTGCTCTTGAAGTCCT-3' <i>KpnI</i>
(-1801 – 1596)	RP 5'-GTCTCGAGTGGAGAAAACACACACGAAA-3' <i>XhoI</i>
Produktlänge: 205bp	Annealing Temperatur: 67°C

Insert-DNA (geschnitten)	1:3 (Vektor:Insert)
Wasser (Nuklease frei)	ad 15µl
5x Ligase-IT Puffer	4µl
T4 DNA Ligase	1µl

2.3.4 Transformation

Die Plasmid DNA wurde durch die Hitzeschock Methode in kompetente *E.coli* Bakterien transformiert [169]. Diese wurden dazu frisch aufgetaut und im Eisbad inkubiert, jeder Ansatz enthielt 50µl Bakteriensuspension. Weiterhin enthielt der Ansatz β -Merkaptoethanol in einer Endkonzentration von 24mM, um die Transformationseffizienz zu erhöhen. Anschließend wurde der komplette Ligationsansatz aus 2.3.3 zu den Zellen gegeben und für 30min auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock erfolgte im Anschluss für 45sec in einem 42°C Wasserbad woraufhin eine weitere 2-minütige Inkubation im Eisbad erfolgte. Es wird angenommen, dass die Bakterien die Plasmid DNA durch diesen Schock leichter aufnehmen. Nach der Inkubation wurde zu jedem Ansatz 1ml LB-Medium (ohne Antibiotikum) gegeben und für 1h bei 37°C und 220rpm inkubiert. Als nächster Schritt wurden 250µl Suspension auf LB-Agarplatten aufgetragen und bei 37°C inkubiert. Nach 16h wurden Kolonien abgenommen und die Plasmid-DNA mit Hilfe des Plasmid minikits isoliert. Die Klone wurden in 2ml LB-Medium für 16h bei 37°C und 220rpm inkubiert. Die Isolierung der Plasmide wurde mit 1ml dieser Suspension - wie unter 2.2.1 beschrieben - durchgeführt und positive Klone durch Restriktionsverdau identifiziert. Die restliche Suspension der positiven Klone wurde daraufhin in 50ml LB-Medium überführt und wiederum für 16h bei 37°C und 220rpm inkubiert. Die Aufreinigung der Plasmid-DNA erfolgte durch das Plasmid midikit.

Verwendete Bakterienstämme:

XL1-Blue MRF' Supercompetent Cells (Stratagene)
Genotyp: $\Delta(mcrA)183 \Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1$
 $lac [F^- proAB lacI^q \Delta M15 Tn10 (Tet^r)]$

Verwendete Nährmedien:

LB-Medium	2,5% LB Trockenmedium (Roth, Karlsruhe) 40U/ml Ampicillin
LB-Agarplatten	4% LB-Agar (Roth, Karlsruhe) 40U/ml Ampicillin

2.4 Reportergenversuche

2.4.1 Transfektion von Plasmid DNA

Die Reportergenversuche wurden in humanen Caco2 Zellen durchgeführt. Für jede Probe wurden 24h vor Versuchsbeginn $2 \cdot 10^5$ Zellen in 6-Kammer Platten eingesät. Die Transfektion erfolgte mit dem jetPEITM DNA Transfektions Reagenz (Polyplus transfection, Illkirch, Frankreich). Dieses Reagenz ist ein kationisches Polymer, bestehend aus einem polaren Kopf und einer lipophilen Seitenkette, das sich um die Plasmid DNA lagert und Mizellen bildet. Die polaren Enden sind nach außen gelagert, ähnlich wie in einem Lipidbilayer. Die Mizellen sind in der Lage mit der Plasmamembran der Zellen zu verschmelzen und katalysieren so die Transfektion der DNA in den Zellkern. Für die Transfektion wurde die entsprechende Gesamtmenge an Plasmid DNA und Transfektionsreagenz in einem Verhältnis 1:2 (w/v) in 200 μ l 150mM NaCl angesetzt und für 20min bei RT inkubiert. Pro Ansatz wurden 3 μ g Plasmid, sowie 50ng eines *pRL-TK* Kontrollplasmid zur Bestimmung der Transfektionseffizienz verwendet. Die Transfektion erfolgte in 1,8ml frischem Zellkulturmedium. Die Titrierung des Ansatzes wurde unter ständigem Schwenken der Zellen durchgeführt. Die Inkubationszeit betrug 24h. Der Ansatz für die Transfektion war wie folgt:

Transfektionsansatz:

Vektor	3 μ g
pRL-TK	50ng
jetPEI TM	6 μ l
150mM NaCl	200 μ l

2.4.2 Analyse der BCRP Promotoraktivität

Nach der Transfektion erfolgte eine 24 stündige Belastung mit den entsprechenden Substanzen. Für die Analyse wurden die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend durch 400µl Passiv Lysispuffer lysiert. Die Membranfragmente wurden abzentrifugiert (13.000 rpm, 5min) und der Proteingehalt des Überstandes mit dem Uptima BC Assay Kit (VWR, Sankt Augustin-Buisdorf) bestimmt. Für die Aktivitätsmessung wurden 25µl des Lysats mit dem Dual-Glo Luciferase Assay System Kit (Promega, Mannheim) verwendet. In diesem Kit sind die Substrate für die *Firefly* Luciferase des *pGl3B*-Vektor und die *Renilla* Luciferase des *pRL-TK* Vektor enthalten. Beide Enzyme arbeiten bei verschiedenen pH-Werten, weshalb bei dieser Methode in zwei Schritten gemessen wird. Die Aktivitätsmessung erfolgte in einem Multi-Bioluminat LB 9505C Gerät (Berthold Detection Systems, Oak Ridge, TN, USA) nach Angaben des Herstellers. Die Zeit der Lumineszenz-Messung betrug jeweils 30sec, die Verzögerungszeit zwischen der Messung der *Firefly*- und *Renilla*-Aktivitäten 4sec. Die ermittelten Aktivitäten der *Firefly* Luziferase wurden auf 1µg Protein berechnet und mittels der *Renilla* Luziferase-Aktivitäten normalisiert.

2.5 Enzymaktivitätsstudien

Allgemeines

Die beschriebenen Aktivitätsmessungen wurden fluorometrisch mit einem Ascent Fluorometer (Thermo Fisher, Waltham, USA) durchgeführt. Sämtliche Messungen erfolgten bei 37°C.

2.5.1 Messung der 7-Ethoxyresorufin-O-Deethylaseaktivität (EROD) in Caco2 Zellen

Die Methode basiert auf der katalytischen Umwandlung von 7-Ethoxyresorufin in den fluoreszierenden Farbstoff Resorufin. Diese Reaktion wird von den AhR regulierten Genprodukten CYP1A1, 1A2 und 1B1 katalysiert. Die Messung erfolgt hierbei an lebenden Zellen. Die in dieser Arbeit angewandte Methode basiert auf den von Rolsted *et al.* [170] durchgeführten Experimenten. Das Ausmaß der Aktivitätszunahme im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle ist ein Hinweis auf die Induktion des Enzyms.

Die Zellen wurden für 24h mit den entsprechenden Substanzen belastet. Vor der Aktivitätsmessung wurden die Zellen mit PBS gewaschen und das Assay-Medium in einem Volumen

von 250µl hinzugegeben. Die EROD Messung erfolgte in serumfreiem Kulturmedium, das 2,5µM 7-Ethoxyresorufin als Substrat und 10µM Dicumarol enthielt. Das Dicumarol dient zur Hemmung von Chinon-Oxidoreduktasen die Resorufin metabolisieren und somit die Messung verfälschen können. Unmittelbar nach Zugabe des Assay-Medium wurde eine Kinetik über 20 min aufgenommen. Die Anregung erfolgte bei 544nm, die Emission bei 590nm. Zusätzlich wurde eine Resorufin Kalibrierreihe von 50pmol bis 1000pmol gemessen. Im Anschluss an die Kinetik wurden die Zellen mit PBS gewaschen und die Proteinmenge mit dem CBQCA Kit (Molceular Probes, Leiden, Niederlande) bestimmt. Dieses Kit basiert auf einem Farbstoff, der Proteine bindet und dadurch fluoreszent wird. Die Anwendung des Kits erfolgte nach Herstellerangaben. Die Aktivität der Proben wurde auf die Menge an gebildetem Resorufin pro mg Protein pro Minute berechnet.

Assay-Medium:

Kulturmedium (serumfrei)

7-Ethoxyresorufin 2,5µM

Dicumarol 10µM

2.5.2 Messung der Glucuronosyltransferase (UGT) Aktivität in Caco2 Zellen

Die in dieser Arbeit verwendete Methode misst die Aktivität aller exprimierter Isoenzyme und basiert auf den von Sörgel *et al.* beschriebenen Experimenten [171]. Der Vorteil dieser Methode ist, dass sie an lebenden Zellen durchgeführt wird. Bei der Bestimmung wird die Abnahme des Farbstoff 4-Methylumbeliferon (4-MUF) gemessen, der nach der Konjugation seine chromophoren Eigenschaften verliert.

Die Belastung der Zellen mit den entsprechenden Substanzen erfolgte für 24h. Für die Aktivitätsmessung wurde das Inkubationsmedium entfernt und die Zellen mit PBS gewaschen. Anschließend wurde zu jeder Probe 250µl Versuchsmedium mit 100µM 4-MUF gegeben und für 1h unter Standardbedingungen inkubiert. Nach Beendigung der Inkubation wurden jeder Probe 10µl Medium entnommen und mit 190µl 10mM NaOH in 96-Kammer Mikrotiterplatten appliziert. Die Fluoreszenzmessung erfolgte bei 37°C sowie 390nm Anregung, 420nm Emission. Für die Auswertung wurde zusätzlich eine Kalibrierreihe von 100pmol bis 10000pmol 4-MUF gemessen. Der Umsatz des 4-MUF wurde mittels Referenz und Kalibrierreihe bestimmt. Die Aktivitäten wurden auf die Menge an umgewandeltem 4-MUF pro mg Protein

und Minute berechnet. Die Bestimmung des Proteingehalts erfolgte durch Verwendung des CBQCA Kit.

2.5.3 Messung der Sulfotransferase (SULT) Aktivität in Caco2 Zellen

Die Methode zur Messung der SULT Aktivität wurde modifiziert nach Beckmann *et al.* [172]. Bei diesem Versuch wird die Aktivität aller in der Zelle exprimierter Isoenzyme gemessen. Die für diesen Versuch relevanten Sulfotransferasen sind im Zytosol lokalisiert. Als Substrat diente Resorufin, das nach der Konjugation mit Sulfat seine fluoreszierenden Eigenschaften verliert. Die Aktivität der Sulfotransferasen ist somit umgekehrt proportional zur Fluoreszenz des Resorufin. Der Versuch wurde mit zytosolischen Überständen durchgeführt, ist also abhängig von der Zugabe von Kofaktoren, in diesem Falle dem Donor der Sulfatgruppe, 3-Phosphoadenosin-5-Phosphosulfat (PAPS).

Die Zellen wurden für 24h mit den entsprechenden Substanzen belastet. Vor der Ernte der zytosolischen Proteine erfolgte ein Waschschrift mit PBS. Die Zellen wurden daraufhin in 500µl Natrium-Phosphat Puffer aufgenommen und anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren um die Zellmembran aufzuschließen. Die Aufreinigung des Zellüberstandes erfolgte durch Zentrifugation bei 14000rpm für 20min. Der Proteingehalt des Überstandes wurde mit dem CBQCA Kit bestimmt. Für den Versuch wurden 50µg zytosolischen Proteins pro Probe verwendet. Unmittelbar vor Beginn des Versuchs wurde frischer SULT Puffer angesetzt. Der Versuch erfolgte in 96-Kammer Mikrotiterplatten. Das zytosolische Protein wurde mit SULT Puffer auf ein Endvolumen von 150µl eingestellt. Für die Messung wurde eine Kinetik über 20min bei 544nm Anregung und 590nm Emission aufgenommen. Zusätzlich wurde eine Resorufin Kalibrierreihe von 5pmol bis 200pmol erstellt. Die Bestimmung der Aktivität erfolgte anhand des Umsatzes von Resorufin pro mg Protein und Minute.

Puffer:

Na-Phosphatpuffer pH6,4:

A: diNatriumhydrogenphosphat	25mM
B: Natriumdihydrogenphosphat	25mM

Zur Erstellung des Na-Phosphatpuffers wurden Lösung A und B hergestellt. Der pH Wert von Lösung B wurde durch Titration mit Lösung A auf pH6,4 eingestellt.

SULT-Puffer:

Na-Phosphatpuffer pH6,4

PAPS 100mM

Resorufin 10 μ M

2.6 Einfluss von Flavonoiden auf den Export von B(a)P-Metaboliten in Caco2 Zellen

2.6.1 Kultivierung von Zellen in Transwell Inserts

Durch Hilfe von Transwell inserts ist es möglich einen Zellmonolayer so zu kultivieren, das er für Transportstudien verwendet werden kann. Der Vorteil der Caco2 Zellen ist, dass sie im konfluenten Monolayer ausdifferenzieren und eine apikal-basolaterale Orientierung entwickeln. Dabei generieren sie an der apikalen Membran Microvilli zur Vergrößerung der Oberfläche, genauso wie die Enterozyten des Darms *in vivo*. Für die Polarisierung der Zelle ist unter anderem die differenzierte Lokalisation von ABC-Transportern verantwortlich, deren Expressionsort innerhalb der Zelle auf die apikale oder basolaterale Membran begrenzt ist [173]. Die obere Kammer des Inserts repräsentiert in diesem Falle das Darmlumen. Somit kann die Aktivität von apikal oder basolateral orientierten ABC-Transportern gemessen werden. Dafür wird die Menge von Transportierten Substraten in der jeweiligen Kammer bestimmt.

Die Zellen wurden in Transwell-Kammern eingesät und zur Differenzierung entsprechend kultiviert. In die obere Kammer wurden 2ml Kulturmedium gegeben, in die untere Kammer 3ml Medium. Ein Wechsel des Mediums erfolgte alle 2 Tage. Die Integrität des Monolayer wurde durch Messung des transepithelialen Widerstandes (TEER) mit einem Volt-Ohm-Meter (WPI, Sarasota, USA) gemessen, nach der Methode von Ebert [168]. Die Monolayer mussten einen Netto-Widerstand von $> 300\Omega$ haben bevor Sie für den Versuch verwendet werden konnten. Eine weitere Methode erfordert die Beobachtung des Mediumspiegels in den beiden Kammern. Da vitale Caco2 Zellen in einem Monolayer Flüssigkeit über die basolaterale Membran transportieren, sinkt nach ca. 12h der Mediumspiegel in der oberen Kammer und steigt in der unteren Kammer. Dieser Vorgang kann nur durch aktiven Transport und einen intakten Monolayer stattfinden. Für die Messung des Transports wurden die Zellen mit den entsprechenden Substanzen belastet und das Medium nach Beendigung der Inkubation für die chemische Analyse gesammelt.

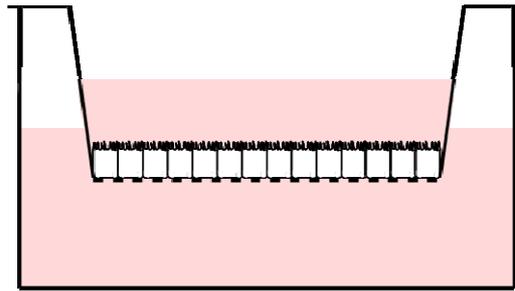


Abbildung 12

Transwell Insert: Die Zellen werden auf eine Polycarbonatmembran eingesät, die Stoffwechsel durch kleine Poren ($0,4\mu\text{M } \varnothing$) ermöglicht

2.6.2 High Performance Liquid Chromatographie

Die Quantifizierung der transportierten B(a)P Metabolite wurde durch High Performance Liquid Chromatography (HPLC) durchgeführt. Dabei handelt es sich um ein chromatisches Trennverfahren. Bei der in dieser Arbeit angewandten Methode werden lipophile Stoffe nach dem Grad ihrer Hydrophobie aufgetrennt. Das geschieht durch die Verwendung von zwei Phasen, einer flüssigen oder mobilen Phase und einer stationären Phase. Bei der mobilen Phase handelt es sich um ein Lösemittel, das als Trägermedium dient. In den meisten Fällen ist das eine Mischung aus Wasser und Puffer oder Acetonitril und Methanol. Bei der isokratischen Trennung bleibt die Zusammensetzung des Fließmittels über die gesamte Zeit gleich, bei der Gradiententrennung wird die Polarität während der Analyse verändert. So lassen sich auch Stoffe trennen, die ähnliche Löseverhalten zeigen. Die stationäre Phase ist in einer Säule enthalten und besteht aus einem polaren Kieselgel mit hydrophoben Kohlenstoffseitenketten. Dadurch kehrt sich die Polarität des Kieselgels um. Man spricht in diesem Fall auch von einer reverse phase HPLC. Die zu analysierenden Stoffe werden im Trägermedium gelöst und auf die stationäre Phase gegeben. Wenn ein Stoff gut mit der stationären Phase wechselwirkt, verbleibt er länger auf der Säule. Ist die Wechselwirkung hingegen schlecht, wird er schneller heruntergespült. Die Zeit, die ein Stoff auf der Säule verbringt, wird Retentionszeit genannt. Am Ende der Säule werden die jeweiligen Substanzen von einem geeigneten Detektor gemessen. Anhand der Stärke des Signals und der Verwendung von Standards lassen sich Stoffe quantifizieren. Da die HPLC unter Hochdruck (100-300 bar) stattfindet, ist sie etwa 100-mal effektiver als herkömmliche Chromatographieverfahren.

Materialien und Chemikalien für die HPLC

Für die Standardgenerierung wurden Benzo(a)Pyren-3-Sulfat (BP3S), Benzo(a)Pyren-3-Glykopyranosid (BP3G) und Benz(a)anthracene-*trans*-1,2-dihydrodiol (BA2O) von MRI (Kansas City, USA) verwendet. Die C18-Säulen für die Festphasenextraktion (SPE) wurden von Malinckrodt-Baker (Deventer, Niederlande) geliefert. Für die HPLC wurde eine Grom-Sil PAH, 5µm Säule von Grace Davison Discovery (Lokeren, Belgium) verwendet.

Extraktionsmethanol:

Methanol	99,5%
Triethylamin	0,5%

Konditionierungsmethanol:

Extraktionsmethanol	20%
Wasser	80%

2.6.3 Probenaufbereitung

Die genaue Quantifizierung der B(a)P-Metabolite erfolgte unter Anwendung der internen Standard Methode. Dabei wird jeder Probe ein bekannter Stoff in bestimmter Konzentration hinzugegeben, der ähnliche chemische Eigenschaften besitzt wie die zu analysierenden Substanzen. Der Vorzug dieser Methode beruht darauf, dass Verluste, die bei der Aufbereitung der Proben auftreten, durch den internen Standard angezeigt und automatisch herausgerechnet werden. Als interner Standard wurde in dieser Arbeit Benz(a)anthracene-*trans*-1,2-dihydrodiol (B(a)A-diOH) verwendet. Jede Probe wurde mit einer Endkonzentration von 3µM versetzt und dann für die Festphasenextraktion verwendet.

Bei der Festphasenextraktion werden die Stoffe aus dem Inkubationsmedium aufgereinigt. Dieser Schritt dient dazu, die HPLC-Säule vor Verunreinigungen durch Mediumbestandteile zu schützen. Vor der Festphasenextraktion wurde jede SPE-Säule zweimal mit je einem Säulenvolumen (SV) Methanol gewaschen. Die Konditionierung der Säule erfolgte mit einem SV Konditionierungsmethanol. Bei diesem Schritt werden die Seitenketten des Säulenmaterials aufgerichtet und können dann mit lipophilen Stoffen wechselwirken. Dieser Schritt ist essentiell, da sonst die zu analysierenden Stoffe beim Waschen eluieren. Anschließend wurden die Proben auf die Säule gegeben und mit zwei SV Konditionierungsmethanol gewaschen. Die Elution der Proben erfolgte durch Zugabe von 1,8ml Extraktionsmethanol. Anschließend

wurden die Proben durch Vakuumzentrifugation eingeengt. Die Reste wurden in 1ml 50% Methanol gelöst und für die HPLC verwendet.

Für die HPLC (HP1090, Agilent Technologies, Böblingen) wurden von jeder Probe 1:100 Verdünnungen angesetzt. 25µl jeder Verdünnung wurden auf die Säule gegeben und unter isokratischen Bedingungen bei Methanol/Wasser (50/50), 0,6ml Fluß, für 7min getrennt. Im Anschluß erfolgte ein Waschritt bei Methanol/Wasser (100/0), 0,6ml Fluß, für 10min. Die Detektion wurde mit einem HP Fluoreszenz Detektor bei 290nm Anregung, 420nm Emission (Agilent Technologies, Böblingen) durchgeführt.

2.6.4 Intrazelluläre Akkumulation von B(a)P-Metaboliten

Bei diesem Versuch wurde der intrazelluläre Gehalt von Tritium-markierten B(a)P in Caco2 Zellen gemessen. Die Belastung der Zellen erfolgte mit den entsprechenden Substanzen für 8h. Von dem in diesem Versuch verwendeten B(a)P, war ein Anteil von 3% radioaktiv markiert. Als Isotop wurde ^3H -B(a)P mit einer spezifischen Aktivität von 2,85TBq/mmol verwendet (Amersham). Nach der Inkubation wurde das Medium entfernt und die Zellen dreimal mit 15µM B(a)P in Kulturmedium gewaschen. Bei diesem Schritt wird radioaktiv markiertes B(a)P, das an den Kammerwänden oder auf der Zelloberfläche sitzt, verdrängt. Anschließend wurden die Zellen noch zweimal mit kaltem PBS gewaschen. Alle Waschschrte erfolgten auf Eis. Für die Lyse wurden die Zellen für 5min mit 500µl 1x RIPA-Puffer bei Raumtemperatur inkubiert. Das Zytosol wurde durch Zentrifugation (13.000rpm, 10min) aufgereinigt. 250µl jeder Probe wurden mit 3ml Szintillationscocktail versetzt und in einem Beckmann Coulter 6000-IC (Fullerton, USA) gemessen. Die gemessene Aktivität in cpm (counts per minute) wurde umgerechnet und in pmol/cm² aufgetragen.

2x RIPA-Puffer:

HEPES pH7,5	100mM
NaCl	300mM
EDTA	10mM
Nonidet P40	2%
Desoxycholol	2%
SDS	0,2%
Natriumazid	0,05%

2.6.5 Statistik

Die gezeigten Mittelwerte \pm Standardabweichung stammen aus mindestens drei Einzelergebnissen. Die statistische Signifikanz wurde mittels ungepaartem *Student's t-Test* (Excel, Microsoft) überprüft. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von unter 5% ($p \leq 0,05$) wurde als signifikant gewertet.

3 Ergebnisse

3.1 Einfluss von Flavonoiden auf die Zellviabilität

Da in dieser Arbeit mit Flavonoiden in relativ hohen Konzentrationen gearbeitet wurde, war es notwendig, zu Beginn die Zytotoxizität dieser Substanzen zu untersuchen. Die Viabilität der verwendeten Kolonkarzinomzelllinie Caco2 wurde mit Hilfe des Laktatdehydrogenase (LDH) Assays bestimmt. Dieser Test beruht auf der Detektion des zytosolischen Enzyms LDH im Zellkulturüberstand, das nur aus beschädigten Zellen freigesetzt wird. Die Enzymaktivität wurde nach 24-stündiger Belastung der Zellen mit den Flavonoiden in Konzentrationen von 25µM und 50µM bestimmt (Abbildung 13). Als Positivkontrolle für die maximal mögliche LDH-Aktivität (100%) dienten Zellen, die mit Lysepuffer behandelt wurden. Die basale Aktivität der unbehandelten Kontrolle liegt bei 20% der maximalen Aktivität. Im Vergleich zu dieser Kontrolle zeigen die Flavonoide keine signifikanten Aktivitätsunterschiede. Daraus kann geschlossen werden, dass die Flavonoide in den getesteten Konzentrationen keinen negativen Einfluss auf die Zellviabilität haben.

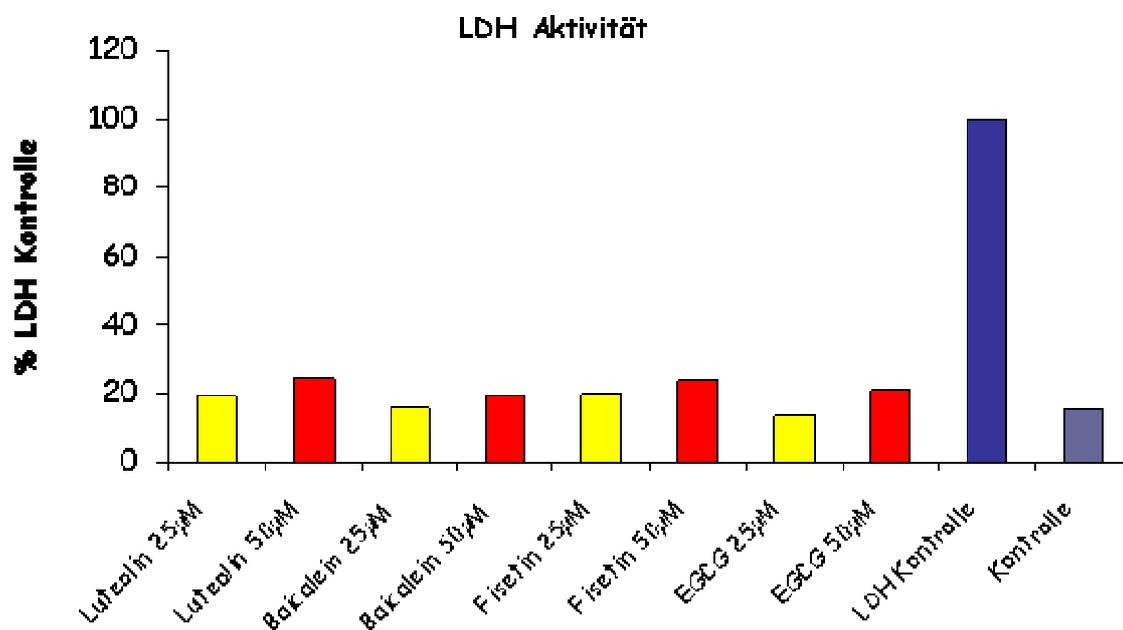


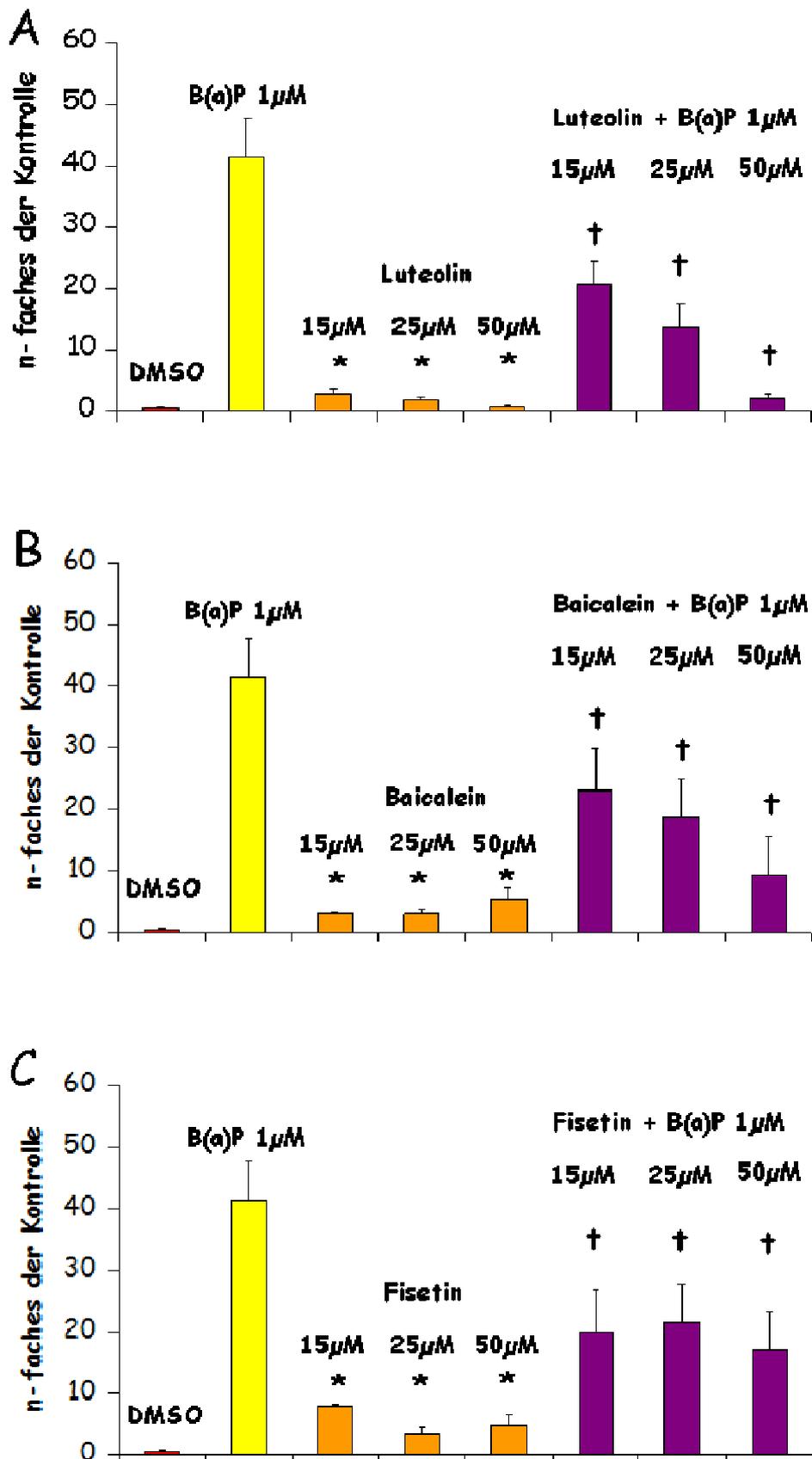
Abbildung 13 Untersuchungen zur Zytotoxizität von Flavonoiden in Caco2 Zellen: Die Zellen wurden für 24h mit den Flavonoiden belastet. Im Anschluss an die Inkubation wurde die LDH-Aktivität im Medium gemessen. Als Positivkontrolle wurde eine unbehandelte Probe lysiert, um den kompletten Austritt der LDH ins Medium zu ermöglichen (LDH Kontrolle). Die Aktivität der anderen Proben ist in Prozent der maximalen Aktivität angezeigt.

3.2 Effekte von Flavonoiden auf die Transkription und Aktivität von Enzymen der Phase 1

3.2.1 Einfluss von Flavonoiden auf die CYP1A1 mRNA Transkription

In diesem Versuchsteil wurde der Einfluss von Flavonoiden auf die transkriptionelle Aktivität des AhR in Darmzellen untersucht. Als repräsentative Flavonoide wurden Luteolin, Fisetin, Baicalein und Epigallocatechingallat verwendet, weil von ihnen bekannt ist, dass sie als AhR Antagonisten wirken können. Als Nachweis für die AhR Aktivität wurde die Expression des CYP1A1 Gens untersucht. Um mögliche agonistische Effekte zu identifizieren, wurden die Zellen mit 15µM, 25µM und 50µM der jeweiligen Flavonoide für 24h belastet, als Positivkontrolle diente 1µM B(a)P. Eine Kobelastung mit B(a)P und den Flavonoiden in den eben genannten Konzentrationen diente dazu, die potentielle antagonistische Wirkung dieser Substanzen aufzudecken. Die Ergebnisse der CYP1A1 mRNA Expressionsanalyse sind in Abbildung 14 dargestellt. Eine Belastung mit 1µM B(a)P über 24h führt zu einer 41,3±6,35-fachen Induktion der CYP1A1 mRNA Synthese. Mit Ausnahme von EGCG wirken alle Flavonoide schwach agonistisch auf die CYP1A1 Expression, die etwa 3- bis 8-fach erhöht wird. Bei einer Kobelastung wird die Induktion der CYP1A1 mRNA-Expression durch B(a)P inhibiert. Die Stärke des Effekts fällt unterschiedlich stark aus.

Luteolin hat den größten Effekt auf die B(a)P induzierte CYP1A1 mRNA-Expression. Die Inhibierung erfolgt dosisabhängig, durch 15µM wird die Induktion um 50% im Vergleich zur Positivkontrolle verringert (20,7±3,73-fache Induktion). Durch Erhöhung der Konzentration des Flavonoids wird die Induktion stärker gehemmt, in der höchsten Konzentration bis auf das 2,38±0,42-fache der Kontrolle, was einer Inhibierung von 95% entspricht. Die Wirkung von Baicalein ist ähnlich, 15µM Baicalein inhibieren die B(a)P induzierte CYP1A1 Expression signifikant um 45% auf das 23,4±9-fache der Kontrolle. Die Konzentrationserhöhung von Baicalein führt zu einer weiteren Reduktion der CYP1A1 mRNA-Expression, die bei 50µM nur noch das 9,3±0,24-fache der Kontrolle erreicht. Dies entspricht einer Inhibierung von 77,5%. Aufgrund der Streuung konnte kein dosisabhängiger Effekt von Fisetin nachgewiesen werden. Die Inhibierung der Induktion liegt hierbei dosisunabhängig bei 50%.



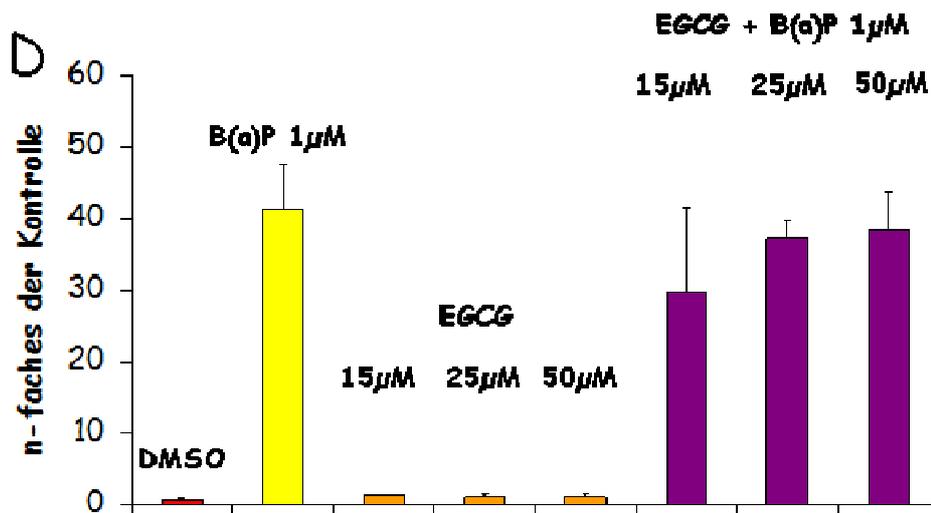


Abbildung 14 A-D CYP1A1 mRNA Expression in Caco2 Zellen: Die Zellen wurden für 24h mit den Flavonoiden und B(a)P einzeln und in Kombination belastet. Vor der Kobelastung wurden die Zellen 1h mit Flavonoiden vorbelastet. Die Expression der mRNA wurde auf 500000 Moleküle β -Aktin normiert und als n-faches der unbelasteten Kontrolle aufgetragen. *, signifikanter Unterschied zur unbelasteten Kontrolle ($p \leq 0,05$); †, signifikanter Unterschied zu B(a)P ($p \leq 0,05$).

3.2.2 EROD Aktivität in Caco2 Zellen

Im EROD-Assay wird das Substrat 7-Ethoxyresorufin durch die Enzyme CYP1A1, CYP1A2 und CYP1B1 zu Resorufin, einem fluoreszierenden Farbstoff, umgewandelt. Um die Kapazität der Zellen für diese Methode zu charakterisieren, wurden die AhR Agonisten B(a)P und 3MC in Konzentrationen zwischen 0,05 und 10µM (Abbildung 15A) eingesetzt. Zur Berechnung der Aktivität wurde die Menge des gebildeten Resorufins pro mg Protein und Minute nach 24h gemessen. Die basale Aktivität der Lösemittelkontrolle beträgt $6 \pm 0,32$ pmol/mg Protein*min. Die Aktivität nach Belastung mit 3MC nimmt einen biphasischen Verlauf. Bei der niedrigsten Konzentration von 0,05µM 3MC beträgt die Aktivität von $53,8 \pm 3,23$ pmol/mg Protein*min. Durch Erhöhung der Konzentration von 3MC steigt die Aktivität weiter an und erreicht ein Maximum bei 0,3µM 3MC mit $130 \pm 5,69$ pmol/mg*min. Eine weitere Erhöhung der 3MC-Konzentration führt zu einer Abnahme der Aktivität. Zum Beispiel beträgt die Aktivität bei einer 3MC Konzentration von 1µM $79,6 \pm 8,37$ pmol/mg Protein*min, was 43% unter dem Maximum liegt. Die Aktivität sinkt im Verlauf weiter ab und beträgt bei 10µM 3MC nur noch $16,9 \pm 1,19$ pmol/mg Protein*min. Exemplarisch wird in Abbildung 15B die Kinetik der

0,3 μ M Probe gezeigt. Nach einer Minute werden $0,35\pm 0,02$ pmol Resorufin detektiert, die Akkumulation nimmt mit der Zeit linear zu auf $1,52\pm 0,06$ pmol nach 10 Minuten.

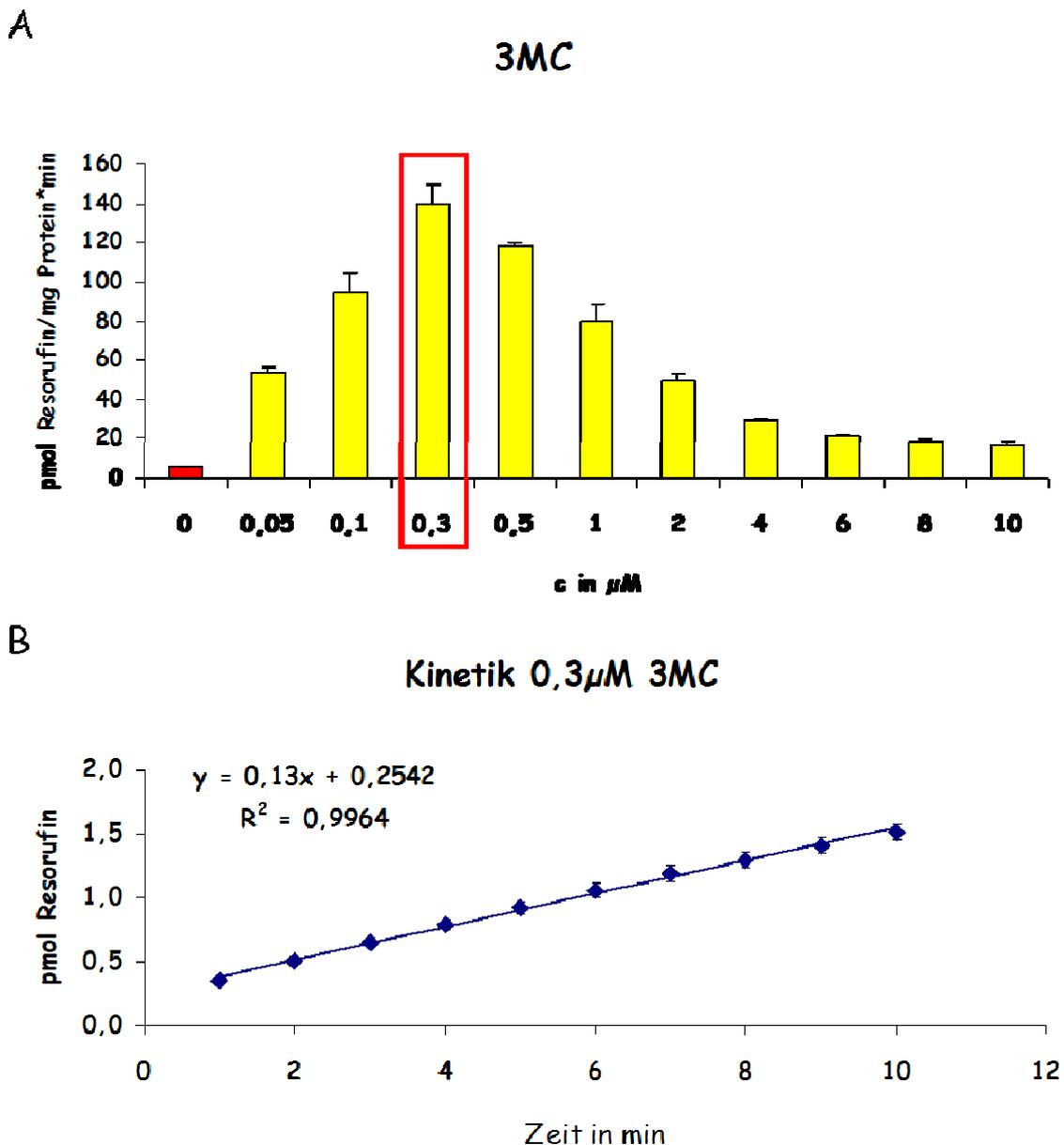


Abbildung 15 Dosisabhängige EROD Aktivität nach 3MC-Belastung: Caco2 Zellen wurden für 24h mit den indizierten Konzentrationen von 3MC belastet. Nach der Belastung wurde von jeder Probe eine Kinetik aufgenommen und die Fluoreszenz des gebildeten Resorufins gemessen. Repräsentativ wurde von der Konzentration, bei der 3MC die höchste Aktivität induzierte (roter Kasten), die Kinetik dargestellt (B). Über die Steigung der Kinetik wurde die Aktivität der Proben in pmol Resorufin/mg Protein*min bestimmt (A).

Nach Belastung der Zellen mit B(a)P zeigt die Aktivität ebenfalls einen biphasischen Verlauf (Abbildung 16). 0,3 μ M B(a)P induziert eine Aktivität von $32,2\pm 0,72$ pmol/mg Protein*min.

Bei Erhöhung der B(a)P-Konzentration steigt die Aktivität weiter an und erreicht ein Maximum bei 1 μM , mit einer Aktivität von $76 \pm 34,05 \text{ pmol/mg Protein} \cdot \text{min}$. Das durch B(a)P erzeugte Aktivitätsmaximum liegt 42% unter der von 3MC maximal erzeugten Aktivität. Bei 3 μM B(a)P sinkt die Aktivität um 37% auf $28,3 \pm 5,86 \text{ pmol/mg Protein} \cdot \text{min}$. Durch die weitere Erhöhung der B(a)P-Konzentration sinkt die Aktivität auf $20,1 \pm 10,07 \text{ pmol/mg Protein} \cdot \text{min}$ bei 6 μM B(a)P und $17,5 \pm 6,12 \text{ pmol/mg Protein} \cdot \text{min}$ bei 10 μM B(a)P.

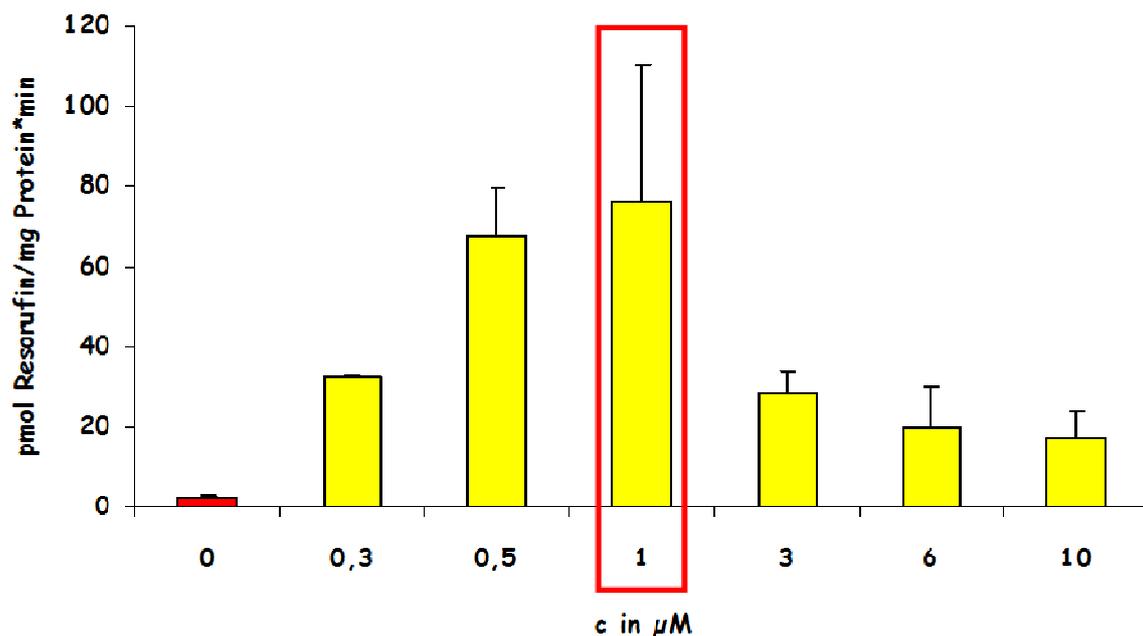
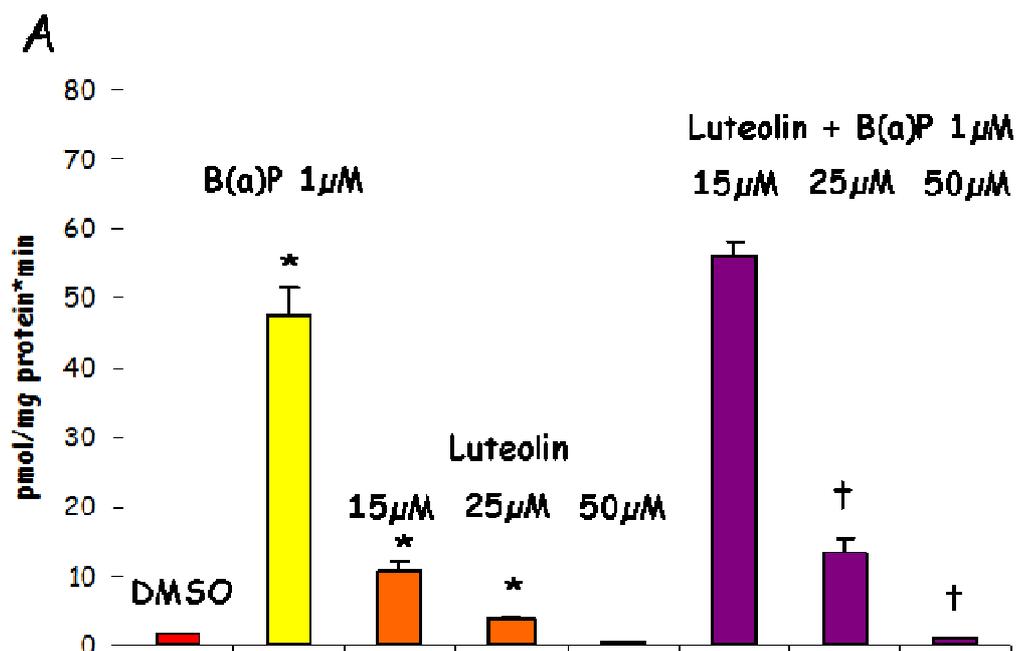


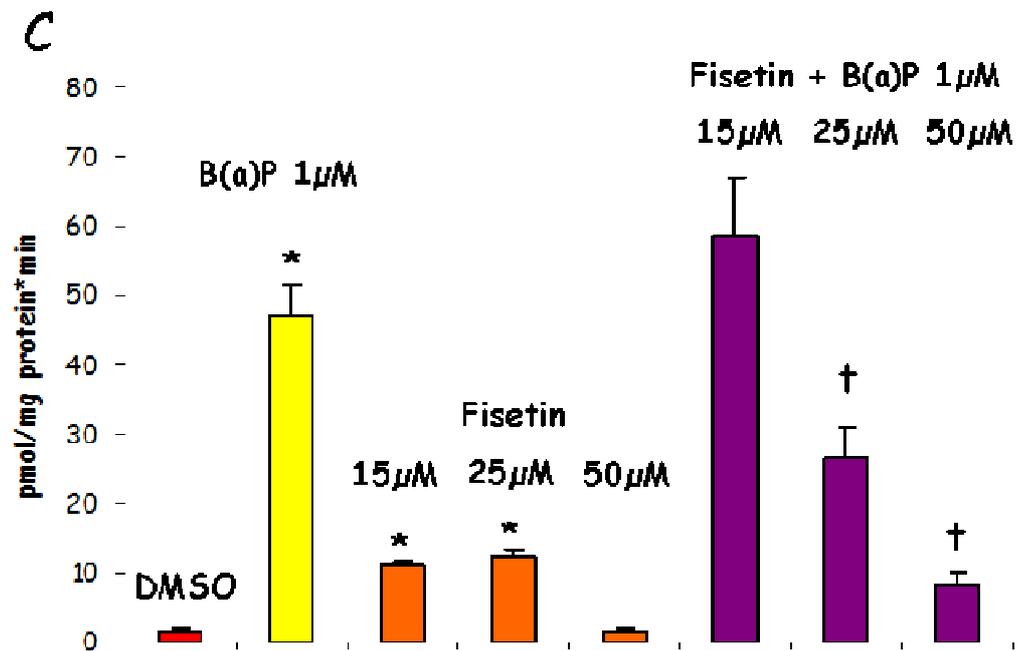
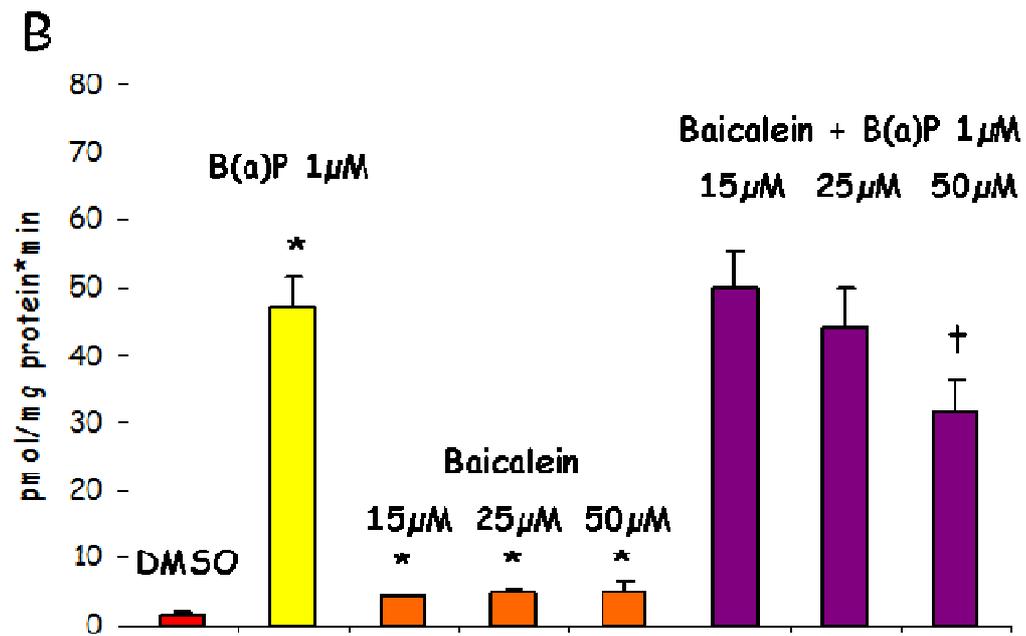
Abbildung 16 Dosisabhängige EROD Aktivität nach B(a)P-Belastung: Die Belastung der Zellen erfolgte mit B(a)P nach dem Schema aus Abbildung 15

Die Ergebnisse zeigen, dass Caco2 Zellen eine EROD-Aktivität besitzen, die durch 3MC und B(a)P induziert werden kann. Die Höhe der Konzentration ist in diesem Modell jedoch limitiert. Dies beruht darauf, dass bei hohen Konzentrationen die EROD Aktivität sinkt, weil die verwendeten Substanzen ebenfalls von Enzymen der Familie CYP1 verstoffwechselt werden und vermutlich Substratinhibierung durch Verdrängung des 7-Ethoxyresorufin hervorrufen. Da bekannt ist, dass B(a)P durch Sulfatasen und Glucuronidasen konjugiert wird und diese Eigenschaft für die Transportversuche essentiell ist, wurde entschieden, für die weiteren EROD-Versuche eine Konzentration von 1 μM B(a)P zu verwenden.

3.2.3 Einfluss von Flavonoiden auf die EROD Aktivität

Da bereits gezeigt werden konnte, dass Flavonoide die B(a)P induzierte Expression von CYP1A1 hemmen können, wurde als nächstes untersucht, ob dies auch für die Aktivität der Enzyme gilt. Dazu wurden Caco2 Zellen für 24h mit 1µM B(a)P, sowie 15µM, 25µM und 50µM der jeweiligen Flavonoide belastet. Zusätzlich erfolgte eine 24-stündige Kobelastung der Zellen mit B(a)P und Flavonoiden in den oben genannten Konzentrationen. Wie in Abbildung 17 zu sehen ist, wird durch eine 24-stündige Belastung mit 1µM B(a)P die EROD-Aktivität der Zellen auf $47,3 \pm 4,18 \text{ pmol/mg Protein} \cdot \text{min}$ erhöht. Das entspricht einer 28-fachen Induktion im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Mit Ausnahme von EGCG wirken alle Flavonoide schwach agonistisch und rufen eine EROD-Aktivität zwischen 2 und 12 pmol/mg Protein*min hervor. Bei Kobelastung wird die B(a)P induzierte Aktivität, mit Ausnahme von EGCG, durch alle Flavonoide signifikant gehemmt. Die Effekte fallen ähnlich den Expressionsdaten unterschiedlich stark aus. Luteolin hemmt die B(a)P induzierte Aktivität signifikant ab einer Konzentration von 25µM um 72% auf $13,26 \pm 2,04 \text{ pmol/mg Protein} \cdot \text{min}$ (Abbildung 17A). Durch Erhöhung der Konzentration auf 50µM verringert sich die Aktivität auf $0,9 \pm 0,07 \text{ pmol/mg Protein} \cdot \text{min}$, was unter dem Kontrollniveau liegt. Durch 50µM Baicalein wird eine signifikante Hemmung der B(a)P induzierten Aktivität auf $31,8 \pm 4,45 \text{ pmol/mg Protein} \cdot \text{min}$ hervorgerufen (Abbildung 17B). Fisetin hemmt die Aktivität signifikant in Konzentrationen von 25µM auf $26,6 \pm 4,61 \text{ pmol/mg Protein} \cdot \text{min}$ und 50µM auf $8,41 \pm 1,45 \text{ pmol/mg Protein} \cdot \text{min}$ (Abbildung 17C).





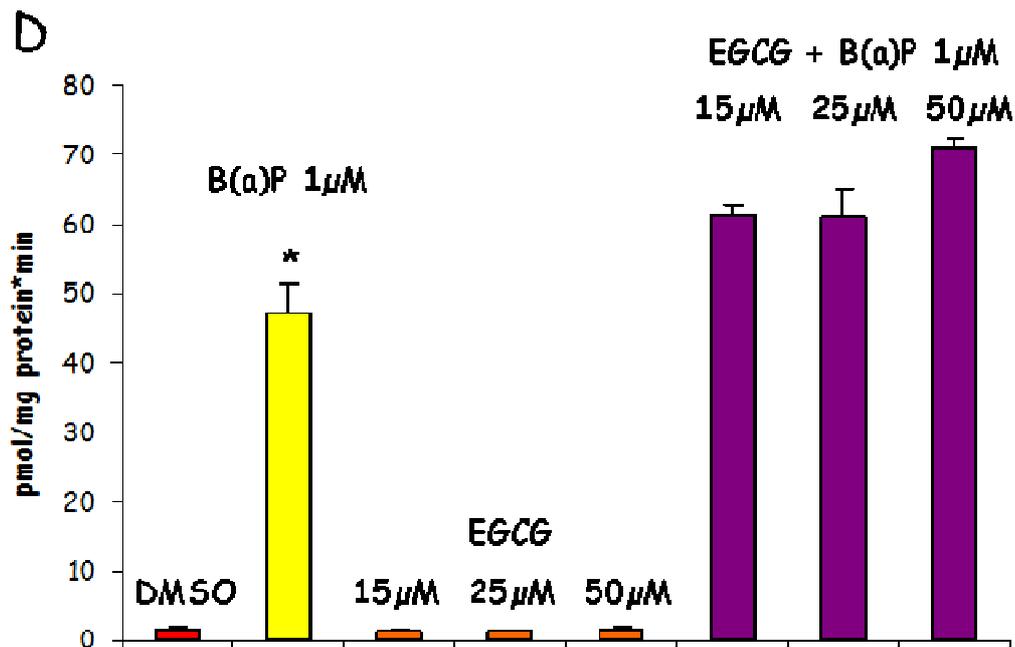


Abbildung 17 A-D Einfluss von Flavonoiden auf die EROD Aktivität: Caco2 Zellen wurden für 24h mit B(a)P und den Flavonoiden in den indizierten Konzentrationen belastet. Für die Messung der EROD Aktivität wurde der Umsatz von 7-Ethoxyresorufin in jeder Probe durch Aufnahme einer Kinetik gemessen. Über die Steigung der Kinetik wurde die Aktivität jeder Probe in pmol Resorufin pro mg Protein und Minute bestimmt. *, signifikanter Unterschied zur unbelasteten Kontrolle ($p \leq 0,05$); †, signifikanter Unterschied zu B(a)P ($p \leq 0,05$).

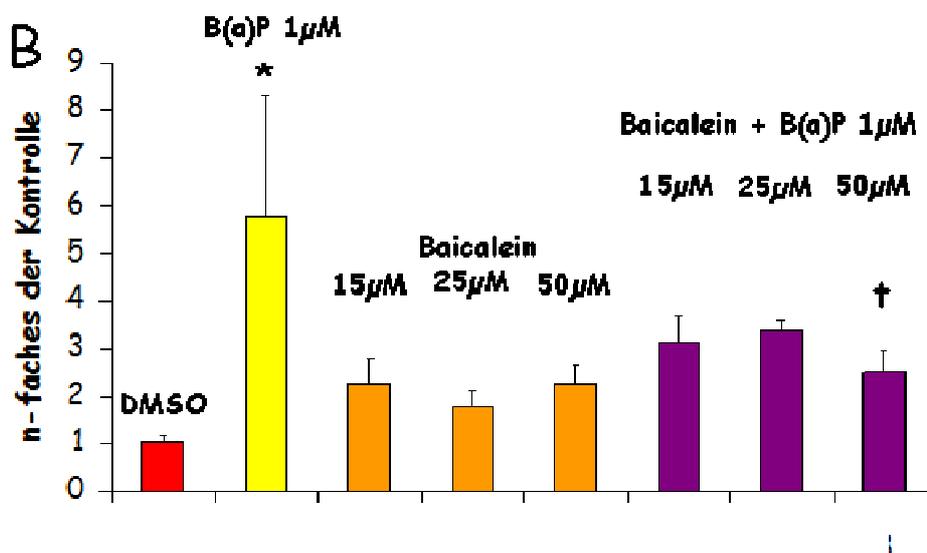
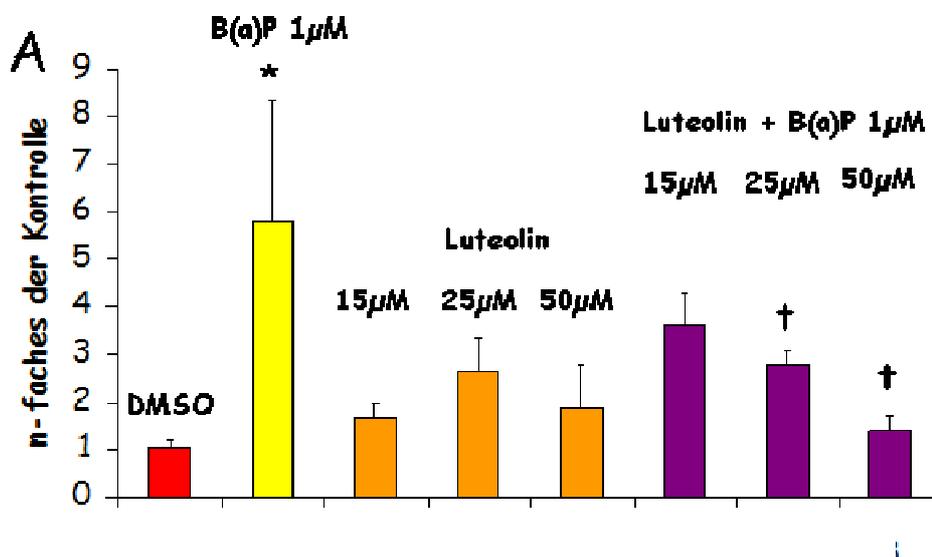
Sowohl bei der Transkriptionsanalyse, als auch bei der Aktivitätsbestimmung konnte gezeigt werden, dass Luteolin, Baicalein und Fisetin durch Interaktion mit dem AhR die CYP1A1 Transkription aktivieren können. Der AhR scheint vermutlich eine höhere Affinität für Flavonoide zu besitzen, weshalb sie in Kombination mit B(a)P als Antagonisten wirken. Man kann die verwendeten Flavonoide also als Partialagonisten bezeichnen.

3.3 Effekte von Flavonoiden auf Transkription und Aktivität von Enzymen der Phase 2

3.3.1 Einfluss von Flavonoiden auf die mRNA Expression von UGTs und SULTs

Im Zusammenhang mit den Versuchen zum Einfluss von Flavonoiden auf die mRNA Expression des CYP1A1 Gens wurde untersucht ob die Transkription der Phase 2 Glucuronidasen 1A1 und 1A6, sowie der Sulfotransferase 1A1 ebenfalls einen Effekt zeigt, da der AhR auch an der Regulation dieser Gene beteiligt ist [151;152]. Bei den mRNA-Analysen wurde jedoch nur ein Effekt von B(a)P auf die Transkription der UGT1A1 beobachtet (Abbildung 18), die

Expression der UGT1A6 (Abbildung 19) und SULT1A1 (Abbildung 20) zeigte keine Veränderungen. Durch 1µM B(a)P kommt es zu einer signifikanten 5,8±2,53-fachen Induktion der UGT1A1 mRNA Expression. Die alleinige Belastung mit Flavonoiden führt zu keiner Veränderung der Transkription, jedoch können Luteolin und Baicalein die B(a)P induzierte UGT1A1 Expression hemmen. In einer Konzentration von 25µM hemmt Luteolin die UGT1A1 Expression um etwa 50% auf das 2,8±0,27-fache der unbehandelten Kontrolle. Durch 50µM Luteolin ist die Expression 1,4±0,33-fach, dies entspricht Kontrollniveau. Baicalein hemmt die B(a)P induzierte UGT1A1 Expression bei einer Konzentration von 50µM um 57% auf das 2,5±0,47-fache der Kontrolle.



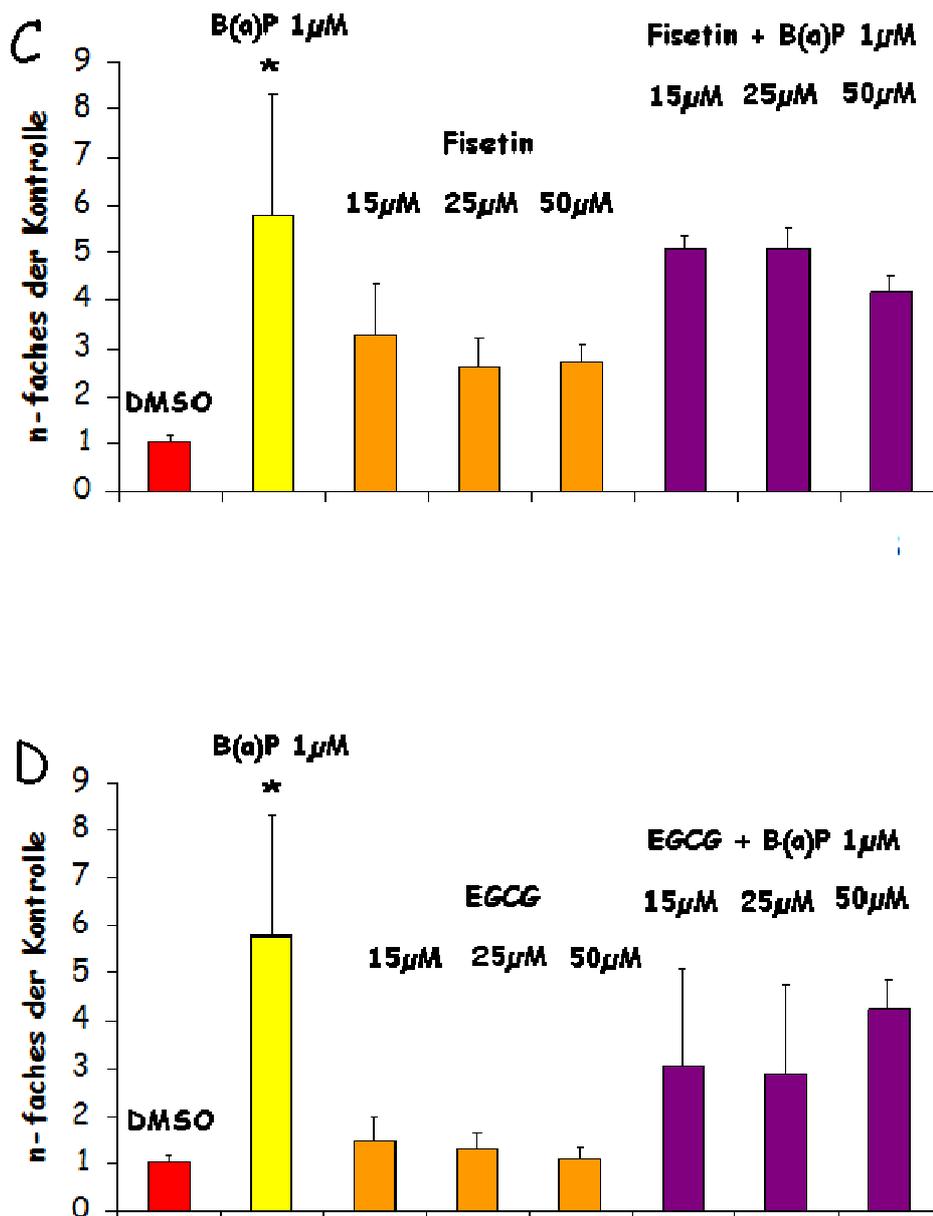


Abbildung 18 A-D *UGT1A1* Expression in *Caco2* Zellen: Die Belastung erfolgte nach dem Schema aus Abbildung 14

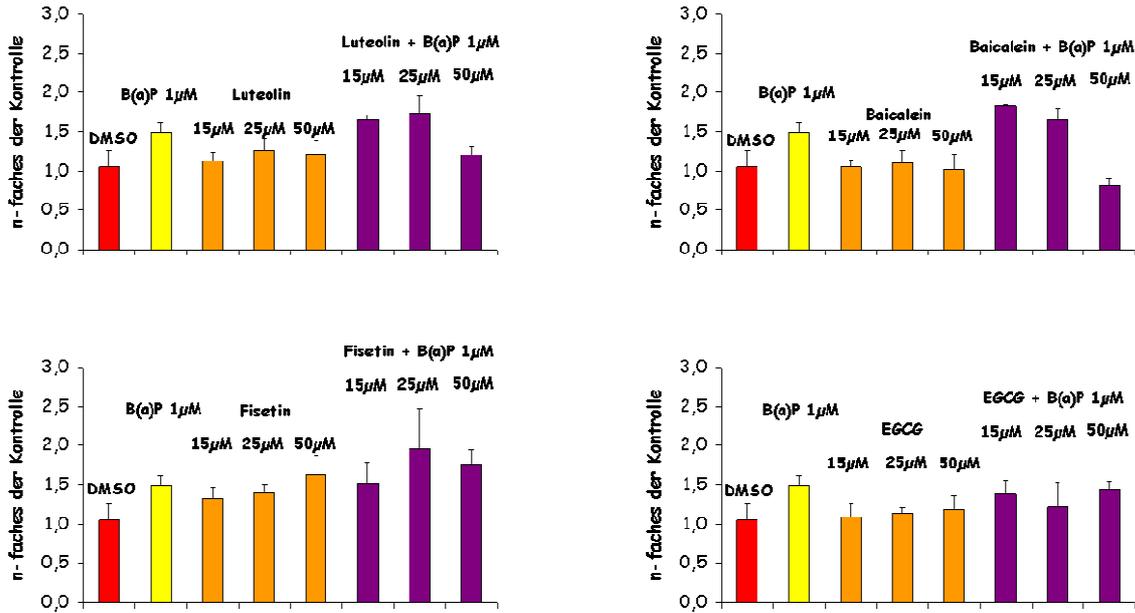


Abbildung 19 UGT1A6 Expression in Caco2 Zellen: Die Belastung erfolgte nach dem Schema aus Abbildung 14

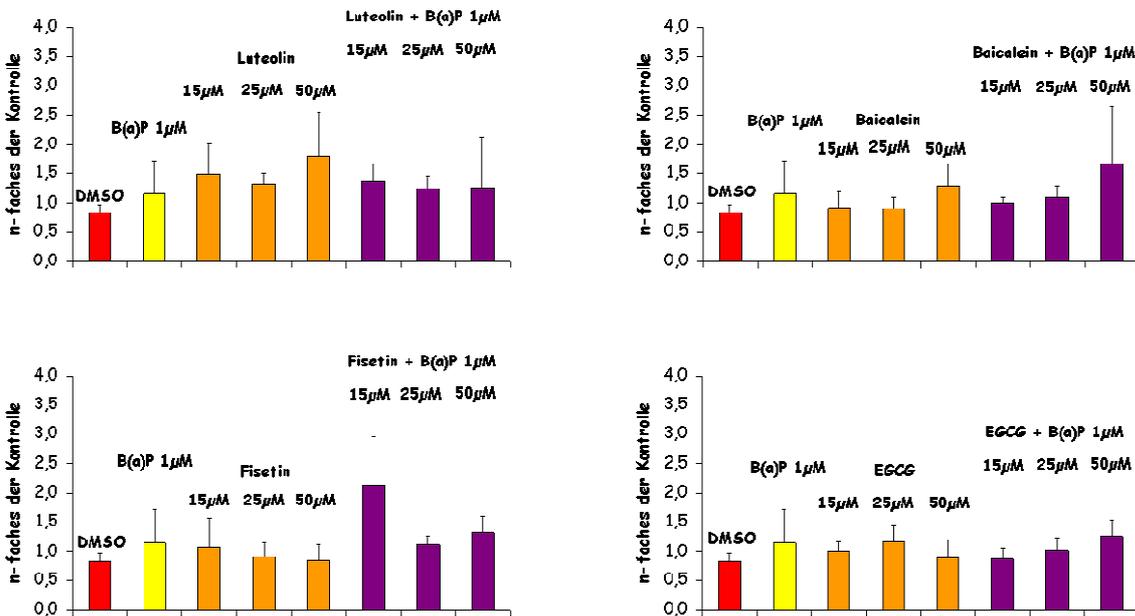


Abbildung 20 SULT1A1 Expression in Caco2 Zellen: Die Belastung erfolgte nach dem Schema aus Abbildung 14

3.3.2 Einfluss von Flavonoiden auf die Aktivität von UGTs und SULTs

In den bisherigen Versuchen konnte gezeigt werden, dass die AhR regulierte mRNA-Induktion von Isoenzymen der UGTs in unserem Zellsystem durch Flavonoide inhibiert werden kann. Für den Export von lipophilen Fremdstoffen ist eine Konjugation essentiell. Daher sollte untersucht werden, ob die Enzymaktivität ebenfalls durch Flavonoide moduliert wird. Die UGT Aktivität der Zellen wurde durch den Umsatz von fluoreszierendem 4-Methylumbelliferon (4-MUF) zu nicht fluoreszierendem Methylumbelliferon (MUF) bestimmt. Die Bestimmung der Aktivität erfolgt daher durch die Messung der Abnahme der Fluoreszenz. Das 4-MUF dient als allgemeines Substrat für UGTs, weshalb in diesem Versuch die Aktivität aller in der Zelle exprimierter Isoenzyme gemessen wird. Durch Standardkurven wurde der Umsatz an 4-MUF bestimmt und somit die Aktivität errechnet.

In Tabelle 5 sind die Ergebnisse der UGT-Aktivitäten in Caco2 Zellen gezeigt. Die Aktivität der Lösemittelkontrolle beträgt $8,16 \pm 2,88 \text{ pmol/mg Protein} \cdot \text{min}$. Durch die Belastung mit $1 \mu\text{M}$ B(a)P kommt es zu keiner signifikanten Veränderung der Aktivität, eine Behandlung mit $50 \mu\text{M}$ Flavonoid führt zum gleichen Resultat.

Eine Beteiligung des AhR an der Regulation der *SULT1A1* mRNA Expression konnte ausgeschlossen werden. Es wurde dennoch untersucht, ob die Aktivität der Sulfotransferasen beeinflusst wird. In diesem Fall wurde nur das effektivste Flavonoid Luteolin für die Versuche verwendet. Die Aktivitätsmessungen wurden mit zytosolischem Protein durchgeführt. Als Substrat wurde Resorufin verwendet, das nach der Konjugation nicht mehr fluoresziert. Die Aktivität ist somit umgekehrt proportional zur Abnahme der Fluoreszenz. Um die Aktivität der Enzyme zu gewährleisten, musste der Kofaktor PAPS zu der Reaktion hinzugegeben werden. Für den Versuch wurden Caco2 Zellen mit $1 \mu\text{M}$ B(a)P und $50 \mu\text{M}$ Luteolin für 24h belastet. Im Anschluss an die Inkubation wurden die Zellen lysiert und die zytosolische Fraktion für die Enzymmessung entnommen. Der Umsatz des Resorufins wurde durch Standardgeraden errechnet.

Die Ergebnisse der SULT-Messung zeigen (Tabelle 5), dass die Aktivität weder durch B(a)P, noch durch Luteolin beeinflusst wird. Die Aktivität der Lösemittelkontrolle beträgt $4 \text{ pmol/mg Protein} \cdot \text{min}$, die Aktivitäten der behandelten Proben zeigen keine signifikanten Abweichungen.

Tabelle 5: Ergebnisse der Aktivitätsmessung der UGTs und der SULTs

	DMSO	B(a)P 1µM	Luteolin 50µM	Baicalein 50µM	Fisetin 50µM	EGCG 50µM
UGT Aktivität pmol/mg*min	8,16	5,67	10,99	7,20	8,07	9,17
Stabw	2,88	1,60	3,29	2,06	0,81	1,98
p < 0,05	-	-	-	-	-	-
SULT Aktivität pmol/mg*min	4,02	4,24	4,17	-	-	-
Stabw	0,57	0,49	0,69			
p < 0,05	-	-	-			

Die Ergebnisse der mRNA Analysen deuten darauf hin, dass der AhR an der transkriptionellen Regulation der UGT1A1 beteiligt ist. Die Induktion der UGT1A1 auf mRNA Ebene hatte jedoch keinen messbaren Effekt auf die UGT-Aktivität im gewählten Versuchsystem. Der AhR scheint demnach bei der Regulation der Phase 2 Enzyme eine untergeordnete Rolle zu spielen.

3.4 Einfluss des AhR auf die Phase 3 des Fremdstoffmetabolismus

3.4.1 BCRP-mRNA Expression in Caco2 Zellen unter Einfluss von AhR Agonisten

Eine wichtige Rolle bei der Eliminierung von metabolisierten Stoffen, wie beispielsweise AhR-Agonisten, spielt der ABC-Transporter Breast Cancer Resistance Protein (BCRP). Um die Rolle des AhR bei der Transkription dieses Transporters genauer zu verstehen, wurde zuerst die Regulation auf mRNA-Ebene untersucht. Eine mRNA-Induktion des BCRP durch AhR-Liganden wie B(a)P und TCDD konnte von Ebert *et al.* in Caco2-Zellen nachgewiesen werden [168]. Um diese Beobachtung zu bestätigen, wurden Versuche mit AhR-Agonisten in unserem Zellsystem durchgeführt. Dazu wurden Caco2 Zellen für 24 Stunden mit 3MC in drei verschiedenen Konzentrationen belastet und anschließend die BCRP mRNA-Expression untersucht. Des Weiteren wurde überprüft, ob eine Induktion durch den potenten AhR Antagonisten 3-Methoxy-4-Nitroflavon (MNF) inhibiert werden kann.

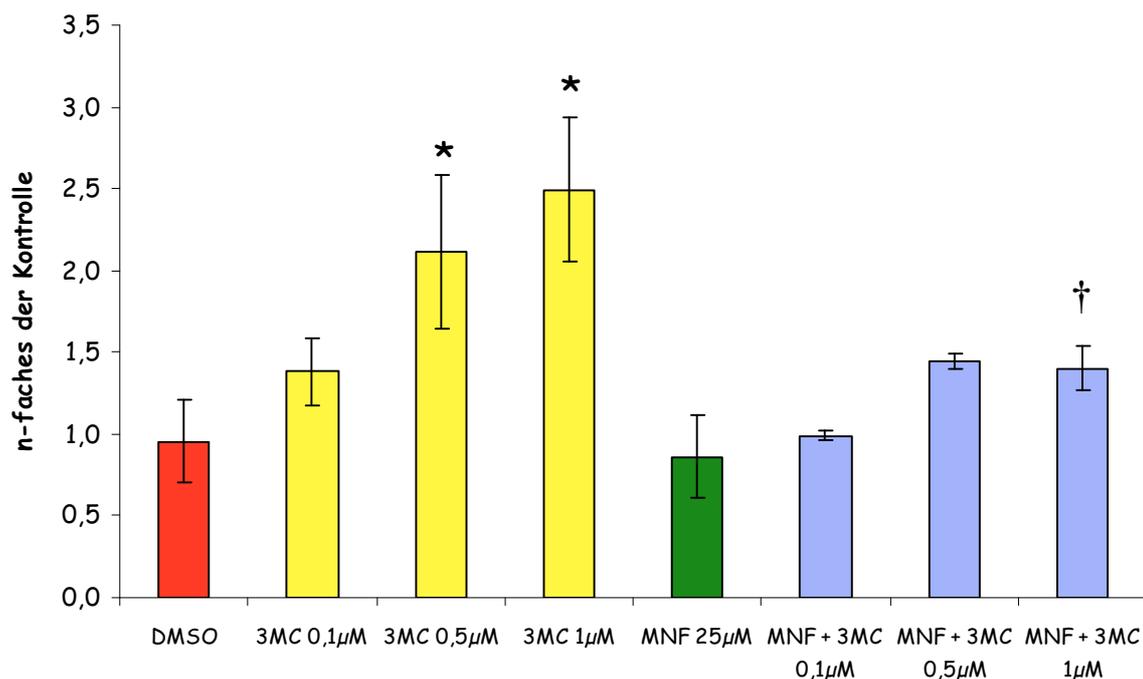


Abbildung 21 Untersuchung zur AhR regulierten BCRP mRNA-Expression: Caco2 Zellen wurden für 24h mit 0,1, 0,5 und 1µM 3MC belastet. Außerdem erfolgte eine Kobelastung mit 3MC und 25µM des AhR Antagonisten MNF. Die BCRP mRNA-Expression wurde auf 500000 Moleküle β -Aktin normiert und als n-faches der unbehandelten Kontrolle aufgetragen. *, signifikanter Unterschied zur Kontrolle ($p \leq 0,05$); †, signifikanter Unterschied zu 3MC ($p \leq 0,05$)

Die Ergebnisse in Abbildung 21 zeigen, dass die Induktion der BCRP mRNA dosisabhängig durch 3MC erfolgt. Nach Behandlung mit 0,5µM 3MC ist die Induktion signifikant 2,1±0,47-fach erhöht und erreicht bei 1µM das 2,5±0,44-fache des Kontrollwertes. Eine Kobelastung mit MNF verhindert die Induktion durch 1µM 3MC, die Expression ist 1,4±0,13-fach erhöht und liegt damit auf Kontrollniveau. Diese Daten deuten darauf hin, dass der AhR an der transkriptionellen Regulation des BCRP beteiligt ist.

3.4.2 mRNA Expression des BCRP in AhR defizienten Zellen

Um einen weiteren Beweis für die Beteiligung des AhR zu liefern, wurden Experimente an AhR defizienten HaCaT Keratinozyten durchgeführt. In dieser Zelllinie ist der AhR durch stabil transfizierte shRNA ausgeschaltet. Für die Untersuchung wurden die Zellen für 24h mit 1µM 3MC belastet. Als Kontrolle wurden auch non-silence shRNA (NS) und empty-vector (EV) transfizierte Zellen belastet. Als Kontrolle für die Aktivierbarkeit des AhR wurde die Expression des CYP1A1 Gens untersucht.

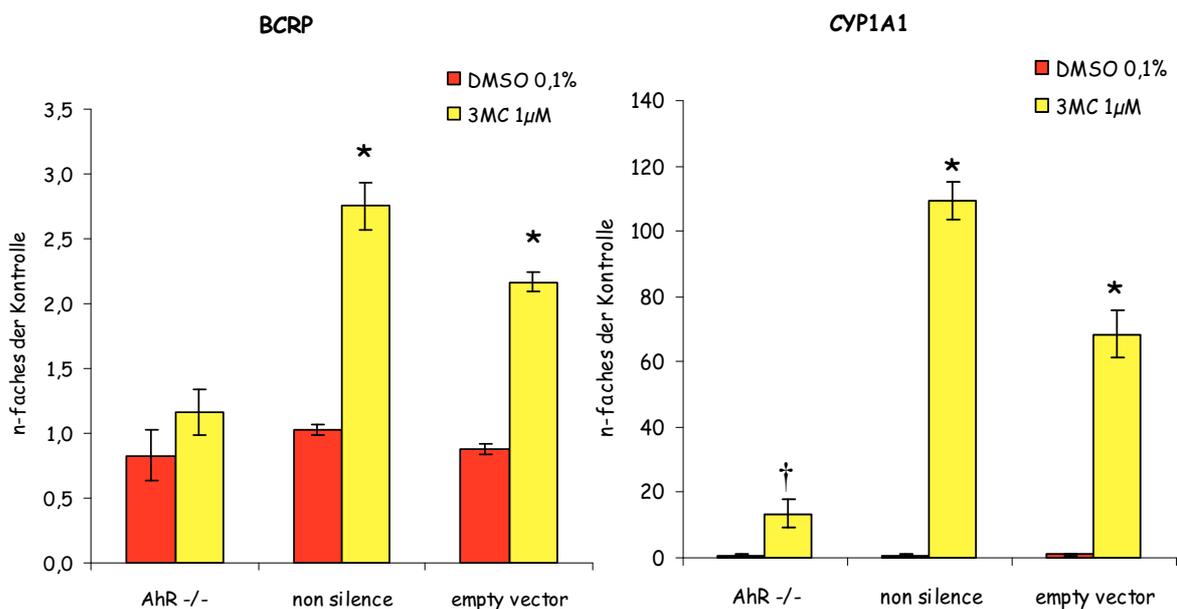


Abbildung 22 AhR regulierte Genexpression in AhR defizienten HaCat Zellen: HaCaT Zellen wurden für 24h mit 1µM 3MC belastet. Die Expression von CYP1A1 und BCRP wurde jeweils auf 500000 Moleküle β-Aktin normiert und als n-faches der unbehandelten Kontrolle aufgetragen. . *, signifikanter Unterschied zur Kontrolle ($p \leq 0,05$); †, signifikanter Unterschied zu 3MC ($p \leq 0,05$)

Wie in Abbildung 22 zu sehen ist, wird die BCRP und CYP1A1 mRNA-Expression in den NS- und EV-Kontrollen durch 3MC signifikant induziert. Die Expression des BCRP ist

2,8±0,18-fach in der NS-Kontrolle und 2,17±0,08-fach in der EV-Kontrolle erhöht, die Höhe der Induktion entspricht der in Caco2 Zellen. Die CYP1A1 Expression wird 109,3±5,65- und 68,5±7,06-fach erhöht. Dies kann als Beweis für die Aktivierung des AhR angesehen werden. In den AhR defizienten Zellen bleibt die BCRP Expression nach 3MC-Behandlung auf Niveau der unbehandelten Kontrolle. Die CYP1A1 Expression wird in den AhR defizienten Zellen auf das 13,4±4,32-fache induziert, was im Vergleich mit den Kontrollen eine Restkapazität des AhR von etwa 25% andeutet. Die hohe Induktion der CYP1A1 mRNA Expression der Kontrollen deutet auf einen sensitiven Promotor hin, der wahrscheinlich auch auf wenige AhR-Moleküle reagiert, die bei knock down noch vorhanden sein können. In den AhR defizienten Zellen kann die BCRP mRNA-Expression nicht mehr induziert werden. Die Induktion des BCRP bei den Kontrollen ist 2- bis 3-fach, was auf einen weniger sensitiven Promotor hindeutet, der bei 25% Restkapazität des AhR nicht mehr aktiviert werden kann. Die Ergebnisse stützen die Vermutung, dass der AhR an der Regulation des BCRP beteiligt ist.

3.4.3 Struktur des humanen BCRP Gens und Identifizierung von putativen XREs

Um funktionelle AhR-Bindestellen innerhalb des BCRP-Promotors zu identifizieren, wurde die DNA-Sequenz des Gens aus der NCBI-Datenbank entnommen (Acc.no.: AC022718). Das BCRP Gen ist auf Chromosom 4q22 lokalisiert, erstreckt sich über insgesamt 66kb und besteht aus 16 Exons [174]. Durch manuelle Suche wurde im 5' untranslatierten Bereich des Gens 6 putative XRE- Sequenzen identifiziert (siehe Abbildung 23).

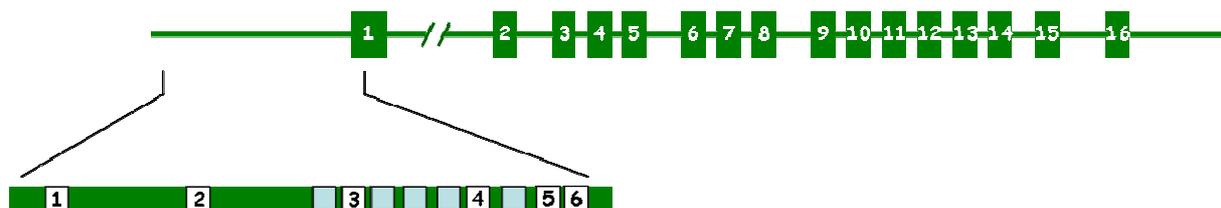


Abbildung 23 Schematische Struktur des BCRP Gen: Grüne Rechtecke stellen Exons (1-16), Linien Introns dar. Im 5' Bereich des Gen wurden putative XRE (weiß, 1-6) und SP1 (Türkis) Bindestellen identifiziert.

pXRE1

```

-4749 TCTTCTCGCC GCTTTTCTTT GCAGGAGCCA TTCTGCCTGG CCCAATTTGG
-4699 AAAAGAAGAG CGTGAGGGAT TCTTAAGTTT CCTTTTCTTT TCTAATTCTA
-4649 ATTCCTCTGG ATCCCATTTT ATTATGCTTC CTAAGGGACC TGACACTACC
-4599 AATAACCCCT TCTTTCTTTA TGGCTTGTC TCTTGGCATG CACACATGTT

```

pXRE2

```

-1849 CCCGGCTAAT TTTTGTATTT TTAGTAGAGA AGGGTTTCAC CATGTTGGCCC
-1799 AGGCTGCTCT TGAAGTCCTG ATATCAGGTG ATCCACCTGC CTCGGCCTCC
-1749 CAAAGTACTA GGATTACAGG CGTGAGCCAC CGTGCCTGGC CTCTATGTAT
-1699 AGGGTTTTGA TTTGTTTTTA CTTTGCATAA TTACAGAATG CTATATTCAA
-1649 CTAAGTATCC ATTTTTAAAA ATGTGCTTCA TATCAGTTTC GTGTGTGTTT
-1599 TCTCCATTTT TGTTCACTCT CCTCCTGTAG TGCCTTCAGA TCTTGCTGGA
-1549 AATGTTTTCA TTTTTTCTGG TATCATAAAA TTTTATTCTT TTCACTTATC

```

pXRE3

```

-599 CATTAAACT ATGGTAATAT TTTCAATCAG TAAGTTTCTC CCCTTTCCTT
-549 CCTTGGGTTA GATTCAGTGC CTGATTTTTT TAGGCCCTGG GGCGCAAGCA
-499 TCCACTTTCT CAGAATCCA TTCACCAGAA ACCACCCATT TAACTTGCTC
-449 TGGGTGCGAG CAGCGCTTGT GACTGGGCAA CCTGTGCGTC AGCGTCCCCG
-399 GTGCTTCGGC GCTCCGGCCA GTGACGGCGA CCAAACCCAG CTAGGTCAGA
-349 CGAGGTACTG ATCAGCCCAA TGAGCGCCTG GTGATTCTCG TAGTTAATCA
-299 CTCTGGTTCA TTCCGTTTCA TCCCGGAGGC GGGAGTGTTT GGCTTGTCCC
-249 TGCGTGTCAC GGCAGGGTGA CCCTAGCCCC GAGGGAGGGC GGTGGTACCA
-199 GTCCTGCTGG CGGCTCAGCG CGGCAGGACA CGTGTGCGCT TTCAGCCGGG
-149 TCGCAGGGCG CTTATCGCGG CCCGGCAGTC GGGGCCACGC CTCACCCCG
-99 CCCGCGAACC CCGACCTGGG GAAACCCGGG GCGCTGGGGA GGGGCCACTG
-49 CGTTCAGCTC TGGCGGTCCA CAGCCGAAG CGCGGCTTAG GAAGTTCGTG
2 TCAGCGCTGC CTGAGCTCGT CCCCTGGATG TCCGGGTCTC CCCAGGCGGC
52 CACCCGCCGG CTCCCATCGT GACCTCCAGC CGCAGCGCCT CCCACGCCGG
102 CCGCCGCGCG AGGGGAGCGC TCGGGCFCGC CGGGTGTGGT TGGGGGAAGG
152 GGTTGTGCCG CGCGCGGGCT GCGTGCTGTG CCCACTCAA AGGTTCCGGG
202 CGCGCAGGAG GGAAGAGGCA GTGCCCGCCA CTCCCCTGA GATTGAGAGA
252 CGCGGCAAGG AGGCAGCCTG TGGAGGAACT GGG

```

Abbildung 24 Sequenz der Promotorkonstrukte: Die fett gedruckten und unterstrichenen Basen markieren den Bereich der in die Luciferase Vektoren kloniert wurde. Rot markierte Sequenzen zeigen putative XRE Sequenzen, Türkis sind putative SP1 Sequenzen. Der blaue Bereich markiert das Exon 1.

Der Bereich, in dem putative XRE Sequenzen identifiziert wurden, ist insgesamt 4,7kb groß (siehe Abbildung 24). XRE1 ist an Position -4690 und XRE2 an -1730 lokalisiert. Die Mehrzahl der putativen XREs ist im Bereich unmittelbar vor oder im Exon 1 lokalisiert, XRE3 an Position -248, XRE4 an -114, XRE 5 an +93 und XRE6 an +171. Für die nachfolgenden Analysen wurden die Bereiche in drei Sequenzabschnitte unterteilt und einzeln in den *pGL3-basic* Vektor kloniert. Im Bezug auf die Reihenfolge von der niedrigsten Position an ausgehend, wurden die Vektoren als pXRE1, pXRE2 und pXRE3 bezeichnet.

3.4.4 Identifizierung regulatorischer Bereiche durch Reporter-genversuche

Um die Funktionalität der Promotorfragmente zu überprüfen, wurden vergleichende Reporter-genversuche durchgeführt. Dazu wurden die Vektoren in Caco2 Zellen transfiziert und einen Tag später für 24h mit $1\mu\text{M}$ 3MC belastet. Im Anschluss erfolgte die Lyse der Zellen und die Bestimmung der Luziferaseaktivität. Die basale Aktivität des *pGL3-basic* Vektors beträgt $28\pm 6,23\text{RLU}/\mu\text{g}$ Protein (Abbildung 25). Durch Belastung mit 3MC kommt es zu keiner signifikanten Veränderung der Aktivität. Die Konstrukte XRE1 und XRE2 zeigen bei einer Aktivität von $18\pm 4,41\text{RLU}/\mu\text{g}$ Protein und $30\pm 5,16\text{RLU}/\mu\text{g}$ Protein ebenfalls keine signifikanten Unterschiede nach Belastung mit 3MC. Die Luziferaseaktivität des XRE3 Konstruktes wird jedoch durch 3MC signifikant erhöht. Die Aktivität von $296\pm 42,5\text{RLU}/\mu\text{g}$ Protein entspricht dabei einer 2-fachen Induktion im Bezug auf die unbehandelte Kontrolle. Im Vergleich zu den anderen Konstrukten fällt die deutlich höhere basale Aktivität des XRE3-Plasmids von $161\pm 17,63\text{RLU}/\mu\text{g}$ Protein auf. Dies ist vermutlich auf die hohe Anzahl von funktionellen SP1 Bindestellen zurückzuführen.

Da die Luciferase-Aktivität des XRE3 Konstruktes durch Behandlung mit 3MC signifikant erhöht wird, ist davon auszugehen, dass in diesem Bereich ein funktionelles XRE-Motiv lokalisiert ist.

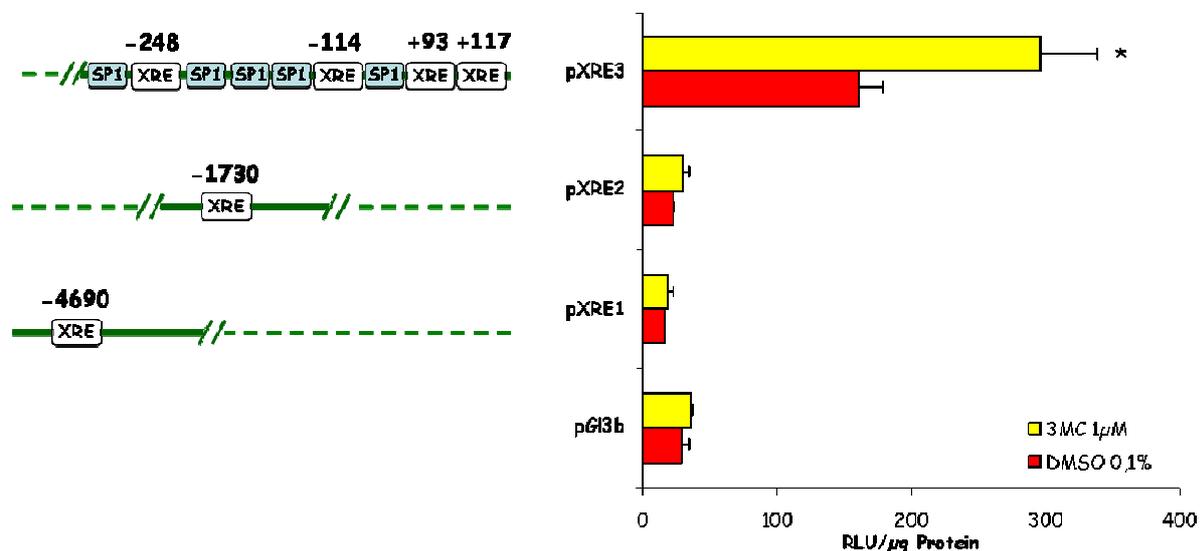


Abbildung 25 Reporter-genaktivität der Promotorfragmente in Caco2 Zellen: Die Zellen wurden für 24h mit $3\mu\text{g}$ des jeweiligen Plasmids und 50ng pRL-TK-Plasmid transfiziert. Nach der Transfektion erfolgte eine 24-stündige Belastung mit $1\mu\text{M}$ 3MC. Die Aktivität der Firefly-Luziferase wurde gegen die Aktivität der Renilla-Luziferase normiert und als Aktivität/ μg Protein dargestellt. *, signifikanter Unterschied zur unbehandelten Kontrolle ($p\leq 0,05$).

3.4.5 Wirkung von AhR antagonistischen Flavonoiden auf die mRNA-Expression des BCRP

Da in den vorangegangenen Versuchen die Beteiligung des AhR an der transkriptionellen Regulation des BCRP nachgewiesen werden konnte, sollte untersucht werden, ob die Flavonoide Luteolin, Baicalein, Fisetin und EGCG die mRNA-Expression des BCRP beeinflussen können. Dazu wurden Caco2 Zellen für 24h mit jeweils 50 μ M der Flavonoide belastet und im Anschluss an die Inkubationszeit die mRNA-Expression untersucht. Abbildung 26 zeigt die Ergebnisse der Analyse. Die Belastung der Zellen mit den Flavonoiden führte zu keiner signifikanten Veränderung der BCRP mRNA-Expression.

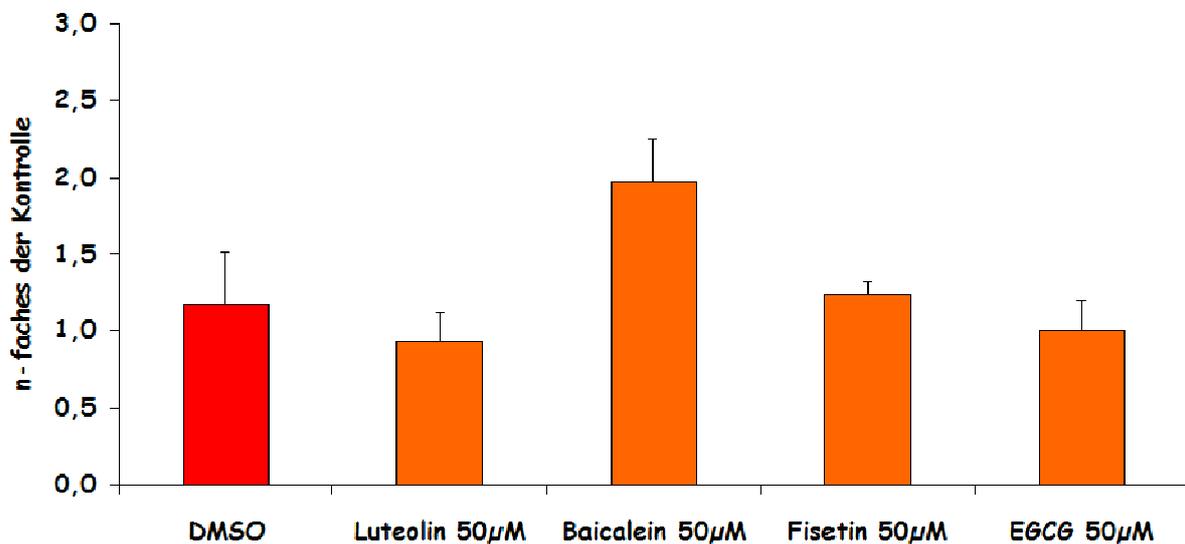


Abbildung 26 BCRP mRNA-Expression in Caco2 Zellen: Die Zellen wurden für 24h mit 50 μ M der indizierten Flavonoide und DMSO als Lösemittelkontrolle belastet. Die Expression der BCRP mRNA wurde auf 500000 Moleküle der Aktin mRNA normiert und als n-faches der unbehandelten Kontrolle aufgetragen.

3.5 Zellulärer Export von konjugiertem B(a)P-Metaboliten

3.5.1 Bestimmung und Nachweis von B(a)P-Konjugaten

Für die interne Standardmethode ist die Generierung von Eichkurven der zu analysierenden Substanzen und des internen Standards notwendig. Dazu wurden Konzentrationsreihen der beiden Metabolite Benzo(a)Pyren-3-Sulfat (BP3S), Benzo(a)Pyren-3-Glykopyranosid (BP3G) und des internen Standards (IS) Benz(a)anthracene-*trans*-1,2-dihydrodiol (BA2O) in Konzentrationen von 1 μ M bis 5 μ M erstellt. Um zu gewährleisten, dass die Standards genauso vorbereitet wurden wie die zu analysierenden Proben, wurde die Standardreihen ebenfalls in

Zellkulturmedium angesetzt und durch SPE für die HPLC-Analyse aufgereinigt. In Abbildung 27 ist ein repräsentatives Chromatogramm der Standards bei einer Konzentration von $3\mu\text{M}$ gezeigt. Die erste Substanz, die eluiert, ist BP3G nach einer Retentionszeit von 2,76min, gefolgt vom BP3S nach 3,47min und dem BA2O nach 5,36min. Der Verlust durch die SPE im Vergleich zu einer reinen Probe beträgt ungefähr 40%, was einer Wiederfindungsrate von 60% entspricht.

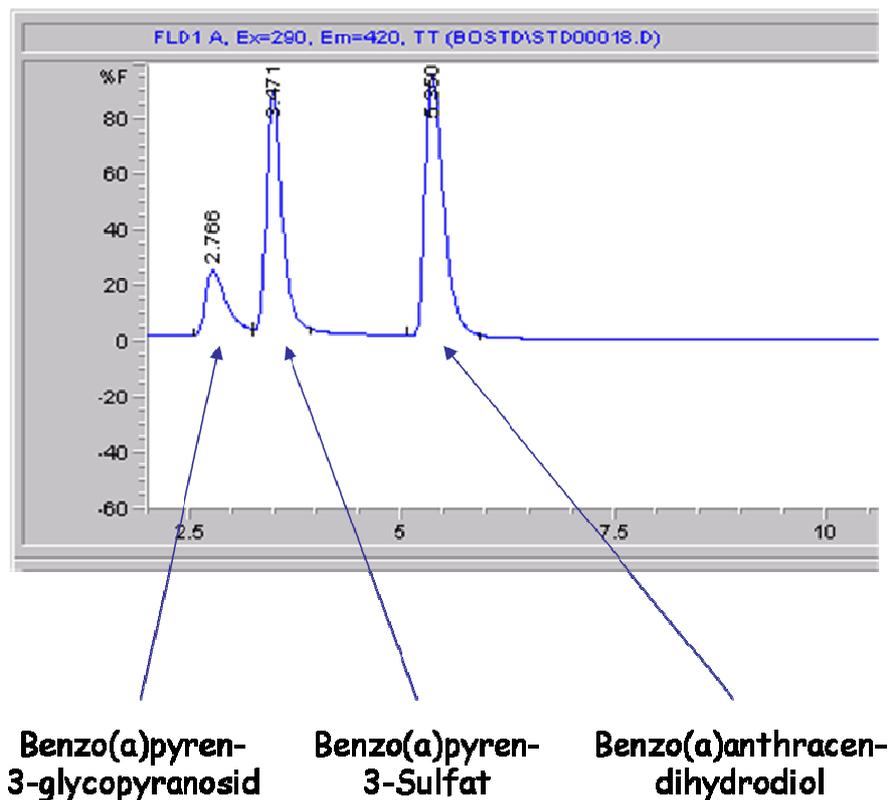


Abbildung 27 Chromatogramm der Kalibrierungsstandards mit Methanol/Wasser 1:1 (v/v): Chromatogramm der Konjugate in einer Konzentration von $3\mu\text{M}$. Die x-Achse zeigt die Retentionszeit, die y-Achse die relative Fluoreszenz der Konjugate bei 290nm Anregung, 420nm Emission.

Für die Generierung der Standardkurven wurden die Peakflächen der Substanzen gegen die Konzentration aufgetragen (Abbildung 28). Für die spätere Bestimmung der Konjugate müssen deren Verhältnisse zum internen Standard bekannt sein. Dazu wird die Steigung der Ausgleichsgeraden der Standardkurven benötigt. Der Quotient aus der Steigung des Konjugats und der Steigung des internen Standards bildet das Verhältnis der beiden Stoffe. Um die Konzentration einer Probe zu bestimmen wird das Produkt aus der Peakfläche des Konjugats, der Konzentration des IS und deren Verhältnis gebildet und durch die Peakfläche des IS geteilt:

$$c = \frac{(\text{Peakfläche Konjugat} * \text{Konzentration IS} * (\text{Verhältnis Konjugat} / \text{IS}))}{\text{Peakfläche IS}}$$

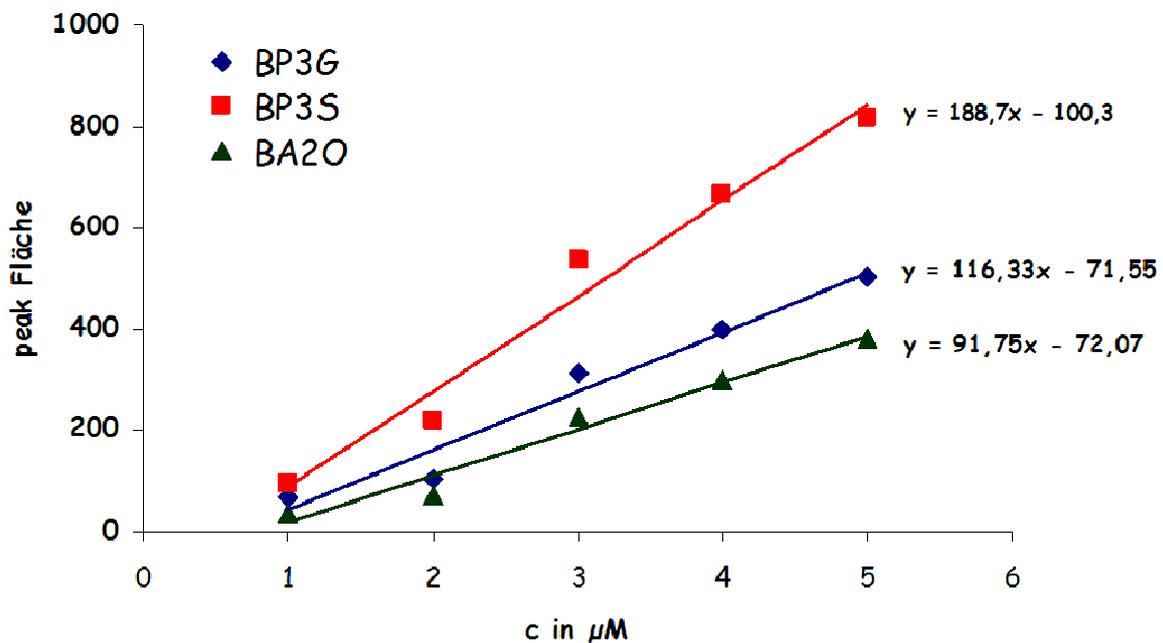


Abbildung 28 Standardkurven der Konjugate und des internen Standards: Auf der x-Achse ist die Konzentration des BP3S (Quadrat), BP3G (Rombe) und BA2O (Dreieck) in μM angegeben. Die y-Achse zeigt die relative Peakfläche. Durch die Geradengleichung wird die Steigung und der Schnittpunkt der Ausgleichsgerade mit der y-Achse angezeigt.

Nachdem die Konzentration der Proben durch die IS-Methode bestimmt wurde, konnte anhand des Ausgangsvolumens die absolute Menge der beiden Konjugate in pmol bestimmt werden.

3.5.2 BCRP vermittelter apikaler Transport von konjugiertem B(a)P

Da der ABC-Transporter BCRP als Mediator der apikalen Exkretion von glucuronidiertem und sulfatiertem B(a)P in Enterozyten identifiziert werden konnte, wurde im Folgenden die Transportkapazität von Caco2 Zellen charakterisiert. Dieser Versuch wurde in Transwell-Kammern durchgeführt. In diesen Kammern ist es möglich, apikale und basolaterale Transportvorgänge getrennt voneinander in einem System zu verfolgen. Die Transporter, die den Export über die basolaterale Membran vermitteln, konnten bisher noch nicht identifiziert werden, weshalb in den Versuchen zur Charakterisierung des Transports nur der apikal katalysierte Transport beobachtet wurde. Dazu wurden Caco2 Zellen in Transwellkammern mit

1 μ M, 5 μ M und 10 μ M 3-OH-B(a)P (BPOH) belastet. Die Menge an Konjugaten, die in der oberen Kammer akkumulierte, wurde für jede Konzentration nach 2, 4, 6 und 8h gemessen. Die Quantifizierung erfolgte durch HPLC Analysen mittels der IS-Methode. Wie in Abbildung 29 zu sehen, ist der apikale Transport von BP3S und BP3G zeit- und dosisabhängig. Nach Belastung mit einer Konzentration von 1 μ M BPOH kann bereits nach 2h eine Akkumulation von 66,7 \pm 29,16pmol/cm² BP3S in der apikalen Kammer gemessen werden. Nach Belastung mit 5 μ M BPOH akkumulieren nach der gleichen Zeit 96,5 \pm 5,78pmol/cm² in der apikalen Kammer, durch 10 μ M werden 143,5 \pm 76,32pmol/cm² detektiert. Die Akkumulation steigt im weiteren Zeitverlauf dosisabhängig an und erreicht nach 8h bei 1 μ M BPOH einen Wert von 387,4 \pm 72,76pmol/cm². Zu diesem Zeitpunkt akkumulieren bei der mittleren Konzentration von 5 μ M BPOH 1107,6 \pm 369,24pmol/cm² in der apikalen Kammer. Bei der höchsten Konzentration von 10 μ M BPOH erreicht der Export nach 6h ein Plateau bei 1179 \pm 27,47pmol/cm². Der apikale Export von BP3G ist niedriger als der von BP3S und wird bei der niedrigsten Konzentration erst nach 4h mit 19,2 \pm 33,23pmol/cm² gemessen werden. Nach Belastung mit der mittleren und hohen Konzentration akkumulieren nach 2h 31 \pm 53,76pmol/cm² und 84,1 \pm 66,08pmol/cm² in der apikalen Kammer. Die Akkumulation des BP3G über die Zeit verläuft linear. Nach 8h liegt das Maximum der niedrigsten Konzentration bei 112,3 \pm 21,15pmol/cm², das der mittleren Konzentration bei 567,2 \pm 156,98pmol/cm². Die apikale Akkumulation der höchsten Konzentration erreicht schon nach 6h ein Plateau bei 803,4 \pm 83,14pmol/cm².

Beim Vergleich der Maxima fällt auf, dass die Affinität des apikalen Transporters für das BP3S etwa 2-3-mal höher ist als für BP3G. Aufgrund der Ergebnisse wurde entschieden, für die weiteren Transportversuche eine Konzentration von 5 μ M BPOH zu verwenden, da bei dieser Konzentration der Export von BP3S und BP3G über 8h linear ist.

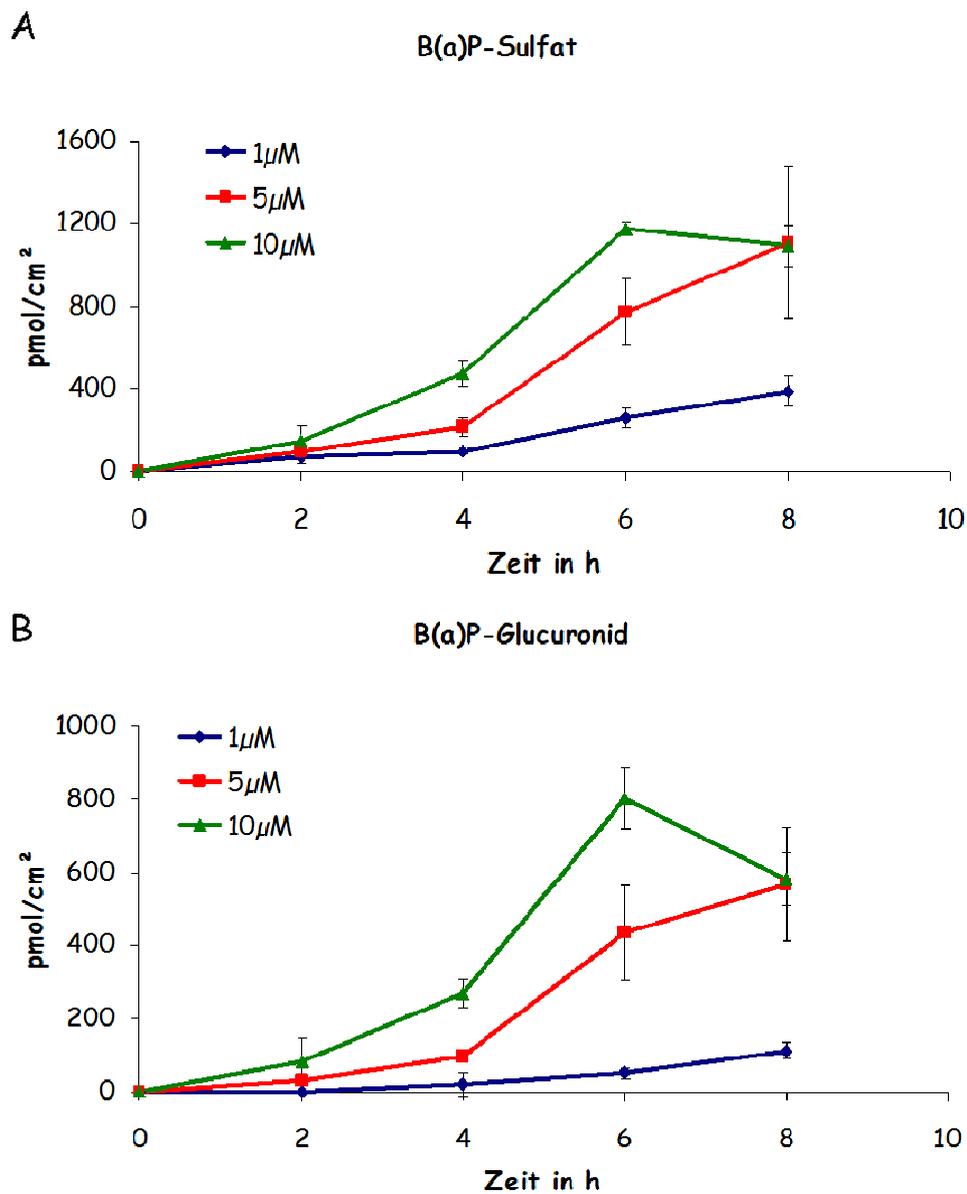


Abbildung 29 Apikaler Transport von konjugiertem B(a)P: Caco2 Zellen wurden mit 1 µM, 5 µM und 10 µM hydroxiliertem B(a)P belastet. Nach 2, 4, 6 und 8 h wurde die Menge an sulfatierten (A) und glucuronidierten (B) B(a)P gemessen, das in der apikalen Kammer akkumulierte. Die Quantifizierung erfolgte durch HPLC Analyse mittels der internen Standard Methode. Der Transport ist in pmol/cm² angegeben.

3.5.3 Hemmung der BCRP Transporteraktivität

Um zu beweisen, dass BCRP die apikale Exkretion von BP3S und BP3G vermittelt, wurden Versuche mit dem spezifischen BCRP Inhibitor KO143 durchgeführt. Diese Substanz ist ein nicht-kompetitiver Inhibitor, der die ATPase-Aktivität des BCRP blockiert. Für den Versuch wurden die Zellen mit $5\mu\text{M}$ BPOH belastet und die apikal akkumulierte Menge an BP3S und BP3G nach 2, 4, 6 und 8h quantifiziert.

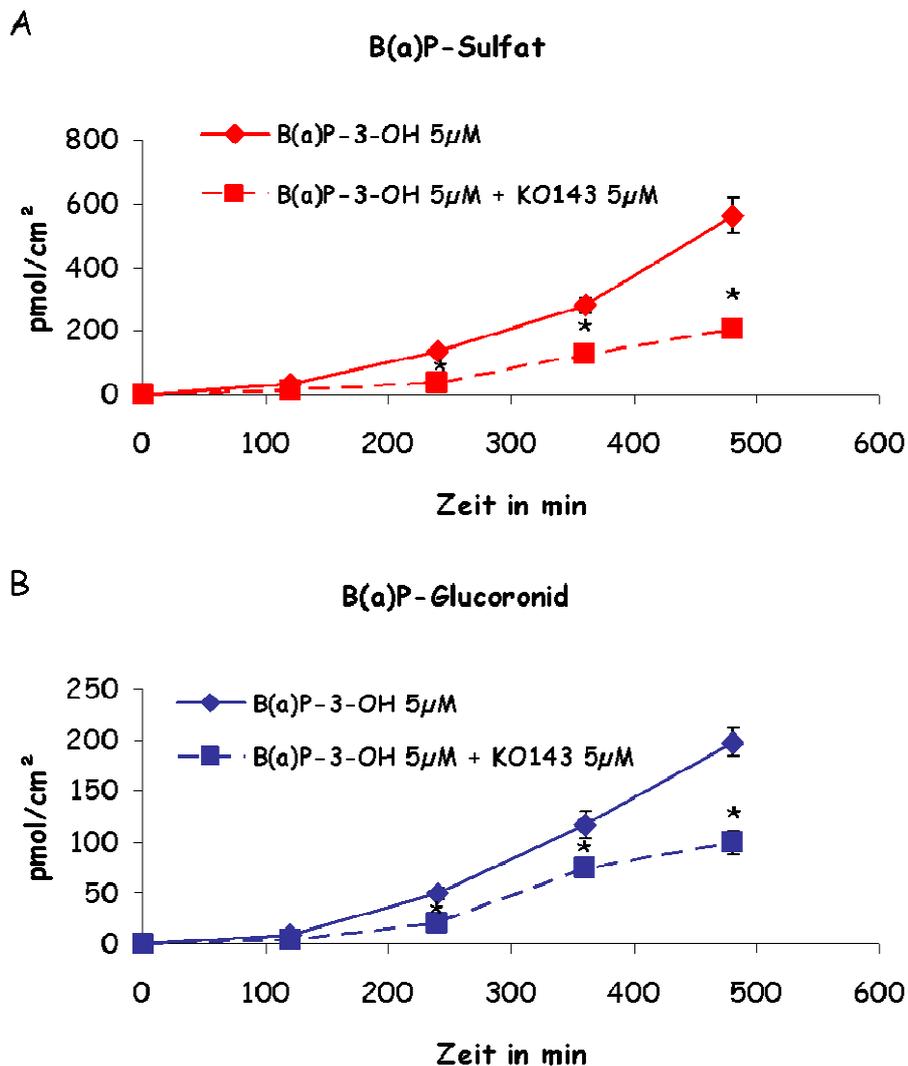


Abbildung 30 BCRP vermittelter apikaler Transport: Caco2 Zellen wurden für 8h mit $5\mu\text{M}$ BPOH belastet. Zusätzlich erfolgte eine Kobelastung mit $5\mu\text{M}$ des spezifischen BCRP Inhibitors KO143. Die apikal akkumulierte Menge an BP3S (A) und BP3G (B) wurde durch HPLC quantifiziert und in pmol/cm^2 aufgetragen.

Die Graphen in Abbildung 30 zeigen, dass die apikale Akkumulation von BP3S und BP3G zeitabhängig ist und linear verläuft. Nach 2h werden in der apikalen Kammer $30,8 \pm 2,99 \text{ pmol}/\text{cm}^2$ BP3S und $8,2 \pm 1,29 \text{ pmol}/\text{cm}^2$ BP3G gemessen. Das Maximum an akku-

mulierten BP3S nach 8h beträgt $564 \pm 54 \text{ pmol/cm}^2$, das von BP3G $198 \pm 14 \text{ pmol/cm}^2$. Erneut ist eine etwa 3-fach höhere Affinität des Transporters für das BP3S zu erkennen. Durch Kobelastung mit dem spezifischen Inhibitor KO143 wird der Transport von BP3S und BP3G zu allen Zeitpunkten der Untersuchung um 50% inhibiert. Die Ergebnisse bestätigen die Befunde, dass der apikale Transport von BP3S und BP3G durch den ABC-Transporter BCRP katalysiert wird.

3.5.4 Einfluss von Flavonoiden auf den Transport von konjugiertem B(a)P

Da gezeigt werden konnte, dass Flavonoide diverse Abschnitte des Fremdstoffmetabolismus beeinflussen können, wurde untersucht, ob dies auch in der Phase 3 geschieht. Für diesen Versuch wurde sowohl der apikale als auch der basolaterale Transport untersucht. Dazu wurden die Zellen in Transwell-Kammern eingesät und für 8h mit $5 \mu\text{M}$ BPOH belastet. Zusätzlich wurden die Zellen mit einer niedrigen ($5 \mu\text{M}$), einer mittleren ($25 \mu\text{M}$) und einer hohen ($50 \mu\text{M}$) Konzentration der Flavonoide Luteolin, Baicalein, Fisetin und EGCG kobelastet. Die Quantifizierung der Konjugate erfolgte durch HPLC Analysen.

Die Ergebnisse zeigen, dass mit Ausnahme von EGCG sowohl der apikale als auch der basolaterale Transport von konjugiertem B(a)P dosisabhängig durch Flavonoide inhibiert wird. Die Stärke des inhibierenden Effekts variiert jedoch zwischen den Flavonoiden. Die apikal gemessene Menge an Konjugaten in der Kontrolle nach 8h entspricht einem Transport von $801,7 \pm 69,64 \text{ pmol/cm}^2$ BP3S und $383,3 \pm 38,85 \text{ pmol/cm}^2$ BP3G. In der basolateralen Kammer akkumulieren zum gleichen Zeitpunkt $59,6 \pm 7,4 \text{ pmol/cm}^2$ BP3S und $60,42 \pm 7,73 \text{ pmol/cm}^2$ BP3G. Ausgehend von dieser Beobachtung ist der Transport von BP3S und BP3G über die apikale Membran etwa 10-mal höher als über die basolaterale Membran.

Luteolin hatte in diesem Versuch den stärksten Effekt (Abbildung 31). Der apikale Transport von BP3S und BP3G wird durch $5 \mu\text{M}$ Luteolin signifikant um 50% auf $332,6 \pm 48,33 \text{ pmol/cm}^2$ und $186,8 \pm 7,07 \text{ pmol/cm}^2$ inhibiert. Durch Erhöhung der Konzentration auf $25 \mu\text{M}$ sinkt der Transport von BP3S und BP3G auf $31,4 \pm 7,58 \text{ pmol/cm}^2$ und $64,2 \pm 17,11 \text{ pmol/cm}^2$. Bei Kobelastung mit der höchsten Konzentration können in der apikalen Kammer $18,5 \pm 11,87 \text{ pmol/cm}^2$ BP3S und $35,3 \pm 7,95 \text{ pmol/cm}^2$ BP3G detektiert werden. Der Verlauf des Graphen zeigt, dass der apikale Transport von BP3S stärker inhibiert wird als der von BP3G. Auf der basolateralen Seite wird der Transport der beiden Konjugate nicht in niedrigen Konzentrationen beeinflusst. In der mittleren Konzentration hemmt Luteolin den basolateralen

Transport von BP3S signifikant um 85% auf $9,4 \pm 1,64 \text{ pmol/cm}^2$, der Transport von BP3G wird nicht beeinflusst. In der höchsten Konzentration inhibiert Luteolin den Transport von BP3S um 95% auf $2,8 \pm 0,74 \text{ pmol/cm}^2$. Der Transport von BP3G wird bei dieser Konzentration um 62% auf $23,4 \pm 4,99 \text{ pmol/cm}^2$ gehemmt.

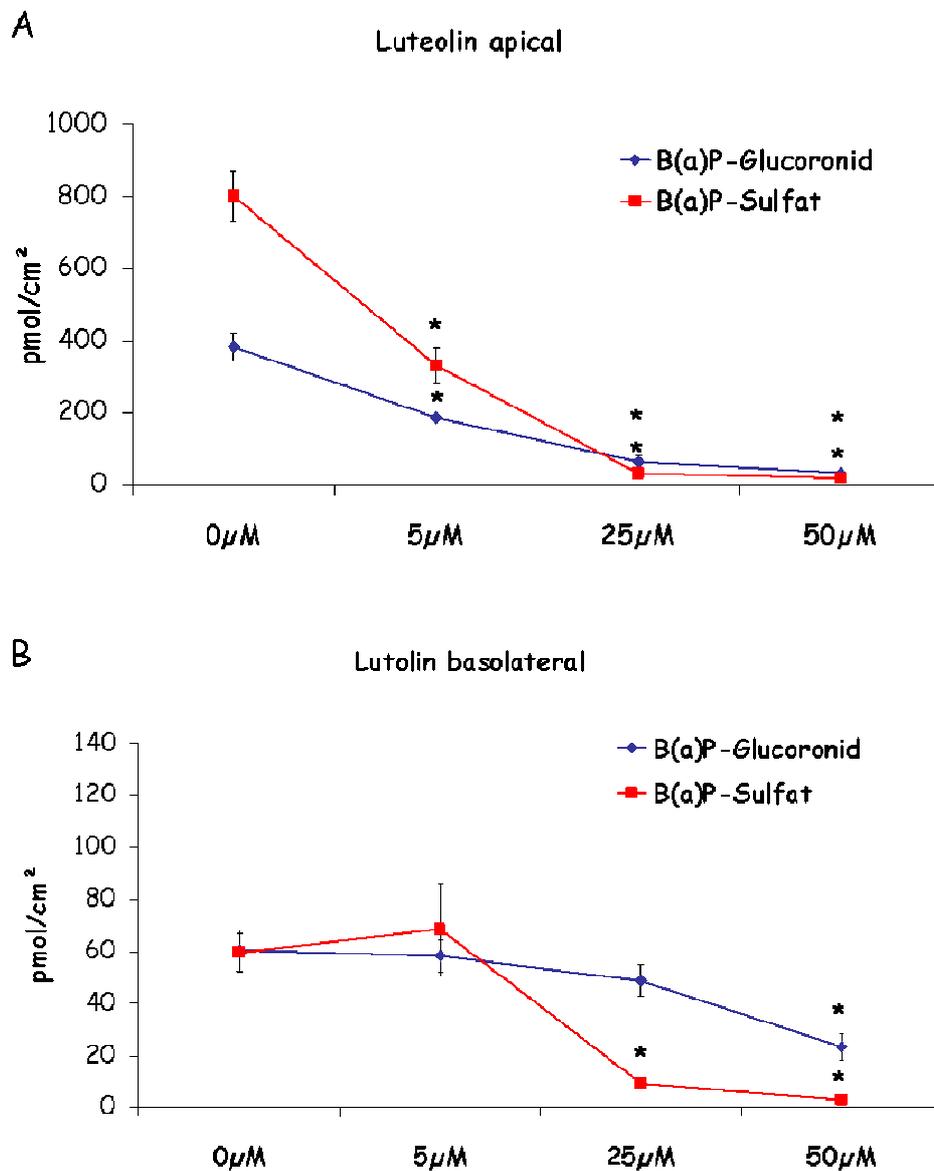


Abbildung 31 Einfluss von Luteolin auf den Export von BP3S und BP3G: Caco2 Zellen wurden für 8h mit $5 \mu\text{M}$ BPOH belastet. Zusätzlich wurden die Zellen mit $5 \mu\text{M}$, $25 \mu\text{M}$ und $50 \mu\text{M}$ des Flavonoid belastet. Die Quantifizierung der Konjugate erfolgte durch HPLC Analysen. Die Transportrate ist in pmol/cm^2 Fläche des Monolayer gegeben. A: apikaler Transport, B: basolateraler Transport. *, signifikanter Unterschied zur unbehandelten Kontrolle, $0 \mu\text{M}$ ($p \leq 0,05$).

Durch Baicalein (siehe Abbildung 32) wird der apikale Transport von BP3S und BP3G in der niedrigsten Konzentration von 5 μM signifikant um 40% inhibiert auf $467,3 \pm 34,75 \text{ pmol/cm}^2$ und $222,1 \pm 14,71 \text{ pmol/cm}^2$. In der mittleren Konzentration wird der apikale Transport von BP3S und BP3G stärker inhibiert, auf $60 \pm 21,28 \text{ pmol/cm}^2$ und $88,3 \pm 26,09 \text{ pmol/cm}^2$. Auf der basolateralen Seite bleibt der Transport von BP3G unbeeinträchtigt. Die basolaterale Exkretion von BP3S wird in der mittleren Konzentration signifikant um etwa 85% auf $8,3 \pm 1,58 \text{ pmol/cm}^2$ inhibiert. In der höchsten Konzentration beträgt der Transport $32 \pm 48,4 \text{ pmol/cm}^2$ und ist damit signifikant um 96% inhibiert.

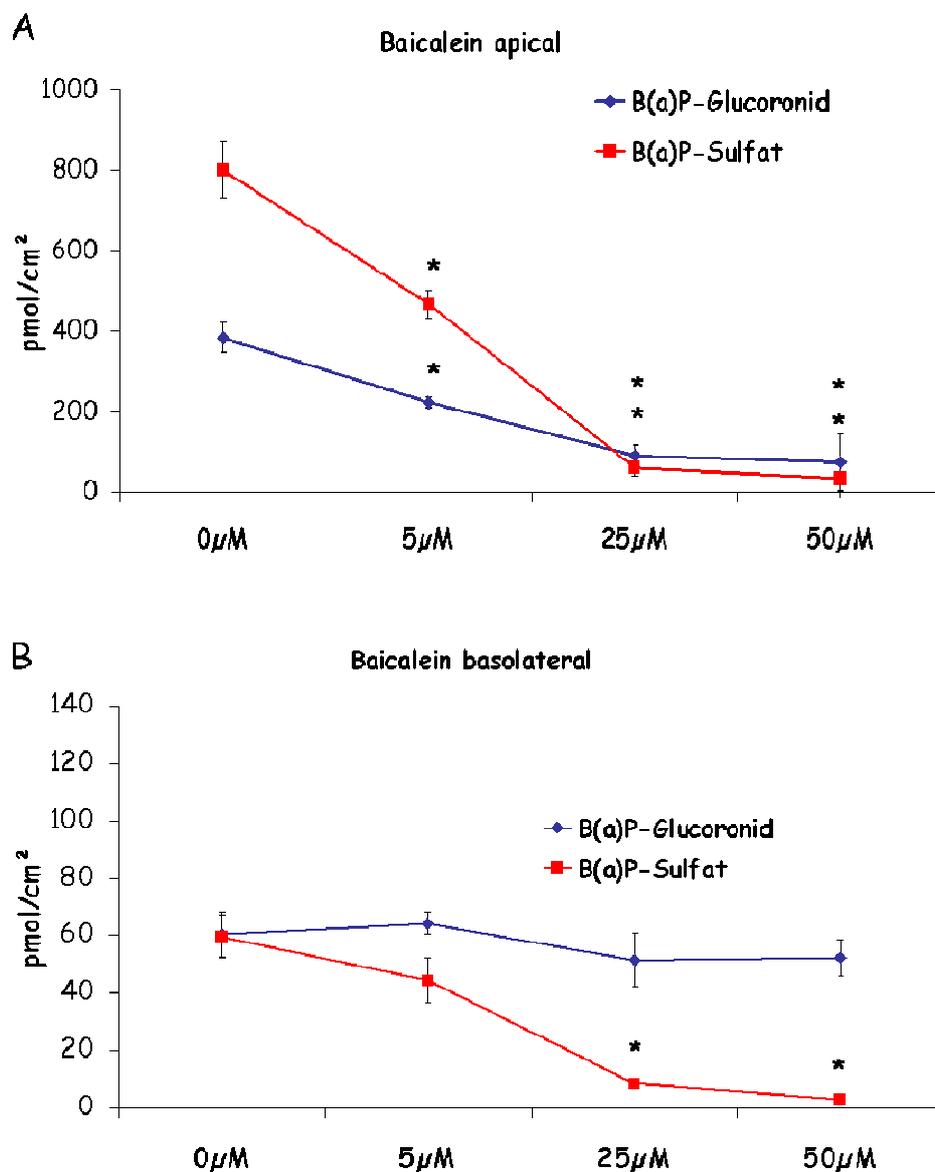


Abbildung 32 Einfluß von Baicalein auf den Export von BP3S und BP3G: Die Belastung der Zellen erfolgte nach dem Schema aus Abbildung 31

Fisetin inhibiert den apikalen Transport von BP3S und BP3G in der niedrigsten Konzentration (5µM) signifikant auf $538,9 \pm 76,8 \text{ pmol/cm}^2$ (67%) und $210,9 \pm 21,71 \text{ pmol/cm}^2$ (45%) (Abbildung 33). In der mittleren Konzentration (25µM) wird der Transport von BP3S und BP3G reduziert auf $141,4 \pm 6,62 \text{ pmol/cm}^2$ und $112,9 \pm 5,12 \text{ pmol/cm}^2$, was einer signifikanten Inhibierung von 82% und 70% entspricht. In der höchsten Konzentration (50µM) hemmt Fisetin den Transport von BP3S um 91% auf $69,3 \pm 4,98 \text{ pmol/cm}^2$. Der Transport von BP3G wird bei dieser Konzentration um 82% auf $69 \pm 6,73 \text{ pmol/cm}^2$ gehemmt. Auf der basolateralen Seite wird der Transport von BP3S und BP3G nur durch die höchste Konzentration signifikant auf $36,1 \pm 6,51 \text{ pmol/cm}^2$ und $34,8 \pm 6,61 \text{ pmol/cm}^2$ inhibiert, was einer signifikanten Reduktion von jeweils 42% entspricht.

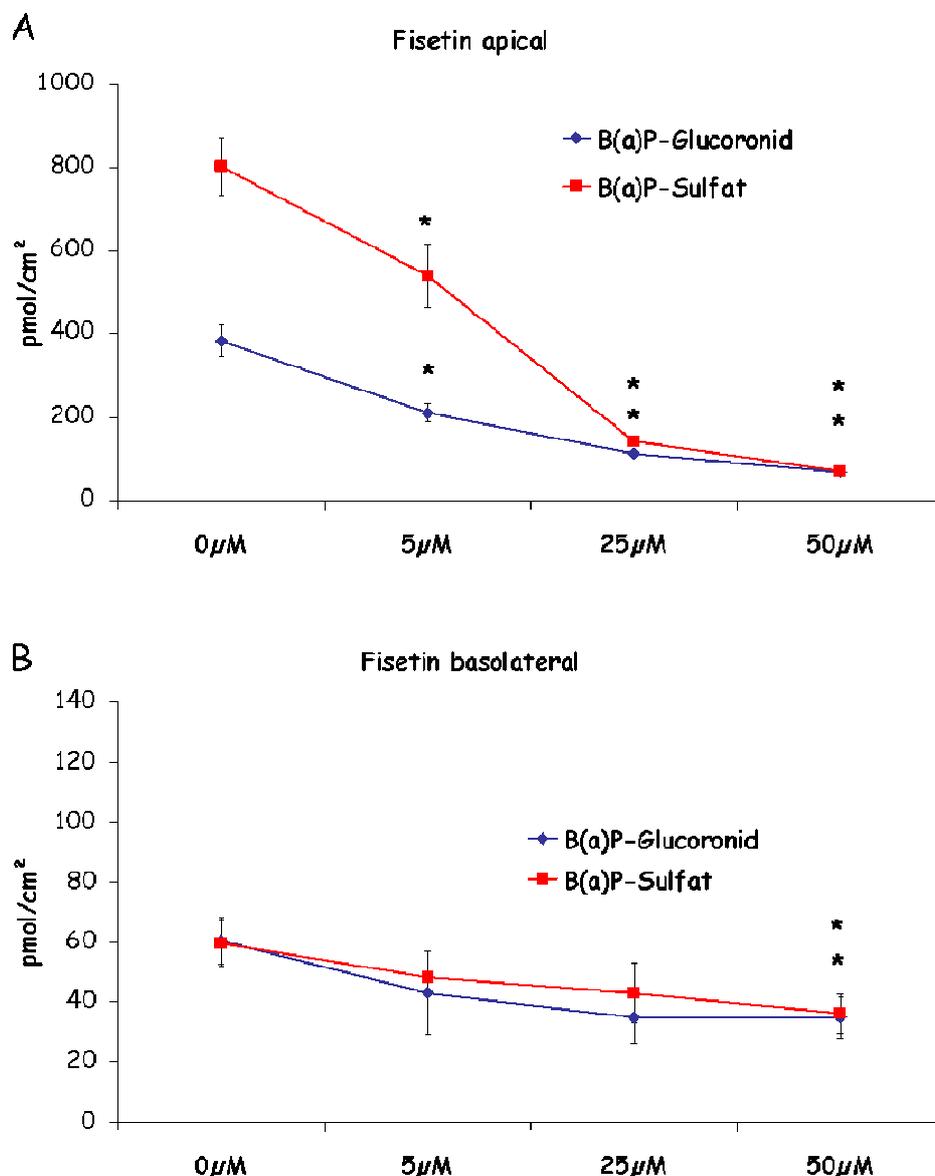


Abbildung 33 Einfluss von Fisetin auf den Export von BP3S und BP3G: Die Belastung der Zellen erfolgte nach dem Schema aus Abbildung 31

Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen wird der Transport auf apikaler und basolateraler Seite durch EGCG nicht beeinträchtigt (siehe Abbildung 34).

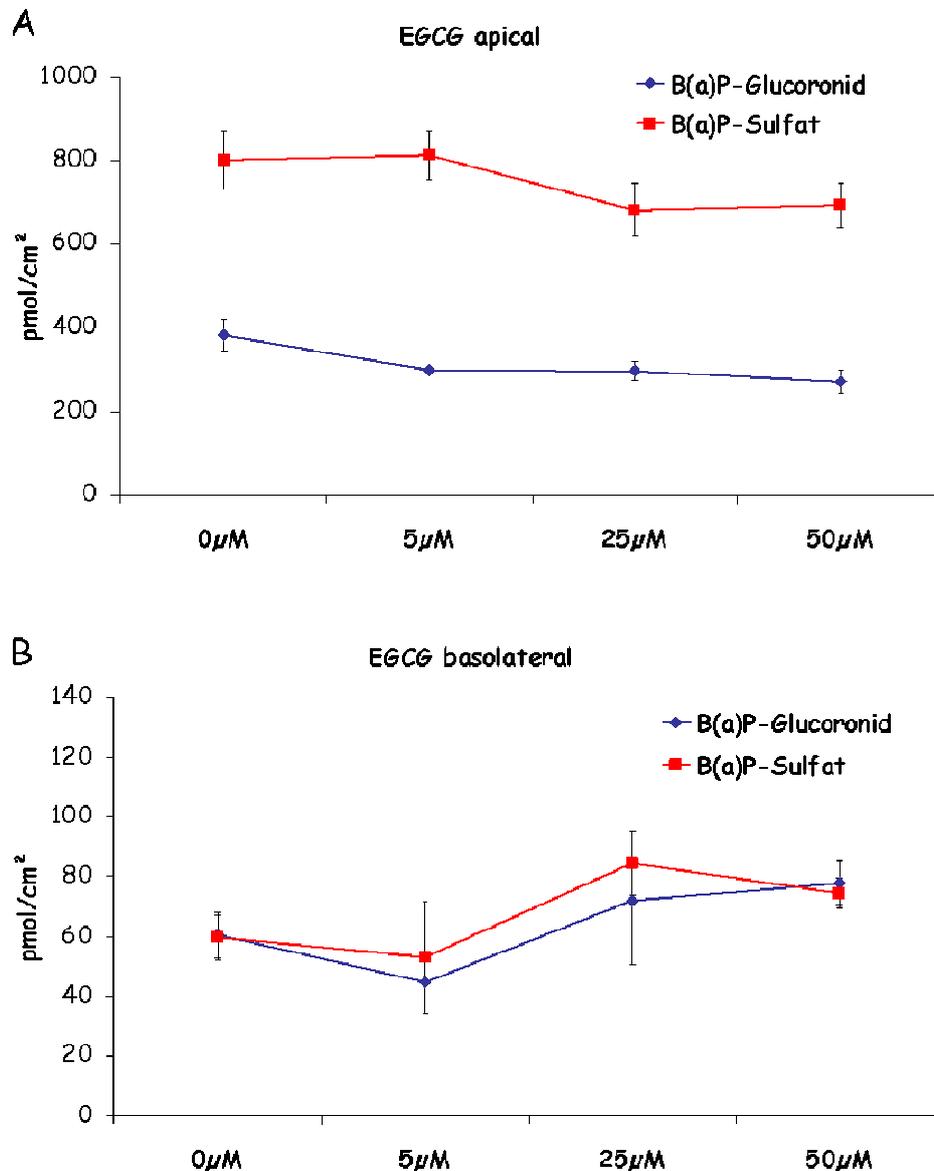


Abbildung 34 Einfluss von EGCG auf den Transport von BP3S und BP3G: Die Belastung der Zellen erfolgte nach dem Schema aus Abbildung 31

3.5.5 Kooperative Untersuchungen mit KO143 und Flavonoiden

Dass der spezifische Inhibitor im Gegensatz zu den Flavonoiden den Export von BP3S und BP3G gleichermaßen hemmt, kann als Hinweis auf unterschiedliche Wirkmechanismen gedeutet werden. Aus diesem Grund wurde untersucht, welchen Effekt die beiden Substanzen in

Kombination ausüben. Dazu wurden Caco2 Zellen für 8h mit 5µM BPOH belastet. Neben der Belastung der Zellen mit 5µM KO143, erfolgte eine Kobelastung mit 5 µM KO143 und 5µM der Flavonoide Luteolin, Fisetin und Baicalein. EGCG wurde nicht berücksichtigt, da dieses Flavonoid keinen Effekt auf den Transport hat.

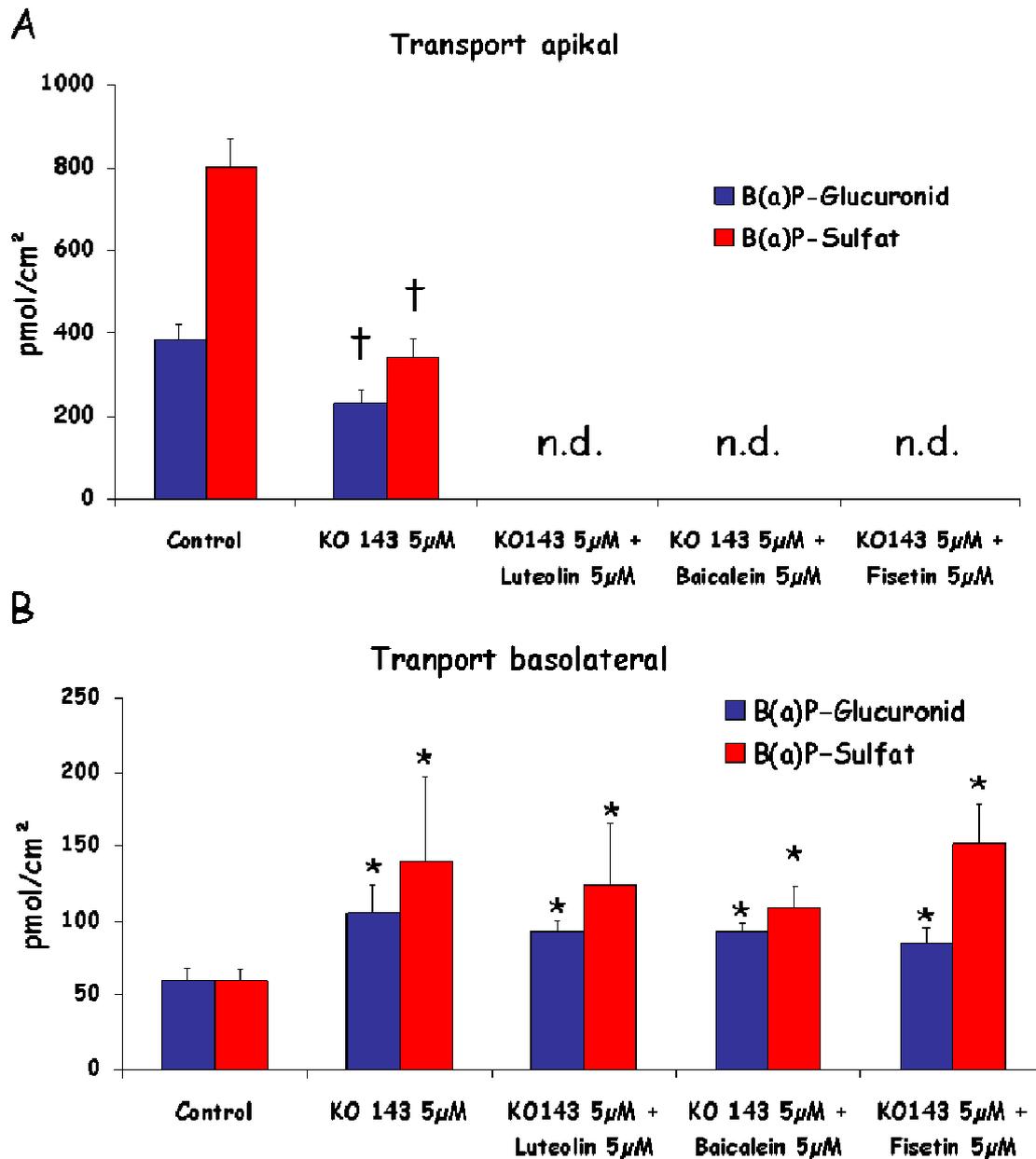


Abbildung 35 *Kooperative Effekte von Flavonoiden und KO143*: Caco2 Zellen wurden für 8h mit 5µM BPOH belastet. Außerdem wurden Zellen mit 5µM KO143 alleine und in Kombination mit je 5µM Flavonoid belastet. Die Quantifizierung der Konjugate erfolgte durch HPLC Analysen. n.d.: nicht detektierbar. *, signifikanter Unterschied zur Kontrolle, basolateral ($p \leq 0,05$). †, signifikanter Unterschied zur Kontrolle, apikal ($p \leq 0,05$).

Auf der apikalen Seite führt die Belastung mit 5µM KO143 zu einer Inhibierung des Transports um 50% auf $231 \pm 31,49 \text{ pmol/cm}^2$ (siehe Abbildung 35). Bei Kobelastung mit Luteolin,

Baicalein und Fisetin in einer Dosis von $5\mu\text{M}$ wird der apikale Transport vollständig inhibiert und keine Konjugate mehr detektierbar. Im Gegensatz dazu kommt es durch KO143 auf der basolateralen Membran zu einer um fast 100% erhöhten Transportrate von $105,62\pm 18,77\text{pmol}/\text{cm}^2$. Dieser Effekt wird vermutlich durch eine erhöhte Aktivität von basolateralen ABC-Transportern verursacht. Dieser Befund bestätigt die Spezifität des KO143 für den apikalen Transporter BCRP. Die zusätzliche Applikation von Flavonoiden hat keinen Effekt auf den basolateralen Transport. Die Ergebnisse dieses Versuches deuten daraufhin, dass Flavonoide und KO143 möglicherweise synergistisch wirken.

3.5.6 Wirkung von Flavonoiden auf die intrazelluläre Akkumulation von B(a)P

Da die Analysen gezeigt haben, dass der Export von konjugiertem B(a)P durch Flavonoide inhibiert wird, wurde untersucht, ob dies zu einer intrazellulären Anreicherung des B(a)P führt. Dazu wurden Caco2-Zellen mit Tritium-markiertem B(a)P für 8h belastet. Zusätzlich erfolgte eine Kobelastung mit $50\mu\text{M}$ Luteolin als repräsentatives Flavonoid. Nach der Inkubation wurden die Zellen lysiert und der intrazelluläre Gehalt des B(a)P radiometrisch bestimmt. Nach 8h Belastung mit $5\mu\text{M}$ B(a)P beträgt der intrazelluläre Gehalt $0,42\pm 0,06\text{pmol}/\text{cm}^2$. Durch Koinkubation mit $50\mu\text{M}$ Luteolin kommt es zu einem 4-fachen Anstieg des intrazellulären B(a)P auf $2,14\pm 0,08\text{pmol}/\text{cm}^2$. Die Ergebnisse deuten an, dass Flavonoide die Bioverfügbarkeit von B(a)P durch Inhibierung von ABC-Transportern erhöhen.

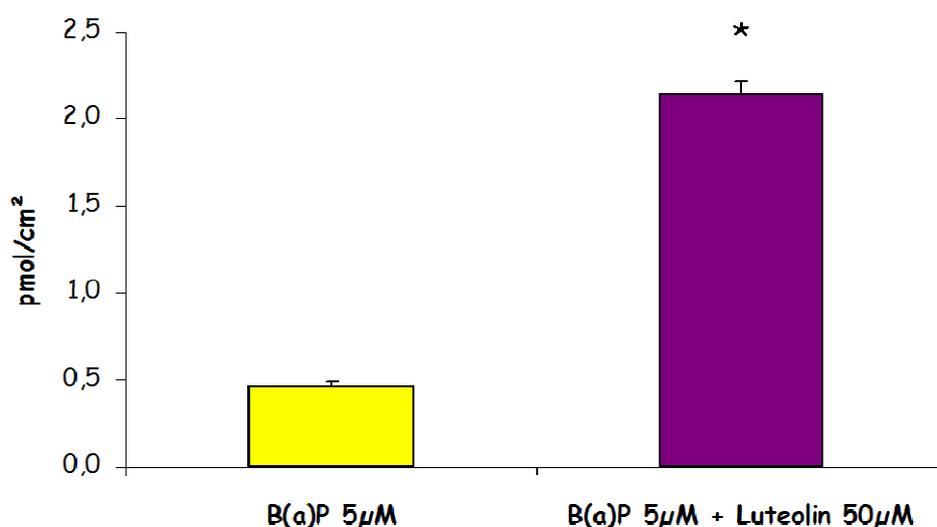


Abbildung 36 Intrazelluläre Akkumulation von B(a)P: Caco2 Zellen wurden für 8h mit Tritium-markiertem B(a)P belastet, alleine und in Kombination mit $50\mu\text{M}$ Luteolin. Der intrazelluläre B(a)P-Gehalt wurde radiometrisch bestimmt und in pmol/cm^2 (y-Achse) angegeben.

4 Diskussion

Es gibt in der Literatur zahlreiche Hinweise, dass Flavonoide sowohl die Pharmako-/Toxikodynamik, als auch die Pharmako-/Toxikokinetik vieler Arzneimittel und Umweltchemikalien beeinflussen können. Ein zentraler Bestandteil dieser biologischen Prozesse ist das fremdstoffmetabolisierende System, das die Kinetik, Bioverfügbarkeit und die biologischen Wirkungen von Chemikalien moduliert. In dieser Arbeit sollte deshalb untersucht werden, inwieweit sich die AhR antagonisierenden Flavonoide Luteolin, Baicalein, Fisetin und EGCG auf diese Stoffwechselprozesse auswirken, also Toxikodynamik und Toxikokinetik beeinflussen können. Als Untersuchungsmodell diente die Kolonkarzinomzelllinie Caco2. Diese Zellen wurden ausgewählt, weil der Darm sowohl die primäre Eintrittspforte für Flavonoide, als auch für chemische Stoffe wie Dioxin, PAKs und heterozyklische Amine ist. Die letztgenannten Stoffe sind bekannte AhR Agonisten und entstehen bei Verbrennungs- bzw. Brat- und Kochprozessen.

Ein auffälliger Befund dieser Arbeit ist, dass EGCG keinen Effekt auf die untersuchten Endpunkte Fremdstoffmetabolismus und Fremdstofftransport hat. Dies könnte durch eine verringerte zelluläre Aufnahme bedingt sein, oder dadurch, dass die verwendeten Konzentrationen (5-50µM) in unserem Zellsystem zu niedrig waren. In Untersuchungen an Maus-Hepa1c1c7 Zellen konnte gezeigt werden, dass nach einer Belastung mit 200µM EGCG die TCDD induzierte CYP1A1 mRNA-Expression unterdrückt wird [175]. Diese Konzentration erwies sich in Vorversuchen in unserem Zellmodell als zytotoxisch. In einer anderen Arbeit, die ebenfalls den Effekt von EGCG auf die Induktion von CYP1A1 untersuchte, konnte übereinstimmend mit unseren Ergebnissen kein Effekt auf das CYP-System beobachtet werden. Die EGCG Konzentration lag in einer vergleichbaren Größenordnung wie die hier verwendete [176]. Jüngste Daten zeigen, dass EGCG aufgrund seiner nicht-planaren Struktur nicht mit dem AhR interagieren kann. Die hemmende Wirkung des EGCG auf die Rezeptor medierte Signaltransduktion wird durch eine hemmende Interaktion mit dem AhR assoziierten HSP90 zurückgeführt [176;177]. EGCG blockiert vermutlich die Dissoziation des HSP90 vom AhR und somit die nukleäre Translokation.

4.1 Effekt von Flavonoiden auf die Phase 1 des Fremdstoffmetabolismus

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die Flavonoide Luteolin, Baicalein und Fisetin den AhR Signalweg in Caco2 Zellen beeinflussen können. Die Expressionsanalysen

zeigen, dass die Flavonoide sowohl agonistische als auch antagonistische Effekte auf die CYP1A1 mRNA-Expression ausüben. Aus den Daten geht hervor, dass Luteolin, Baicalein und Fisetin die CYP1A1 mRNA-Expression induzieren können. Die Induktion der drei genannten Flavonoide fällt in der vorliegenden Arbeit im Vergleich zur B(a)P behandelten Positivkontrolle deutlich geringer aus und deutet auf ein schwaches agonistisches Potential hin. Bei Betrachtung der CYP1A1 mRNA-Expression in Gegenwart von Luteolin und Fisetin fällt auf, dass die Induktion durch Erhöhung der Konzentration des Flavonoid schwächer wird. Ein ähnlicher Effekt wurde ebenfalls von van der Heiden und Kollegen in Versuchen mit Flavonoiden in T47D-Zellen beobachtet {Van der Heiden E., 2009 321 /id}. Die Zellen wurden stabil mit einem Luciferase-Vektor transfiziert, der funktionelle XREs im Promotor inseriert hatte. Nach Belastung der Zellen mit Chrysin und Quercetin in Konzentrationen bis 20µM kam es zu einer Induktion der Luciferase-Aktivität, höhere Konzentrationen reduzierten die Induktion. Die Ursache für die unterschiedlichen Induktionsantworten ist unbekannt. Offensichtlich scheinen zellspezifische Effekte dabei eine Rolle zu spielen. Durgo und Kollegen konnten zeigen, dass Fisetin die CYP1A1 mRNA-Expression in HEp2 und CK2 Zellen induzieren kann [179]. Die agonistischen Effekte von Baicalein und Luteolin wurden in Reporter-Genversuchen an MCF-7-, HepG2- und Hepa1-Zellen nachgewiesen [180]. Nach einer 24-stündigen Belastung mit 10µM der beiden Flavonoide kam es zu einer signifikanten Induktion der Reporter-Genaktivität. Eine ähnliche Beobachtung zeigen auch die Daten dieser Arbeit. Die agonistische Aktivität von Flavonoiden ist im Vergleich zu den klassischen Agonisten wie TCDD, 3MC und B(a)P geringer.

Bei Kobelastung der Zellen mit Flavonoiden konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Flavonoide die B(a)P induzierte CYP1A1 mRNA-Expression inhibieren können. Luteolin erwies sich bei diesen Experimenten von allen Flavonoiden als wirksamster Antagonist, gefolgt von Fisetin und Baicalein. Diese Beobachtung wird von anderen Arbeitsgruppen bestätigt. XRE-Luciferase Reporter-Genversuche, die von Chan *et al.* durchgeführt wurden zeigten, dass Baicalein die nukleäre Transformation des AhR in TCDD behandelten MCF-7 Zellen verhindert [181]. Unterstützt werden diese Daten durch Gelverzögerungsuntersuchungen zur TCDD induzierten Transformation des AhR in Gegenwart von Flavonoiden. Ashida und Kollegen konnten zeigen, dass unter anderem durch Luteolin und Baicalein die TCDD induzierte Bindung des AhR an XRE-Sequenzen blockiert wird [182]. Weitere Studien zeigen, dass Baicalein die DMBA induzierte CYP1A1 mRNA-Expression in MCF-7 Zellen reduziert [181]. Des Weiteren fanden Kang und Kollegen heraus, dass Quercetin die B(a)P induzierte CYP1A1 mRNA-Expression in HepG2 Zellen inhibiert [183].

Die Befunde der Expressionsanalysen stehen im Einklang mit den Ergebnissen der enzymatischen Messungen. Die Daten zeigen, dass die Flavonoide Luteolin, Baicalein und Fisetin agonistisch auf die EROD Aktivität in Caco2 Zellen wirken. Bei Kobelastung mit B(a)P wirken sie antagonistisch und hemmen die B(a)P induzierte EROD Aktivität dosisabhängig. Die Induktion der EROD-Aktivität durch Luteolin und Fisetin nimmt auch in diesen Versuchen mit der Erhöhung der Konzentration des Flavonoid ab. Dies unterstützt die oben diskutierten Ergebnisse von van der Heiden und Kollegen. Die antagonistische Wirkung der Flavonoide auf die EROD Aktivität korreliert mit den Befunden von Chan *et al.* die zeigen konnten, dass Baicalein die DMBA induzierte EROD Aktivität in MCF-7 Zellen hemmt. Unterstützt werden die Ergebnisse durch EROD-Analysen an humanen Mikrosomen, die rekombinantes CYP1A1 enthielten. Die Proben wurden 2min vor Reaktionsstart mit den Flavonoiden Myricetin, Apigenin, Kaempferol, Quercetin, Amentoflavon, Quercitrin und Isoquercitrin inkubiert. Nach Zugabe des Substrats konnte die EROD Aktivität der Mikrosomen dosisabhängig durch die Flavonoide in Konzentrationen zwischen 0,1µM und 10µM gehemmt werden.

In Anbetracht der Ergebnisse zur Transkriptionsanalyse und Enzymaktivität ist anzunehmen, dass die Flavonoide Luteolin, Baicalein und Fisetin die B(a)P induzierte Transkription und Aktivität des CYP1A1 durch direkte Interaktion mit dem AhR hemmen. Flavonoide besitzen alle eine planare Struktur, weshalb die oben diskutierten Ergebnisse von Ashida *et al.*, die gezeigt haben, dass die Transformation des AhR durch TCDD von Flavonoiden blockiert wird, als ein Mechanismus für deren Wirkung angesehen werden kann. Der AhR favorisiert lipophile Verbindungen mit einer planaren Struktur um die 14 x 12 x 5 Å, von denen TCDD als prototypischer Ligand gilt [41;184].

Die Befunde können unter mehreren Gesichtspunkten diskutiert werden. Aus medizinischer Sicht kann eine Inhibierung des CYP1A1 die Bioaktivierung von PAKs wie z.B. B(a)P zum ultimalen DNA bindenden Metaboliten verhindern [185]. B(a)P ist kanzerogen im Tierversuch und wurde deshalb von der MAK Kommission in die Kategorie 2 der kanzerogenen Substanzen eingestuft. Die Metabolisierung der PAKs durch CYP1A1 fördert die pulmonare Karzinogenese und ist mit einem erhöhten Risiko für Lungenkrebs verbunden [186]. Eine erhöhte CYP1A1 Aktivität, ausgelöst durch einen Polymorphismus, ist ebenfalls mit einer erhöhten Rate an Kolorektalkrebs verbunden, was durch epidemiologische Studien festgelegt werden konnte [187]. Die Inhibierung der CYP1A1 Aktivität durch Flavonoide könnte in diesen Fällen die schädigende Wirkung des CYP1A1 vermindern, also protektive Wirkung haben, eine These die von einigen Autoren vertreten wird [181]. In *in vitro* Studien an B(a)P

behandelten V79 Zellen konnte gezeigt werden, dass die Flavonoide Chrysin und Apigenin die DNA-Adduktbildung durch B(a)P reduzieren konnten [188]. Die meisten Daten zu den protektiven Eigenschaften von Flavonoiden stammen - wie das eben genannte Beispiel - aus *in vitro* Experimenten und stehen im Widerspruch zu *in vivo* Daten, die aus Studien an CYP1A1 defizienten Mäusen stammen. In C57BL/6J Mäusen, die defizient für CYP1A1 waren, wurde nach einer einmaligen Dosis von 500mg/kg B(a)P eine geringere B(a)P vermittelte Toxizität und längere Überlebensdauer beobachtet, als in Wildtyp-Mäusen [189]. Es wurde ein Anstieg der hepatischen mRNA, Protein und Enzymaktivität des CYP1A1 in Wildtyp-Mäusen beobachtet, im Gegensatz zu den CYP1A1(-/-) Mäusen, die keinerlei Induktion zeigten. Allerdings trat bei den CYP1A1(-/-) Mäusen eine 4-fach höhere DNA-Adduktmenge auf. Eine verminderte CYP1A1 Aktivität scheint mit einem geringeren Mutationsrisiko assoziiert zu sein. Andererseits könnten diese Befunde durch die extrem hohe Dosis bedingt sein, die die Entgiftungskapazität der Tiere überfordert hat. Hierauf weisen andere Studien hin. In Langzeitversuchen traten bei CYP1A2 defizienten Mäusen keine Tumoren auf, wenn sie mit B(a)P behandelt wurden [190]. Diese Befunde unterstreichen die Bedeutung von AhR regulierten Phase 1 Enzymen bei der Umwandlung von Chemikalien in ultimale Kanzerogene.

4.2 Interaktion von Flavonoiden mit der Phase 2 Reaktion

Um zu überprüfen, ob die Flavonoide Luteolin, Baicalein und Fisetin mit der Phase 2 interagieren, wurde deren Einfluss auf die Transkription und Aktivität von Glucuronidasen und Sulfotransferasen untersucht.

Auf Ebene der Glucuronidasen wurde durch Behandlung der Zellen mit B(a)P eine 6-fache Erhöhung der UGT1A1 mRNA-Expression gemessen. Diese Beobachtung wird durch die Arbeit von Yueh und Kollegen bestätigt, die zeigen konnten, dass HepG2 Zellen, die mit 10nM TCDD und 20µM BNF über einen Zeitraum von 24h bis 72h belastet wurden, einen signifikanten 3- bis 5-fachen Anstieg der UGT1A1 mRNA-Expression vorwiesen. Durch Behandlung der Zellen mit Flavonoiden wurde in dieser Arbeit kein signifikanter Unterschied der UGT1A1 mRNA-Expression beobachtet. Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu den Ergebnissen von Walle *et al.* [191], die in Northern-Blot Analysen gezeigt haben, dass HepG2 Zellen, die 3 Tage mit 25µM des Flavonoids Chrysin behandelt wurden, eine 20- bis 30-fache Induktion der UGT1A1 mRNA vorwiesen. Die Induktion der UGT1A1 durch Chrysin konnte von den Autoren auch auf Proteinebene nachgewiesen werden. Bei der Kobelastung der Zel-

len mit B(a)P und Luteolin und Baicalein in hohen Konzentrationen wird die B(a)P induzierte mRNA-Expression der UGT1A1 signifikant inhibiert. Chrysin scheint also anders als Luteolin und Baicalein ein AhR-Agonist zu sein. Die Induktion der UGT1A1 durch Chrysin ist AhR abhängig wie Bonzo *et al.* herausgefunden haben [192]. In Promotorgenversuchen in HepG2 Zellen gelang es den Autoren ein funktionelles XRE im Promoter der UGT1A1 zu identifizieren, durch das nach Behandlung mit Chrysin die Luciferaseaktivität in Reporter-genversuchen signifikant erhöht wird. Des Weiteren zeigte die Arbeitsgruppe, dass Chrysin in der Lage ist TCDD aus der Ligandenbindetasche des AhR zu verdrängen. Im Gegensatz zur UGT1A1 wurde in dieser Arbeit die mRNA-Expression der UGT1A6 nicht nach Behandlung der Zellen mit B(a)P beeinflusst. Die Arbeitsgruppe um Münzel konnte jedoch zeigen, dass die mRNA-Expression der UGT1A6 in Caco2 Zellen, die 48h mit 50 μ M des AhR Agonisten β -Naphthoflavon (BNF) behandelt wurden, um das 4-fache induziert wird [193]. Die Beteiligung des AhR an der transkriptionellen Regulation der UGT1A6 konnte von dieser Arbeitsgruppe durch Identifizierung eines funktionellen XREs in Gelverzögerungsversuchen nachgewiesen werden [139]. Möglicherweise reichte die in dieser Arbeit verwendete vergleichsweise geringe Konzentration von 1 μ M B(a)P nicht aus, um die mRNA-Expression der UGT1A6 signifikant zu induzieren. Eine Induktion der UGT1A6 ist wahrscheinlich abhängig von hoch affinen AhR-Liganden wie z.B. TCDD oder der Verwendung von AhR-Liganden in hohen Konzentrationen. Unterstützt wird diese Vermutung von Arbeiten, die eine Induktion der UGT1A6 mRNA-Expression in Caco2-Zellen nach Behandlung mit 10nM TCDD (ein hoch affiner AhR-Ligand) oder 40-80 μ M Tert-Butylhydrochinon (AhR-Ligand in hoher Konzentration) zeigen [194]. Die mRNA Expression der UGT1A6 zeigte nach Behandlung mit den Flavonoiden keinen Effekt. Im Gegensatz dazu konnte von Bock *et al.* gezeigt werden, dass durch 72-stündige Belastung mit 100 μ M Quercetin die UGT1A6 mRNA-Expression 3-fach induziert wird [195]. Die Autoren verwendeten bei ihren Experimenten jedoch eine doppelt so hohe Flavonoidkonzentration wie die in dieser Arbeit und zusätzlich sehr viel längere Inkubationszeiten.

Auf Ebene der Enzymaktivität konnte weder durch Behandlung der Zellen mit B(a)P noch durch Behandlung mit den Flavonoiden eine Veränderung beobachtet werden. Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu Untersuchungen die zeigten, dass Chrysin ein hoch affines Substrat der UGT1A1 ist, durch Autoinduktion seine Glucuronidierung hervorruft und die Aktivität der UGT1A1 in HepG2 Zellen 4-fach erhöht [191]. Anders als in der bei dieser Arbeit verwendeten Methode, bei der die Aktivität aller Isoenzyme gemessen wird, wurde von den Autoren spezifisch die Aktivität der UGT1A1 gemessen. Im Menschen sind insgesamt 26

verschiedene UGTs klassifiziert [138], von denen sicher nicht alle in dem bei dieser Arbeit verwendeten Zellmodell exprimiert sind, jedoch ausreichend genug, so dass die Aktivitätsänderung einzelner Enzyme nicht signifikant Einfluss auf die Gesamtaktivität nehmen kann.

Die Regulation der UGTs ist nicht alleine AhR abhängig, sondern wird auch von anderen Transkriptionsfaktoren beeinflusst. In Studien, die an Ratten durchgeführt wurden, konnte gezeigt werden, dass unter anderem CAR, PPAR α , und Nrf2 Gewebeabhängig die Transkription einzelner Isoenzyme induzieren können [196]. Die Rolle einiger dieser Transkriptionsfaktoren bei der Regulation der UGTs scheint höher zu liegen als die des AhR. In Nrf2 defizienten Mäusen ist die Kanzerogenese durch Behandlung mit B(a)P erhöht, weil die Phase 2 Reaktion durch die verminderte Expression der UGTs nicht mehr ausreichend katalysiert wird [197]. Dieser Effekt kann auch nicht durch erhöhte AhR-Aktivität ausgeglichen werden, was daraufhin deutet, dass die Regulation der UGTs durch Nrf2 höhere Bedeutung hat, als die Regulation durch den AhR.

Sowohl auf transkriptioneller als auch auf enzymatischer Ebene wurde durch Behandlung der Caco2 Zellen mit Flavonoiden kein Effekt auf Sulfotransferasen beobachtet. Die Behandlung der Zellen mit dem AhR Agonist B(a)P zeigte ebenfalls keine Veränderung der Sulfotransferasen auf transkriptioneller oder enzymatischer Ebene, was eine Regulation durch den AhR ausschließt. Einige Autoren konnten jedoch eine Beteiligung des AhR an der transkriptionellen Regulation von Sulfotransferasen nachweisen. Yanagiba und Kollegen konnten zeigen, dass in der Leber von 3MC behandelten Mäusen die mRNA-Expression der SULT1A1 2,8-fach erhöht ist [152]. In der Arbeit von Alnouti *et al.* wurde geschildert, dass es in der Leber von Mäusen nach Behandlung mit PCB126 zu einer 8-fachen Erhöhung der SULT1C1 mRNA-Expression kommt [151]. Des Weiteren zeigten die Autoren, dass die Leberexpression der SULT5A1 durch TCDD, PCB126 und BNF induziert wurde. Dass die Aktivität der Sulfotransferasen nicht durch die Behandlung mit Luteolin beeinflusst wurde steht im Gegensatz zu einigen Veröffentlichungen. Es wurde berichtet, dass die Flavonoide Quercetin, Genestein, Daidzein und Flavon die Aktivität der phenolischen Sulfotransferase in Blutkulturen um 50% inhibieren konnten [198]. Harris *et al.* testeten 37 verschiedene Flavonoide, von denen sich viele, darunter auch Baicelein und Fisetin als kompetitive Inhibitoren der phenolischen Sulfotransferase in humanen Leberhomogenaten erwiesen [199]. In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, dass Quercetin ein potenter Inhibitor der phenolischen Sulfotransferase in HepG2 Zellen ist [18]. Der Grund, dass in dieser Arbeit keine Änderung der Aktivität beobachtet wurde, besteht darin, dass die hier verwendete Methode die Aktivität aller in der Zelle

exprimierten Sulfotransferasen misst, wodurch die Aktivitätsänderung einzelner Isoenzyme nicht erfasst wird.

4.3 Transkriptionelle Regulation des BCRP und seine Interaktion mit Flavonoiden

4.3.1 Rolle des AhR bei transkriptioneller Regulation des BCRP

Ein wichtiger Bestandteil des Fremdstoffmetabolismus ist der aktive Transport von konjugierten Substanzen aus der Zelle hinaus, da dies nach der Addition von polaren Gruppen nicht mehr passiv geschehen kann. Ein wichtiger Faktor in diesem System ist der ABC-Transporter BCRP. Dieser Transporter wurde in einer MCF-7 Brustkrebszelllinie von Doyle *et al.* identifiziert, worauf auch der Name beruht [200]. Gleichzeitig wurden zwei weitere Transporter identifiziert, ABCP und Mitoxantron Resistance (MXR) [201;202]. Als wenig später die DNA Sequenz dieser drei Gene bekannt wurde und sich herausstellte, dass sie nahezu identisch waren, wurde das BCRP/ABCP/MXR Gen in die Untergruppe G der Transporter einsortiert und ihm von da an die Bezeichnung ABCG2 zugeteilt. Die Mitglieder der Gruppe G sind alle Halbtransporter. BCRP katalysiert den Export vieler Xenobiotika, zu denen auch Medikamente zählen, die in der Chemotherapie eingesetzt werden. Dadurch wird die Akkumulation der Chemotherapeutika am Wirkort in der Zelle limitiert. Erschwerend hinzu kommt, dass viele Tumorzellen ABC-Transporter überexprimieren und deshalb verstärkt Chemotherapeutika exportieren, weshalb BCRP zur Multiplen Medikamenteresistenz (MDR) beiträgt [203]. Ursprünglich wurde mit dem Phänomen der MDR nur das p-Glykoprotein in Verbindung gebracht, mit der Zeit wurden jedoch p-Glykoprotein unabhängige Resistenzen beobachtet [204;205]. Viele ABC-Transporter besitzen überlappende Substratspezifitäten, was die zielgerichtete Suche nach weiteren MDR verursachenden Kandidaten erschwerte. Erst durch die Verwendung von selektiven Chemotherapeutika konnte die genaue Identifizierung einzelner ABC-Transporter gelingen. Bisher wurden 48 verschiedene ABC-Transporter identifiziert, von denen einige, wie z.B. auch die Multiple-Drug-Resistance-Associated Proteine (MRPs), mit dem Phänomen der MDR assoziiert sind.

Ebert und Kollegen konnten in ihrer Arbeit nachweisen, dass BCRP den Transport von glucuronidiertem und sulfatiertem B(a)P katalysiert [168]. Daher ist es naheliegend, dass Substanzen, in diesem Fall AhR Agonisten, durch Autoinduktion ihren Metabolismus sowie den Ex-

port aus der Zelle regulieren. Um diese Hypothese zu belegen, sollte untersucht werden, ob der AhR die Transkription des BCRP reguliert. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass BCRP in Caco2 Zellen dosisabhängig durch 3MC induziert wird. Da 3MC ein potenter AhR Agonist ist, lässt das auf einen AhR abhängigen Mechanismus bei der Induktion der Expression schließen. Die Ergebnisse stehen im Einklang mit den von Ebert *et al.* präsentierten Daten, die zeigen, dass BCRP in Caco2 Zellen nach Behandlung mit 50nM TCDD 6-fach induziert wird. Die Autoren verwendeten weitere AhR Agonisten wie z.B. Oltipraz und Benzo(k)Fluoranthen, durch die es ebenfalls zu einer signifikanten Induktion der BCRP mRNA-Expression kam. Unterstützt werden die Befunde durch Ergebnisse dieser Arbeit, die zeigen, dass die Applikation des AhR Antagonisten MNF zu einer signifikanten Inhibierung der 3MC induzierten BCRP Expression führt. Ein weiterer erhärtender Beweis wird durch die Experimente an AhR defizienten HaCaT Zellen geliefert. In diesem Zelltyp bleibt die BCRP Induktion durch 3MC aus. Die Aktivierung des AhR durch 3MC in HaCat Wildtypzellen ist durch die induzierte CYP1A1 Expression belegt. Die Ergebnisse stimmen überein mit den von Ebert *et al.* präsentierten Daten, die zeigen, dass die Induktion durch AhR Agonisten in MCFaHR₂₀₀ Zellen, die einen nicht-funktionellen AhR besitzen, ebenfalls ausbleibt [206]. Die Resultate wurden von den Autoren auch auf Proteinebene bestätigt. Durch transiente Transfektion dieser Zellen mit einem AhR exprimierenden Plasmid konnte die Responsivität auf mRNA- und Protein-Ebene wieder hergestellt werden. Diese Daten unterstützen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass der AhR an der transkriptionellen Regulation des BCRP beteiligt ist.

Die Expression von ABC-Transportern unterliegt verschiedenen regulativen Mechanismen, die bei einigen Kandidaten überlappend sind. Beispielsweise kann die Expression von Multidrug Resistance Associated Protein 2 (MRP2) und p-Glykoprotein von verschiedenen nukleären Rezeptoren induziert werden, wie z.B. dem Pregnane X Rezeptor (PXR), Farnesoid X-activated Rezeptor (FXR) und dem Constitutive Androstane Rezeptor (CAR) [207-209]. Ein weiterer Kandidat für die Regulation des p-Glykoprotein ist der AhR, was jedoch kontrovers diskutiert wird. So wurde gezeigt, dass eine Induktion des p-Glykoprotein in HepG2 Zellen durch PAHs in hohen Konzentrationen hervorgerufen werden kann, nicht aber durch den viel potenteren AhR-Agonisten TCDD. Anders als TCDD verursachen PAHs DNA-Schäden durch Adduktbildung, woraufhin p53 induziert wird, das wiederum p-Glykoprotein induziert [210-212]. Es gibt weitere Stressfaktoren die eine p-Glykoprotein Expression hervorrufen, wie zum Beispiel Hitzeschock, Hypoxie oder UV-Strahlung [213-215]. Interessanterweise wird auch BCRP durch Hitzeschock und Hypoxie induziert [216;217], was in dieser Arbeit aber nicht näher untersucht wurde.

BCRP scheint der einzige Transporter zu sein, der direkt durch den AhR reguliert wird, was durch die Befunde der transkriptionellen Analysen verdeutlicht wird. Deswegen wurde in dieser Arbeit die regulative Region des BCRP-Gens hinsichtlich funktioneller XRE-Sequenzen näher charakterisiert. Der Promotorbereich von BCRP ist wie bei MDR1 und MRP1 ohne TATA-Motiv, dafür aber reich an GC-Box Elementen [218-220]. Diese Sequenzen finden sich häufig in Promotoren ohne TATA-Motiv und dienen als Bindestellen für Sp1 Transkriptionsfaktoren. Bei der Regulation von CYP1A1 wurde eine Interaktion von AhR/ARNT und Sp1 nachgewiesen [221]. In *Drosophila* SL2 Zellen, die selbst kein AhR, ARNT oder Sp1 exprimieren wurden diese Proteine stabil transfiziert. Nach Transfektion mit einem CYP1A1-Promotor reguliertem Luciferase-Vektor wurde die Luciferase-Aktivität der Zellen nach Behandlung mit 3MC signifikant erhöht. Die Autoren konnten zeigen, dass im CYP1A1-Promotor das AhR/ARNT-Dimer an die XRE-Sequenz bindet und Sp1 rekrutiert, das an die GC-Box in unmittelbarer Nähe bindet und die Bildung des Transkriptionskomplexes initiiert. Die Sp1 Proteine gehören zur Familie der Sp/XKLF (specificity protein/Krüppel-like factor) Transkriptionsfaktoren [222]. Die Mitglieder dieser Familie besitzen drei konservierte Zink-Finger Domänen, die GC- und GT-Box DNA-Motive erkennen und binden können. Die Aktivierung der Genexpression durch den AhR ist also abhängig von GC-Box Elementen, die an XRE Sequenzen angrenzen. Im Promotorbereich des BCRP-Gens konnten insgesamt 6 putative XRE-Sequenzen identifiziert werden, von denen das dritte Motiv 2 Basen und das vierte Motiv 4 Basen aufwärts einer putativen Sp1 Bindestelle lokalisiert sind. Dementsprechend ist das Luziferase-Konstrukt pXRE3, in dem diese beiden Motive enthalten sind, responsiv gegenüber 3MC. Das Ausmaß der induzierten Reporter-genaktivität korreliert mit der Induktion der mRNA Expression, beides ist in etwa 2-fach erhöht. In dieser Arbeit gelang es jedoch nur den funktionellen Bereich innerhalb des BCRP-Promotors einzugrenzen. Die Durchführung von Punktmutationen zur genauen Identifizierung des aktiven XREs war nicht erfolgreich. Es ist jedoch wahrscheinlich, dass die Transkription des BCRP auf Wechselwirkung zwischen AhR/ARNT (XRE) und Sp1 (GC-Box) beruht. Die GC-Box Elemente spielen bei der Regulation eine große Rolle, was auch in den Versuchen dieser Arbeit beobachtet wurde. Ein Befund dieser Experimente ist die hohe basale Luziferaseaktivität, die das pXRE3 Konstrukt im Vergleich zu den beiden anderen Konstrukten und der Leervektor Kontrolle zeigt. Baily-Dell *et al.* konnten in ihren Arbeiten zeigen, dass dies auf der vermehrten Präsenz von funktionellen GC-Box Elementen beruht [218]. Die Autoren haben in Reporter-genversuchen nachgewiesen, dass der Promotorbereich bis zur Position -312 in MCF-7, JAR, JEG-3 und BeWo Zellen eine hohe basale Luciferase-Aktivität hervorruft. Dieser Bereich ist

auch in dem pXRE-Vektor enthalten. Diese Befunde unterstreichen die Bedeutung der GC-Box Regionen für die Regulation des BCRP.

4.3.2 Wirkung von Flavonoiden auf die BCRP mRNA Expression und Aktivität

Die Befunde der Reporter- und Expressionsanalysen bestätigen die Vermutung einer AhR-medierten Transkriptionsregulation des BCRP. Deswegen wurde in den folgenden Experimenten die Wirkung von AhR-antagonistischen Flavonoiden auf die mRNA-Expression des BCRP untersucht. Die Flavonoide Luteolin, Baicalein, Fisetin und EGCG zeigten in diesen Untersuchungen keinen Effekt auf Transkription des BCRP. Dagegen fand die Arbeitsgruppe von Ebert eine 15- bis 35-fache Stimulation der BCRP mRNA-Expression in Caco2 Zellen nach 48-stündiger Belastung mit je 50µM Quercetin, Resveratrol, Chrysin und Flavon [223]. Ein weiterer Befund dieser Arbeitsgruppe war, dass in Caco2 Zellen der BCRP-vermittelte apikale Transport eines BCRP-Substrats signifikant erhöht wurde.

4.3.3 Charakterisierung des BCRP-vermittelten Transports von konjugiertem B(a)P

Zunächst wurden die Zellen hinsichtlich ihrer Kapazität untersucht, sulfatiertes und glucuronidiertes B(a)P zu transportieren. Die Konjugation von Stoffen dient nicht nur zur Erhöhung der Wasserlöslichkeit, sondern erhöht auch deren Affinität zu bestimmten Transportproteinen wie z.B. BCRP. Grundlage für die Experimente waren Befunde, die zeigen, dass BCRP am Transport von sulfatiertem Östrogen beteiligt ist [224]. Anhand von dosis- und zeitabhängigen Versuchsreihen sollte der apikale Transport von BP3S und BP3G charakterisiert werden. Die Ergebnisse zeigen, dass bis zu einer Konzentration von 5µM BPOH die Transportaktivität über 8h linear ist. Die Transportrate für das BP3S nach Belastung mit 5µM BPOH beträgt ungefähr 140pmol/cm²*h, die Transportrate des BP3G liegt bei ungefähr 80pmol/cm²*h. Vergleichbare Daten für den Transport des BP3S und BP3G mit 150pmol/cm²*h und 70pmol/cm²*h wurden von Ebert und Kollegen ermittelt, die das gleiche Versuchssystem verwendeten [168]. Bei Applikation von höheren Konzentrationen erreicht die Aktivität nach 6h die Sättigung. Aus diesem Grund wurde entschieden, für die folgenden Versuche eine Konzentration von 5µM BPOH zu verwenden. Die Beobachtung, dass BP3S stärker transportiert wird als BP3G, kann mehrere Ursachen haben. Der Unterschied kann darauf beruhen, dass BCRP eventuell eine höhere Affinität für sulfatierte Substanzen hat. Ein weiterer Grund könnte sein, dass die Sulfotransferasen in dem verwendeten Zellsystem eine höhere Aktivität

besitzen und somit mehr sulfatiertes Substrat zur Verfügung steht. Eine andere Möglichkeit wäre die Beteiligung eines weiteren Transporters. Um sicherzustellen, dass der apikale Transport von BP3S und BP3G nur durch BCRP katalysiert wird, wurde deshalb ein Experiment mit dem spezifischen BCRP Inhibitor KO143 durchgeführt. Dieser Inhibitor hemmt die ATPase Aktivität des BCRP und unterdrückt somit den Substratexport [225]. Die Ergebnisse zeigen, dass die Anreicherung von BP3S und BP3G im Medium gleichmäßig um 50% gehemmt wird. Da selektiv nur die Aktivität des BCRP gehemmt wurde, ist davon auszugehen, dass dieses Protein ausschließlich für den apikalen Transport verantwortlich ist.

Des Weiteren wurde beobachtet, dass der Großteil der Exkretion von BP3S und BP3G über die apikale Membran vermittelt wird. Die Transportkapazität war hier etwa 10-mal größer als auf der basolateralen Seite. Durch diesen Mechanismus wird verhindert, dass toxische Substanzen weiter in den Organismus verteilt werden. Auch wenn das eigentliche Entgiftungsorgan die Leber ist, kommt dem Darm eine wichtige Aufgabe bei der ersten Eliminierung von Fremdstoffen bei. Durch die erhöhte Exkretion von BP3S und BP3G über die apikale Membran wird deutlich, dass durch BCRP bereits eine erste Barriere gegen lipophile toxische Substanzen errichtet ist.

4.3.4 Einfluß von Flavonoiden auf den Export von konjugiertem B(a)P

Die Untersuchungen zum Einfluss der Flavonoide auf den zellulären Export von BP3S und BP3G ergeben, dass alle Flavonoide, mit Ausnahme von EGCG, eine dosisabhängige Inhibierung des Transports verursachen. Höchstwahrscheinlich ist dieser Effekt unspezifisch und beruht auf kompetitiver Inhibierung. Als Beweis für diese Annahmen sprechen mehrere Fakten. Der Transport von BP3S und BP3G wird auf der apikalen und basolateralen Seite inhibiert. Bei einer spezifischen Inhibierung wäre der Export nur auf einer der beiden Seiten beeinflusst, weil ABC-Transporter gezielt nur an jeweils einer Membranseite lokalisiert sind. Eine weitere Beobachtung ist, dass der Transport von BP3S stärker inhibiert wird als der von BP3G. Ursache hierfür ist möglicherweise, dass BP3S und BP3G unterschiedlich stark durch Flavonoide verdrängt werden. In Versuchen an primären humanen Hepatozyten konnte gezeigt werden, dass nach der Behandlung der Zellen mit dem Flavonoid Galangin hauptsächlich drei Isomere entstanden, zwei verschiedene Glucuronsäurekonjugate und ein Sulfokonjugat [226]. Möglicherweise verdrängen die konjugierten Flavonoide das konjugierte B(a)P und konkurrieren um die Substratbindestelle des BCRP. In einer Reihe von weiteren Studien konnte dokumentiert werden, dass Flavonoide wie z.B. Quercetin, Luteolin und Chrysin glu-

curonidiert werden [227-229]. In Studien an Caco2 Zellen konnte gezeigt werden, dass Apigenin in der Zelle sulfatiert und glucuronidiert und durch MRPs aus der Zelle heraus transportiert wird [230]. Die Zellen wurden dafür mit 10 μ M Apigenin behandelt und der intrazelluläre Gehalt an konjugiertem Apigenin durch HPLC-Analysen bestimmt. Durch Verwendung von MRP spezifischen Inhibitoren wie Leukotrin C4 und MK-571 wurde der Export der Konjugate inhibiert. Diese Daten deuten darauf hin, dass Flavonoide auf die gleiche Weise wie PAHs konjugiert werden und beim Export um die Transportproteine konkurrieren. Unabhängig von diesen Ergebnissen gibt es Hinweise aus der Literatur die darauf hindeuten, dass Flavonoide auch spezifisch ABC-Transporter inhibieren können. In Versuchen mit rekombinant überexprimierter NBD eines Maus MRP-Protein wurde untersucht, ob Luteolin an die NBD binden kann [231]. Dafür wurde die Fluoreszenz eines Tryptophanrestes in der NBD gemessen. Durch Bindung des ATP an die NBD wird die Fluoreszenz des Tryptophan gelöscht, der gleiche Mechanismus unterliegt der Bindung von Luteolin. Die Autoren konnten nachweisen, dass Luteolin die Fluoreszenz des Tryptophanrestes in der NBD löschen kann und somit bindet. Die NBD ist in der Familie der ABC-Transporter stark konserviert, weshalb dieser Mechanismus auch für BCRP gelten könnte. In einer anderen Studie wurde ein ähnlicher Mechanismus beobachtet. Durch Versuche mit einem rekombinanten c-terminalen Teilstück des Maus p-Glykoproteins in dem die Nukleotidbindedomäne (NBD) enthalten war, konnte gezeigt werden, dass Flavonoide die Bindung eines fluoreszierenden ATP-Analog verhindern [232]. In dieser Studie wurde jedoch auch gezeigt, dass die Bindung von Steroiden an die Substratbindestelle des p-Glykoprotein durch Flavonoide verhindert wird. Dadurch wird angedeutet, dass Flavonoide auch als Substrat dienen können, was wiederum für eine kompetitive Verdrängung bei der Inhibierung des B(a)P Exports spricht. Diese beiden Studien haben jedoch ergeben, dass die Aktivität der Transporter durch Verhinderung der ATPase Aktivität möglich ist. Die Versuche wurden allerdings mit rekombinantem Protein durchgeführt, die tatsächliche Situation *in vivo* muss unter Umständen differenzierter betrachtet werden. In Anbetracht der hier präsentierten Daten ist von einer kompetitiven Inhibierung des apikalen und basolateralen Transports auszugehen.

4.3.5 Kooperative Effekte von Flavonoiden mit KO143

Um den Mechanismus genauer aufzuklären wie die Flavonoide die Aktivität der Transporter inhibieren, wurde untersucht, welche Effekte die Kobelastung mit dem spezifischen BCRP Inhibitor KO143 hat. Wenn beide Substanzen über den gleichen Mechanismus wirken, wäre in diesem Versuch eine Verstärkung des Effekts proportional zur Konzentration zu erwarten.

Die Ergebnisse zeigen jedoch, dass die zusätzliche Applikation der Flavonoide den apikalen Transport komplett blockiert und dies bei relativ niedrigen Konzentrationen von $5\mu\text{M}$. Zum Vergleich, bei $50\mu\text{M}$ des effektivsten Flavonoids Luteolin ist immer noch eine geringe Transportkapazität detektierbar. Im Gegensatz zum apikalen Transport wird durch die Belastung mit dem spezifischen Inhibitor der Transport auf der basolateralen Seite signifikant erhöht. Dies ist höchstwahrscheinlich auf eine erhöhte Aktivität von basolateralen ABC-Transportern zurückzuführen, die aufgrund der erhöhten Substrat-Akkumulation verstärkt arbeiten. Kandidaten, die den Transport von BP3S und BP3G basolateral katalysieren, wurden bisher noch nicht identifiziert. Aufgrund des überlappenden Substratspektrums sind hierfür vermutlich MRP1 und MRP3 verantwortlich [224]. Durch die Koinkubation mit Flavonoiden wird kein zusätzlicher Effekt auf den basolateralen Transport beobachtet.

Zusammen mit den Ergebnissen des vorherigen Versuches ist davon auszugehen, dass Flavonoide ihre inhibitorischen Effekte auf den Transport durch einen anderen Mechanismus als die Hemmung der ATP-Bindung ausüben, vermutlich durch kompetitive Inhibition.

4.3.6 Intrazelluläre Akkumulation von B(a)P durch Flavonoide

In unseren Versuchen konnten wir zeigen, dass durch Luteolin, Baicalein und Fisetin der Export von konjugiertem B(a)P vermindert wird. Daher haben wir in einem weiteren Experiment untersucht, ob es durch Flavonoide zu einer intrazellulären Akkumulation von B(a)P kommt. Da wir zeigen konnten, dass die inhibierenden Effekte von allen Flavonoiden ähnlich stark ausfielen, haben wir bei diesem Experiment Luteolin als repräsentatives Flavonoid verwendet. Die Inkubationszeit betrug wie bei den Versuchen zum Transport 8h. Tatsächlich konnten wir nachweisen, dass es durch Luteolin zu einer 4-fach höheren Akkumulation von B(a)P in Caco2 Zellen kommt. Dieses Ergebnis wird unterstützt durch Befunde die zeigen, dass durch Flavonoide die intrazelluläre Akkumulation von Mitoxantron gefördert wird. Bei diesem Zytostatikum handelt es sich um ein Chemotherapeutikum, das nur von BCRP transportiert wird, nicht aber von anderen ABC-Transportern. In MCF/MR Zellen, die BCRP überexprimieren, kam es nach Behandlung mit je $30\mu\text{M}$ Sylimarin, Hesperetin, Quercetin, Daidzein und Resveratrol zu einer erhöhten intrazellulären Mitoxantron Akkumulation [233]. Der gleiche Effekt wurde in MCF-7 MX100 Zellen beobachtet, bei denen insgesamt 23 verschiedene Flavonoide getestet wurden [234]. Ob die Anreicherung des B(a)P bereits negative Folgen hat, kann aus den vorliegenden Daten nicht abgeleitet werden. B(a)P kann auch durch andere Systeme wie zum Beispiel der COX2 und der CYP3A4 metabolisiert werden [235;236]. Die geringe Substratspezifität von Fremdstoffen auf das P450 kann möglicherweise die beschriebenen Effekte

auf Transport und Metabolismus kompensieren. Der hochtoxische B(a)P Metabolit B(a)P-7,8-diol-9,10-Epoxid wird ausschließlich mit Glutathion konjugiert und nur durch MRPs transportiert, wie an Studien mit Caco2 Zellen herausgefunden wurde [237]. Es wäre also auch möglich, dass in den Zellen vermehrt die Konjugation mit Glutathion und somit die Exkretion über andere Transporter als Kompensation stattfindet. Die Versuche mit dem spezifischen BCRP Inhibitor haben gezeigt, dass zumindest auf der basolateralen Seite der Export von BP3S und BP3G erhöht wird, die Zelle also in der Lage ist, kompensatorisch auf inhibierte ABC-Transporter zu reagieren.

4.4 Zusammenfassung und Bewertung der Befunde

Kritisches Zielorgan für die übermäßige Aufnahme von Nahrungsmittelinhaltsstoffen und Nahrungsmittelkontaminanten ist der Darm. Die Befunde dieser Arbeit zeigen, dass die Hemmung der Phase 1 und 3 in einer Akkumulation von Fremdstoffen resultiert. Diese Ergebnisse sind relevant im Bezug auf die Verwendung von mit Flavonoiden angereicherten Nahrungsmittelpräparaten. Die Verwendung dieser Präparate kann möglicherweise dazu führen, dass Umweltchemikalien, die durch die Nahrung aufgenommen werden, verzögert metabolisiert werden und adverse Effekte ausüben können. Des Weiteren können Flavonoide durch Hemmung des fremdstoffmetabolisierenden Systems die Wirkung von Arzneimittel beeinflussen und schädigende Nebenwirkungen hervorrufen. Die natürliche Aufnahme von Flavonoiden durch Verzehr von Obst oder Gemüse ist bedenkenlos. Die Verwendung von Flavonoid-Präparaten muss kritisch betrachtet werden, da die toxischen Eigenschaften noch unzureichend charakterisiert sind. Inwieweit die erzielten Ergebnisse für den Organismus relevant sind, muss durch entsprechende tierexperimentelle Untersuchungen erhärtet werden, da schon wie von Paracelsus (1493-1541) beschrieben, alle Substanzen in entsprechenden Konzentrationen für lebende Organismen giftig sein können.

5 Zusammenfassung

Aus der Literatur gibt es zahlreiche Hinweise, dass Flavonoide die Toxikodynamik und Toxikokinetik von Umweltchemikalien beeinflussen können. Ein kritisches Zielorgan dieser Substanzen ist der Darm, der über die Nahrung einer Vielzahl von Fremdstoffen ausgesetzt ist. Das fremdstoffmetabolisierende System reguliert die Kinetik, Bioverfügbarkeit und die biologischen Wirkungen von Chemikalien. Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit die Wirkung von den Arylhydrokarbon Rezeptor (AhR) antagonistischen Flavonoiden Luteolin, Baicalein, Fisetin und Epigallocatechin Gallat (EGCG) auf diese Stoffwechselprozesse untersucht. Als Untersuchungsmodell diente die Kolonkarzinomzelllinie Caco2. Die Arbeit umfasste eine detaillierte Untersuchung auf allen drei Ebenen des Fremdstoffmetabolismus.

Die Untersuchungen zur Phase 1 Reaktion haben ergeben, dass die Flavonoide Luteolin, Baicalein und Fisetin die B(a)P induzierte mRNA-Expression und Aktivität von CYP1-Enzymen dosisabhängig inhibieren. EGCG zeigte in diesen, wie auch in allen anderen Versuchen, keinen Effekt. Die Untersuchungen zur Aktivität von Sulfotransferasen und Glucuronidasen zeigen, dass die hier getesteten Flavonoide die B(a)P induzierte mRNA-Expression der UGT1A1 hemmen. Die Flavonoide haben aber keinen Effekt auf die Aktivität der Enzyme. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die mRNA-Expression des ABC-Transporter BCRP durch den AhR Agonisten 3MC induziert wird. Die mRNA-Induktion kann durch den AhR-Antagonisten MNF und AhR-shRNA blockiert werden. In Reporter-genversuchen konnte nachgewiesen werden, dass im Promotorbereich des BCRP eine funktionelle AhR XRE-Bindestelle lokalisiert ist, was eine Beteiligung des AhR an der transkriptionellen Regulation des BCRP belegt. Sowohl der apikale, BCRP vermittelte, als auch der basolaterale Export von konjugiertem B(a)P wird dosisabhängig durch die Flavonoide Luteolin, Baicalein und Fisetin inhibiert. Als möglicher Mechanismus wird sowohl kompetitive Interaktion am ABC-Transporter, als auch eine Hemmung der ATP-Bindung bzw. der ATPase-Aktivität diskutiert. Die Inhibierung des Exports durch Flavonoide resultiert in einer intrazellulären Akkumulation des B(a)P. Diese Befunde zeigen, dass Umweltchemikalien durch Flavonoide verzögert metabolisiert werden und somit zu einer Erhöhung der Körperlast von unerwünschten Stoffen beitragen. Die Aufnahme von Flavonoiden durch Verzehr von Obst oder Gemüse ist bedenkenlos, die Verwendung von Flavonoid-Präparaten ist jedoch kritisch zu betrachten.

6 Literaturverzeichnis

1. Hodek P, Trefil P, and Stiborova M, Flavonoids-potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes P450. *Chem.Biol.Interact.* 139: 1-21, 2002.
2. Pietta PG, Flavonoids as antioxidants. *J.Nat.Prod.* 63: 1035-1042, 2000.
3. Dixon RA and Harrison MJ, Activation, structure, and organization of genes involved in microbial defense in plants. *Adv.Genet.* 28: 165-234, 1990.
4. Cermak R, Effect of dietary flavonoids on pathways involved in drug metabolism. *Expert.Opin.Drug Metab Toxicol.* 4: 17-35, 2008.
5. Manach C, Williamson G, Morand C, Scalbert A, and Remesy C, Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *Am.J.Clin.Nutr.* 81: 230S-242S, 2005.
6. Walgren RA, Lin JT, Kinne RK, and Walle T, Cellular uptake of dietary flavonoid quercetin 4'-beta-glucoside by sodium-dependent glucose transporter SGLT1. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 294: 837-843, 2000.
7. Ferguson LR, Role of plant polyphenols in genomic stability. *Mutat.Res.* 475: 89-111, 2001.
8. Manthey JA, Biological properties of flavonoids pertaining to inflammation. *Micro-circulation.* 7: S29-S34, 2000.
9. Chao SH, Fujinaga K, Marion JE, Taube R, Sausville EA, Senderowicz AM, Peterlin BM, and Price DH, Flavopiridol inhibits P-TEFb and blocks HIV-1 replication. *J.Biol.Chem.* 275: 28345-28348, 2000.
10. Lopez-Lazaro M, Distribution and biological activities of the flavonoid luteolin. *Mini.Rev.Med.Chem.* 9: 31-59, 2009.
11. Deschamps JD, Kenyon VA, and Holman TR, Baicalein is a potent in vitro inhibitor against both reticulocyte 15-human and platelet 12-human lipooxygenases. *Bio-org.Med.Chem.* 14: 4295-4301, 2006.
12. Khan N, Afaq F, Syed DN, and Mukhtar H, Fisetin, a novel dietary flavonoid, causes apoptosis and cell cycle arrest in human prostate cancer LNCaP cells. *Carcinogenesis* 29: 1049-1056, 2008.
13. Tachibana H, Koga K, Fujimura Y, and Yamada K, A receptor for green tea polyphenol EGCG. *Nat.Struct.Mol.Biol.* 11: 380-381, 2004.
14. Wattenberg LW, Inhibition of carcinogenesis by minor dietary constituents. *Cancer Res.* 52: 2085s-2091s, 1992.
15. Chun YJ, Kim MY, and Guengerich FP, Resveratrol is a selective human cytochrome P450 1A1 inhibitor. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 262: 20-24, 1999.

16. Ahn D, Putt D, Kresty L, Stoner GD, Fromm D, and Hollenberg PF, The effects of dietary ellagic acid on rat hepatic and esophageal mucosal cytochromes P450 and phase II enzymes. *Carcinogenesis* 17: 821-828, 1996.
17. Surh YJ, Lee RC, Park KK, Mayne ST, Liem A, and Miller JA, Chemoprotective effects of capsaicin and diallyl sulfide against mutagenesis or tumorigenesis by vinyl carbamate and N-nitrosodimethylamine. *Carcinogenesis* 16: 2467-2471, 1995.
18. Eaton EA, Walle UK, Lewis AJ, Hudson T, Wilson AA, and Walle T, Flavonoids, potent inhibitors of the human P-form phenolsulfotransferase. Potential role in drug metabolism and chemoprevention. *Drug Metab Dispos.* 24: 232-237, 1996.
19. Glatt H, Sulfotransferases in the bioactivation of xenobiotics. *Chem.Biol.Interact.* 129: 141-170, 2000.
20. Glatt H, Engelke CE, Pabel U, Teubner W, Jones AL, Coughtrie MW, Andrae U, Falany CN, and Meinel W, Sulfotransferases: genetics and role in toxicology. *Toxicol.Lett.* 112-113: 341-348, 2000.
21. Galati G and O'Brien PJ, Potential toxicity of flavonoids and other dietary phenolics: significance for their chemopreventive and anticancer properties. *Free Radic.Biol.Med.* 37: 287-303, 2004.
22. Decker EA, Phenolics: prooxidants or antioxidants? *Nutr.Rev.* 55: 396-398, 1997.
23. Li Y and Trush MA, Reactive oxygen-dependent DNA damage resulting from the oxidation of phenolic compounds by a copper-redox cycle mechanism. *Cancer Res.* 54: 1895s-1898s, 1994.
24. Yamanaka N, Oda O, and Nagao S, Green tea catechins such as (-)-epicatechin and (-)-epigallocatechin accelerate Cu²⁺-induced low density lipoprotein oxidation in propagation phase. *FEBS Lett.* 401: 230-234, 1997.
25. Hirose M, Hoshiya T, Mizoguchi Y, Nakamura A, Akagi K, and Shirai T, Green tea catechins enhance tumor development in the colon without effects in the lung or thyroid after pretreatment with 1,2-Dimethylhydrazine or 2,2'-dihydroxy-di-n-propylnitrosamine in male F344 rats. *Cancer Lett.* 168: 23-29, 2001.
26. Ferguson LR and Baguley BC, Topoisomerase II enzymes and mutagenicity. *Environ.Mol.Mutagen.* 24: 245-261, 1994.
27. Fotsis T, Pepper M, Adlercreutz H, Fleischmann G, Hase T, Montesano R, and Schweigerer L, Genistein, a dietary-derived inhibitor of in vitro angiogenesis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 90: 2690-2694, 1993.
28. Kondo K, Tsuneizumi K, Watanabe T, and Oishi M, Induction of in vitro differentiation of mouse embryonal carcinoma (F9) cells by inhibitors of topoisomerases. *Cancer Res.* 51: 5398-5404, 1991.
29. McCabe MJ, Jr. and Orrenius S, Genistein induces apoptosis in immature human thymocytes by inhibiting topoisomerase-II. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 194: 944-950, 1993.

30. Watanabe T, Kondo K, and Oishi M, Induction of in vitro differentiation of mouse erythroleukemia cells by genistein, an inhibitor of tyrosine protein kinases. *Cancer Res.* 51: 764-768, 1991.
31. Massari ME and Murre C, Helix-loop-helix proteins: regulators of transcription in eucaryotic organisms. *Mol.Cell Biol.* 20: 429-440, 2000.
32. Nambu JR, Lewis JO, Wharton KA, Jr., and Crews ST, The *Drosophila* single-minded gene encodes a helix-loop-helix protein that acts as a master regulator of CNS midline development. *Cell* 67: 1157-1167, 1991.
33. Butler RA, Kelley ML, Powell WH, Hahn ME, and Van Beneden RJ, An aryl hydrocarbon receptor (AHR) homologue from the soft-shell clam, *Mya arenaria*: evidence that invertebrate AHR homologues lack 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and beta-naphthoflavone binding. *Gene* 278: 223-234, 2001.
34. Crews ST and Fan CM, Remembrance of things PAS: regulation of development by bHLH-PAS proteins. *Curr.Opin.Genet.Dev.* 9: 580-587, 1999.
35. Taylor BL and Zhulin IB, PAS domains: internal sensors of oxygen, redox potential, and light. *Microbiol.Mol.Biol.Rev.* 63: 479-506, 1999.
36. Kewley RJ, Whitelaw ML, and Chapman-Smith A, The mammalian basic helix-loop-helix/PAS family of transcriptional regulators. *Int.J.Biochem.Cell Biol.* 36: 189-204, 2004.
37. Hahn ME, Karchner SI, Shapiro MA, and Perera SA, Molecular evolution of two vertebrate aryl hydrocarbon (dioxin) receptors (AHR1 and AHR2) and the PAS family. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 94: 13743-13748, 1997.
38. Poland A, Glover E, and Kende AS, Stereospecific, high affinity binding of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin by hepatic cytosol. Evidence that the binding species is receptor for induction of aryl hydrocarbon hydroxylase. *J.Biol.Chem.* 251: 4936-4946, 1976.
39. Denison MS and Heath-Pagliuso S, The Ah receptor: a regulator of the biochemical and toxicological actions of structurally diverse chemicals. *Bull.Environ.Contam Toxicol.* 61: 557-568, 1998.
40. Safe S, Polychlorinated biphenyls (PCBs), dibenzo-p-dioxins (PCDDs), dibenzofurans (PCDFs), and related compounds: environmental and mechanistic considerations which support the development of toxic equivalency factors (TEFs). *Crit Rev.Toxicol.* 21: 51-88, 1990.
41. Poland A and Knutson JC, 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and related halogenated aromatic hydrocarbons: examination of the mechanism of toxicity. *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.* 22: 517-554, 1982.
42. Fernandez-Salguero PM, Hilbert DM, Rudikoff S, Ward JM, and Gonzalez FJ, Aryl-hydrocarbon receptor-deficient mice are resistant to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced toxicity. *Toxicol.Appl.Pharmacol.* 140: 173-179, 1996.

43. Hundeiker C, Pineau T, Cassar G, Betensky RA, Gleichmann E, and Esser C, Thymocyte development in Ah-receptor-deficient mice is refractory to TCDD-inducible changes. *Int.J.Immunopharmacol.* 21: 841-859, 1999.
44. Mimura J, Yamashita K, Nakamura K, Morita M, Takagi TN, Nakao K, Ema M, Sogawa K, Yasuda M, Katsuki M, and Fujii-Kuriyama Y, Loss of teratogenic response to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in mice lacking the Ah (dioxin) receptor. *Genes Cells* 2: 645-654, 1997.
45. Schmidt JV, Su GH, Reddy JK, Simon MC, and Bradfield CA, Characterization of a murine Ahr null allele: involvement of the Ah receptor in hepatic growth and development. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 93: 6731-6736, 1996.
46. Thurmond TS, Silverstone AE, Baggs RB, Quimby FW, Staples JE, and Gasiewicz TA, A chimeric aryl hydrocarbon receptor knockout mouse model indicates that aryl hydrocarbon receptor activation in hematopoietic cells contributes to the hepatic lesions induced by 2,3,7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Toxicol.Appl.Pharmacol.* 158: 33-40, 1999.
47. Safe S, Molecular biology of the Ah receptor and its role in carcinogenesis. *Toxicol.Lett.* 120: 1-7, 2001.
48. Schwarz M, Buchmann A, Stinchcombe S, Kalkuhl A, and Bock K, Ah receptor ligands and tumor promotion: survival of neoplastic cells. *Toxicol.Lett.* 112-113: 69-77, 2000.
49. Schwarz M and Appel KE, Carcinogenic risks of dioxin: mechanistic considerations. *Regul.Toxicol.Pharmacol.* 43: 19-34, 2005.
50. Kim DW, Gazourian L, Quadri SA, Romieu-Mourez R, Sherr DH, and Sonenshein GE, The RelA NF-kappaB subunit and the aryl hydrocarbon receptor (AhR) cooperate to transactivate the c-myc promoter in mammary cells. *Oncogene* 19: 5498-5506, 2000.
51. Yang X, Liu D, Murray TJ, Mitchell GC, Hesterman EV, Karchner SI, Merson RR, Hahn ME, and Sherr DH, The aryl hydrocarbon receptor constitutively represses c-myc transcription in human mammary tumor cells. *Oncogene* 24: 7869-7881, 2005.
52. Pitot HC, Goldsworthy T, Campbell HA, and Poland A, Quantitative evaluation of the promotion by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin of hepatocarcinogenesis from diethylnitrosamine. *Cancer Res.* 40: 3616-3620, 1980.
53. Moolgavkar SH, Luebeck EG, Buchmann A, and Bock KW, Quantitative analysis of enzyme-altered liver foci in rats initiated with diethylnitrosamine and promoted with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin or 1,2,3,4,6,7,8-heptachlorodibenzo-p-dioxin. *Toxicol.Appl.Pharmacol.* 138: 31-42, 1996.
54. Luebeck EG, Buchmann A, Stinchcombe S, Moolgavkar SH, and Schwarz M, Effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on initiation and promotion of GST-P-positive foci in rat liver: A quantitative analysis of experimental data using a stochastic model. *Toxicol.Appl.Pharmacol.* 167: 63-73, 2000.

55. Stinchcombe S, Buchmann A, Bock KW, and Schwarz M, Inhibition of apoptosis during 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-mediated tumour promotion in rat liver. *Carcinogenesis* 16: 1271-1275, 1995.
56. Boverhof DR, Tam E, Harney AS, Crawford RB, Kaminski NE, and Zacharewski TR, 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin induces suppressor of cytokine signaling 2 in murine B cells. *Mol.Pharmacol.* 66: 1662-1670, 2004.
57. Lawrence BP and Vorderstrasse BA, Activation of the aryl hydrocarbon receptor diminishes the memory response to homotypic influenza virus infection but does not impair host resistance. *Toxicol.Sci.* 79: 304-314, 2004.
58. Nohara K, Pan X, Tsukumo S, Hida A, Ito T, Nagai H, Inouye K, Motohashi H, Yamamoto M, Fujii-Kuriyama Y, and Tohyama C, Constitutively active aryl hydrocarbon receptor expressed specifically in T-lineage cells causes thymus involution and suppresses the immunization-induced increase in splenocytes. *J.Immunol.* 174: 2770-2777, 2005.
59. Fisher MT, Nagarkatti M, and Nagarkatti PS, 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin enhances negative selection of T cells in the thymus but allows autoreactive T cells to escape deletion and migrate to the periphery. *Mol.Pharmacol.* 67: 327-335, 2005.
60. Fernandez-Salguero PM, Ward JM, Sundberg JP, and Gonzalez FJ, Lesions of aryl-hydrocarbon receptor-deficient mice. *Vet.Pathol.* 34: 605-614, 1997.
61. Murphy KA, Villano CM, Dorn R, and White LA, Interaction between the aryl hydrocarbon receptor and retinoic acid pathways increases matrix metalloproteinase-1 expression in keratinocytes. *J.Biol.Chem.* 279: 25284-25293, 2004.
62. Peterson RE, Theobald HM, and Kimmel GL, Developmental and reproductive toxicity of dioxins and related compounds: cross-species comparisons. *Crit Rev.Toxicol.* 23: 283-335, 1993.
63. Thomae TL, Stevens EA, and Bradfield CA, Transforming growth factor-beta3 restores fusion in palatal shelves exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *J.Biol.Chem.* 280: 12742-12746, 2005.
64. Zhang S, Qin C, and Safe SH, Flavonoids as aryl hydrocarbon receptor agonists/antagonists: effects of structure and cell context. *Environ.Health Perspect.* 111: 1877-1882, 2003.
65. Denison MS and Nagy SR, Activation of the aryl hydrocarbon receptor by structurally diverse exogenous and endogenous chemicals. *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.* 43: 309-334, 2003.
66. Fritsche E, Schafer C, Calles C, Bernsmann T, Bernshausen T, Wurm M, Hubenthal U, Cline JE, Hajimiragha H, Schroeder P, Klotz LO, Rannug A, Furst P, Hanenberg H, Abel J, and Krutmann J, Lightning up the UV response by identification of the arylhydrocarbon receptor as a cytoplasmatic target for ultraviolet B radiation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 104: 8851-8856, 2007.

67. Walisser JA, Bunger MK, Glover E, and Bradfield CA, Gestational exposure of Ahr and Arnt hypomorphs to dioxin rescues vascular development. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 101: 16677-16682, 2004.
68. Hankinson O, The aryl hydrocarbon receptor complex. *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.* 35: 307-340, 1995.
69. Perdew GH and Bradfield CA, Mapping the 90 kDa heat shock protein binding region of the Ah receptor. *Biochem.Mol.Biol.Int.* 39: 589-593, 1996.
70. Fukunaga BN, Probst MR, Reisz-Porszasz S, and Hankinson O, Identification of functional domains of the aryl hydrocarbon receptor. *J.Biol.Chem.* 270: 29270-29278, 1995.
71. Reisz-Porszasz S, Probst MR, Fukunaga BN, and Hankinson O, Identification of functional domains of the aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator protein (ARNT). *Mol.Cell Biol.* 14: 6075-6086, 1994.
72. Felts SJ and Toft DO, p23, a simple protein with complex activities. *Cell Stress.Chaperones.* 8: 108-113, 2003.
73. Petrusis JR, Hord NG, and Perdew GH, Subcellular localization of the aryl hydrocarbon receptor is modulated by the immunophilin homolog hepatitis B virus X-associated protein 2. *J.Biol.Chem.* 275: 37448-37453, 2000.
74. Petrusis JR, Kusnadi A, Ramadoss P, Hollingshead B, and Perdew GH, The hsp90 Co-chaperone XAP2 alters importin beta recognition of the bipartite nuclear localization signal of the Ah receptor and represses transcriptional activity. *J.Biol.Chem.* 278: 2677-2685, 2003.
75. Gu YZ, Hogenesch JB, and Bradfield CA, The PAS superfamily: sensors of environmental and developmental signals. *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.* 40: 519-561, 2000.
76. Hoffman EC, Reyes H, Chu FF, Sander F, Conley LH, Brooks BA, and Hankinson O, Cloning of a factor required for activity of the Ah (dioxin) receptor. *Science* 252: 954-958, 1991.
77. Denison MS, Fisher JM, and Whitlock JP, Jr., The DNA recognition site for the dioxin-Ah receptor complex. Nucleotide sequence and functional analysis. *J.Biol.Chem.* 263: 17221-17224, 1988.
78. Denison MS, Fisher JM, and Whitlock JP, Jr., Inducible, receptor-dependent protein-DNA interactions at a dioxin-responsive transcriptional enhancer. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 85: 2528-2532, 1988.
79. Durrin LK, Jones PB, Fisher JM, Galeazzi DR, and Whitlock JP, Jr., 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin receptors regulate transcription of the cytochrome P1-450 gene. *J.Cell Biochem.* 35: 153-160, 1987.
80. Arany Z, Huang LE, Eckner R, Bhattacharya S, Jiang C, Goldberg MA, Bunn HF, and Livingston DM, An essential role for p300/CBP in the cellular response to hypoxia. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 93: 12969-12973, 1996.

81. Kallio PJ, Okamoto K, O'Brien S, Carrero P, Makino Y, Tanaka H, and Poellinger L, Signal transduction in hypoxic cells: inducible nuclear translocation and recruitment of the CBP/p300 coactivator by the hypoxia-inducible factor-1alpha. *EMBO J.* 17: 6573-6586, 1998.
82. Kobayashi A, Numayama-Tsuruta K, Sogawa K, and Fujii-Kuriyama Y, CBP/p300 functions as a possible transcriptional coactivator of Ah receptor nuclear translocator (Arnt). *J.Biochem.* 122: 703-710, 1997.
83. Carlson DB and Perdew GH, A dynamic role for the Ah receptor in cell signaling? Insights from a diverse group of Ah receptor interacting proteins. *J.Biochem.Mol.Toxicol.* 16: 317-325, 2002.
84. Davarinos NA and Pollenz RS, Aryl hydrocarbon receptor imported into the nucleus following ligand binding is rapidly degraded via the cytoplasmic proteasome following nuclear export. *J.Biol.Chem.* 274: 28708-28715, 1999.
85. Ma Q and Baldwin KT, 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced degradation of aryl hydrocarbon receptor (AhR) by the ubiquitin-proteasome pathway. Role of the transcription activator and DNA binding of AhR. *J.Biol.Chem.* 275: 8432-8438, 2000.
86. Ma Q and Baldwin KT, A cycloheximide-sensitive factor regulates TCDD-induced degradation of the aryl hydrocarbon receptor. *Chemosphere* 46: 1491-1500, 2002.
87. Bock KW and Kohle C, Ah receptor: dioxin-mediated toxic responses as hints to de-regulated physiologic functions. *Biochem.Pharmacol.* 72: 393-404, 2006.
88. Nebert DW, Dalton TP, Okey AB, and Gonzalez FJ, Role of aryl hydrocarbon receptor-mediated induction of the CYP1 enzymes in environmental toxicity and cancer. *J.Biol.Chem.* 279: 23847-23850, 2004.
89. Bock KW and Kohle C, Coordinate regulation of drug metabolism by xenobiotic nuclear receptors: UGTs acting together with CYPs and glucuronide transporters. *Drug Metab Rev.* 36: 595-615, 2004.
90. Prochaska HJ and Talalay P, Regulatory mechanisms of monofunctional and bifunctional anticarcinogenic enzyme inducers in murine liver. *Cancer Res.* 48: 4776-4782, 1988.
91. Ramos-Gomez M, Kwak MK, Dolan PM, Itoh K, Yamamoto M, Talalay P, and Kensler TW, Sensitivity to carcinogenesis is increased and chemoprotective efficacy of enzyme inducers is lost in *nrf2* transcription factor-deficient mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 98: 3410-3415, 2001.
92. Prochaska HJ and Talalay P, Regulatory mechanisms of monofunctional and bifunctional anticarcinogenic enzyme inducers in murine liver. *Cancer Res.* 48: 4776-4782, 1988.
93. Ma Q, Kinneer K, Bi Y, Chan JY, and Kan YW, Induction of murine NAD(P)H:quinone oxidoreductase by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin requires the CNC (cap 'n' collar) basic leucine zipper transcription factor Nrf2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2): cross-interaction between AhR (aryl hydrocarbon receptor) and Nrf2 signal transduction. *Biochem.J.* 377: 205-213, 2004.

94. Nebert DW and Gonzalez FJ, P450 genes and evolutionary genetics. *Hosp.Pract.(Off Ed)* 22: 63-74, 1987.
95. Mimura J, Ema M, Sogawa K, and Fujii-Kuriyama Y, Identification of a novel mechanism of regulation of Ah (dioxin) receptor function. *Genes Dev.* 13: 20-25, 1999.
96. Dunlap JC, Molecular bases for circadian clocks. *Cell* 96: 271-290, 1999.
97. Makino Y, Uenishi R, Okamoto K, Isoe T, Hosono O, Tanaka H, Kanopka A, Poellinger L, Haneda M, and Morimoto C, Transcriptional up-regulation of inhibitory PAS domain protein gene expression by hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1): a negative feedback regulatory circuit in HIF-1-mediated signaling in hypoxic cells. *J.Biol.Chem.* 282: 14073-14082, 2007.
98. Hahn ME, Allan LL, and Sherr DH, Regulation of constitutive and inducible AHR signaling: complex interactions involving the AHR repressor. *Biochem.Pharmacol.* 77: 485-497, 2009.
99. Haarmann-Stemmann T, Bothe H, Kohli A, Sydlik U, Abel J, and Fritsche E, Analysis of the transcriptional regulation and molecular function of the aryl hydrocarbon receptor repressor in human cell lines. *Drug Metab Dispos.* 35: 2262-2269, 2007.
100. Oshima M, Mimura J, Yamamoto M, and Fujii-Kuriyama Y, Molecular mechanism of transcriptional repression of AhR repressor involving ANKRA2, HDAC4, and HDAC5. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 364: 276-282, 2007.
101. Korkalainen M, Tuomisto J, and Pohjanvirta R, Primary structure and inducibility by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) of aryl hydrocarbon receptor repressor in a TCDD-sensitive and a TCDD-resistant rat strain. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 315: 123-131, 2004.
102. Tsuchiya Y, Nakajima M, Itoh S, Iwanari M, and Yokoi T, Expression of aryl hydrocarbon receptor repressor in normal human tissues and inducibility by polycyclic aromatic hydrocarbons in human tumor-derived cell lines. *Toxicol.Sci.* 72: 253-259, 2003.
103. Bernshausen T, Jux B, Esser C, Abel J, and Fritsche E, Tissue distribution and function of the Aryl hydrocarbon receptor repressor (AhRR) in C57BL/6 and Aryl hydrocarbon receptor deficient mice. *Arch.Toxicol.* 80: 206-211, 2006.
104. Korkalainen M, Linden J, Tuomisto J, and Pohjanvirta R, Effect of TCDD on mRNA expression of genes encoding bHLH/PAS proteins in rat hypothalamus. *Toxicology* 208: 1-11, 2005.
105. Eguchi H, Ikuta T, Tachibana T, Yoneda Y, and Kawajiri K, A nuclear localization signal of human aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator/hypoxia-inducible factor 1beta is a novel bipartite type recognized by the two components of nuclear pore-targeting complex. *J.Biol.Chem.* 272: 17640-17647, 1997.
106. Whitelaw ML, Gustafsson JA, and Poellinger L, Identification of Transactivation and Repression Functions of the Dioxin Receptor and Its Basic Helix-Loop-Helix/Pas

- Partner Factor Arnt - Inducible Versus Constitutive Modes of Regulation. *Molecular and Cellular Biology* 14: 8343-8355, 1994.
107. Semenza GL, HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia. *J.Appl.Physiol* 88: 1474-1480, 2000.
 108. Hickey MM and Simon MC, Regulation of angiogenesis by hypoxia and hypoxia-inducible factors. *Curr.Top.Dev.Biol.* 76: 217-257, 2006.
 109. Kobayashi A, NumayamaTsuruta K, Sogawa K, and FujiiKuriyama Y, CBP/p300 functions as a possible transcriptional coactivator of Ah receptor nuclear translocator (Arnt). *Journal of Biochemistry* 122: 703-710, 1997.
 110. Fujii-Kuriyama Y and Mimura J, Molecular mechanisms of AhR functions in the regulation of cytochrome P450 genes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 338: 311-317, 2005.
 111. Kozak KR, Abbott B, and Hankinson O, ARNT-deficient mice and placental differentiation. *Dev.Biol.* 191: 297-305, 1997.
 112. Antonsson C, Arulampalam V, Whitelaw ML, Pettersson S, and Poellinger L, Constitutive Function of the Basic Helix-Loop-Helix Pas Factor Arnt - Regulation of Target Promoters Via the E-Box Motif. *Journal of Biological Chemistry* 270: 13968-13972, 1995.
 113. Hoffman EC, Reyes H, Chu FF, Sander F, Conley LH, Brooks BA, and Hankinson O, Cloning of A Factor Required for Activity of the Ah (Dioxin) Receptor. *Science* 252: 954-958, 1991.
 114. Nebert DW, Dalton TP, Okey AB, and Gonzalez FJ, Role of aryl hydrocarbon receptor-mediated induction of the CYP1 enzymes in environmental toxicity and cancer. *J.Biol.Chem.* 279: 23847-23850, 2004.
 115. Kawajiri K, Watanabe J, and Hayashi S, Identification of allelic variants of the human CYP1A1 gene. *Methods Enzymol.* 272: 226-232, 1996.
 116. Mathis JM, Houser WH, Bresnick E, Cidlowski JA, Hines RN, Prough RA, and Simpson ER, Glucocorticoid regulation of the rat cytochrome P450c (P450IA1) gene: receptor binding within intron I. *Arch.Biochem.Biophys.* 269: 93-105, 1989.
 117. Jin CJ, Miners JO, Burchell B, and Mackenzie PI, The glucuronidation of hydroxylated metabolites of benzo[a]pyrene and 2-acetylaminofluorene by cDNA-expressed human UDP-glucuronosyltransferases. *Carcinogenesis* 14: 2637-2639, 1993.
 118. Coffman BL, King CD, Rios GR, and Tephly TR, The glucuronidation of opioids, other xenobiotics, and androgens by human UGT2B7Y(268) and UGT2B7H(268). *Drug Metab Dispos.* 26: 73-77, 1998.
 119. Formelli F, Barua AB, and Olson JA, Bioactivities of N-(4-hydroxyphenyl) retinamide and retinoyl beta-glucuronide. *FASEB J.* 10: 1014-1024, 1996.
 120. Evans WE and Relling MV, Pharmacogenomics: translating functional genomics into rational therapeutics. *Science* 286: 487-491, 1999.

121. Nowell SA, Massengill JS, Williams S, Radomska-Pandya A, Tephly TR, Cheng Z, Strassburg CP, Tukey RH, MacLeod SL, Lang NP, and Kadlubar FF, Glucuronidation of 2-hydroxyamino-1-methyl-6-phenylimidazo[4, 5-b]pyridine by human microsomal UDP-glucuronosyltransferases: identification of specific UGT1A family isoforms involved. *Carcinogenesis* 20: 1107-1114, 1999.
122. Bartsch H, Petruzzelli S, De FS, Hietanen E, Camus AM, Castegnaro M, Alexandrov K, Rojas M, Saracci R, and Giuntini C, Carcinogen metabolism in human lung tissues and the effect of tobacco smoking: results from a case-control multicenter study on lung cancer patients. *Environ.Health Perspect.* 98: 119-124, 1992.
123. Jin CJ, Miners JO, Burchell B, and Mackenzie PI, The glucuronidation of hydroxylated metabolites of benzo[a]pyrene and 2-acetylaminofluorene by cDNA-expressed human UDP-glucuronosyltransferases. *Carcinogenesis* 14: 2637-2639, 1993.
124. Orzechowski A, Schrenk D, Bock-Hennig BS, and Bock KW, Glucuronidation of carcinogenic arylamines and their N-hydroxy derivatives by rat and human phenol UDP-glucuronosyltransferase of the UGT1 gene complex. *Carcinogenesis* 15: 1549-1553, 1994.
125. Bock KW and Schirmer G, Species differences of glucuronidation and sulfation in relation to hepatocarcinogenesis. *Arch.Toxicol.Suppl* 10: 125-135, 1987.
126. Stillwell WG, Turesky RJ, Sinha R, and Tannenbaum SR, N-oxidative metabolism of 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline (MeIQx) in humans: excretion of the N2-glucuronide conjugate of 2-hydroxyamino-MeIQx in urine. *Cancer Res.* 59: 5154-5159, 1999.
127. Vienneau DS, DeBoni U, and Wells PG, Potential genoprotective role for UDP-glucuronosyltransferases in chemical carcinogenesis: initiation of micronuclei by benzo(a)pyrene and benzo(e)pyrene in UDP-glucuronosyltransferase-deficient cultured rat skin fibroblasts. *Cancer Res.* 55: 1045-1051, 1995.
128. Kim PM and Wells PG, Genoprotection by UDP-glucuronosyltransferases in peroxidase-dependent, reactive oxygen species-mediated micronucleus initiation by the carcinogens 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone and benzo[a]pyrene. *Cancer Res.* 56: 1526-1532, 1996.
129. Belanger A, Hum DW, Beaulieu M, Levesque E, Guillemette C, Tchernof A, Belanger G, Turgeon D, and Dubois S, Characterization and regulation of UDP-glucuronosyltransferases in steroid target tissues. *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* 65: 301-310, 1998.
130. Liu J, Liu Y, Barter RA, and Klaassen CD, Alteration of thyroid homeostasis by UDP-glucuronosyltransferase inducers in rats: a dose-response study. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 273: 977-985, 1995.
131. Jude AR, Little JM, Bull AW, Podgorski I, and Radomska-Pandya A, 13-hydroxy- and 13-oxooctadecadienoic acids: novel substrates for human UDP-glucuronosyltransferases. *Drug Metab Dispos.* 29: 652-655, 2001.

132. Monaghan G, Clarke DJ, Povey S, See CG, Boxer M, and Burchell B, Isolation of a human YAC contig encompassing a cluster of UGT2 genes and its regional localization to chromosome 4q13. *Genomics* 23: 496-499, 1994.
133. Turgeon D, Carrier JS, Levesque E, Beatty BG, Belanger A, and Hum DW, Isolation and characterization of the human UGT2B15 gene, localized within a cluster of UGT2B genes and pseudogenes on chromosome 4. *J.Mol.Biol.* 295: 489-504, 2000.
134. Beaulieu M, Levesque E, Tchernof A, Beatty BG, Belanger A, and Hum DW, Chromosomal localization, structure, and regulation of the UGT2B17 gene, encoding a C19 steroid metabolizing enzyme. *DNA Cell Biol.* 16: 1143-1154, 1997.
135. Owens IS and Ritter JK, Gene structure at the human UGT1 locus creates diversity in isozyme structure, substrate specificity, and regulation. *Prog.Nucleic Acid Res.Mol.Biol.* 51: 305-338, 1995.
136. Ritter JK, Chen F, Sheen YY, Tran HM, Kimura S, Yeatman MT, and Owens IS, A novel complex locus UGT1 encodes human bilirubin, phenol, and other UDP-glucuronosyltransferase isozymes with identical carboxyl termini. *J.Biol.Chem.* 267: 3257-3261, 1992.
137. Gong QH, Cho JW, Huang T, Potter C, Gholami N, Basu NK, Kubota S, Carvalho S, Pennington MW, Owens IS, and Popescu NC, Thirteen UDPglucuronosyltransferase genes are encoded at the human UGT1 gene complex locus. *Pharmacogenetics* 11: 357-368, 2001.
138. Guillemette C, Pharmacogenomics of human UDP-glucuronosyltransferase enzymes. *Pharmacogenomics.J.* 3: 136-158, 2003.
139. Munzel PA, Lehmkoetter T, Bruck M, Ritter JK, and Bock KW, Aryl hydrocarbon receptor-inducible or constitutive expression of human UDP glucuronosyltransferase UGT1A6. *Arch.Biochem.Biophys.* 350: 72-78, 1998.
140. Yueh MF, Huang YH, Hiller A, Chen S, Nguyen N, and Tukey RH, Involvement of the xenobiotic response element (XRE) in Ah receptor-mediated induction of human UDP-glucuronosyltransferase 1A1. *J.Biol.Chem.* 278: 15001-15006, 2003.
141. Beutler E, Gelbart T, and Demina A, Racial variability in the UDP-glucuronosyltransferase 1 (UGT1A1) promoter: a balanced polymorphism for regulation of bilirubin metabolism? *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 95: 8170-8174, 1998.
142. Bosma PJ, Seppen J, Goldhoorn B, Bakker C, Oude Elferink RP, Chowdhury JR, Chowdhury NR, and Jansen PL, Bilirubin UDP-glucuronosyltransferase 1 is the only relevant bilirubin glucuronidating isoform in man. *J.Biol.Chem.* 269: 17960-17964, 1994.
143. Bosma PJ, Seppen J, Goldhoorn B, Bakker C, Oude Elferink RP, Chowdhury JR, Chowdhury NR, and Jansen PL, Bilirubin UDP-glucuronosyltransferase 1 is the only relevant bilirubin glucuronidating isoform in man. *J.Biol.Chem.* 269: 17960-17964, 1994.

144. Monaghan G, Ryan M, Seddon R, Hume R, and Burchell B, Genetic variation in bilirubin UDP-glucuronosyltransferase gene promoter and Gilbert's syndrome. *Lancet* 347: 578-581, 1996.
145. Chapman E, Best MD, Hanson SR, and Wong CH, Sulfotransferases: structure, mechanism, biological activity, inhibition, and synthetic utility. *Angew.Chem.Int.Ed Engl.* 43: 3526-3548, 2004.
146. Superti-Furga A, A defect in the metabolic activation of sulfate in a patient with achondrogenesis type IB. *Am.J.Hum.Genet.* 55: 1137-1145, 1994.
147. Watabe T, Hiratsuka A, and Ogura K, Sulphotransferase-mediated covalent binding of the carcinogen 7,12-dihydroxymethylbenz[a]anthracene to calf thymus DNA and its inhibition by glutathione transferase. *Carcinogenesis* 8: 445-453, 1987.
148. Wu W, Kocarek TA, and Runge-Morris M, Sex-dependent regulation by dexamethasone of murine hydroxysteroid sulfotransferase gene expression. *Toxicol.Lett.* 119: 235-246, 2001.
149. Matsui M and Homma H, Biochemistry and molecular biology of drug-metabolizing sulfotransferase. *Int.J.Biochem.* 26: 1237-1247, 1994.
150. Strott CA, Sulfonation and molecular action. *Endocr.Rev.* 23: 703-732, 2002.
151. Alnouti Y and Klaassen CD, Regulation of sulfotransferase enzymes by prototypical microsomal enzyme inducers in mice. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 324: 612-621, 2008.
152. Yanagiba Y, Ito Y, Kamijima M, Gonzalez FJ, and Nakajima T, Octachlorostyrene Induces Cytochrome P450, UDP-glucuronosyltransferase and Sulfotransferase via the Aryl Hydrocarbon Receptor and Constitutive Androstane Receptor. *Toxicol.Sci.*, 2009.
153. Higgins CF and Linton KJ, The ATP switch model for ABC transporters. *Nat.Struct.Mol.Biol.* 11: 918-926, 2004.
154. Jacquemin E, Progressive familial intrahepatic cholestasis. Genetic basis and treatment. *Clin.Liver Dis.* 4: 753-763, 2000.
155. Martinez-Mir A, Paloma E, Allikmets R, Ayuso C, del RT, Dean M, Vilageliu L, Gonzalez-Duarte R, and Balcells S, Retinitis pigmentosa caused by a homozygous mutation in the Stargardt disease gene ABCR. *Nat.Genet.* 18: 11-12, 1998.
156. Higgins CF, Hiles ID, Salmond GP, Gill DR, Downie JA, Evans IJ, Holland IB, Gray L, Buckel SD, Bell AW, and ., A family of related ATP-binding subunits coupled to many distinct biological processes in bacteria. *Nature* 323: 448-450, 1986.
157. Higgins CF and Linton KJ, The ATP switch model for ABC transporters. *Nat.Struct.Mol.Biol.* 11: 918-926, 2004.
158. Higgins CF, Hiles ID, Salmond GP, Gill DR, Downie JA, Evans IJ, Holland IB, Gray L, Buckel SD, Bell AW, and ., A family of related ATP-binding subunits coupled to many distinct biological processes in bacteria. *Nature* 323: 448-450, 1986.

159. Higgins CF and Linton KJ, The ATP switch model for ABC transporters. *Nat.Struct.Mol.Biol.* 11: 918-926, 2004.
160. Doyle LA and Ross DD, Multidrug resistance mediated by the breast cancer resistance protein BCRP (ABCG2). *Oncogene* 22: 7340-7358, 2003.
161. Xu C, Li CY, and Kong AN, Induction of phase I, II and III drug metabolism/transport by xenobiotics. *Arch.Pharm.Res.* 28: 249-268, 2005.
162. Kitagawa S, Inhibitory effects of polyphenols on p-glycoprotein-mediated transport. *Biol.Pharm.Bull.* 29: 1-6, 2006.
163. Brand W, Schutte ME, Williamson G, van Zanden JJ, Cnubben NH, Groten JP, van Bladeren PJ, and Rietjens IM, Flavonoid-mediated inhibition of intestinal ABC transporters may affect the oral bioavailability of drugs, food-borne toxic compounds and bioactive ingredients. *Biomed.Pharmacother.* 60: 508-519, 2006.
164. Morris ME and Zhang S, Flavonoid-drug interactions: effects of flavonoids on ABC transporters. *Life Sci.* 78: 2116-2130, 2006.
165. Ihm CG, Park JK, Kim HJ, Lee TW, and Cha DR, Effects of high glucose on interleukin-6 production in human mesangial cells. *J.Korean Med.Sci.* 17: 208-212, 2002.
166. Omiecinski CJ, Redlich CA, and Costa P, Induction and developmental expression of cytochrome P450IA1 messenger RNA in rat and human tissues: detection by the polymerase chain reaction. *Cancer Res.* 50: 4315-4321, 1990.
167. Chen Y, Huang C, Zhou T, and Chen G, Genistein induction of human sulfotransferases in HepG2 and Caco-2 cells. *Basic Clin.Pharmacol.Toxicol.* 103: 553-559, 2008.
168. Ebert B, Seidel A, and Lampen A, Identification of BCRP as transporter of benzo[a]pyrene conjugates metabolically formed in Caco-2 cells and its induction by Ah-receptor agonists. *Carcinogenesis* 26: 1754-1763, 2005.
169. Sambrook J and Fritsch EF und Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* 1989. Cold Spring Harbour Laboratory USA.
Ref Type: Serial (Book, Monograph)
170. Rolsted K, Kissmeyer AM, Rist GM, and Hansen SH, Evaluation of cytochrome P450 activity in vitro, using dermal and hepatic microsomes from four species and two keratinocyte cell lines in culture. *Arch.Dermatol.Res.* 300: 11-18, 2008.
171. Sorgel F, Beyhl FE, and Mutschler E, Inhibition of uridinediphosphate glucuronyltransferase caused by furosemide. *Experientia* 36: 861-863, 1980.
172. Beckmann JD, Continuous fluorometric assay of phenol sulfotransferase. *Anal.Biochem.* 197: 408-411, 1991.
173. Shah P, Jogani V, Bagchi T, and Misra A, Role of Caco-2 cell monolayers in prediction of intestinal drug absorption. *Biotechnol.Prog.* 22: 186-198, 2006.

174. Bailey-Dell KJ, Hassel B, Doyle LA, and Ross DD, Promoter characterization and genomic organization of the human breast cancer resistance protein (ATP-binding cassette transporter G2) gene. *Biochim.Biophys.Acta* 1520: 234-241, 2001.
175. Palermo CM, Westlake CA, and Gasiewicz TA, Epigallocatechin gallate inhibits aryl hydrocarbon receptor gene transcription through an indirect mechanism involving binding to a 90 kDa heat shock protein. *Biochemistry* 44: 5041-5052, 2005.
176. Sergent T, Dupont I, Van Der HE, Scippo ML, Pussemier L, Larondelle Y, and Schneider YJ, CYP1A1 and CYP3A4 modulation by dietary flavonoids in human intestinal Caco-2 cells. *Toxicol.Lett.*, 2009.
177. Yin Z, Henry EC, and Gasiewicz TA, (-)-Epigallocatechin-3-gallate is a novel Hsp90 inhibitor. *Biochemistry* 48: 336-345, 2009.
178. Van Der HE, Bechoux N, Muller M, Sergent T, Schneider YJ, Larondelle Y, Maghuin-Rogister G, and Scippo ML, Food flavonoid aryl hydrocarbon receptor-mediated agonistic/antagonistic/synergic activities in human and rat reporter gene assays. *Anal.Chim.Acta* 637: 337-345, 2009.
179. Durgo K, Vukovic L., Rusak G., Osmak M., and Colic J. F. Effect of Flavonoids on Glutathione Level, Lipid Peroxidation and Cytochrome P450 CYP1A1 Expression in Human Laryngeal Carcinoma Cell Lines. *Food Technol.Biotechnol* 45[1], 69-79. 2007.
Ref Type: Magazine Article
180. Zhang S and Morris ME, Effect of the flavonoids biochanin A and silymarin on the P-glycoprotein-mediated transport of digoxin and vinblastine in human intestinal Caco-2 cells. *Pharm.Res.* 20: 1184-1191, 2003.
181. Chan HY, Chen ZY, Tsang DS, and Leung LK, Baicalein inhibits DMBA-DNA adduct formation by modulating CYP1A1 and CYP1B1 activities. *Bio-med.Pharmacother.* 56: 269-275, 2002.
182. Ashida H, Fukuda I, Yamashita T, and Kanazawa K, Flavones and flavonols at dietary levels inhibit a transformation of aryl hydrocarbon receptor induced by dioxin. *FEBS Lett.* 476: 213-217, 2000.
183. Kang ZC, Tsai SJ, and Lee H, Quercetin inhibits benzo[a]pyrene-induced DNA adducts in human Hep G2 cells by altering cytochrome P-450 1A1 gene expression. *Nutr.Cancer* 35: 175-179, 1999.
184. Van Den BM, Birnbaum L, Bosveld AT, Brunstrom B, Cook P, Feeley M, Giesy JP, Hanberg A, Hasegawa R, Kennedy SW, Kubiak T, Larsen JC, van Leeuwen FX, Liem AK, Nolt C, Peterson RE, Poellinger L, Safe S, Schrenk D, Tillitt D, Tysklind M, Younes M, Waern F, and Zacharewski T, Toxic equivalency factors (TEFs) for PCBs, PCDDs, PCDFs for humans and wildlife. *Environ.Health Perspect.* 106: 775-792, 1998.
185. Guengerich FP and Shimada T, Oxidation of toxic and carcinogenic chemicals by human cytochrome P-450 enzymes. *Chem.Res.Toxicol.* 4: 391-407, 1991.

186. McLemore TL, Adelberg S, Liu MC, McMahon NA, Yu SJ, Hubbard WC, Czerwinski M, Wood TG, Storeng R, Lubet RA, and ., Expression of CYP1A1 gene in patients with lung cancer: evidence for cigarette smoke-induced gene expression in normal lung tissue and for altered gene regulation in primary pulmonary carcinomas. *J.Natl.Cancer Inst.* 82: 1333-1339, 1990.
187. Sivaraman L, Leatham MP, Yee J, Wilkens LR, Lau AF, and Le ML, CYP1A1 genetic polymorphisms and in situ colorectal cancer. *Cancer Res.* 54: 3692-3695, 1994.
188. Lautraite S, Musonda AC, Doehmer J, Edwards GO, and Chipman JK, Flavonoids inhibit genetic toxicity produced by carcinogens in cells expressing CYP1A2 and CYP1A1. *Mutagenesis* 17: 45-53, 2002.
189. Uno S, Dalton TP, Shertzer HG, Genter MB, Warshawsky D, Talaska G, and Nebert DW, Benzo[a]pyrene-induced toxicity: paradoxical protection in Cyp1a1(-/-) knockout mice having increased hepatic BaP-DNA adduct levels. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 289: 1049-1056, 2001.
190. Talaska G, Ginsburg D, LaDow K, Puga A, Dalton T, and Warshawsky D, Impact of Cyp1a2 or Ahr gene knockout in mice: implications for biomonitoring studies. *Toxicol.Lett.* 162: 246-249, 2006.
191. Walle T, Otake Y, Galijatovic A, Ritter JK, and Walle UK, Induction of UDP-glucuronosyltransferase UGT1A1 by the flavonoid chrysin in the human hepatoma cell line hep G2. *Drug Metab Dispos.* 28: 1077-1082, 2000.
192. Bonzo JA, Belanger A, and Tukey RH, The role of chrysin and the ah receptor in induction of the human UGT1A1 gene in vitro and in transgenic UGT1 mice. *Hepatology* 45: 349-360, 2007.
193. Munzel PA, Schmohl S, Buckler F, Jaehrling J, Raschko FT, Kohle C, and Bock KW, Contribution of the Ah receptor to the phenolic antioxidant-mediated expression of human and rat UDP-glucuronosyltransferase UGT1A6 in Caco-2 and rat hepatoma 5L cells. *Biochem.Pharmacol.* 66: 841-847, 2003.
194. Munzel PA, Schmohl S, Heel H, Kalberer K, Bock-Hennig BS, and Bock KW, Induction of human UDP glucuronosyltransferases (UGT1A6, UGT1A9, and UGT2B7) by t-butylhydroquinone and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in Caco-2 cells. *Drug Metab Dispos.* 27: 569-573, 1999.
195. Bock KW, Eckle T, Ouzzine M, and Fournel-Gigleux S, Coordinate induction by antioxidants of UDP-glucuronosyltransferase UGT1A6 and the apical conjugate export pump MRP2 (multidrug resistance protein 2) in Caco-2 cells. *Biochem.Pharmacol.* 59: 467-470, 2000.
196. Shelby MK and Klaassen CD, Induction of rat UDP-glucuronosyltransferases in liver and duodenum by microsomal enzyme inducers that activate various transcriptional pathways. *Drug Metab Dispos.* 34: 1772-1778, 2006.
197. Ramos-Gomez M, Kwak MK, Dolan PM, Itoh K, Yamamoto M, Talalay P, and Kensler TW, Sensitivity to carcinogenesis is increased and chemoprotective efficacy of enzyme inducers is lost in nrf2 transcription factor-deficient mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 98: 3410-3415, 2001.

198. Ghazali RA and Waring RH, The effects of flavonoids on human phenolsulphotransferases: potential in drug metabolism and chemoprevention. *Life Sci.* 65: 1625-1632, 1999.
199. Harris RM, Wood DM, Bottomley L, Blagg S, Owen K, Hughes PJ, Waring RH, and Kirk CJ, Phytoestrogens are potent inhibitors of estrogen sulfation: implications for breast cancer risk and treatment. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 89: 1779-1787, 2004.
200. Doyle LA, Yang W, Abruzzo LV, Krogmann T, Gao Y, Rishi AK, and Ross DD, A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 95: 15665-15670, 1998.
201. Allikmets R, Schriml LM, Hutchinson A, Romano-Spica V, and Dean M, A human placenta-specific ATP-binding cassette gene (ABCP) on chromosome 4q22 that is involved in multidrug resistance. *Cancer Res.* 58: 5337-5339, 1998.
202. Miyake K, Mickley L, Litman T, Zhan Z, Robey R, Cristensen B, Brangi M, Greenberger L, Dean M, Fojo T, and Bates SE, Molecular cloning of cDNAs which are highly overexpressed in mitoxantrone-resistant cells: demonstration of homology to ABC transport genes. *Cancer Res.* 59: 8-13, 1999.
203. Gottesman MM, Fojo T, and Bates SE, Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nat.Rev.Cancer* 2: 48-58, 2002.
204. Chen YN, Mickley LA, Schwartz AM, Acton EM, Hwang JL, and Fojo AT, Characterization of adriamycin-resistant human breast cancer cells which display overexpression of a novel resistance-related membrane protein. *J.Biol.Chem.* 265: 10073-10080, 1990.
205. Lee JS, Scala S, Matsumoto Y, Dickstein B, Robey R, Zhan Z, Altenberg G, and Bates SE, Reduced drug accumulation and multidrug resistance in human breast cancer cells without associated P-glycoprotein or MRP overexpression. *J.Cell Biochem.* 65: 513-526, 1997.
206. Ebert B, Seidel A, and Lampen A, Phytochemicals induce breast cancer resistance protein in Caco-2 cells and enhance the transport of benzo[a]pyrene-3-sulfate. *Toxicol.Sci.* 96: 227-236, 2007.
207. Kast HR, Goodwin B, Tarr PT, Jones SA, Anisfeld AM, Stoltz CM, Tontonoz P, Kliewer S, Willson TM, and Edwards PA, Regulation of multidrug resistance-associated protein 2 (ABCC2) by the nuclear receptors pregnane X receptor, farnesoid X-activated receptor, and constitutive androstane receptor. *J.Biol.Chem.* 277: 2908-2915, 2002.
208. Jigorel E, Le VM, Boursier-Neyret C, Parmentier Y, and Fardel O, Differential regulation of sinusoidal and canalicular hepatic drug transporter expression by xenobiotics activating drug-sensing receptors in primary human hepatocytes. *Drug Metab Dispos.* 34: 1756-1763, 2006.
209. Cervený L, Svecova L, Anzenbacherova E, Vrzal R, Staud F, Dvorak Z, Ulrichova J, Anzenbacher P, and Pavek P, Valproic acid induces CYP3A4 and MDR1 gene expression by activation of constitutive androstane receptor and pregnane X receptor pathways. *Drug Metab Dispos.* 35: 1032-1041, 2007.

210. Schuetz EG, Schuetz JD, Thompson MT, Fisher RA, Madariage JR, and Strom SC, Phenotypic variability in induction of P-glycoprotein mRNA by aromatic hydrocarbons in primary human hepatocytes. *Mol.Carcinog.* 12: 61-65, 1995.
211. Mathieu MC, Lapierre I, Brault K, and Raymond M, Aromatic hydrocarbon receptor (AhR). AhR nuclear translocator- and p53-mediated induction of the murine multidrug resistance *mdr1* gene by 3-methylcholanthrene and benzo(a)pyrene in hepatoma cells. *J.Biol.Chem.* 276: 4819-4827, 2001.
212. Teeter LD, Petersen DD, Nebert DW, and Kuo MT, Murine *mdr-1*, *mdr-2*, and *mdr-3* gene expression: no coinduction with the *Cyp1a-1* and *Nmo-1* genes in liver by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *DNA Cell Biol.* 10: 433-441, 1991.
213. Kioka N, Yamano Y, Komano T, and Ueda K, Heat-shock responsive elements in the induction of the multidrug resistance gene (MDR1). *FEBS Lett.* 301: 37-40, 1992.
214. Scotto KW, Transcriptional regulation of ABC drug transporters. *Oncogene* 22: 7496-7511, 2003.
215. Hu Z, Jin S, and Scotto KW, Transcriptional activation of the MDR1 gene by UV irradiation. Role of NF-Y and Sp1. *J.Biol.Chem.* 275: 2979-2985, 2000.
216. Stein U, Lage H, Jordan A, Walther W, Bates SE, Litman T, Hohenberger P, and Dietel M, Impact of BCRP/MXR, MRP1 and MDR1/P-Glycoprotein on thermoresistant variants of atypical and classical multidrug resistant cancer cells. *Int.J.Cancer* 97: 751-760, 2002.
217. Krishnamurthy P, Ross DD, Nakanishi T, Bailey-Dell K, Zhou S, Mercer KE, Sarkadi B, Sorrentino BP, and Schuetz JD, The stem cell marker *Bcrp/ABCG2* enhances hypoxic cell survival through interactions with heme. *J.Biol.Chem.* 279: 24218-24225, 2004.
218. Bailey-Dell KJ, Hassel B, Doyle LA, and Ross DD, Promoter characterization and genomic organization of the human breast cancer resistance protein (ATP-binding cassette transporter G2) gene. *Biochim.Biophys.Acta* 1520: 234-241, 2001.
219. Muredda M, Nunoya K, Burtch-Wright RA, Kurz EU, Cole SP, and Deeley RG, Cloning and Characterization of the Murine and Rat *mrp1* Promoter Regions. *Mol.Pharmacol.* 64: 1259-1269, 2003.
220. Marthinet E, Divita G, Bernaud J, Rigal D, and Baggetto LG, Modulation of the typical multidrug resistance phenotype by targeting the MED-1 region of human MDR1 promoter. *Gene Ther.* 7: 1224-1233, 2000.
221. Kobayashi A, Sogawa K, and Fujii-Kuriyama Y, Cooperative interaction between AhR.Arnt and Sp1 for the drug-inducible expression of *CYP1A1* gene. *J.Biol.Chem.* 271: 12310-12316, 1996.
222. Bouwman P and Philipsen S, Regulation of the activity of Sp1-related transcription factors. *Mol.Cell Endocrinol.* 195: 27-38, 2002.

223. Ebert B, Seidel A, and Lampen A, Phytochemicals induce breast cancer resistance protein in Caco-2 cells and enhance the transport of benzo[a]pyrene-3-sulfate. *Toxicol.Sci.* 96: 227-236, 2007.
224. Haimeur A, Conseil G, Deeley RG, and Cole SP, The MRP-related and BCRP/ABCG2 multidrug resistance proteins: biology, substrate specificity and regulation. *Curr.Drug Metab* 5: 21-53, 2004.
225. Glavinas H, Kis E, Pal A, Kovacs R, Jani M, Vagi E, Molnar E, Bansaghi S, Kele Z, Janaky T, Bathori G, von RO, Koomen GJ, and Krajcsi P, ABCG2 (breast cancer resistance protein/mitoxantrone resistance-associated protein) ATPase assay: a useful tool to detect drug-transporter interactions. *Drug Metab Dispos.* 35: 1533-1542, 2007.
226. Otake Y, Hsieh F, and Walle T, Glucuronidation versus oxidation of the flavonoid galangin by human liver microsomes and hepatocytes. *Drug Metab Dispos.* 30: 576-581, 2002.
227. Boersma MG, van der WH, Bogaards J, Boeren S, Vervoort J, Cnubben NH, van Iersel ML, van Bladeren PJ, and Rietjens IM, Regioselectivity of phase II metabolism of luteolin and quercetin by UDP-glucuronosyl transferases. *Chem.Res.Toxicol.* 15: 662-670, 2002.
228. Boutin JA, Meunier F, Lambert PH, Hennig P, Bertin D, Serkiz B, and Volland JP, In vivo and in vitro glucuronidation of the flavonoid diosmetin in rats. *Drug Metab Dispos.* 21: 1157-1166, 1993.
229. Galijatovic A, Otake Y, Walle UK, and Walle T, Extensive metabolism of the flavonoid chrysin by human Caco-2 and Hep G2 cells. *Xenobiotica* 29: 1241-1256, 1999.
230. Hu M, Chen J, and Lin H, Metabolism of flavonoids via enteric recycling: mechanistic studies of disposition of apigenin in the Caco-2 cell culture model. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 307: 314-321, 2003.
231. Nissler L, Gebhardt R, and Berger S, Flavonoid binding to a multi-drug-resistance transporter protein: an STD-NMR study. *Anal.Bioanal.Chem.* 379: 1045-1049, 2004.
232. Conseil G, Baubichon-Cortay H, Dayan G, Jault JM, Barron D, and Di PA, Flavonoids: a class of modulators with bifunctional interactions at vicinal ATP- and steroid-binding sites on mouse P-glycoprotein. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 95: 9831-9836, 1998.
233. Cooray HC, Janvilisri T, van Veen HW, Hladky SB, and Barrand MA, Interaction of the breast cancer resistance protein with plant polyphenols. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 317: 269-275, 2004.
234. Zhang S, Yang X, Coburn RA, and Morris ME, Structure activity relationships and quantitative structure activity relationships for the flavonoid-mediated inhibition of breast cancer resistance protein. *Biochem.Pharmacol.* 70: 627-639, 2005.
235. Kelley DJ, Mestre JR, Subbaramaiah K, Sacks PG, Schantz SP, Tanabe T, Inoue H, Ramonetti JT, and Dannenberg AJ, Benzo[a]pyrene up-regulates cyclooxygenase-2 gene expression in oral epithelial cells. *Carcinogenesis* 18: 795-799, 1997.

236. Shou M, Grogan J, Mancewicz JA, Krausz KW, Gonzalez FJ, Gelboin HV, and Korzekwa KR, Activation of CYP3A4: evidence for the simultaneous binding of two substrates in a cytochrome P450 active site. *Biochemistry* 33: 6450-6455, 1994.
237. Hessel S., John A., Seidel A., and Lampen A. MRPs, but not BCRP, transport the glutathione conjugates of the ultimate carcinogenic metabolite of benzo(a)pyrene. 2008. Ref Type: Unpublished Work

7 Abkürzungsverzeichnis

4-MUF	4-Methylumbelliferon
ABC	ATP-Bindekassette
AhR	Arylhydrokarbon Rezeptor
AhRR	AhR Repressor
AIP	AhR Interacting Protein
AMV	Avian-Myoblastosis-Virus
ARNT	Arylhydrokarbon Rezeptor Nuklear Translokator
B(a)P	Benzo(a)Pyren
BA2O	Benz(a)anthracene- <i>trans</i> -1,2-dihydrodiol
BCRP	Breast Cancer Resistance Proteine
bHLH	basic helix-loop-helix
BP3G	Benzo(a)Pyren-3-Glykopyranosid
BP3S	Benzo(a)Pyren-3-Sulfat
CYP	Cytochrom P450
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiotreitol
EGCG	Epigallocatechin Gallat
EROD	7-Ethoxyresorufin-O-Deethylaseaktivität
GRE	glucocorticoid response element
HAK	halogenierten aromatischen Kohlenwasserstoffe
HDAC	Histon Deacetylasen
HIF	Hypoxia inducible factor
HPLC	High performance liquid chromatographie
HSP90	Hitze-Schock-Protein
LDH	Laktatdehydrogenase
MDR	Multiple Drug Resistance
M-MLV	Moloney-Murine-Leukemia-Virus
MRP	MDR associated Protein
NBD	Nukleotidbindedomäne
NES	Kern Export Sequenz
NLS	Nukleäre Lokalisationssequenz
Nrf2	NF-E2-related factor 2
PAK	polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen
PAPS	3'-Phosphoadenosin,5'-Phosphosulfat
PAS	PER-ARNT-SIM
PCR	Polymerasekettenreaktion
PWO	Pyrococcus woesei
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
SGLT1	Natriumabhängigen Glukosetransporter 1
SIM	Single-minded
SPE	Festphasenextraktion
SULT	Sulfotransferasen
Taq	Thermophilus aquaticus
TCDD	2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo- <i>p</i> -Dioxin
TGFβ	transforming growth factor β
TMD	Transmembrandomäne

Topo
UDP
UGT
XRE

Topoisomerasen
Uridindiphosphoglucuronsäure
UDP-Glucuronosyltransferasen
xenobiotisch responsives Element

Eidesstattliche Erklärung

Die hier vorgelegte Dissertation habe ich eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt.
Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen
Institution eingereicht.

Hanno Bothe

Danksagung

Für die Überlassung des Themas, sowie der tatkräftigen Unterstützung möchte ich Herrn Professor Josef Abel danken.

Des Weiteren danke ich Herrn Professor Peter Proksch für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Außerdem danke ich der Leiterin des Graduierten Kollegs 1427, Frau Professor Regine Kahl, für drei äußerst lehrreiche Jahre und die fakultätsübergreifende Betreuung.

Besonders möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des UG und EG Hennekamp, sowie dem 4.Stock der Gurlittstrasse für die nette Arbeitsatmosphäre und viele erheiternde Arbeitsgruppengespräche bedanken.

Meinen Eltern möchte ich vor allen Dingen für die andauernde Unterstützung und den langen Atem danken, den sie mit mir hatten. Meinem Vater gilt dabei ein besonderer Dank für die ausdauernde Bekämpfung der Kommafehler.