

2. Literaturübersicht

2.1. P-Glykoprotein (P-gp, MDR1, ABCB1)

P-Glykoprotein gehört als Effluxtransporter zu den ABC-Transportern (ATP Binding Cassette), einer Klasse von mehr als 50 Proteinen. Die Proteine aus der Familie der ABC-Transporter beziehen die Energie für den aktiven Transport ihrer Substrate aus der Hydrolyse von ATP. 1976 wurde das 170 kDa schwere Membranprotein erstmals von Juliano und Ling beschrieben. Das glykosylierte Protein wurde mit einer veränderten Permeabilität assoziiert, so dass es die Bezeichnung P-Glykoprotein erhielt (Juliano und Ling, 1997).

2.1.1. Physiologische Rolle *in vivo*

In vielen Geweben wird das P-gp in der apikalen Membran von polarisierten Epithel- und Endothelzellen exprimiert (Tabelle 1). Das P-Glykoprotein spielt aufgrund dieser Lokalisation als Effluxtransporter eine große Rolle bei der Minimierung der Absorption von Arzneistoffen/ Xenobiotica und bei der Exkretion von Metaboliten (billiär, renal, intestinal). Zusätzlich dient der Effluxtransporter als Schutzmechanismus vor Toxinen an Barrieren wie der Blut-Hirn-Schranke und Blut-Testis-Schranke.

Tabelle 1: Lokalisation von P-Glykoprotein in Geweben

Organ	Zelltyp	Lokalisation	Transport
Leber	Hepatozyt	kanalikuläre Membran	in die Galle
Darm	Enterozyt	apikale Membran	ins Lumen des Gastro-intestinal-Trakts
Niere	Epithelzellen	apikale Membran	ins Lumen des Tubulus
Gehirn	Endothelzellen	luminale Membran	ins Blut
Plazenta	Endothelzellen	luminale Membran	ins Blut
Testis	Endothelzellen	luminale Membran	ins Blut
Leukozyten	CD56 ⁺ , CD4 ⁺ , CD15 ⁺ , CD19 ⁺ , CD14 ⁺	Zellmembran	aus der Zelle
Knochenmark	CD34 ⁺ -Stammzellen	Zellmembran	aus der Zelle

Bei seiner Rolle als Effluxtransporter wird ein Zusammenspiel mit dem Metabolisierungsenzym CYP3A4 vermutet, um durch Metabolisierung und Efflux von

Xenobiotica einen effizienteren Schutz der Zellen gegenüber Xenobiotica zu gewährleisten (Cummins et al., 2002; Christians, 2004). Die These wird damit begründet, dass P-gp und CYP3A4 die gleiche Lokalisation aufweisen und über den Pregnan X-Rezeptor koreguliert werden. Des Weiteren findet sich ein überlappendes Substratspektrum.

Im einzelnen wird folgender Ablauf für die Eliminierung von Xenobiotica angenommen (Abb.1): P-Glykoprotein schleust die Ausgangsverbindung aus der Zelle heraus (Phase 0), wodurch die Konzentration der Ausgangsverbindung unterhalb der Sättigungskonzentration des CYP3A4 bleibt. Eine weitere Rolle wird P-Glykoprotein bei der Eliminierung von Metaboliten (Phase III) zugesprochen, wobei Metabolisierung häufig die Affinität der Verbindung für P-gp verbessert oder die Affinität zu anderen Effluxtransportern verschiebt, was ein geringeres Interaktions-Potenzial mit der Ausgangsverbindung mit sich bringt.

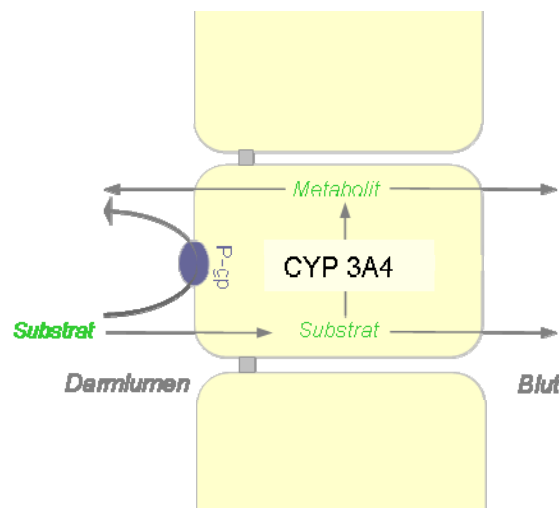


Abbildung 1 Zusammenspiel des P-Glykoproteins mit CYP 3A4

2.1.2. Struktur, Mechanismus und Transportzyklus

Das P-gp ist ein 170 kDa schweres, 3-fach glykosiliertes Protein, welches vom MDR-1-Gen kodiert wird. P-gp ist ein dimeres Protein, bestehend aus etwa 1280 Aminosäuren. Jede Hälfte besteht aus einer Transmembrandomäne (TMD) und einer zytosolischen Nukleotid-Bindungsdomäne (NBD), welche mittels eines Linker miteinander verknüpft sind. Die Transmembrandomäne (TMD) ist wiederum aus 6 Transmembran-Segmenten aufgebaut und ist für die Bindung und für den Transport von P-gp-Substraten verantwortlich. Die zytosolischen Nukleotid-Bindungsdomänen (NBD) sind hingegen für die Bindung und Hydrolyse von ATP zuständig und liefern damit die notwendige Energie für den aktiven, gegen das Konzentrationsgefälle gerichteten Transport (Abbildung 2).

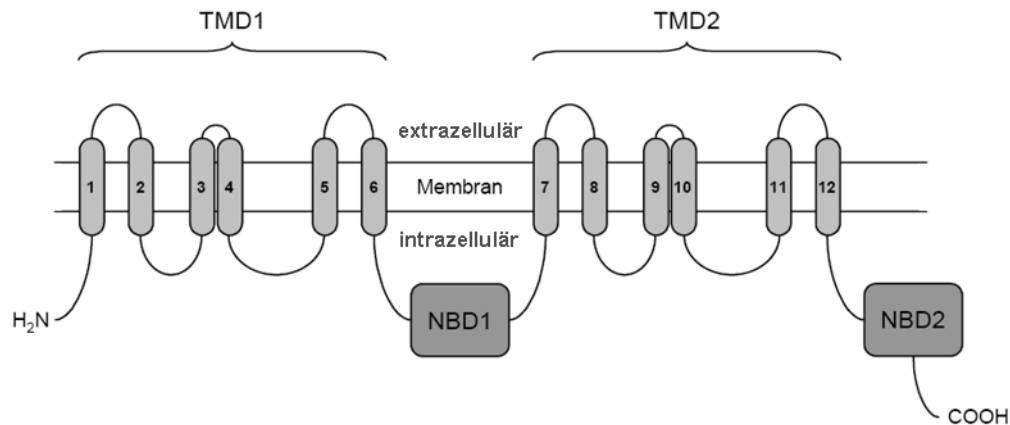


Abbildung 2: Struktur des P-Glykoproteins

In der Tertiärstruktur präsentiert sich das P-gp als zylindrische Struktur mit einem Gesamtdurchmesser von 10 nm und einer Gesamthöhe von 8 nm, bei einer Membranhöhe von 4 nm (Abb. 3). Die extrazellulären Schleifen sind zu einem hexagonalem Proteinring angeordnet und umschließen die Zentralpore, eine wassergefüllte Kammer tassenähnlicher Struktur von 5 nm Durchmesser. Die Zentralpore, bestehend aus 12 Transmembran-Helices (TMH), ist durch zytosolische Schleifen und NBDs zur zytosolischen Membranseite hin verschlossen. Durch einen Spalt im Proteinring ist die Zentralpore von der Lipidphase der Membran zugänglich (Rosenberg et al., 1997).

Verschiedene Modelle werden diskutiert, um die Funktionsweise des Transports von Molekülen durch P-gp zu erklären. Am weitesten verbreitet sind dabei drei Modelle: das Poren-Modell, das Flippase-Modell und das Staubsaugermodell („Hydrophobic Vacuum-Cleaner“). Beim Porenmodell nach Borst und Schinkel von 1997 (Abb.3 (1)), wird die Substanz aus dem Cytoplasma mittels aktivem Transport durch P-gp entfernt. Dabei fungiert P-gp als Pumpe. P-gp-Substrate stellen aber überwiegend unpolare Verbindungen dar, die sich gut in Lipiddoppelschichten verteilen und dort in hohen Konzentrationen akkumulieren. Das Modell nach Higgins und Gottesmann von 1992 erscheint daher eher wahrscheinlich, bei dem das P-gp als Staubsauger agiert (Abb.3 (2)), indem es unpolare Substanzen aus der Lipiddoppelschicht „ansaugt“ und über die Zentralpore entfernt. Im dritten Modell wird die Funktion des P-gp als Flippase beschrieben (Abb.3 (3)). Darin wird das Substrat von der inneren zur äußeren Membranhälfte transportiert, so dass auch hier eine Permeation ins Cytoplasma vermieden wird (Higgins and Gottesmann, 1992; Eytan et al., 1996; u.a.). Das „Abfangen“ der Substanz vor ihrem Eintritt ins Cytoplasma ist sinnvoll, um Interaktionen mit intrazellulären Targets zu vermeiden. Zur Zeit wird das Staubsauger-Modell favorisiert.

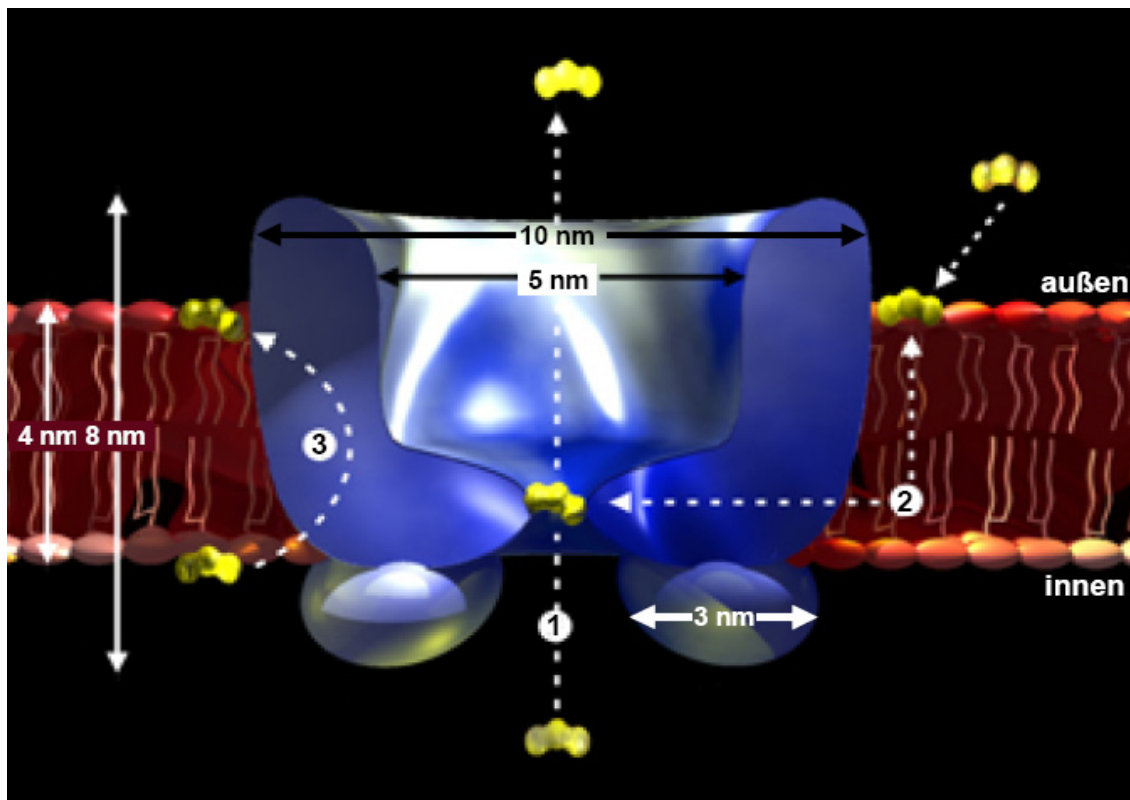


Abbildung 3: Mögliche Transportmechanismen des P-gp: 1) Porenmodell, 2) Vacuum-Cleaner-Modell und 3) Flippase-Modell (Abb. nach Meibohm et al.)

Wie genau der Transportzyklus des P-gp ablaufen könnte, beschreibt das ATP-Switch-Modell (Abb.4 a) von Higgins und Linton (2004), basierend auf dem Vacuum-Cleaner-Modell. Nach diesem Modell besitzt P-gp basal eine hohe Affinität zu den Substraten und eine niedrige Affinität zu ATP. Der Transportzyklus wird durch das Anbinden des Substrats an die Substratbindungsstelle initiiert. Die Substratbindung bewirkt eine Steigerung der Affinität zu ATP. Nach Anbindung von beiden Molekülen ATP dimerisieren die NBDs und bilden das sogenannte Nukleotid-Sandwich-Dimer. Das geschlossene Dimer induziert eine Konformationsänderung der TMDs. Durch Rotation der TM-Helices wird die Bindungsstelle ins Innere des Transporters verschoben und zum Extrazellulärraum freigelegt. Durch die Konformationsänderung wird die Affinität zum Substrat reduziert, so dass das Substrat in die Zentralpore abdiffundiert, wo es wahrscheinlich protoniert wird und über die Zentralpore nach außen gelangt. Im letzten Schritt werden die beiden ATP-Moleküle hydrolysiert und so der Ausgangszustand wiederhergestellt. Die Triebkraft für den Transport wird allein durch den Wechsel zwischen der offenen zur geschlossenen Konformation bereitgestellt, während die beiden Moleküle ATP zur Regeneration des P-gp verbraucht werden.

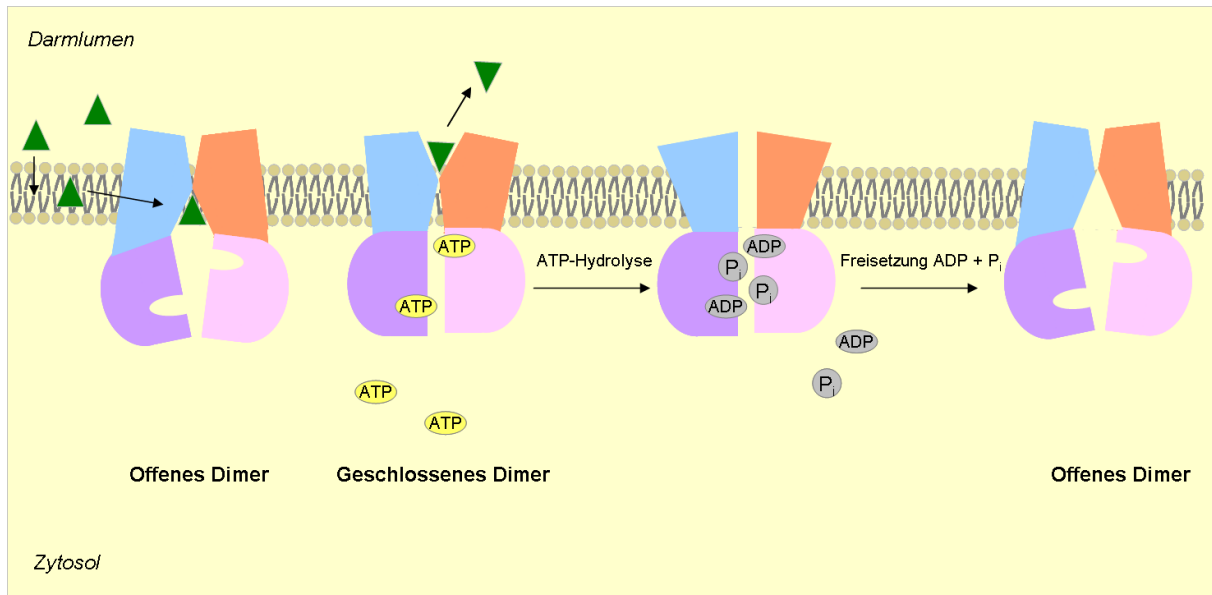


Abbildung 4a: ATP-Switch-Modell

Beim alternierenden Modell („Alternating Catalytic Sites Modell“; Senior et al., 1995; Sauna and Ambudkar, 2001) binden im ersten Schritt ATP und Substrat an das P-gp. Es folgt die Hydrolyse des ATP zu ADP und P_i , was mit einer Konformationsänderung des Proteins einhergeht und die Translokation des gebundenen Substrats von der hochaffinen zur niedrig-affinen Bindungsstelle bewirkt. Im nächsten Schritt werden Substrat und P_i freigesetzt. Anschließend wird zur Regeneration des P-gp das ADP freigesetzt und ein zweites Molekül ATP bindet an der NBD. Die Hydrolyse des ATP bewirkt wiederum eine Konformationsänderung. Nach Freisetzung von ADP und P_i kehrt das P-gp in den Ausgangszustand zurück (Abb. 4 b).

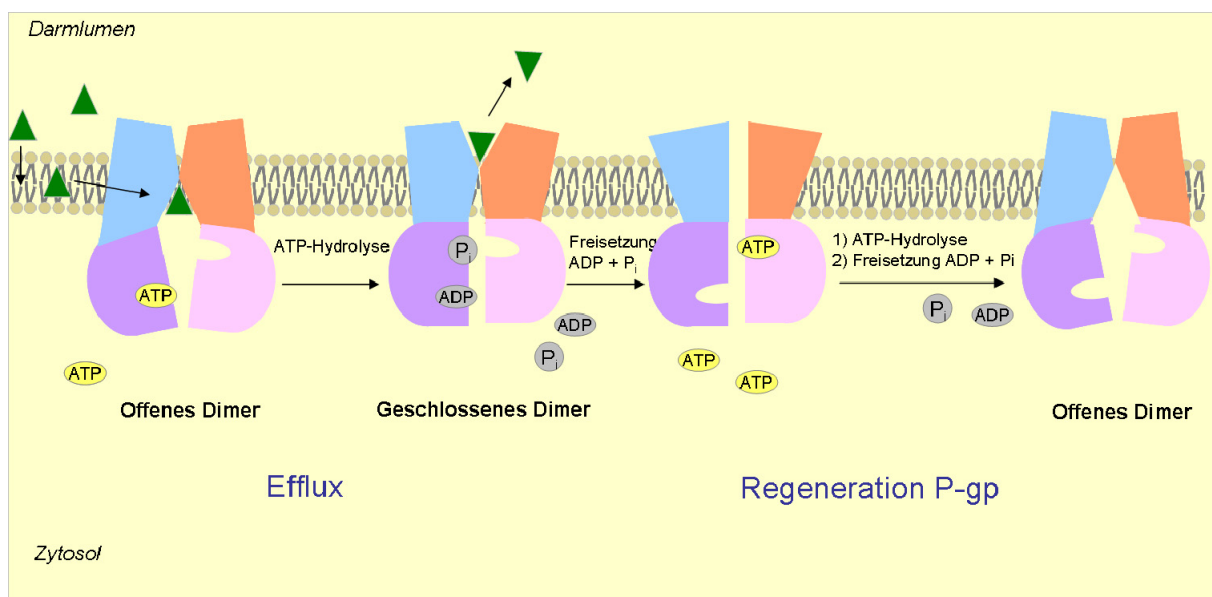


Abbildung 4b: Alternierendes Modell

Die Funktionalität des P-gp ist untrennbar mit der Lipiddoppelschicht, in welche der Effluxtransporter eingebettet ist, verbunden. Lipide sind essentiell für die katalytische Funktion der NBDs und beeinflussen die basale ATPase-Aktivität, sowie deren Stimulation/Inhibition durch Substanzen (Doige et al., 1993; Sharom 1997b). Die Fluidität der Lipiddoppelschicht nimmt ebenso Einfluss auf die NBDs (Romsicki und Sharom, 1999). Eine cholesterol- und sphingolipidreiche Umgebung ermöglicht die Funktionalität des P-gp (Modok et al., 2004).

2.1.3. Substrate und Modulatoren

Substrate

Der Effluxtransporter P-gp weist ein ausgesprochen breites Spektrum an Substraten auf, die sich sowohl strukturell als auch pharmakologisch stark voneinander unterscheiden. Zu den Arzneistoffen, die mit P-gp interagieren bzw. von P-gp transportiert werden gehören Zytostatika, Antibiotika, Immunsuppressiva, β -Blocker, HIV-Protease-Inhibitoren, Lipidsenker, Ca^{2+} -Kanal-Blocker und Steroide. Ihnen allen gemein ist ein lipophiler bis amphiphiler Charakter, wobei die Substanzen ein Molekulargewicht von 250-2000 Da besitzen und neben der Planarität häufig ein positiv geladenes tertiäres N-Atom aufweisen (Ecker et al., 1999). Methotrexat als hydrophiles und negativ geladenes Molekül stellt hierbei eine Ausnahme dar. Viele Arbeitsgruppen beschäftigen sich intensiv mit der Frage, ob Substrate an einer oder mehreren Bindungsstellen des Proteins binden. In den letzten Jahren ergaben sich Hinweise auf die Existenz von mindestens zwei Bindungsstellen, was das breite Substratspektrum erklären könnte. Shapiro und Ling konnten 1997 zeigen, dass die Farbstoffe Rhodamin 123 und Hoechst 33342 an unterschiedlichen Stellen des Proteins binden (Shapiro et al., 1997). Dabei sollen die TMHs 4, 5, 6, 10, 11 und 12 zur Substratbindung beitragen, wobei sie die Fähigkeit besitzen, untereinander allosterisch zu kommunizieren (Loo and Clarke, 1997, 2000). Die TMHs 5 und 6 sind für die Bindung des Hoechst 33342 zuständig (H-Bindungsstelle), während die TMHs 6 und 12 als R-Bindungsstelle Rhodamine 123 binden. Die Bindungsstellen können sich aufgrund der Beweglichkeit der TMHs entweder in verschiedenen Regionen des Proteins oder innerhalb einer großen Bindungstasche neben weiteren spezifischen Bindungsstellen befinden (Martin et al., 2000).

Modulatoren

Modulatoren sind fähig, durch kompetitive oder allosterische Wechselwirkung mit P-gp den Efflux von P-gp-Substraten zu inhibieren und so die Bioverfügbarkeit zu steigern. Der Ca^{2+} -

Kanal-Blocker Verapamil war die erste Substanz, bei der sich eine Inhibition des P-gp feststellen ließ. Neben Verapamil gehören Cyclosporin A und Chinidin zur ersten Generation von P-gp-Modulatoren. Alle diese Substanzen stellen selbst P-gp-Substrate dar, die aber aufgrund einer höheren Affinität, den Efflux anderer Substrate kompetitiv zu hemmen vermögen. Zur Inhibition des P-gp sind jedoch hohe Konzentrationen notwendig, da die Affinität zum P-gp verhältnismäßig schwach ist. Darüber hinaus sind diese Modulatoren selbst pharmakologisch wirksam, so dass der Einsatz dieser Modulatoren mit einer erhöhten Toxizität einhergeht. Die Modifikation der Cyclosporin-Struktur ergab mit Valspodar (PSC-833) einen Modulator, der zwar ebenfalls P-gp kompetitiv hemmt, aber bereits eine hohe Affinität zu P-gp und eine verringerte Toxizität aufweist. Valspodar zeigte in *in vitro*-Versuchen eine 10-20-fach stärkere Inhibition des P-gp als sein Vorgänger (Boekhorst et al., 1992). Modulatoren mit hoher Affinität zu P-gp und kompetitiver Inhibition werden zur zweiten Generation zusammengefasst. Nachteilig ist die schwache Selektivität zu P-gp. Zusätzlich inhibieren diese Substanzen häufig den Metabolismus (CYP3A4) und die Exkretion von Metaboliten aus Leber und Niere und bewirken so eine Anreicherung. So kann es vor allem bei zytotoxischen Arzneistoffen unter den P-gp-Substraten durch pharmakokinetische Interaktionen mit P-gp-Inhibitoren zu Nebenwirkungen kommen.

Die P-gp-Modulatoren der dritten Generation wurden anhand von Struktur-Wirkungsbeziehungen speziell zur P-gp-Inhibition neu synthetisiert. Als Strukturmerkmale wurden eine Hauptkette von mindestens 18 C-Atomen, Planarität und ein positiv geladenes tertiäres N-Atom gefordert (Wang et al., 2003). Zusätzlich wurde eine nicht-kompetitive Inhibition des P-gp, eine hohe Affinität und Selektivität für P-gp, sowie eine geringe Toxizität bei fehlender pharmakologischer Wirkung angestrebt. Vielversprechende Vertreter dieser dritten Generation sind Laniquidar, Zosuquidar, Elacridar und Tariquidar, die bereits bei nanomolaren Konzentrationen P-gp komplett über einen Zeitraum von mindestens 24 h zu inhibieren vermögen und daher bei Multi Drug Resistance eingesetzt werden sollen. Elacridar und Zosuquidar befinden sich bereits in Phase III der klinischen Studie.

Neben der direkten Bindung an P-gp gibt es weitere Mechanismen, um den P-gp-Efflux zu inhibieren. Cyclodextrine, speziell das 2,6-Dimethyl- β -Cyclodextrin, lösen aus der Membran Cholesterol und Phospholipide heraus. Als Folgeeffekt wird die ATPase-Aktivität verringert. Mit dem Herauslösen der Membranbestandteile wird dem P-gp der „Anker“ in der Membran entzogen, so dass P-gp ebenfalls aus der Membran herausgelöst wird (Nakanishi et al., 1992; Arima et al., 2004).

Tenside mit mittleren HLB-Werten zeigen in Form ihrer Unimere bei P-gp-Substraten eine verbesserte Resorption. Der parazelluläre Transport wird hingegen nicht beeinflusst. Die P-gp-Inhibition ist wahrscheinlich auf ATP-Depletion, Reduktion der ATPase-Aktivität und auf eine Verringerung der Membranviskosität zurückzuführen. Die Bioverfügbarkeit von P-gp-Substraten kann jedoch lediglich bei der Resorption über die Darmschleimhaut verbessert werden, da Tenside selbst nicht resorbiert werden und damit keinen Effekt auf andere Barrieren wie Blut-Hirn-Schranke ausüben können (Batrakova et al., 1998, 2001).

Ebenso führt eine Beeinflussung der Phosphorylierung von P-gp zu einer veränderten Funktionalität und Affinität (Ahmad et al., 1994). Eine Hemmung der P-gp-Proteinkinase resultiert in einer Hemmung des P-gp-Effluxes von Substraten. Beispiele für Proteinkinase-Inhibitoren sind die Staurosporin-Analoga CGP42700 und GF109203X (Wang et al., 2003).

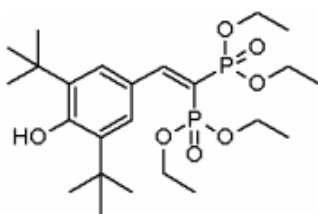
2.1.4. P-Glykoprotein-Expression

P-Glykoprotein ist das Genprodukt des MDR1-Gens. Das MDR1-Gen besteht aus 27 Exons und ist auf dem langem Arm des Chromosoms 7 lokalisiert. Für das MDR1-Gen sind mehrere Promotorelemente vorhanden. Folgende Promotorelemente sind bereits identifiziert: GC-Box, Y-Box, p53-Element, Pregnan X-Rezeptor (PXR)-Element, MED1-Element, AP-1-Element, NF- κ B-Element und Hitzeschockprotein-Element. Diese Promotorelemente sind Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren, die auf Veränderungen in der Umgebung wie oxidativer Stress, Entzündung, Hypoxie, Xenobiotica (inklusive Toxine) und Schwermetalle reagieren. Die MDR1-Gen-Expression kann aber ebenso durch Mechanismen wie DNA-Methylierung und Histon-Acetylierung beeinflusst werden (Baker et al., 2005). Außerdem werden multiple post-translationale Mechanismen zur Modulation der P-gp-Funktionalität und –Aktivität diskutiert. Dazu zählen Mechanismen wie der Transport von P-gp zur apikalen Membran (Kipp und Arias, 2002), der Abbau des Proteins (Zhang et al., 2004), die Phosphorylierung/Dephosphorylierung (Sachs et al., 1999) und spezifische Assoziationen mit anderen Membranproteinen wie Caveolin (Schlachetzki und Pardridge, 2003). Kernrezeptoren wie der Pregnan X-Rezeptor (PXR, NR112) oder der Vitamin D-Rezeptor (VDR, NR111) regulieren als ligandengesteuerte Transkriptionsfaktoren, zusammen mit Co-Aktivatoren und Co-Repressoren, die Expression. Die Regulation der Transkription geschieht durch Beeinflussung der Initiation der Transkription. Histone werden durch die Histonacetyltransferase-Aktivität der Kernrezeptoren acetyliert, was zu einer Verringerung der Affinität zur DNA führt. Dadurch ergibt sich eine Öffnung der Chromatinstruktur (Chen et al., 1999). Zusätzlich wird die RNA-Polymerase II rekrutiert (Yang et al., 1999). Kernrezeptoren stellen entscheidende Regulatoren der entgiftenden Systeme im Körper, insbesondere von Cytochrom-P450-

Enzymen und Transportproteinen dar. In Anwesenheit von Xenobiotica und endogenen lipophilen Substanzen werden sie aktiviert.

Pregnan X-Rezeptor (PXR, SXR, NR1I2)

Der Pregnan X-Rezeptor, auch als Steroid X-Rezeptor (SXR) bekannt, dient als Sensor für Fremdstoffe und ist damit ein wichtiger Regulator bei der Expression von P-gp und CYP3A4. Daneben reguliert PXR unter anderem auch die Genexpression von CYP1A1, CYP2C8, CYP2C9, MRP2, UDP-Glucuronyltransferasen und Sulfotransferasen. PXR wird überwiegend in der Leber exprimiert, findet sich aber auch im Dün- und Dickdarm (Bertilsson et al., 1998; Blumberg et al., 1998; Lehmann et al., 1998). Eine Vielzahl von endogenen und exogenen Substanzen unterschiedlichster Struktur binden an die Liganden-Bindungsdomäne (LBD) des PXR. Zu den endogenen Liganden zählt man Gallensäuren und Steroide, zu den exogenen Liganden beispielsweise Rifampicin, Hyperforin, Clotrimazol, Paclitaxel, Lovastatin, Tamoxifen und Phenobarbital. Die Fähigkeit ein so breites Spektrum unterschiedlicher Verbindungen mit Molekulargewichten von 250 bis 800 kDa zu binden, ist in der Familie der Kernrezeptoren einzigartig. Um die Ursache zu klären wurden röntgenkristallographische Untersuchungen der dreidimensionalen Struktur der LBD im Komplex mit Hyperforin und SR12813 (= Phosphonsäureester) durchgeführt (Watkins et al., 2001 und 2003). Watkins entdeckte dabei, dass die sphärische Bindungstasche durch eine flexible Schleife an der Helix 6 ihr Volumen bis auf 1150 Å³ vergrößern kann und somit Liganden unterschiedlicher Größe aufnehmen kann. Darüber hinaus konnte der hochaffine Ligand SR12813 in drei unterschiedlichen Ausrichtungen in der Bindungstasche gebunden werden. All dies belegt die variablen und vielseitigen Ligandenbindungseigenschaften von PXR. PXR bindet als Mitglied der NR1-Subfamilie obligat als Heterodimer mit dem Retinoid X-Rezeptor (RXR) an Response-Elemente der DNA an.



Struktur des PXR-Liganden SR12813

2.1.6. Klinische Bedeutung von P-Glykoprotein

P-gp wird in zahlreichen Gewebe- und Organschranken exprimiert (Darm, Leber, Niere, Plazenta, Blut-Hirn-Schranke) und übt dort Einfluss auf Absorption, Verteilung, Metabolisierung und Eliminierung von vielen Arzneistoffen bzw. Fremdstoffen aus. Zusätzlich bedingt

durch das breite Substratspektrum des P-gp kann man mit einem erhöhten Interaktionspotenzial bei Komedikation, mit Nahrungsbestandteilen und Arzneistoffformulierungen rechnen.

Interaktionspotenzial bei Komedikation

Unter den Arzneistoffen finden sich sowohl „klassische“ P-gp-Substrate als auch Substrate mit inhibitorischen Fähigkeiten wie Verapamil und Ketoconazol. Werden beide parallel medikamentös verabreicht, so kann aufgrund einer Effluxhemmung die Absorption des „klassischen“ P-gp-Substrats erhöht werden. Die Interaktion muss kritisch geprüft werden, da einige Arzneistoffe nur eine geringe therapeutische Breite aufweisen. Eine Erhöhung der Plasmakonzentration auf Konzentrationswerte außerhalb der therapeutischen Breite kann auf diesem Wege zu verstärkten Nebenwirkungen führen. In anderen Fällen ist eine Erhöhung der Plasmakonzentration geradezu erwünscht. HIV-Protease-Inhibitoren wie Saquinavir werden häufig mit Ritonavir kombiniert, da dieser neben CYP3A4 auch P-gp hemmt und so die Bioverfügbarkeit deutlich verbessert (Buss et al., 2001). Neben Inhibitoren finden sich unter den Arzneistoffen auch Induktoren der P-gp-Expression, die über Aktivierung des PXR zu einer erhöhten Expressionsrate des P-gp führen. Als Folge des gesteigerten Effluxes resultiert eine verminderte Absorption bzw. eine verstärkte Ausscheidung, was mit einem Verlust der Wirksamkeit eines Arzneistoffes einhergehen kann. Zum Beispiel könnte bei Patienten nach erfolgter Nierentransplantation die gemeinsame Einnahme von Ciclosporin mit Johanniskraut eine Abstoßungsreaktion zur Folge haben. Hyperforin, Bestandteil des Johanniskrauts, ist ein Ligand des PXR. Durch Induktion der P-gp-Expression läge dann die Serumkonzentration von Ciclosporin unterhalb des therapeutischen Bereichs. Zu den PXR-Liganden zählen weiterhin Rifampicin, Clotrimazol, Lovastatin, Paclitaxel, Tamoxifen, Spironolacton, Phenobarbital und Dexamethason. Ausgewählte Arzneistoffinteraktionen im Zusammenhang mit P-gp sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Tabelle 2: Auflistung klinisch relevanter Interaktionen in Zusammenhang mit P-Glykoprotein

Substrat	Inhibitor/ Induktor*	Pharmakokinetische Effekte	Referenz
Digoxin (oral)	Atorvastatin (oral)	Erhöhung c_{\max} um 20 % und $AUC_{0-24\text{ h}}$ um 15 %	<i>Boyd et al., 2000</i>
Digoxin (oral)	Rifampicin* (oral)	Reduktion der c_{\max} um 58 %, BV_{oral} um 30 % erniedrigt	<i>Greiner et al., 1999</i>
Digoxin (oral)	Talinolol (oral)	Erhöhung $AUC_{0-72\text{ h}}$ um 23 %	<i>Westphal et al., 2000</i>
Ciclosporin (oral)	Johanniskraut* (oral)	0,72-fache Erniedrigung der c_{\max}	<i>Dresser et al., 2003</i>

Interaktionspotenzial mit Nahrungsbestandteilen/Phytopharmaka

Pharmakokinetische Interaktionen können auch zwischen Nahrungsbestandteilen bzw. Phytopharmaka und Arzneistoffen stattfinden. Es ist aber schwierig vorherzusagen, ob eine Interaktion bzw. in welchem Ausmaß eine Interaktion stattfindet. Die Probleme ergeben sich aus der variablen Zusammensetzung der Präparate bzw. Nahrung und der Konzentration der aktiven Verbindungen, welche P-gp zu modulieren bzw. induzieren vermögen. Des Weiteren üben diese Verbindungen häufig auch parallel Einflüsse auf andere Transporter oder Metabolisierungsenzyme aus.

Flavonoide wie Kämpferol, Quercetin und Galangin, welche in einer Gesamtmenge von etwa 1g/d regelmäßig durch den Verzehr von Obst, Gemüse, Säften, Wein, Tee, Kaffee, Schokolade und Phytopharmaka aufgenommen werden, zeigen Einfluss auf die P-gp-Aktivität. So wirken einige Catechine des grünen Tees (Jodoin et al., 2002; Mei et al., 2004), Piperin (Bhardwaj et al., 2002), Ginsenoside (Kim et al., 2003; Choi et al., 2003), Silymarin und andere Flavonoide der Mariendistel (Zhang et al., 2003) inhibitorisch auf P-gp, wohingegen Curcumin und Curcuminoide (Anuchapreeda et al., 2002; Limtrakul et al., 2004) sowohl die P-gp-Expression als auch die Aktivität reduzieren. Die Bestandteile des Grapefruit- und Orangensaftes (u.a. Bergamottin und Dihydroxybergamottin) inhibieren neben CYP3A4 ebenfalls P-gp (Spahn Langguth H und Langguth P, 2001; Xu et al., 2003; Panchagnula et al., 2005). Wird hingegen Grapefruitsaft regelmäßig konsumiert, so scheint P-gp verstärkt exprimiert zu werden. Eine längerfristige Applikation von Grapefruitsaft führte an Rattendärmen zu einer verringerten Absorption des P-gp-Substrats Indinavir, welche mit dem P-gp-Inhibitor Verapamil reversibel aufgehoben werden konnte. (Panchagnula et al., 2005). Hyperforin als Bestandteil des Johanniskrauts ist als starker Induktor der P-gp-Expression bekannt. *In vivo* Versuche zeigten, dass die Komedikation mit Johanniskraut die Plasmakonzentration von Arzneistoffen wie Digoxin, Indinavir, Warfarin, oralen Kontrazeptiva, Cyclosporin, Tacrolimus, Fexofenadin signifikant reduzierte und zu Komplikationen bis hin zum Therapieversagen führte (Durr et al., 2000; Perloff et al., 2001).

Rolle der Arzneistoffformulierung auf die Resorption von P-gp-Substraten

Auch die Art der Arzneistoffformulierung kann Einfluss auf die Resorption von P-gp-Substraten besitzen. Viele Publikationen berichten von inhibitorischen Effekten am P-Glykoprotein durch ausgewählte Tenside. Tenside werden häufig in Arzneistoffformulierungen zur Verbesserung der Löslichkeit und Stabilität eingesetzt. Die Fähigkeit der Effluxinhibition führt zusätzlich zu einer verbesserten Resorption über die Darmschleimhaut. So zeigten unter

anderem die Tenside Vitamin E TPGS (= wasserlöslicher Ester aus Vitamin E und Polyethylenglycol 1000), Pluronic PE8100 und PE6100, Cremophor EL, Tween 20 und 80 und Gelucire 44/14 P-gp hemmende Effekte (Lo, 2003; Rege et al., 2002; Nerurkar et al., 1996; Wang et al., 2004). Entscheidend für die inhibitorische Aktivität von Tensiden ist der nicht-ionische Charakter, ein HLB-Wert zwischen 10 und 17, das Vorhandensein von Polyoxyethylen-Ketten und von Alkohol- und Fettsäureintermediaten mittlerer Kettenlänge (Lo, 2003). Als Erklärung für den Mechanismus der P-gp-Inhibition wird eine Absenkung der intrazellulären ATP-Level, der Mikroviskosität und eine Hemmung der P-gp-ATPase-Aktivität diskutiert (Batrakova et al., 2001).

Genetische Polymorphismen

Die Funktion des P-Glykoproteins kann durch Polymorphismen des MDR-1-Gens beeinflusst werden. Mittlerweile sind mindestens 150 Varianten des MDR-1-Gens identifiziert, wobei der Großteil Punktmutationen (single nucleotide polymorphisms, SNPs) darstellt. Bei den meisten SNPs konnte keine Auswirkung bzw. nur widersprüchliche Untersuchungsergebnisse ermittelt werden. Des Weiteren vermutet man eine Kompensation der SNPs durch eine gesteigerte Metabolisierung bei Arzneistoffen die zugleich Substrate für P-gp und CYP3A4 sind. Häufig führt erst die Kombination der SNPs zu einer Veränderung des Phänotyps. So werden zum Beispiel die SNPs C1236T, G2677T und C3435T als ABCB1*2 zusammengefasst. Die Vorhersage der Arzneistoffkinetik und die Festlegung von Dosisregimen erweist sich daher als schwierig, zumal die Änderungen in der Pharmakokinetik oft nur moderat ausfallen. (Eichelbaum et al., 2004)

Die erste Punktmutation, die mit einer veränderten Funktionalität des P-gp assoziiert wurde, war die SNP in Exon 26 C3435T. Unter 21 untersuchten Menschen befanden sich 24 % mit T/T-Allele (homozygot für C3435T), die im Gegensatz zu Menschen mit der C/C-Allele P-Glykoprotein um den Faktor 2 schwächer exprimierten. Die Einnahme von Digoxin (steady-state Bedingungen) führte bei den Trägern der T/T-Allele zu einer Erhöhung der Digoxin-Spiegel um 38 % (Hoffmeyer et al. 2000).

P-Glykoprotein wird eine Rolle bei der Pathogenese von Erkrankungen zugesprochen. So wird ein Zusammenhang zwischen Alzheimer- und Parkinson-Erkrankungen mit der Expression und Funktionalität von P-gp diskutiert (Lee et al., 2004). Im Gehirn von Alzheimer-Patienten finden sich Plaques, die aus β -Amyloid bestehen und für lokale entzündliche Prozesse verantwortlich gemacht werden. β -Amyloid ist vermutlich ein endogenes Substrat für P-gp. Eine Autopsie des Gehirngewebes von 243 älteren Patienten

ergab eine inverse Korrelation zwischen einer erhöhten β -Amyloid-Akkumulation und einer verminderten P-gp-Expression (Vogelsang et al., 2002). Die Punktmutation C3435T soll das Risiko an Alzheimer zu erkranken erhöhen. Man vermutet, dass durch eine geringere P-gp-Aktivität schädigende Effekte durch Pestizide und andere Toxine, welche P-gp-Substrate darstellen, verstärkt werden (Drodzik et al., 2003).

Multidrug Resistance

Krebsgewebe zeigen oft eine ungewöhnlich hohe Expression an den Effluxtransportern P-gp, Multidrug Resistance-related Protein (MRP1) und Breast Cancer related protein (BCRP), wobei die Expressionsrate als Marker für das Krebsstadium genutzt wird. Die Überexpression der Effluxtransporter führt zur *Multidrug Resistance* (MDR). *Multidrug Resistance* beschreibt das Phänomen, dass Zellen, in der Regel Tumorzellen, eine Resistenz gegenüber Arzneistoffen besitzen oder entwickeln. Weitere Gründe für die Ausbildung einer *Multidrug Resistance* sind in der Abbildung 5 dargestellt. Entstehen Tumoren aus Zellen mit hoher P-gp-Expression wie den Darm- und Nierenzellen so wird dies als intrinsische *Multidrug Resistance* bezeichnet, die während einer Chemotherapie noch verstärkt werden kann. Von einer erworbenen *Multidrug Resistance* spricht man, wenn die Expression der Effluxtransporter P-gp, MRP, BCRP erst durch eine medikamentösen Therapie induziert wird (Gottesmann, 2002). Die zunehmende Resistenz von Tumoren gegen die eingesetzten Zytostatika stellt ein ernstes Problem dar. Um die MDR zu überwinden, ist es möglich P-gp-Inhibitoren parallel zum Zytostatikum zu verabreichen.

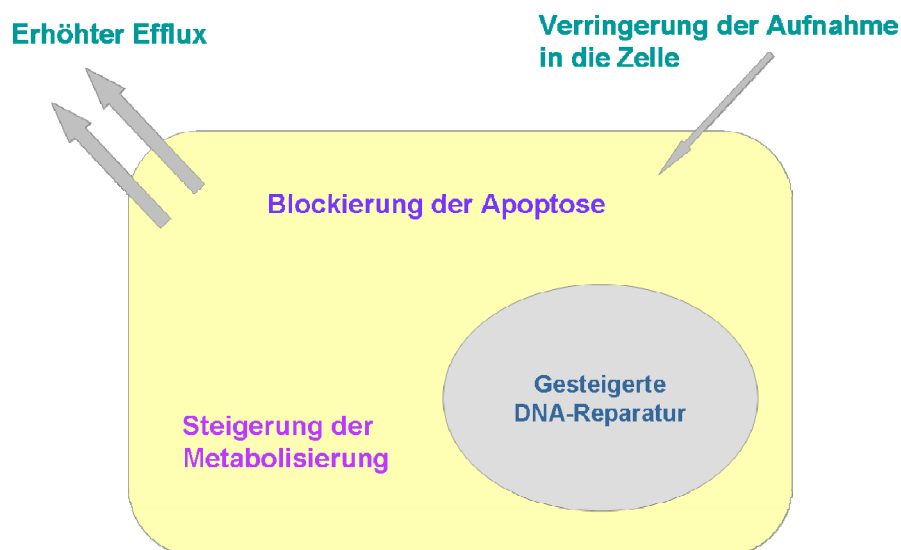
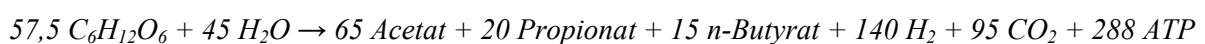


Abbildung 5: Resistenzmechanismen der Zelle (nach Gottesmann, 2002)

2.2. Kurzkettige Fettsäuren (short-chain fatty acids, SCFAs)

2.2.1. Bildung und Resorption

Nahrungskomponenten, die im Dünndarm nicht verdaut und resorbiert werden, werden im Darm einem bakteriellen Abbau unterworfen. Die anteilig wichtigsten Nahrungskomponenten sind hierbei resistente Stärken und Polysaccharide von Pflanzenzellwänden (Zellulose, Pektin, Inulin). Bei dem bakteriellen Abbau handelt es sich um einen mehrstufigen anaeroben Prozess. Komplexe Polysaccharide werden zunächst in Oligosaccharide und Monosaccharide unter Beteiligung der bakteriellen Gattungen *Bacteroides*, *Ruminococcus*, *Eubacterium* und *Peptostreptococcus* zerlegt. Analog werden Proteine in Peptide und Aminosäuren gespalten. Durch Darmbakterien werden die Spaltprodukte letztlich zu kurzkettigen Fettsäuren (SCFAs) und den Gasen Wasserstoff, Kohlendioxid und Methan enzymatisch umgesetzt. Während die Gase über die Lunge oder intestinal durch Flatulation ausgeschieden werden, unterliegen die kurzkettigen Fettsäuren im Kolon zum größten Teil der Resorption und stehen dem Wirt als Substrate zur Verfügung. Aus Kohlenhydraten entstehen im wesentlichen Acetat, Propionat und Butyrat und in geringeren Konzentrationen Formiat, Valeriat und Capronat. Im Zuge der Proteinfermentation entstehen zusätzlich noch die verzweigten SCFAs Isobutytrat und Isovaleriat (entspricht Methylbutyrat) (Cummings, 1981; Macfarlane et al., 1997). Die folgende stöchiometrische Gleichung ist ein Beispiel für die enzymatische Umsetzung von Glucose durch Bakterien (Williams et al., 2001):



Anhand der Gleichung und der Tabellenübersicht 3 wird deutlich, dass unter den Produkten Acetat mengenmäßig überwiegt. Die Zusammensetzung des SCFA-Gemischs und die Gesamtkonzentration variieren hierbei je nach Zahl und Typ der Darmbakterien (Roberfroid, 2005), der Art der Substrate und der Länge der Transitzeit im Darm (Cook et al., 1998). Breves et al.(1993) ermittelte in einer *in vivo*-Untersuchung eine tägliche Produktionsrate für Acetat von bis zu 1350 mmol/ Tag und für Propionat von bis zu 170 mmol pro Tag. Nahrungsbestandteile wie Zellulose, Hemizellulosen und Pentosane führen durch Fermentation zu geringfügiger Butyratbildung, während vor allem mit resistenten Stärken und Inulin erhöhte Butyrat-Konzentrationen erreicht werden (Berggren et al., 1993). Hold et al. identifizierte 2003 in Stuhlproben von 10 Individuen die Butyrat-produzierenden

Bakterienstämme *Roseburia intestinalis*, *Faecalibacterium prausnitzii* und *Eubacterium hallii*.

Tabelle 3: Molare Verhältnisse von Acetat, Propionat und Butyrat in % (Cummings und Macfarlane, 1997)

Substrat	Acetat (%)	Propionat (%)	Butyrat (%)
Stärke	62	15	23
Kleie(Weizen, Hafer)	64	16	20
Fructooligosaccharide	78	14	8
Pektine	80	12	8

Die Absorption der SCFAs ist sehr effizient. 95 % der bakteriell gebildeten SCFAs werden vom Kolonepithel absorbiert (Bugaut et al., 1987). Die schwachen Carbonsäuren können in zwei Formen auftreten: als protonierte, undissoziierte Säure oder als ionisiertes Anion. Aus diesem Grund existieren verschiedene Absorptionsmechanismen. Undissoziierte Säuren sind lipophil genug, um die Darmschleimhaut transzellulär zu durchdringen. Da jedoch bei physiologischem pH nur 0,1 bis 5 % der SCFAs undissoziiert vorliegen, müssen die Anionen zunächst protoniert werden. Dies geschieht an der apikalen Membran durch einen $\text{Na}^+\text{-H}^+$ -Austauscher oder durch eine $\text{K}^+\text{-H}^+$ -ATPase (von Engelhardt, 1995).

Mittels spezifischer Transportmechanismen kann die Absorption der anionischen Form direkt erfolgen (Cook et al., 1998). Die Aufnahme erfolgt zum einen über den Monocarboxylat-Transporter MCT1 (Stein et al., 2000), zum anderen über den Na^+ -gekoppelten Transporter SLC5A8 (oder SMCT = sodium-coupled monocarboxylate transporter). Der MCT1-Transporter ist an der apikalen Membran lokalisiert und transportiert Säuren im Austausch gegen Bikarbonat. Er besitzt eine breite Substratspezifität (Acetat, Propionat, Butyrat, Succinat und Lactat); diese Substrate konkurrieren jedoch um die Aufnahme in die Zelle. So reduziert sich die Aufnahme von Butyrat in Anwesenheit von Propionat um nahezu 50 % (Stein et al., 2000). Dennoch kann MCT1 als spezifischer Butyrat-Transporter angesehen werden, da lediglich Butyrat dessen Expression induziert. Die Kapazität des Butyrat-Transports über MCT1 kann so dem Butyrat-Angebot angepasst werden (Cuff et al., 2002).

2.2.2. Stoffwechsel

SCFAs werden von den Kolonzellen als Energiequelle genutzt. Butyrat stellt das bevorzugte energieliefernde Substrat dar (Roediger, 1980 und 1982). 70-90 % des im Kolon gebildeten Butyrats wird energetisch verwertet (Bergmann, 1990). In den Kolonzellen wird Butyrat

durch β -Oxidation zu zwei Mol Acetyl-CoA verstoffwechselt, die anschließend im Citratzyklus weiter umgesetzt werden. Der oxidative Abbau von ein Mol Butyrat liefert 27 Moleküle ATP und trägt damit zur größten Energiemenge bei (Grossklaus, 1983). Die Anwesenheit von Butyrat hemmt die Oxidation anderer SCFAs (Fitch und Fleming, 1999).

Ein Teil der SCFAs tritt in das Pfortaderblut über. Das molare Verhältnis der drei Fettsäure-Anionen Acetat, Propionat und Butyrat liegt bei 71:21:8 (Abb.4), wobei der Anteil von Butyrat durch die energetische Verwertung von ehemals 22 % bereits auf 8 % reduziert wurde. Die Plasmakonzentration dieser Anionen beträgt insgesamt noch 375 $\mu\text{mol/L}$. Der molare Anteil von Propionat im Blut wird durch die Leberpassage reduziert. Zirkulierendes Acetat kann von allen Körpergeweben oxidativ im Citratzyklus verwertet werden (Bergmann 1990). Der Abbau liefert bei der Endoxidation in Citratzyklus und Atmungskette 12 Moleküle ATP. Acetat spielt zudem eine zentrale Rolle bei der Fettsäuresynthese. Propionat wird in Form des Propionyl-CoAs über Malonyl-CoA in Succinyl-CoA umgewandelt und ebenfalls im Citratzyklus umgesetzt. Zusätzlich findet Propionat für die Gluconeogenese Verwendung. SCFAs liefern insgesamt ein Drittel der benötigten Erhaltungsenergie für den Menschen (Cumming 1986).

Tabelle 4: Molare Verhältnisse von Acetat, Propionat und Butyrat in % (Cummings et al., 1987)

	Acetat (%)	Propionat (%)	Butyrat (%)
Kolon	57	21	22
Pfortader	71	21	8
Lebervene	81	12	7
Peripheres Blut	91	5	4

2.2.3. Funktion

Die SCFAs sind schwache Säuren mit pK_a -Werten um 4,8. Sie senken den pH-Wert innerhalb des Kolons (Topping et al., 1993), was sich als günstig erweist, da das Wachstum pH sensitiver pathogener Bakterien wie Clostridien, E. coli und Salmonellen unterdrückt wird (Cherrington et al., 1991; Prohaszka et al., 1990). Zusätzlich wird die Löslichkeit von Gallensäuren verringert und die Ammoniakresorption durch Protonierung der Aminofunktion reduziert (Grubben et al., 2001).

Darmbakterien wie Bifidobakterien und Lactobacillus-Bakterien können SCFAs selbst verwerten (Gibson et al., 1995; Macfarlane et al., 2006; Swennen et al., 2006), wodurch ihr Wachstum gefördert und pathogene Bakterien verdrängt werden.

Unter den SCFAs steigert vor allem Butyrat die Zellproliferation der Kolonzellen, bei gleichzeitiger Hemmung des Wachstums und Induktion der Apoptose bei Darmkrebszellen. Man spricht deshalb auch vom Butyrat-Paradoxon (Scheppach et al., 2004; Lupton 2004). Butyrat steigert dosis- und zeitabhängig die Vitamin D-Rezeptor-Expression durch Erhöhung der mRNA- und Protein-Level und fördert unter anderem darüber die Differenzierung von Zellen (Gaschott et al., 2001).

Physiologische Konzentrationen des SCFA-Gemischs aus Acetat (80 mmol/L), Propionat (40 mmol/L) und Butyrat (20 mmol/L) senkten in einem *in vitro*-Versuch bereits nach 10 min die Permeabilität der Darmschleimhaut für parazellulär und transzellulär diffundierende Substanzen (Suzuki et al., 2008).

Acetat erhöht als primäres Substrat der Cholesterolsynthese die Produktion von Cholesterol (Wong et al., 2006), während Propionat die Cholesterolsynthese inhibiert (Venter et al., 1990).

2.2.4. Klinische Bedeutung

Die Rolle der SCFAs bei Dickdarmkrebs

Die Aufnahme von Ballaststoffen mit der Nahrung verkürzt die Transitzeit des Nahrungsbreis im Darm, so dass die Kontaktzeit mit der Darmschleimhaut verringert und damit weniger toxische Begleitstoffe wie Ammoniak und sekundäre Gallensäuren resorbiert werden (Zoran et al. 1997). Die Bindung von Toxinen an Ballaststoffe mindert die freie Konzentration dieser, so dass auch über diesen Effekt eine schwächere Resorption der Toxine resultiert (Newmark et al., 1990; Grubben et al, 2001).

Ebenso wird durch die Absenkung des pH-Wertes die Produktion der sekundären Gallensäuren heruntergefahren, welche potenzielle Auslöser des Darmkrebses darstellen. Das bakterielle Enzym 7 α -Dehydroxylase, katalysiert den Abbau der primären Gallensäuren zu den sekundären Gallensäuren. Durch das saure pH-Milieu befindet sich das Enzym außerhalb seines pH-Optimum und ist somit weniger aktiv (Grubben et al., 2001).

Die SCFAs spielen eine entscheidende Rolle bei der Regulierung der Proliferation des Kolonepithels (Abb.6). Zahlreiche Studien belegen, dass SCFAs, vor allem Butyrat, das Wachstum der Kolonkarzinomzellen hemmen und Apoptose zu induzieren vermögen (Hague et al., 1995). Die Invasivität von primären Kolonkarzinomzellen kann zudem durch Acetat, Propionat und Butyrat gehemmt werden, so dass die Metastasierung reduziert werden könnte (Emenaker et al., 2001; Klinder et al., 2004). Den SCFAs, allen voran Butyrat, werden daher

chemoprotektive Effekte auf die Kolonkarzinogenese zugesprochen. Um diese Vermutung zu bestätigen, wurden zahlreiche klinische Studien durchgeführt, um der Frage nachzugehen, ob der Verzehr von Ballaststoffen Darmkrebs vorbeugt. Im Rahmen der EPIC (= European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition) nehmen seit 1992 über 500.000 Menschen aus 10 europäischen Staaten teil, um der Frage nachzugehen, ob Lebensstil und Ernährungsgewohnheiten Krebserkrankungen beeinflussen. Bingham stellte in einer Veröffentlichung von 2003 die ersten Erkenntnisse der europäischen Langzeitstudie vor, in der er dem täglichen Verzehr von 12,6 bis 31,9 g Ballaststoffen eine unterstützende Rolle bei der Vermeidung von Darmkrebs zusprechen konnte (Gonzales 2006).

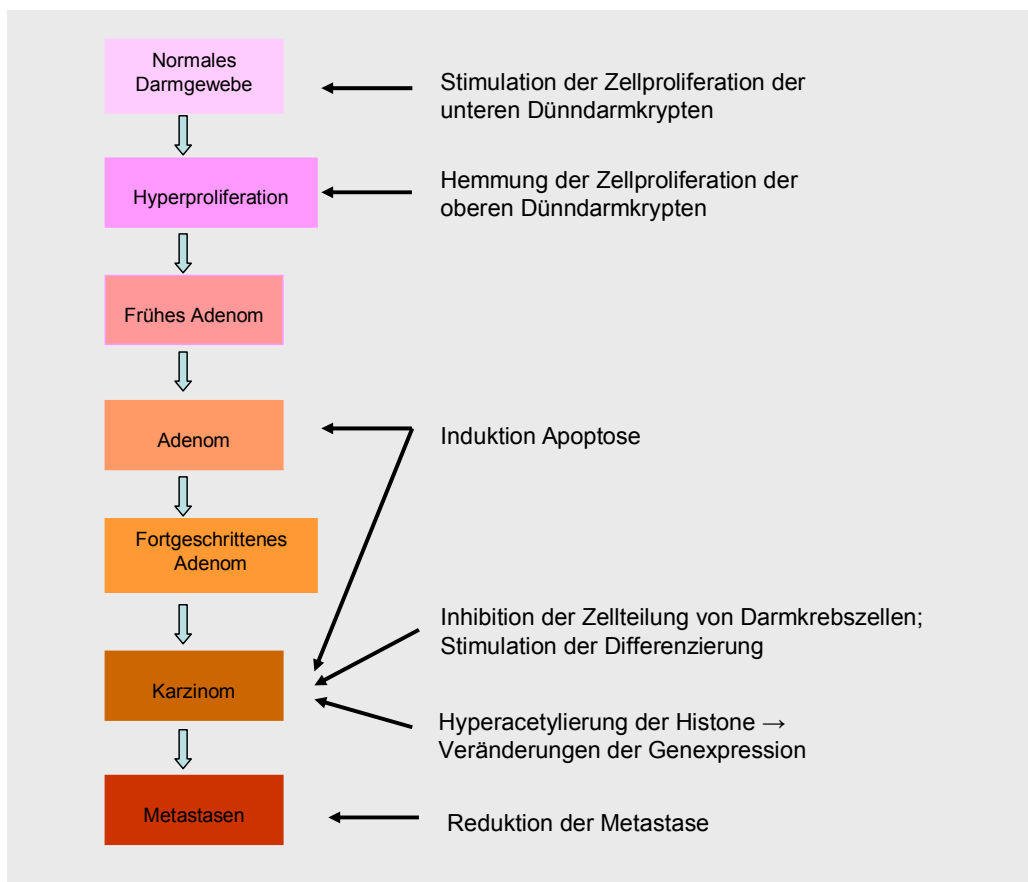


Abbildung 6: Chemoprotektive Effekte der SCFAs auf Kolonkarzinogenese

2.2.5. Wirkmechanismus

Als wichtigster Mechanismus für die biologischen Effekte von Butyrat auf die Darmkrebszellen wird in der Inhibition der Histon-Deacetylase angesehen (Hinnebusch et al., 2002). Die Histonacetylierung beeinflusst die Transkription der Gene durch Verlust des Kontakts der Histone mit der DNA. Die DNA ist in ihrer offenen Form für Transkriptionsfaktoren zugänglich, welche spezifische Gene aktivieren. Außerdem nutzen Reparaturenzyme die Gelegenheit, um vorhandene DNA-Schäden zu beheben (Grunstein,

1997). Auf der anderen Seite ist in Gegenwart von Karzinogenen die Wahrscheinlichkeit höher, die DNA zu schädigen (Lupton, 2004).

Butyrat zeigt eine Hemmung des Wachstums von Darmkrebszellen in Folge einer Induktion der p21^{WAF1/Cip1}-Proteinexpression und -mRNA-Level, welche einen G₁-Block des Zellzyklus bewirkt. Diese G₁-Blockade dient ebenso dazu, vorhandene Mutationen oder Genom-Instabilitäten zu reparieren bzw. die Apoptose einzuleiten (Archer et al., 1998; Siavoshian et al., 2000; Chai et al., 2000; Hinnebusch et al., 2002). Acetat, Propionat und Valeriat zeigen ebenfalls diese Effekte, aber in einem deutlich schwächeren Ausmaß (Scheppach et al., 1995; Hague et al., 1995).

Neben der Hemmung der Histon-Deacetylase, welche zu einer Hyperacetylierung der DNA führt, beeinflusst Butyrat ebenso den Methylierungsstatus der DNA (Boffa et al., 1994), inhibiert die Phosphorylierung der Histone (Boffa et al., 1981), bewirkt eine Hyperacetylierung von Proteinen (Sterner et al., 1981) und moduliert intrazelluläre Kinase-Signalwege (McMillan et al., 2003). Diese Vielfalt der Effekte unterstreicht die Fähigkeit des Butyrats die Genexpression auf verschiedenen Ebenen wie Transkription, mRNA-Stabilität und Elongation zu modulieren.

Daly und Shirazi-Beechey untersuchten Veränderungen der Expression von 19.400 Genen nach Behandlung von Darmzelllinien mit 5 mM Na-Butyrat (Daly und Shirazi-Beechey, 2006). Von den 19.400 Genen wurden 221 Gene verändert exprimiert (≥ 2 -fach gegenüber Kontrolle). Darunter fanden sich 59 hochregulierte und 162 herunterregulierte Gene, welche alle in Prozesse wie Proliferation, Differenzierung und Apoptose involviert sind. Unter den hochregulierten Genen befanden sich 26 Gene, die mit der Regulation des Zellzyklus und Arrest assoziiert sind, wie CDKN1A (p21^{WAF1/CIP1}), CDX2, GADD45A, MAPK12 (p38), FOS, PTEN und TXNIP (VDUP1). Tumorsuppressorgene und proapoptotische Gene, die in Darmkrebszellen durch Hypermethylierung der Promotorregion herunterreguliert sind, werden durch Na-Butyrat wieder hochreguliert. Antiapoptotische Gene hingegen wurden deaktiviert, sowie Gene, welche die Proliferation steigern, Zellen entarten lassen und Metastase auslösen bzw. fördern.

Eine Therapie des Darmkrebs mit Na-Butyrat könnte aktivierte Gene herunterregulieren und stillgelegte Gene zur Apoptose, Differenzierung und Hemmung der Zellteilung aktivieren. Jedoch wird häufig in Darmkrebszellen der MCT1-Rezeptor zur Aufnahme der SCFAs nur schwach exprimiert, so dass wenn nur sehr wenig Butyrat in die Zellen gelangt (Lambert et al., 2002). Eine andere Untersuchung an einer Lungenkarzinomzelllinie ergab zusätzlich eine Herunterregulation von 16 Genen mit Assoziation zu Zytokin-Signalwegen. So wurden

infolge der Herunterregulation z.B. die Interferon γ -Spiegel gesenkt. Interferon γ stellt ein wichtiges proinflammatorisches Zytokin in entzündlichen Darmerkrankungen wie Morbus Crohn und Colitis Ulcerosa dar (Fais et al., 1991 und 1994; Breese et al., 1993). Darüber hinaus wurden weitere Gene durch Butyrat beeinflusst, die am Signalweg des Interferon γ beteiligt sind (Joseph et al., 2004).

Anhand dieser Erkenntnisse wird deutlich, dass Butyrat von grundlegender Bedeutung für die Gesundheit der Darmmucosa ist und dass Veränderungen in Bildung und Bereitstellung von Butyrat mit einer Vielzahl von Darmerkrankungen assoziiert sind.

2.3. Maillardreaktion

2.3.1. Mechanismus der Maillardreaktion

Die Maillard-Reaktion ist eine nicht-enzymatische Bräunungsreaktion, welche im Jahre 1912 erstmals von Louis-Camille Maillard beschrieben wurde. Sie ist eine komplexe Reaktionsfolge zwischen Aminkomponenten und reduzierenden Kohlenhydraten.

Nach Hodge (1953) lässt sich die Maillard-Reaktion im wesentlichen in drei Phasen untergliedern: die „frühe Phase“ als chemisch definierten Schritt ohne Bräunung, die „fortgeschrittene Phase“ mit einer Vielzahl von Reaktionen zu flüchtigen und/oder löslichen Substanzen sowie die „Finalphase“, die durch die Bildung unlöslicher brauner Polymere, den Melanoidinen, gekennzeichnet ist. Die Phasen laufen parallel ab, so dass neben Melanoidinen, Zwischenprodukte, gebildete Aromastoffe sowie nicht umgesetzte Edukte vorliegen.

Frühe Phase/ Initialphase

1a) Zucker-Amin-Kondensation

In der Anfangsphase kommt es durch eine Kondensationsreaktion zwischen der primären Aminogruppe von Aminosäuren bzw. Proteinen und der Carbonylfunktion reduzierender Zucker zur Bildung eines N-substituierten Glykosylamins (Ledl und Schleicher, 1990). Dieser Reaktionsschritt verläuft reversibel und ist grundsätzlich protonenkatalysiert. Durch Protonierung des endocyclischen Sauerstoffs bildet sich zunächst ein Carbeniumion aus, an welches sich nukleophil das Amin unter Bildung eines Carbinolammonium-Ions addiert. Nach Abspaltung von Wasser als gute Abgangsgruppe entsteht intermediär ein mesomeriestabilisiertes Immonium-Amino-carbenium-Ion, das nach Abgabe des Protons in ein cyclisches Halbaminale übergeht (Abb.7). Diese N-Glykoside der Aminosäuren liegen bevorzugt in einer β -pyranoiden 4C_1 -Konformation vor und sind instabil.

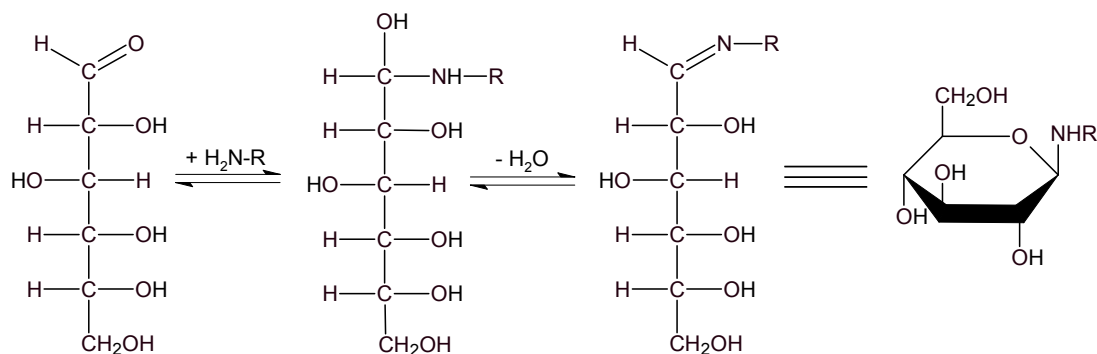


Abbildung 7: Bildung des N-Glykosylamins aus reduzierenden Zuckern und Aminen

I b) Amadori-Umlagerung

Unter Autokatalyse durch die Säurefunktion können N-Glykoside der Aminosäuren einerseits wieder in ihre Edukte zerfallen, andererseits durch eine intramolekulare Umlagerung in ein *Amadori*-Produkt überführt werden (Abb.8). Durch Protonierung des endocyclischen Sauerstoffatoms kommt es erneut zur Öffnung des Rings. Es entsteht das mesomeriestabilisierte Immonium-Aminocarbenium-Ion als Intermediat. Nach einer basenkatalysierten Abspaltung des Protons in Position 2 entsteht ein Enaminol, welches zur 1-Amino-1-desoxy-ketose, dem *Amadori*-Produkt, tautomerisiert und bevorzugt als cyclisches Halbacetal vorliegt. Die *Amadori*-Produkte sind die ersten fassbaren Verbindungen der Maillard-Reaktion und können in vielen erhitzten oder gelagerten Lebensmitteln nachgewiesen werden (Angrick und Rewicki, 1980).

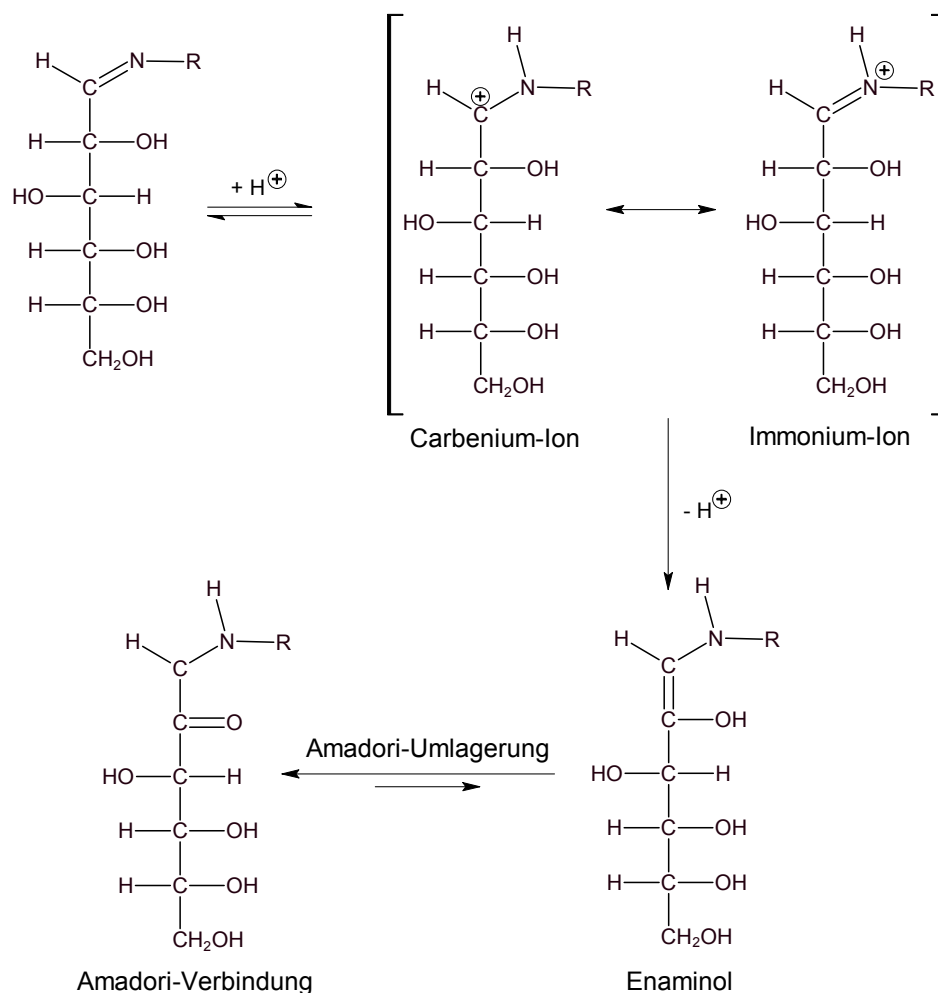


Abbildung 8: Bildung von Amadori-Verbindungen aus Glykosylaminen

Die Umsetzung von Ketosen z.B. Fruktose mit Aminosäuren führt ebenfalls zu N-Glykosiden, welche aber über die *Heyns*-Umlagerung zu 2-Amino-2-desoxy-aldosen, den *Heyns*-Produkten, umgesetzt werden. Im Gegensatz zur *Amadori*-Umlagerung ist die *Heyns*-

Umlagerung reversibel. Neben dem *Heyns*-Produkt entstehen ebenfalls *Amadori*-Produkte, deren Bildung mit einer Sekundärreaktion zwischen dem *Heyns*-Produkt und einer 2. Aminosäure durch Heyns et al. (1961) erklärt wird. Des Weiteren kann es bei der Schiff'schen Base der Fruktose durch eine 2,3-Enolisierung zur Bildung von isomeren 3-Keto-Umlagerungsprodukten kommen.

Kohlenhydrate üben einen stereoselektiven Einfluss auf die nicht-enzymatische Bräunungsreaktion aus. β -Anomere der Kohlenhydrate reagieren bei der N-Glykosidierung von Aminosäuren bevorzugt und beschleunigen die Bräunungsreaktion.

Basische Aminosäuren „bräunen“ stärker als neutrale oder saure Aminosäuren durch die Verschiebung des pHs in den basischen Bereich, welcher die Mutarotations-Geschwindigkeit der Kohlenhydrate erhöht. Durch die schnellere Gleichgewichtseinstellung kann die verbrauchte reaktivere β -Form sofort nachgeliefert werden, was sich in einer Erhöhung der Bräunungsrate äußert.

Außerdem ist die Maillard-Reaktion abhängig von der Stellung der Aminofunktion. Untersuchungen an Modellsystemen konnten nachweisen, dass D-konfigurierte Aminosäuren gegenüber der L-Form bei der Bräunung eindeutig überlegen sind (Westpfahl und Kroh; 1985).

Fortgeschrittene Phase

Die in der Initialphase gebildeten *Amadori*- oder *Heyns*-Verbindungen können über verschiedene Enolisierungs- und Fragmentierungsreaktionen neue, reaktive Verbindungen bilden, die je nach Temperatur mit oder ohne Beteiligung von Aminoverbindungen zu Bräunungsprodukten reagieren. Dabei entstehen als reaktive Intermediate vor allem α -Dicarbonyle. Diese können mit den Proteinen der Nahrung Quervernetzungen (sog. crosslinks) eingehen, was mit einem Verlust der biologischen Wertigkeit einhergeht.

II a) Bildung der α -Dicarbonylverbindungen

Der erste Schritt besteht in der Bildung von Desoxydiketosen bzw. Desoxyaldoketosen durch Enolisierung der *Amadori*- bzw. *Heyns*-Verbindung mit anschließender β -Eliminierung (Abb.9). Die 1,2-Enolisierung läuft im schwach sauren bis neutralen pH-Bereich ab und führt zum 1,2-Enaminol. Nach β -Eliminierung der Hydroxylgruppe am C₃-Atom als Wasser und anschließender hydrolytischer Abspaltung der Aminosäure entsteht die 3-Desoxy-2-glucosulose bzw. das 3-Desoxyoson (Anet, 1960).

Analog bildet sich im neutralen bis basischen pH-Bereich über die 2,3-Enolisierung das 2,3-Enaminol, das nach Abspaltung des Aminorestes das 1-Desoxyoson bildet (Beck et al., 1988).

Vorzugsweise bei Disacchariden bleibt nach 2,3-Enolisierung die Aminofunktion erhalten. In diesem Fall wird eine Eliminierung der Hydroxylgruppe am C₄-Atom begünstigt, wodurch als weitere Dicarbonylverbindung das 4-Desoxyoson gebildet werden kann (Ledl und Schleicher, 1990).

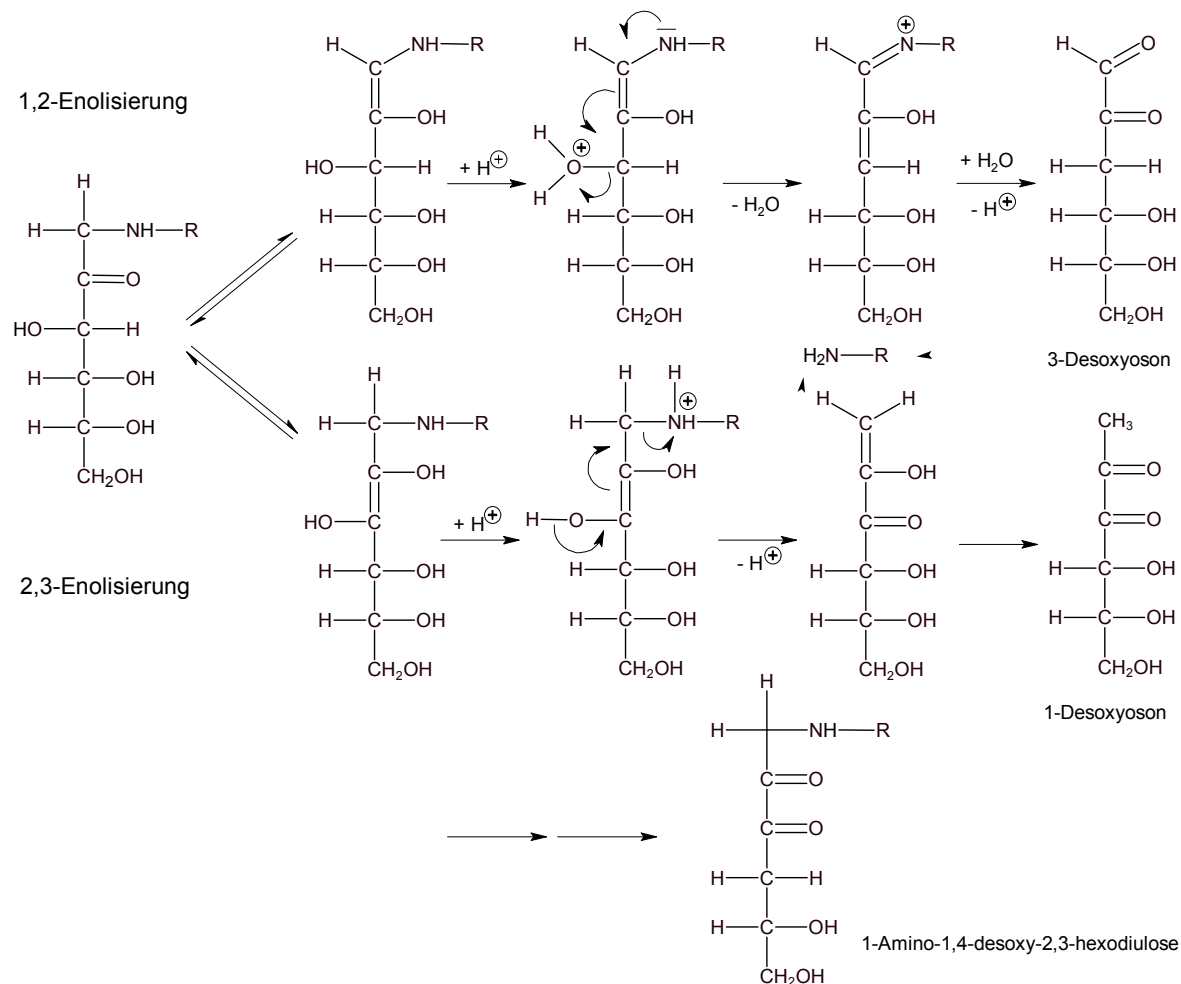


Abbildung 9: Bildung der Desoxyosone über die Enolisierung der *Amadori*-Verbindung

Ein wichtiger Aspekt bei den Enolisierungsreaktionen ist, dass die an der Bildung der *Amadori*-Verbindung beteiligte Aminokomponente unverändert aus den Reaktionen hervorgeht und so für weitere Reaktionsfolgen zur Verfügung steht. Der Aminokomponente kommt daher die Bedeutung eines Katalysators in der frühen Phase zu.

Die Desoxyosone sind sehr reaktive Verbindungen, die zu weiteren α -Dicarbonylverbindungen oder Heterozyklen als Folgeprodukte reagieren können.

In wässrigen Lösungen liegt das 1-Desoxyoson in Form von cyclischen Hydroxyfuranonen und Hydroxypyranonen vor. Viele der typischen Folgeprodukte ergeben sich direkt aus diesen Vorstufen. So entsteht aus der Furanonform durch Dehydratisierung das Isomaltol. Maltol und das 2,3-Dihydro-3-hydroxymaltol (DHM) bilden sich aus der Pyranform. Die Bildung von

Maltol erfolgt aus α -glykosidisch verknüpften und die Bildung von Isomaltol aus β -glykosidisch verknüpften Disacchariden. DHM entsteht hingegen lediglich beim Abbau von Monosacchariden. Maltol, Isomaltol und DHM werden daher als Marker für den Abbau von Mono- bzw. Disacchariden betrachtet (Ledl et al., 1990). Als weitere Folgeprodukte werden aus 1-Desoxyosonen die Dicarbonyl Methylglyoxal, Diacetyl und Hydroxydiacetyl sowie die sauerstoffhaltigen Heterocyclen wie Furaneol und Acetylfuran erhalten.

3-Desoxyosone stellen im Vergleich zu 1-Desoxyosonen die stabileren Verbindungen dar. Im Säuren entstehen aus 3-Desoxyosonen ausgehend von Hydroxypyranonen leicht β -Pyranone und ausgehend von Hydroxyfuranonen das 5-Hydroxymethylfurfural (HMF), das analytisch als Erhitzungsmarker für verschiedenen Lebensmittel dient. Weitere Abbauprodukte sind unter anderem Pyrrol- und Pyridinderivate und Metasaccharinsäure, die im basischen Milieu gebildet wird.

Beim Abbau von 4-Desoxyosonen entstehen hauptsächlich Furosin, Pyrrole und Pyridiniumbetaine.

Ein weiterer Reaktionsweg, der zur Bildung von α -Dicarbonylverbindungen führt, ist der oxidative Abbau von Amadori-Verbindungen, der vor allem für physiologische Systeme Relevanz besitzt. Die Autoxidation verläuft über die Enaminolform der Amadori-Verbindung, wobei neben Glucosonen und Desoxyosonen reaktive Sauerstoffspezies (ROS) entstehen, die zur Schädigung von Proteinen unter oxidativem Stress fähig sind. (Kawakishi et al., 1991; Yim et al, 1995).

Über die Endiolform als Zwischenstufe kann es zu einer weiteren Form der oxidativen Spaltung kommen, die zur Bildung von Glykonsäuren und oxidierten Resten der Amadori-Verbindung wie dem N-Carboxymethyllysin (CML) führt (Ahmed et al., 1986).

II b) Retroaldol-Reaktion

Wichtige Folgereaktionen der Amadori-Verbindungen und der α -Dicarbonylverbindungen sind die Retroaldol-Reaktionen. Auf diesem Wege entstehen eine Vielzahl unterschiedlicher C₂-C₄-Spaltprodukte, die über α -Dicarbonyl- oder α -Hydroxycarbonyl-Strukturen verfügen. Diese sind selbst sehr reaktiv und stellen z. T. geruchsaktive Verbindungen dar.

II c) Strecker-Abbau

Eine wichtige Reaktion stellt unter Beteiligung von α -Dicarbonylverbindungen wie Glyoxal und Methylglyoxal der Abbau der Aminosäuren zu den sensorisch sehr bedeutenden Strecker-Aldehyden dar. Im ersten Schritt bildet sich aus der Kondensationsreaktion der Aminosäure mit der Dicarbonylverbindung eine Schiff'sche Base aus, die leicht Kohlendioxid abspaltet.

Unter Transaminierung und hydrolytischer Spaltung entstehen daraus überwiegend Strecker-Aldehyde (Abb.10).

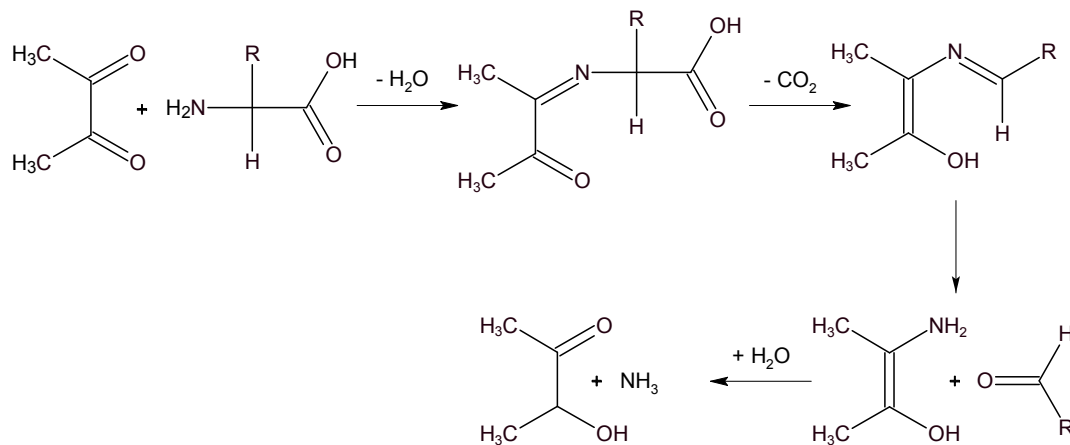


Abbildung 10: Der Strecker-Abbau von Aminosäuren mit α -Dicarbonylverbindungen

Als Nebenprodukt entstehen α -Aminoketone, die an der Bildung verschiedener Heterozyklen wie Pyridinen, Pyrazinen und Imidazolen beteiligt sind. Die Bildung der Pyrazine, welche typische Röstaromastoffe darstellen, findet erst ab Temperaturen über 100 °C statt. (Hayashi und Namiki; 1980; Ledl und Schleicher, 1990)

II d) Bildung heterozyklischer Verbindungen

Heterozyklische Verbindungen können einerseits aus der Reaktion von Ammoniak bzw. Schwefelwasserstoff mit α -Dicarbonylverbindungen andererseits aus α -Aminocarbonylen entstehen.

Finale Phase

In der Endphase der Maillardreaktion kommt es zur Bildung von aromaaktiven, hellbraun bis schwarz gefärbten Verbindungen. Diese Verbindungen, die auch als Melanoidine bezeichnet werden, entstehen durch Kondensation oder Polymerisation der unterschiedlichen Zwischenstufen. Eine genaue Identifizierung ist aufgrund der Vielzahl und der Ähnlichkeit der möglichen Strukturen erschwert. Als Strukturelemente kommen Heterozyklen wie Pyrrole, Imidazole, Pyranone und Furanone vor. Melanoidine weisen einen großen Molmassenbereich von 1000 Da bis 100000 Da auf. Für die niedermolekularen Melanoidine werden stickstofffreie und stickstoffhaltige Produkte mit zwei bis vier Ringsystemen beschrieben (Hodge, 1953; Ledl et al., 1983). Die hochmolekulare Fraktion scheint aus Proteinen, die zum Teil quervernetzt sind, aufgebaut zu sein. An das farblose Proteingerüst sind verschiedene gefärbte, niedermolekulare Verbindungen kovalent gebunden.

Die Abbildung 11 gibt zusammenfassend den Ablauf der Maillard-Reaktion wieder.

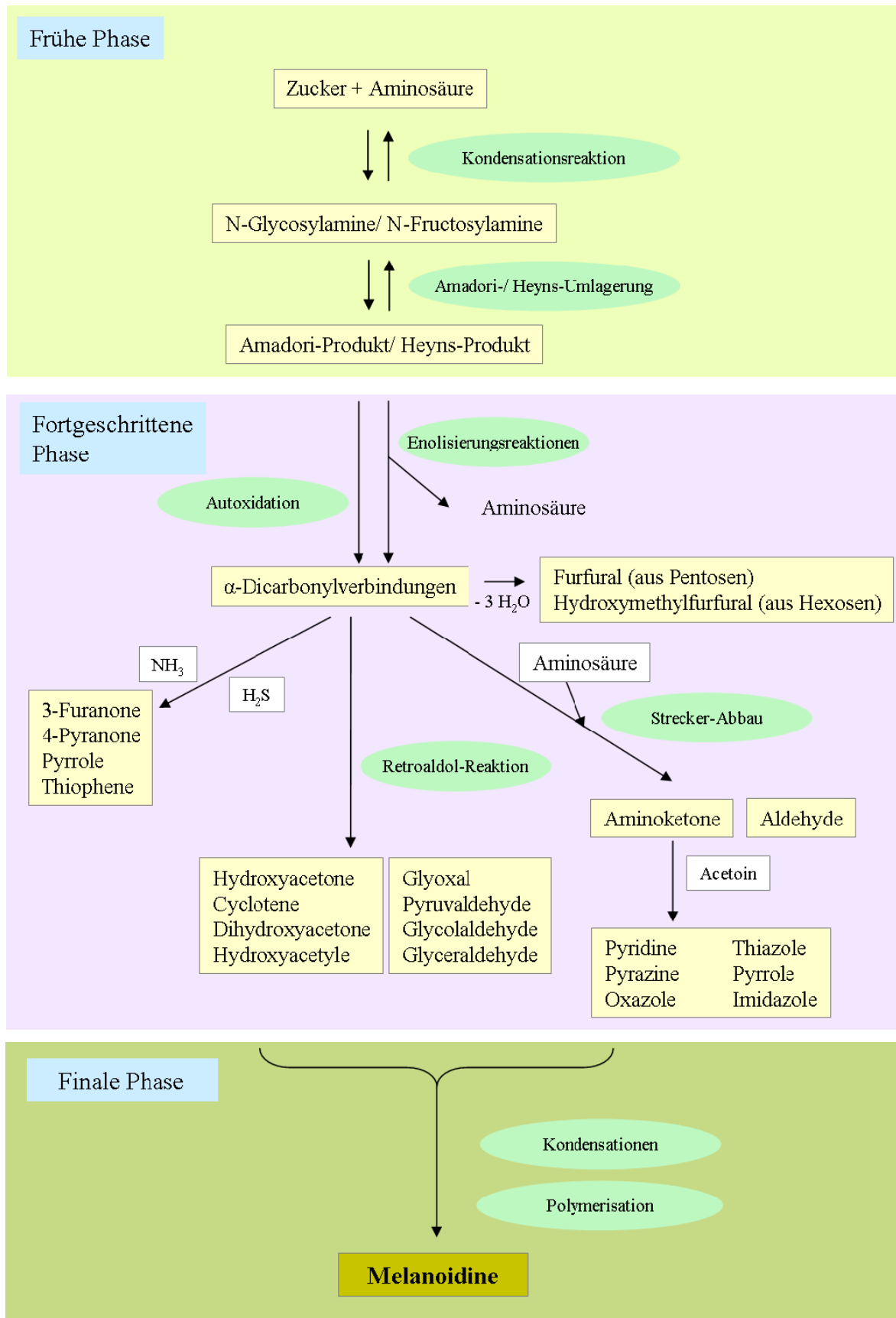


Abbildung 11: Übersicht der Maillard-Reaktion

2.3.2. Bedeutung in der Lebensmittelindustrie

Die Maillard-Reaktion findet bei der Lagerung, beim Kochen, Backen, Braten und Rösten von Lebensmitteln statt, wobei die Rate der Bräunung mit steigender Temperatur zunimmt.

Zahlreiche heterozyklische sowie nichtzyklische Verbindungen, die ab der fortgeschrittenen Phase entstehen, tragen zu Aroma, Farbe und Geschmack bei Lebensmitteln bei und entfalten darüber eine appetitanregende Wirkung. Dies wird zunehmend zur gezielten Herstellung von synthetischen Geschmacksstoffen genutzt. Komplexe Aromen von Kaffee, Kakao, Brot, Karamell, gebratenem Fleisch können jedoch nur unbefriedigend von einer Substanz allein wiedergegeben werden. So hat man im Aroma des Röstkaffees über 600 Verbindungen nachweisen können, darunter Benzole, Toluole, Pyridine, Pyrrole und Thiazole. Daher werden häufig Aromagramme aufgenommen, um den Beitrag einzelner Maillard-Verbindungen zum Gesamtaroma aufzuschlüsseln (Ledl und Schleicher, 1990). In Abbildung 12 sind Strukturen einiger Aromastoffe dargestellt.

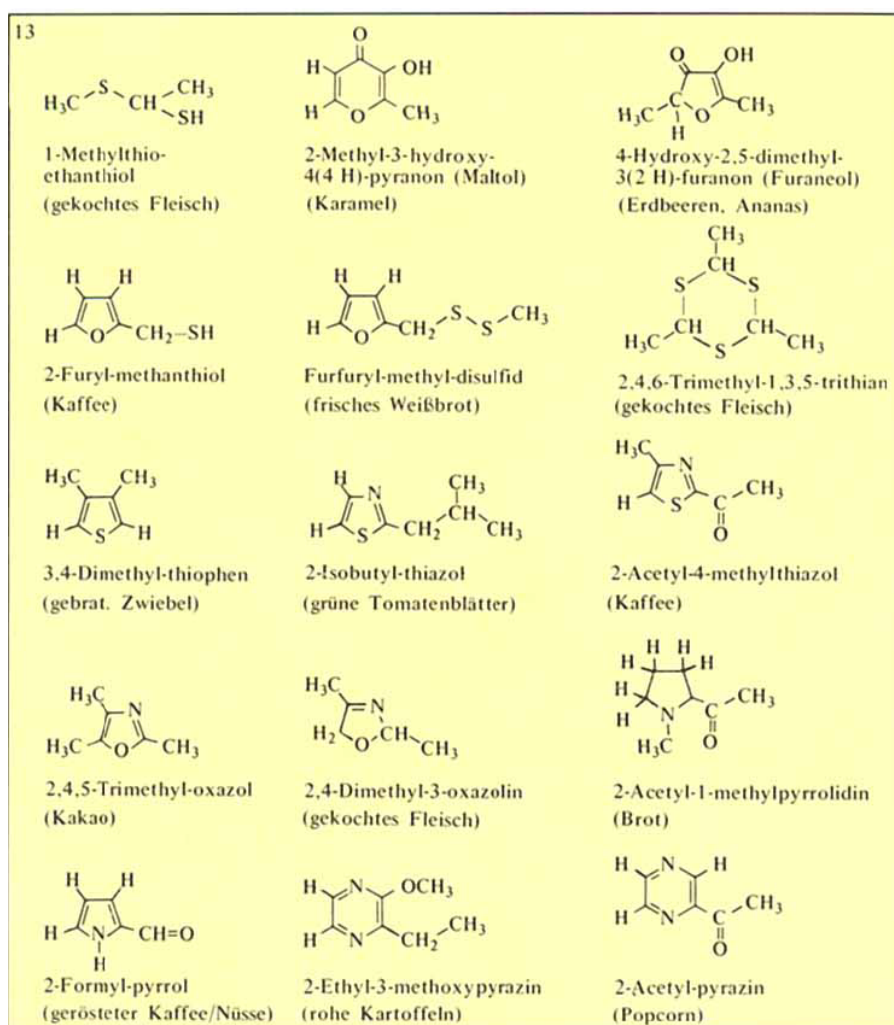


Abbildung 12: Strukturen von Aromastoffen der Maillard-Reaktion (Angrick und Rewicki, 1980)

Der Geschmack wird durch Bildung von Röstbitterstoffen beeinflusst, wobei die stärkste Bitternote mit Prolin erzielt wird (Ledl und Schleicher, 1990).

Neben den organoleptischen Eigenschaften nimmt die Maillard-Reaktion auch direkten Einfluss auf die nutritiven Eigenschaften. Bei der Maillard-Reaktion werden z.B. essentielle Aminosäuren verbraucht bzw. so verändert, dass diese für den Organismus wertlos werden. Die Minderung der biologischen Wertigkeit einzelner Lebensmittel trifft vor allem die Säuglingsnahrung (Ledl und Schleicher, 1990).

Beim Erhitzen von Lebensmitteln kommt es zum Abbau von natürlichen Antioxidationsmitteln. Gleichzeitig entstehen im Zuge der Maillard-Reaktion neue Verbindungen mit antioxidativen und antimikrobiellen Eigenschaften, die die Haltbarkeit der Lebensmittel verbessern (Rufian-Henares und Morales, 2007; Yilmaz und Toledo, 2004). Die antioxidative Wirksamkeit erhöht sich parallel mit steigender Farbbildung. Die Chelatisierung von Metall-Ionen, Radikalfängereigenschaften und reduzierende Fähigkeiten der Carbonylgruppen (Wijewickreme et al., 1997; Monti et al., 1999; Yoshimura et al., 1997; Maillard et al., 2007) werden als mögliche Ursachen angeführt. Unter den Maillard-Reaktionsprodukten zeigen besonders die Melanoidine antioxidative Fähigkeiten (Rufian-Henares und Morales, 2007).

2.3.3. Klinische Relevanz

Bei der nicht-enzymatischen Bräunungsreaktion entstehen komplexe Gemische, deren Zusammensetzung stark abhängig ist von zahlreichen Faktoren wie dem Wassergehalt, der Temperatur, der Zeitdauer des Erhitzens, dem pH-Wert, sowie der Art der verwendeten Aminosäure und des Zuckers (Delgado-Andrade und Morales, 2005).

Die meisten gewählten Reaktionsbedingungen für Modell-Maillard-Reaktionsprodukte sind zudem nicht geeignet, um Bedingungen zu simulieren, wie sie bei der Essenzubereitung vorkommen. So werden Aminosäure-Zucker-Lösungen bei 90 °C für 22 h lang erhitzt. Es ist daher fragwürdig, inwieweit die Ergebnisse aus den Experimenten auf die reelle Essenzubereitung übertragbar sind. Die *europäische Zusammenarbeit auf dem Gebiet der wissenschaftlichen und technischen Forschung* (COST) erstellte 1999 eine Vorschrift zur standardisierten Herstellung eines Modellsystems, bestehend aus Glucose und Glycin. Ziel der Forschung sollte es sein, die Strukturen der Maillard-Reaktionsprodukte zu identifizieren und potentielle physiologische Wirkungen zu erfassen (Somoza, 2005). Die bisher bekannten Effekte, sowie die Resorptions- und Metabolisierungsmechanismen von Maillard-Reaktionsprodukten (MRPs) werden nachfolgend aufgeführt.

Resorption

Bei der Resorption von MRPs muss zwischen der niedermolekularen und der hochmolekularen Fraktion unterschieden werden. Die niedermolekulare Fraktion mit Verbindungen < 10000 Da (LMW) wird zu einem geringen Anteil vermutlich über die Darmschleimhaut resorbiert, während hingegen die Aufnahme der höhermolekularen Fraktion (HMW) als unwahrscheinlich gilt.

Finot und Magneat (1981) beschäftigten sich intensiv mit dem metabolischen Transit von MRP Mischungen. Sie ermittelten im Urin von Ratten einen Anteil von 27 % der LMW-Fraktion gegenüber 4,3 % bei der HMW-Fraktion. Der größte Anteil der oral aufgenommenen MRP-Gemische wurde mit dem Faeces ausgeschieden. Ähnliche Studien führten zu entsprechenden Aussagen (Ames et al., 1999; Homma und Fujimaki, 1981; Nair et al., 1981; Finot, 1990; Lee et al., 1992).

Pharmakologische Wirksamkeit

a) Effekte auf den Darm

Studien belegen positive Wirkungen auf die Darmflora durch Modell-Maillard-Reaktionsprodukte (Ames et al., 1999; Dell'Aquila et al., 2003). MRPs dienen vorzugsweise den gesundheitsfördernden Bakterien wie Bifidobakterien als Nahrungsquelle und steigern so deren Wachstum. Eine Wachstumshemmung von pathogenen Bakterien konnte im Darm nachgewiesen werden. Komplexe Melanoidin-Strukturen wurden hingegen auch von gesundheitsfördernden Bakterien schlecht verwertet und führten eher zu einer Inhibition des Wachstums (Dell'Aquila et al., 2003).

Die Komplexierung von Mutagenen durch Melanoidine unterbindet deren Resorption und trägt auch über diesen Weg zur Gesunderhaltung des Darms bei. (Powrie et al., 1986; Solyakov et al., 2002).

b) Effekte auf die antioxidative Kapazität

Es stellte sich die Frage, ob MRPs auch im menschlichen Körper als Antioxidantien agieren können. Viele *in vitro*-Studien unterstützen mittlerweile diese These (Daglia et al., 2000; Borrrelli et al., 2002). Eine Verbesserung der antioxidativen Kapazität durch erhöhte Glutathion-Spiegel im menschlichen Plasma konnte in Folge eines gemäßigten Kaffeekonsums detektiert werden (Esposito et al., 2003). Valls-Belles beobachtete 2004 an isolierten Ratten-Hepatocyten einen protektiven Effekt auf Lipidperoxidation und Protein-Oxidation durch das Modell-Maillard-Reaktionsprodukt-Gemisch aus Glucose und Glycin.

c) *Effekte auf das chemopräventive Potenzial*

Eine Beeinflussung der chemopräventiven Enzyme konnte sowohl in *in vitro*-, als auch in *in vivo*-Versuchen durch Modell- und Nahrungs-MRPs nachgewiesen werden.

Hofmann et al. konnte in einem *in vitro*-Versuch 2001 zeigen, dass eine trocken erhitzte Glucose-Glycin-Mischung die NADPH-Cytochrom-C-Reduktase und Glutathion-S-Transferase-Aktivität in Caco-2-Zellen senkt. Das MRP-Gemisch aus Glucose und Glycin senkte die Phase I Enzymaktivität um 43 % und die Phase II Enzymaktivität um 22 %. Eine parallele Inkubation der Caco-2-Zellen mit Glucose bzw. Glycin, sowie trocken erhitzter Glucose bzw. Glycin allein führte hingegen nicht zu einer veränderten Phase I- und Phase II-Aktivität.

In einem ähnlich angelegten Versuch von Faist aktivierte die LMW-Fraktion, welche aus gerösteten Malz durch Heißwasserextraktion gewonnen wurde, die NADPH-Cytochrom-C-Reduktase (CCR) um 122 % und die Glutathion-S-Transferase um 33 % in Caco-2-Zellen (Faist et al. 2002).

In einigen *in vivo*-Studien zeigten sich ebenfalls Hinweise auf eine Beeinflussung der Enzymaktivität. Kitts et al. fütterte Mäuse 10 Wochen lang mit einer Nahrung, welche ein MRP-Gemisch aus Glucose-Glycin von 2 % enthielt und konnte eine Senkung der Phase I Aryl-Hydrocarbon-Hydroxylase (AHH), nicht jedoch eine Veränderung der Phase II-Enzymaktivität nachweisen.

Wenzel et al. konnte im Jahr 2000 eine Steigerung der Phase II Glutathion-S-Transferase (GST)-Spiegel um 25 % bei Ratten aufzeigen. Die Ratten wurden 10 Tage lang mit 6 % Carboxymethyllysin (CML), das zu den fluoreszierenden „Advanced Glycation Endproducts“ (AGEs) zählt, gefüttert.

d) *Mutagene und genotoxische Effekte*

Für die mutagene Aktivität von MRPs ist neben der Zeitdauer des Erhitzens auch die Art des reduzierenden Zuckers maßgeblich.

So fand Brands heraus, dass Ketosezucker wie Fructose eine deutlich höhere mutagene Aktivität als Pentosezucker aufweisen (Brands et al., 2000). Das MRP Gemisch aus Kasein und dem reduzierendem Zweifachzucker Lactose wies hingegen keine Mutagenität bei *Salmonella typhimurium* auf (AMES-Test). Generell konnte Brands eine schwächere Mutagenität im Vergleich zu bekannten Mutagenen wie 4-Nitroquinolin-N-Oxid (4-NQO) feststellen.

Taylor untersuchte das genotoxische Potenzial des Melanoidin-Modell-Systems Glucose/Glycin in drei *in vitro*-Assays: AMES-Test, Vitotox-Test, Mikronukleus-Test. Das MRP-Gemisch, sowie dessen LMW- und HMW-Fraktion wiesen keine Genotoxizität auf,

trotz Testkonzentrationen, die höher lagen als sie natürlicherweise in Lebensmitteln vorkommen (Taylor et al., 2004).

Betrachtet man einzelne Maillard-Reaktionsprodukte, so finden sich sowohl gesundheits-schädliche Stoffe wie gesundheitsfördernde Verbindungen. Entscheidend für die Bewertung mutagener oder genotoxischer Effekte ist jedoch das Gemisch. Verglichen mit bekannten Mutagenen, weisen MRP-Gemische nur vernachlässigbare mutagene und genotoxische Effekte in *in vitro*-Systemen auf. Andere Publikationen schreiben den MRPs sogar anti-mutagene Effekte zu. MRPs seien fähig gesundheitsschädliche Stoffe wie heterozyklische aromatische Amine im Darm zu komplexieren und führten so zu einer Abnahme ihrer Resorption (Powrie et al., 1986; Solyakov et al., 2002). Zum anderen wird eine Hemmung der Mutagen-Aktivierung über eine erhöhte Detoxifikation reaktiver Intermediate beschrieben (Kitts et al., 1993; Wenzel et al., 2002). Weitere Publikationen berichten von einer Inhibition des Tumorwachstum durch Zellzyklusarrest und Apoptose bereits im mikromolaren Konzentrationsbereich (Marko et al., 2002 und 2003).

2.3.4. Maillard-Reaktion *in vivo*

Die Maillard-Reaktion findet auch im menschlichem Körper statt. *In vivo* reagiert Glucose unter vornehmlich mit Lysin und Arginin Resten von Proteinen über eine Schiff'sche Base zu *Amadori*-Produkten. Im Laufe der Maillard-Reaktion entstehen „Advanced Glycation Endproducts“ (AGEs), deren Bildung irreversibel ist und zu Protease resistenten Quervernetzung, sog. *Crosslinks*, zwischen Peptiden und Proteinen führt (Brownlee, 1995). Glykierungs-Reaktionen an Lysin- und Arginin-Resten verändern die Enzymaktivität drastisch, da diese Aminosäurereste häufig im Aktivitätszentrum involviert sind.

Die Proteinglykierung wurde *in vivo* als erstes beim Hämoglobin beobachtet (Bookchin und Gallop, 1968). α -Aminogruppen der β -Kette von Hämoglobinen reagieren mit Glucose unter Bildung eines *Amadori*-Produktes (Bunn et al., 1975). Praktische Anwendung findet die Messung des Hämoglobins A_{1c} bei der Therapiekontrolle von Diabetikern, da es eine Aussage über den Glucosespiegel im Blut über die letzten Wochen zulässt (König et al., 1976).

AGEs lagern sich im Gewebe ab und beschleunigen degenerativ-entzündliche und proliferative Prozesse. Unter physiologischen Bedingungen ist die Bildung von AGEs ein relativ langsamer Prozess, so dass die Akkumulation hauptsächlich in langlebigen Proteinen wie Kollagen, Knorpel und Linsenmatrix eine Rolle spielt (Munch et al., 1997).

Die Bildung von AGEs nimmt mit zunehmendem Alter zu. Hohe AGE-Spiegel finden sich vor allem bei Patienten mit Diabetes, Niereninsuffizienz, bei Rauchern und bei einem

gesteigerten Konsum von gegrillten und gebratenen Lebensmitteln (Reddy und Beyaz, 2006). Man geht davon aus, dass die erhöhten AGE-Spiegel mit verschiedenen Komplikationen wie Arteriosklerose, Nephropathie oder Retinopathie in Verbindung stehen (Pirart, 1978; Kume et al., 1995). Ein vermehrtes Auftreten wird auch bei neurodegenerativen Erkrankungen wie Alzheimer beobachtet.

Es scheinen mehrere Wege zu existieren, durch welche die AGEs schädigenden Einfluss aufs Gewebe nehmen können. Zum einen sind AGEs fähig, Quervernetzungen auszubilden, die vom Körper nicht mehr gespalten werden können (Brownlee 1988, 1995). Die durch die AGEs induzierten pathologischen Quervernetzungen führten beim Beispiel Kollagen zu einer erhöhten Starrheit der Proteinmatrix, was eine verringerte Elastizität des Gewebes zur Folge hat (Singh et al., 2001). Ein weiterer Weg erschließt sich, dass nicht nur oxidativer Stress die Bildung von AGEs begünstigt, sondern vielmehr AGEs in der Lage sind selbst oxidativen Stress zu induzieren (Nawroth et al., 1990). Der oxidative Stress seinerseits modifiziert Proteine, Lipide und DNA und führt so zu Dysfunktionen der Organsysteme.

Ebenso interagieren AGEs mit AGE-Rezeptoren (Thornalley, 1998). Den AGEs und ihren Rezeptoren AGE-R1, AGE-R2, AGE-R3, macrophage scavenger receptor II und RAGE (Receptor for AGE) werden eine immer bedeutender werdende Rolle in der Ausbildung von Diabetes-assoziierten Folgeerkrankungen zugesprochen. Darüber hinaus wird ein Einfluss bei der Entstehung von kardiovaskulären Krankheiten angenommen.

Aus diesen Möglichkeiten der AGE Wirkung ergeben sich die Behandlungsansätze, die auf verschiedenen Wegen versuchen, die pathologischen Eigenschaften der AGEs auf das Gewebe zu vermindern und zu blockieren. Verschiedene AGE-Inhibitoren wurden bereits entwickelt. Dazu zählen Aminoguanidin (Pimagedine[®]), Metformin, Carnosin (β -alanyl-L-Histidin) und Pyridoxamin (Vitamin B₆). Diese Substanzen wirken sich hauptsächlich über zwei Wege hemmend auf die Maillard-Reaktion *in vivo* aus. Zum einen überführen sie reaktive Maillard-Reaktionsintermediate in reaktionsträge Verbindungen. Aminoguanidin entfaltet beispielsweise seine hemmende Wirkung auf die Maillard-Reaktion *in vivo* durch die Überführung der reaktiven 1,2-Dicarbonylverbindungen in untoxische und unreaktive 1,2,4-Triazine (Stadler et al., 2005). Zum anderen wird die Bildung von reaktiven Maillard-Reaktionsintermediaten oder *Crosslinks* verhindert, wie im Fall von Pyridoxamin (Booth et al., 1997; Metz et al., 2003).

Ein weiteren Ansatz stellen 1,3-Thiazoliumderivate dar, die fähig sind, bereits bestehende Protein-Crosslinks wieder zu spalten (Thomas et al., 2005).