

4. Ergebnisse und Diskussion

4.1. Gewinnung und Charakterisierung der Maillard-Reaktionsprodukte

Auswahl der Aminosäure- und Zuckerkomponente

Die Art der Aminosäure- und der Zuckerkomponente ist für die Bildung der Maillard-Reaktionsprodukt-Gemische entscheidend (Westpfahl & Kroh; 1985). Für die Gewinnung der Maillard-Reaktionsprodukte wurde als reduzierender Zucker überwiegend Glucose verwendet. Um mögliche Unterschiede zwischen Hexosen (Glucose) und Pentosen (Fructose) als Zuckerkomponente zu untersuchen, wurde ferner ein Maillardproduktgemisch aus Fructose und Glycin hergestellt.

Zusätzlich wurden einige MRP-Gemische mit Lactose als reduzierendem Zweifachzucker hergestellt. Lactose besitzt für die Lebensmittelindustrie wertvolle technologische Eigenschaften, und da es lebensmittelrechtlich als Zutat gilt, findet sich Lactose nicht nur in Milch- und Milchprodukten sondern mittlerweile auch in zahlreichen Lebensmitteln wieder. Als Aminkomponente wurden folgende Aminosäuren (AS) aufgrund unterschiedlicher Strukturelemente und funktioneller Gruppen ausgewählt: Arginin (basische AS, Guanidinstruktur), Asparaginsäure (saure AS, Carboxylfunktion), Asparagin (neutrale AS, Amidfunktion), Serin (neutrale AS, Hydroxylfunktion), Prolin (heterozyklische sekundäre AS), Tryptophan (neutrale AS, Indolrest) und Glycin (neutrale AS).

Herstellung der Maillard-Reaktionsprodukte

Die Maillardproduktgemische wurden nach Vorschrift der COST Action 919 gewonnen. Je nach Art der Aminosäure und des verwendeten Zuckers sind nach einem zweistündigen Erhitzen bei 125 °C Maillardproduktgemische entstanden, die sich im Geruch, im Bräunungsgrad und in ihrer Löslichkeit in Wasser und Ethanol deutlich voneinander unterscheiden. Mit Glc-Arg werden nur wasserlösliche, dunkelbraun gefärbte Maillard-Reaktionsprodukte, mit Glc-Trp, Glc-Asn, Glc-Pro überwiegend wasserlösliche Verbindungen erhalten. Mit Lactose als Zuckerkomponente werden unabhängig von der eingesetzten Aminosäure nur wasserlösliche Maillardproduktgemische gewonnen, die im Gegensatz zu MRP-Gemischen aus Glucose einen deutlich schwächeren Bräunungsgrad aufweisen. Wird Glucose durch den Pentosezucker Fructose ersetzt, so entsteht durch die Maillard-Reaktion ein Pulvergemisch, welches eine schwächere Braunfärbung als Glc-Glyc aufweist und zudem leichter ist. (siehe Tabelle 5).

Tabelle 5 Auftrennung der hergestellten MRPs nach ihren Lösungseigenschaften in Wasser und Ethanol

Zucker-Aminosäure	Wasser-Auszug	ETOH-Auszug	Rückstand
<u>Glucose</u>			
Glucose-Arginin (Glc-Arg)	alles gelöst dunkelbraunes Lyophilisat	-	-
Glucose-Asparagin (Glc-Asn)	größter Anteil in Wasser gelöst, Lyophilisat gelb-braun mit goldartigen Anteilen (2,24 g \approx 60 %)	hellbraunes Pulver 0,11 g	stark dunkelbraun
Glucose-Serin (Glc-Ser)	1,3 g (\approx 33 %) leichtes, braunes Pulver mit goldartigen Anteilen	0,05 g	2,38 g, schweres, feines, schwarzbraunes Pulver
Glucose-Prolin (Glc-Pro)	unangenehmer Geruch, orangebraun; 3,3 g (\approx 83 %)	0,2 g	180 mg; dunkel orangebraun, gut riechend
Glucose-Asparaginsäure (Glc-Asp)	orangebraun, 1,35 g (\approx 43 %)	0,07 g	2,33 g Rückstand schweres, feines, schwarzbraunes Pulver
Glucose-Tryptophan (Glc-Trp)	orangebraun mit goldartigen Anteilen 2,3 g (\approx 60 %)	0,84 g	0,422 g hellbraun
Glucose-Glycin (Glc-Gly)	dunkelbraun, silbrig glänzend	-	2,8 g (50 %)
<u>Fructose</u>			
Fructose-Glycin	braun	-	1,6 g (30 %)
<u>Lactose</u>			
Lactose-Glycin (Lac-Gly)	hellbraun, goldfarbene Anteile 4 g	-	-
Lactose-Prolin (Lac-Pro)	hellbraun, viele goldfarbene Pigmente; 4 g	-	-
Lactose-Asparagin (Lac-Asn)	gelbocker; 4 g	-	-

Bestimmung des Gehalts an kurzkettigen Fettsäuren

Im Zuge der Maillardreaktion werden beim Abbau der α -Dicarbonylverbindungen Ameisensäure und Essigsäure gebildet. Essigsäure zählt zu den kurzkettigen Fettsäuren. Den kurzkettigen Fettsäuren werden Einflüsse auf die Proliferation, Differenzierung und Apoptose von Kolonzellen nachgesagt. Aus diesem Grund wurden die Maillardproduktgemische nach ihrer Herstellung auf das Vorhandensein von kurzkettigen Fettsäuren (SCFAs), inklusive Ameisensäure untersucht. Damit lassen sich Aussagen treffen, ob Effekte durch MRPs auf das Vorhandensein von SCFAs bzw. Ameisensäure zurückzuführen sind. Als Methode wurde die Gaschromatographie verwendet.

Zur Quantifizierung des Gehalts von SCFAs und Ameisensäure in den Maillardproduktgemischen wurden für Ameisensäure, Essigsäure, Propionsäure und Buttersäure Kalibriergeraden erstellt. Alle Kalibriergeraden zeigten eine lineare Abhängigkeit der Peakfläche von der Ausgangskonzentration (Abb.18). Als Retentionszeiten wurden für Ameisensäure 5,9; für Essigsäure 5,07; für Propionsäure 6,6 und für Buttersäure ein Wert von 8,4 min erhalten.

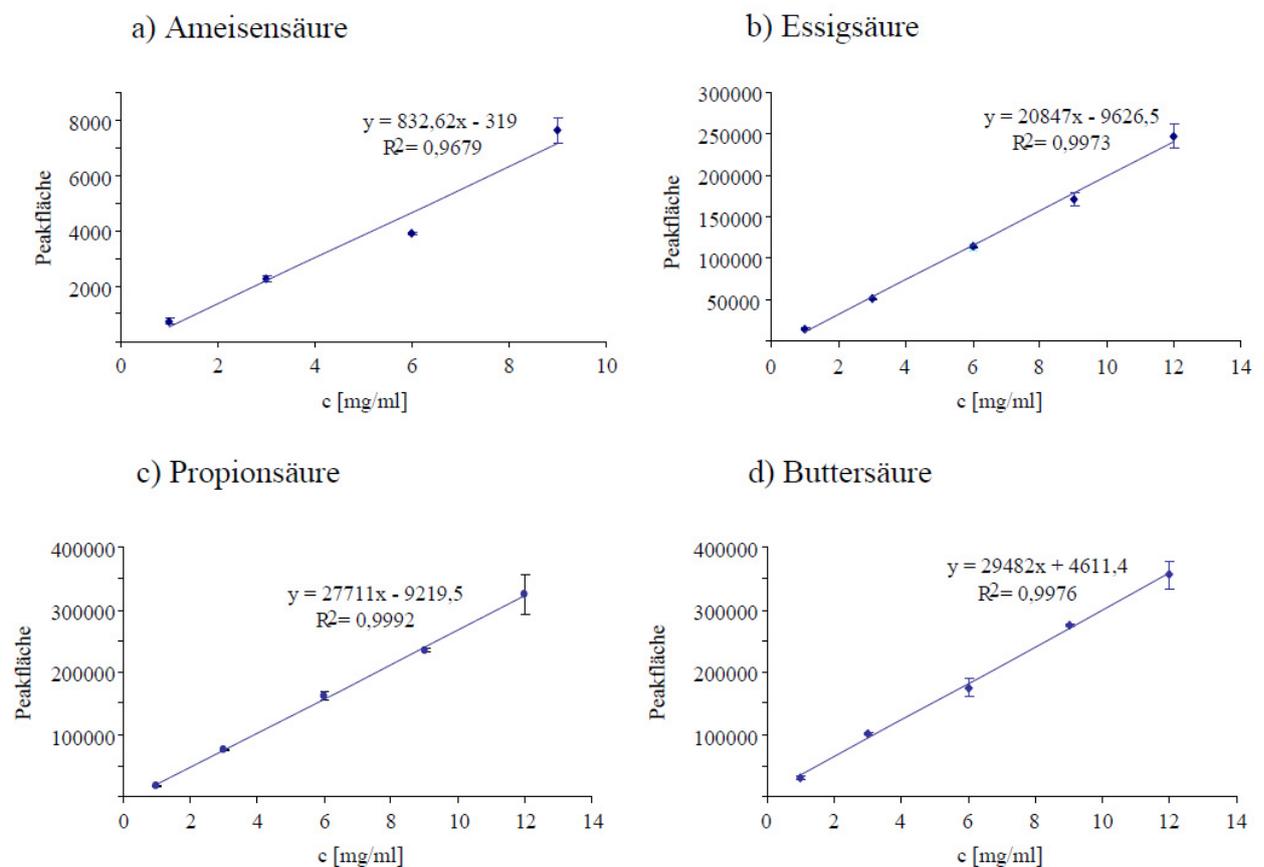


Abbildung 18: Kalibriergeraden von Ameisensäure bis Buttersäure. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD aus 5 Versuchen.

In allen getesteten Maillardproben konnte weder Propionsäure noch Buttersäure detektiert werden. Lediglich das Maillard-Reaktionsprodukt-Gemisch Glucose-Prolin enthielt Ameisensäure und Essigsäure (Abb19). Glucose-Arginin, Glucose-Serin und Lactose-Prolin wiesen nur kleine Mengen an Essigsäure auf. Die Maillard-Reaktionsprodukte wurden in diversen Zellkulturtests mit einer Konzentration von 1 mg/ml eingesetzt, so dass der Gehalt der detektierten kurzkettigen Fettsäuren bei dieser Konzentration kleiner als 10 mM betrug. Ein Einfluss seitens der Ameisensäure bzw. Essigsäure auf die verwendeten Zelllinien ist bei dieser Konzentration nicht zu erwarten. Vermutlich wurde die Hauptmenge an Ameisensäure und Essigsäure bereits bei der Herstellung entfernt. Die Siedepunkte von Ameisensäure (101 °C) und Essigsäure (118 °C) liegen unterhalb der Herstellungstemperatur von 125 °C.

Tabelle 6: Detektierte Menge an SCFAs in 1 mg/ml der Maillard-Reaktionsprodukt-Proben. Dargestellt ist der Median aus 3 Versuchen. n.d. = nicht detektiert

MRP	Ameisensäure	Essigsäure	Propionsäure	Buttersäure
Glucose-Arginin	n.d.	0,087 mg/ml (1,45 mM)	n.d.	n.d.
Glucose-Asparagin	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Glucose-Serin	n.d.	0,11 mg/ml (1,83 mM)	n.d.	n.d.
Glucose-Glycin	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Lactose-Glycin	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Glucose-Prolin	0,51 mg/ml (11,1 mM)	0,075 mg/ml (1,25 mM)	n.d.	n.d.
Lactose-Prolin	n.d.	0,105 mg/ml (1,75 mM)	n.d.	n.d.

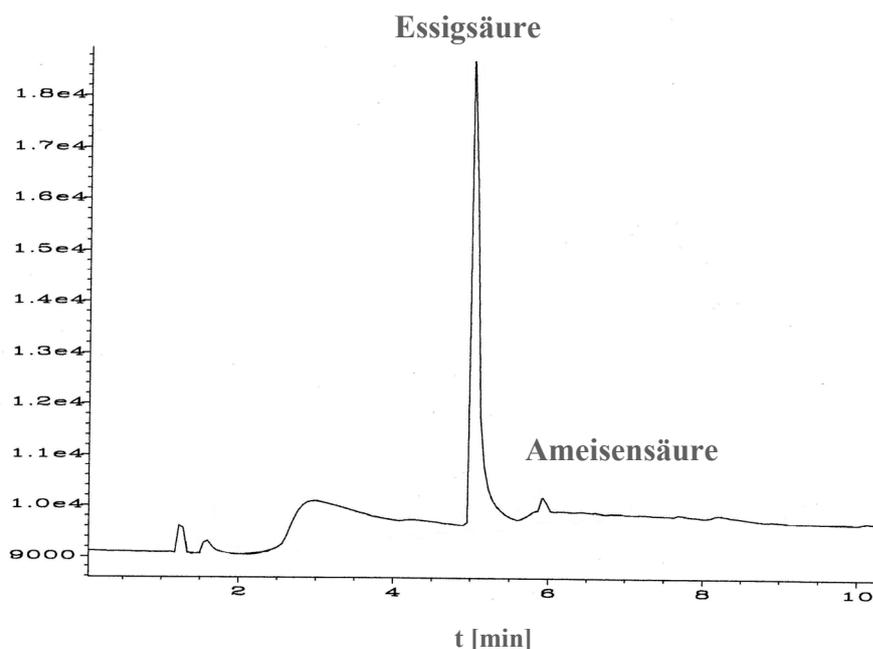


Abbildung 19: Gaschromatogramm von Glucose-Prolin (10 mg/ml)

4.2. *In vitro*- Toxizitätsprüfung

Um zytotoxische Effekte bei der Bewertung der Testergebnisse auszuschließen, wurde der Einfluss der Testsubstanzen auf die Zellviabilität von Caco-2-Zellen und LS180-Zellen unter Verwendung des MTT-Tests bestimmt. Dieser Test basiert auf der Spaltung des gelben Tetrazoliumsalzes in das dunkelblaue Formazan durch mitochondriale Dehydrogenasen metabolisch aktiver Zellen. Trägt man die OD-Werte als Maß für die Viabilität gegen die Konzentration der Testsubstanzen in einem Diagramm auf, so kann daraus die mittlere inhibitorische Konzentration (IC_{50}) bestimmt werden. Da die Inkubation einer Zeitdauer von 48 h umfasst, spielen neben der Hemmung der Dehydrogenasen auch Einflüsse auf die Proliferation eine Rolle. Wirken sich Testsubstanzen hemmend auf die Zellteilung aus, werden verglichen mit unbehandelten Zellen, niedrigere OD-Werte erhalten, obwohl keine Toxizität vorliegen muss. Generell muss festgehalten werden, dass dieser Test an Zellen während ihrer Zellteilung angewendet wird. In dieser Periode sind Zellen wesentlich empfindlicher als im späteren Stadium. Häufig werden erst im Zuge der Differenzierung Schutzmechanismen wie Efflux oder Metabolisierung der Substanzen ausgebildet. Des Weiteren repräsentieren die IC_{50} -Werte die Einflüsse der Substanzen auf die Zellviabilität infolge einer 48 h-Inkubation. Eine Inkubationsdauer von 48 h wurde entsprechend der Inkubationsdauer von 48 h im RH 123-Akkumulationstest I ausgewählt. Werden die Zellen für 90 min, welcher dem Testzeitraum des RH 123-Akkumulationstests II entspricht, mit den Substanzen inkubiert, so wurde die Zellviabilität im MTT-Test nur minimal beeinflusst. Aus diesem Grund sind die erhaltenen IC_{50} -Werte für die Auswahl der geeigneten Konzentrationen der Testsubstanzen nur als grobe Richtwerte zu verstehen.

4.2.1. Salze kurzkettiger Fettsäuren

Caco-2-Zellen

Die Inkubation der Caco-2-Zellen für 48 h führte bei allen Testsubstanzen zu einer konzentrationsabhängigen Verminderung der Viabilität. Die ermittelten Zellviabilitäten sind für Na-Formiat, Na-Acetat und Na-Propionat in Abb. 20 und für die restlichen Salze kurzkettiger Fettsäuren in Abb.21 dargestellt.

Na-Formiat, Na-Acetat und Na-Propionat erwiesen sich bei Konzentrationen von 150 bis 200 mM als zytotoxisch und führten zum Zelltod einiger Caco-2-Zellen. Die lebenden Zellen waren stark granuliert und verkümmert. Bei Konzentrationen von 25 mM bis 100 mM war die

Zellteilung gegenüber unbehandelten Caco-2-Zellen verringert. Nach der Zellinkubation mit MTT waren alle Zellen blau gefärbt und somit fähig, MTT zu reduzieren. Ungefärbte und damit tote Zellen wurden unter dem Lichtmikroskop nicht gesichtet. Die Zellinkubation mit einer Konzentration von 25 μM zeigte bei Na-Formiat, Na-Acetat und Na-Propionat keine mikroskopisch sichtbaren Unterschiede zu unbehandelten Caco-2-Zellen. Nach Bestimmung des OD-Wertes konnte für Na-Formiat ein IC_{50} -Wert von 40 mM, für Na-Acetat ein IC_{50} -Wert von 50 mM und für Na-Propionat ein IC_{50} -Wert von 25 mM ermittelt werden.

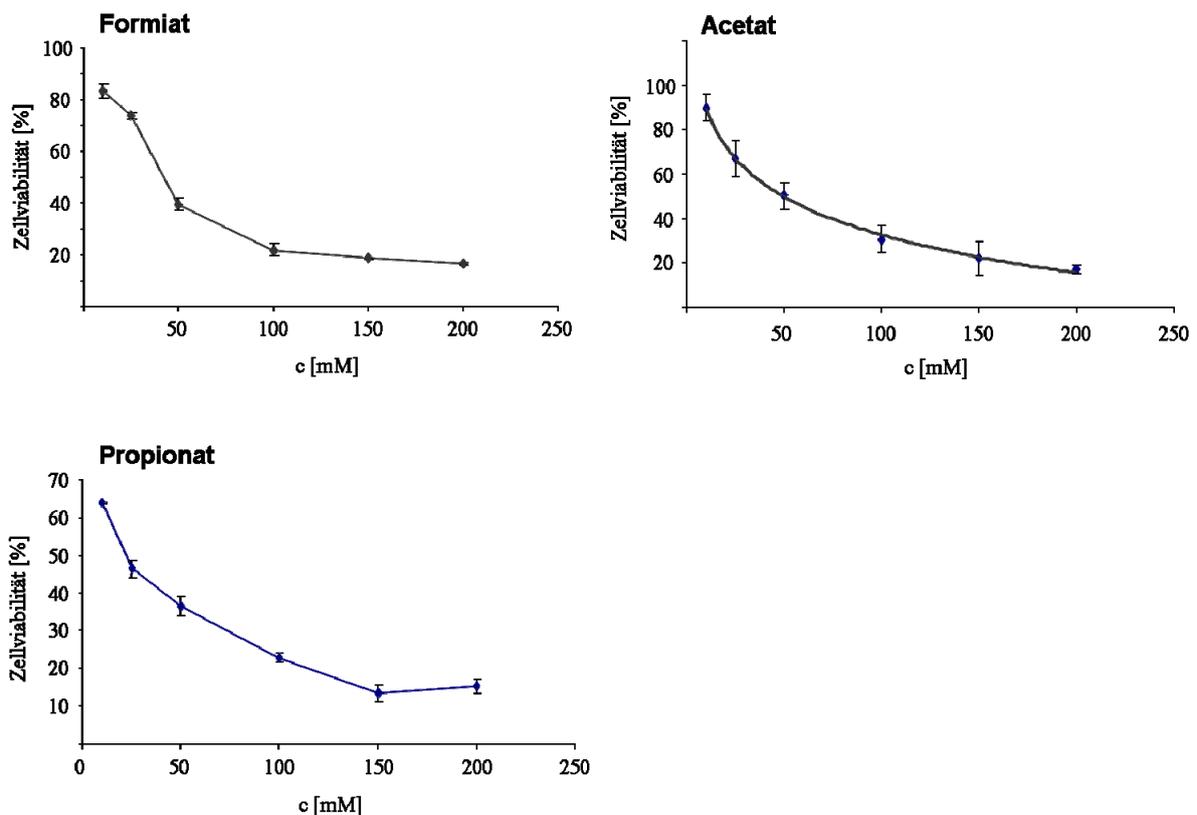


Abbildung 20: Bestimmung der IC_{50} von Na-Formiat, Na-Acetat und Na-Propionat an Caco-2-Zellen mit dem MTT-Test. Dargestellt ist die Zellviabilität der Caco-2-Zellen nach 48 h-Inkubation in Abhängigkeit vom Konzentrationsbereich 10 bis 200 mM (Mittelwert \pm SD; n= 5 Versuche).

Eine Inkubation der Caco-2-Zellen mit Na-Butyrat für 48 h führte bei Konzentrationen über 8 mM zu einer Hemmung der Zellteilung. Ebenso waren ungefärbte, d.h., tote Zellen im Mikroskop sichtbar. Im Konzentrationsbereich von 4 bis 6 mM ist eine gegenüber der Kontrolle deutlich verminderte Zellteilung erkennbar. Unterhalb von 2 mM ist kein Unterschied zur Kontrolle ermittelbar. Na-Butyrat ist nicht nur ein Inhibitor der Zellteilung, sondern bei erhöhten Konzentrationen auch zytotoxisch. Eine IC_{50} von 5 mM wurde anhand der Testdaten berechnet.

Na-Valeriat und seine verzweigte Form Na-Isovaleriat erwiesen sich im Konzentrationsbereich von 0,5-10 mM als untoxisch, d.h., es waren keine toten Zellen mikroskopisch sichtbar. Eine leichte Reduktion der Zellteilung konnte beobachtet werden.

Na-Capronat wirkte auf Caco-2-Zellen nicht zytotoxisch, reduzierte aber die Zellviabilität in Abhängigkeit von der eingesetzten Ausgangskonzentration. Die Diagrammauswertung (Abb.21) von Na-Capronat ergab eine IC_{50} von 10 mM.

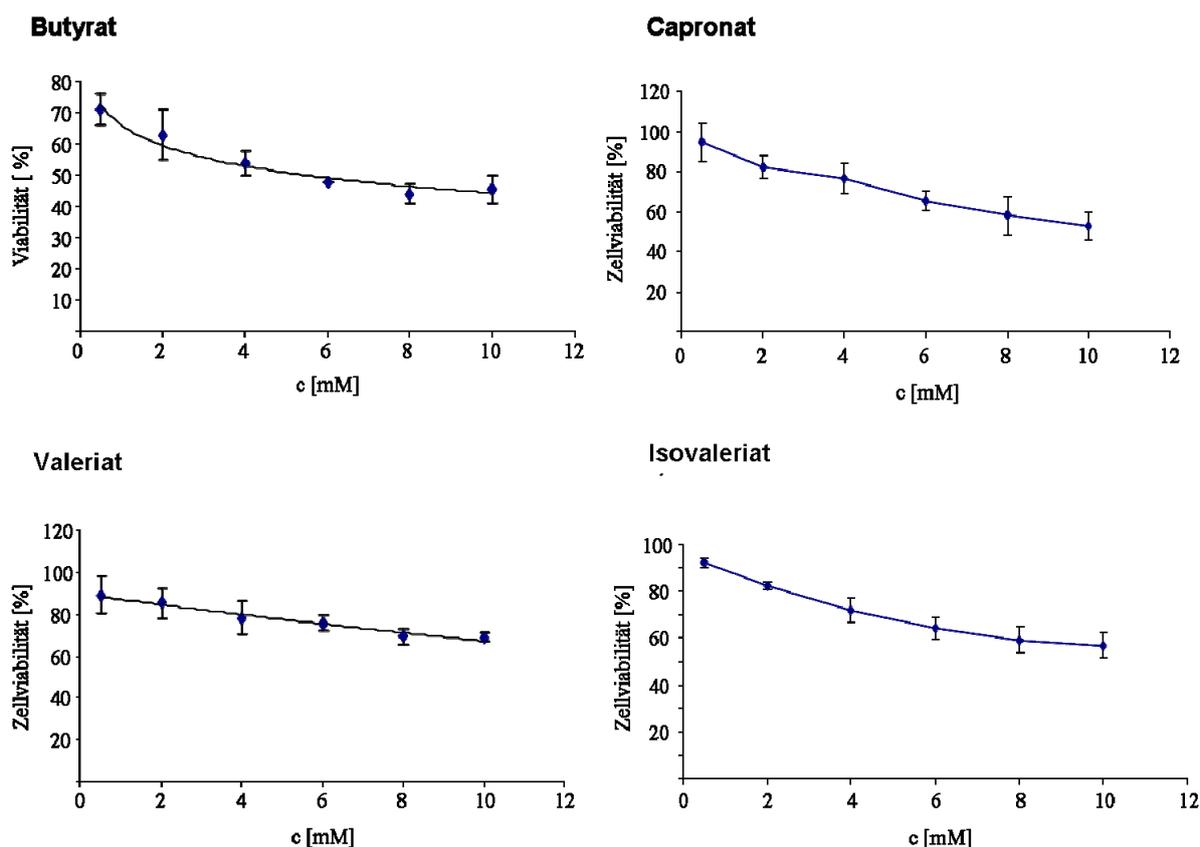


Abbildung 21: Bestimmung der IC_{50} von Na-Butyrat, Na-Valeriat, Na-Isovaleriat und Na-Capronat an Caco-2-Zellen mit dem MTT-Test. Dargestellt ist die Zellviabilität der Caco-2-Zellen nach 48 h-Inkubation in Abhängigkeit vom Konzentrationsbereich 0,5 bis 10 mM. (Mittelwert \pm SD; n= 5 Versuche).

LS180-Zellen

Die Salze kurzkettiger Fettsäuren wurden ebenfalls an LS180-Zellen getestet. Die IC_{50} -Werte entsprachen überwiegend den IC_{50} -Werten bei Caco-2-Zellen. Lediglich bei den IC_{50} -Werten von Acetat und Formiat ergaben sich Unterschiede. Acetat führte im gesamten Konzentrationsbereich nicht zum Absterben von LS180-Zellen. Unter dem Mikroskop wirkten die LS180-Zellen insgesamt robuster bzw. unempfindlicher gegenüber den Testsubstanzen als Caco-2-Zellen. Zusammenfassend sind alle ermittelten IC_{50} Werte tabellarisch aufgeführt (Tab.7).

Tabelle 7: Übersicht der berechneten IC₅₀-Werte anhand von MTT-Tests an Caco-2- und LS180-Zellen

MTT Test an Caco-2-Zellen		MTT Test an LS180-Zellen	
Testsubstanz	IC50 in mM	Testsubstanz	IC50 in mM
Na-Formiat	40	Na-Formiat	50
Na-Acetat	50	Na-Acetat	80
Na-Propionat	25	Na-Propionat	25
Na-Butyrat	5	Na-Butyrat	5
Na-Isobutytrat	> 10	Na-Isobutytrat	> 10
Na-Valeriat	> 10	Na-Valeriat	> 10
Na-Isovaleriat	> 10	Na-Isovaleriat	> 10
Na-Capronat	10	Na-Capronat	10

4.2.2. Maillard-Reaktionsprodukte (MRPs)

Die Maillard-Reaktionsprodukte Glc-Pro, Glc-Ser und Glc-Asn wurden stellvertretend ausgewählt und ihr zytotoxisches Potenzial an Caco-2- und LS180-Zellen getestet. Die wasserlöslichen Verbindungen der Maillard-Reaktionsprodukt-Mischungen wurden im Konzentrationsbereich von 0,1-2 mg/ml untersucht. Die Zellviabilitäten von Caco-2-Zellen in Abhängigkeit vom eingesetztem MRP-Gemisch sind in Abb. 22 dargestellt.

Glc-Pro reduzierte die Zellviabilität von LS180-Zellen stärker als die von Caco-2-Zellen. Bei Caco-2-Zellen konnte erst ab 1 mg/ml eine Absenkung detektiert werden. Bei LS180-Zellen senkte bereits die Konzentration von 0,1 mg/ml die Zellviabilität auf 80 %. Eine Erhöhung der Konzentration bis auf 2 mg/ml senkte die Viabilität nur noch schwach bis auf Werte um 65 %. Bei Glc-Ser konnten nach mikroskopischer Betrachtung weder zytotoxische Effekte noch ein Einfluss auf die Zellproliferation über den gesamten Konzentrationsbereich beobachtet werden. Die Zellviabilität sank bei beiden Zelllinien nie unter 70 %. Glc-Asn reduzierte die Zellviabilität bei Caco-2-Zellen nur um maximal 20 %. Bei LS180-Zellen konnte eine leichte Absenkung der Zellviabilität auf ca. 90 % nur bei 2 mg/ml bestimmt werden.

Trotz hoher Konzentrationen der eingesetzten wasserlöslichen MRPs wurde die Zellviabilität bei Caco-2- und LS180-Zellen verhältnismäßig schwach reduziert. Lediglich bei Glc-Pro konnte bei 2 mg/ml ein schädigender Einfluss auf die Zellen unter dem Mikroskop beobachtet werden. Vereinzelt waren die Zellen granuliert und wirkten verkümmert. Jedoch konnten

keine toten Zellen gesichtet werden. Unter den getesteten MRPs übte Glc-Pro den größten Einfluss auf die Zellviabilität aus.

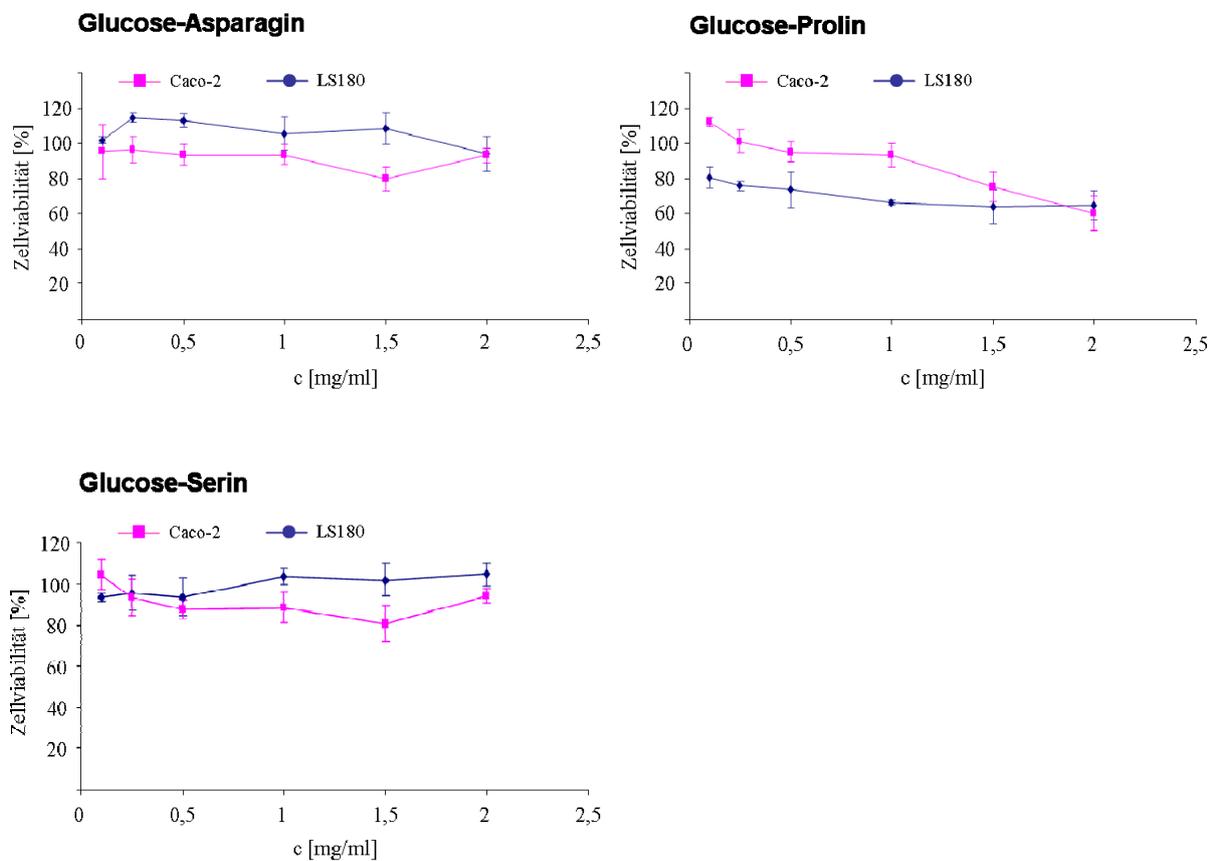


Abbildung 22: Untersuchung der Zellviabilität von Caco-2- und LS180-Zellen in Gegenwart von Glc-Asn, Glc-Pro und Glc-Ser. Nach 48 h-Inkubation wurde die Zellviabilität der Zellen mit dem MTT-Test bestimmt. Die wasserlöslichen MRPs wurden im Konzentrationsbereich 0,1-2 mg/ml getestet. (Mittelwert \pm SD; n= 5 Versuche)

Die ethanollöslichen Lösungsmittelfractionen dieser MRPs wurden nur mit einer Konzentration von 0,1 mg/ml eingesetzt aufgrund der schlechten Löslichkeit in Medium und Puffer. Die Zellviabilitäten beider Zelllinien lag bei allen drei MRPs zwischen 85 bis 94 %.

4.3. Etablierung des Rhodamin 123-Akkumulationstests

Der Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin 123 (RH 123) ist ein Substrat des Effluxtransporters P-Glykoprotein mit hoher Affinität. Die Bestimmung der RH 123-Akkumulation in Zellen lässt Rückschlüsse auf die Aktivität des P-Glykoproteins (P-gp) zu.

Die P-Glykoprotein-Expression in Zelllinien wird sehr stark durch Kulturbedingungen wie Einsaatdichte, Kultivierungsdauer und Passagezahl beeinflusst (Behrens & Kissel, 2003; Sambuy et al., 2005). P-gp ist zudem als Transportsystem sättigbar. Für repräsentative Ergebnisse ist es daher zwingend notwendig, den RH 123-Akkumulationstest zu etablieren.

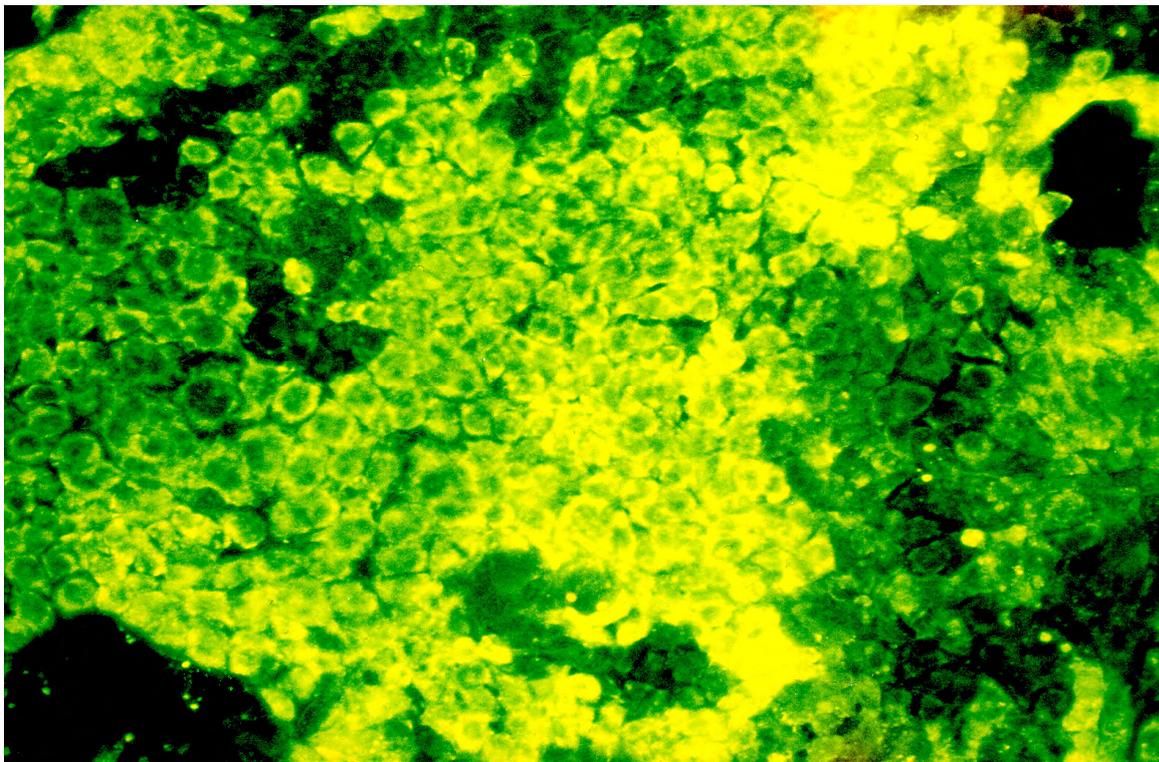


Abbildung 23: Die fluoreszenzmikroskopische Aufnahme zeigt die Aufnahme von Rhodamin 123 in Caco-2-Zellen. 21 d alte Caco-2-Zellen wurden für 90 min mit Rhodamin 123 inkubiert und anschließend 3 x gespült. (100-fach vergrößert)

4.3.1. Auswahl der Zelllinien für den Rhodamin 123-Akkumulationstest

Für Zellkulturversuche wurde zum einen die Caco-2-Zelllinie zum anderen die LS180-Zelllinie ausgewählt, um Aussagen zur Inhibition und zur Induktion des P-Glykoproteins treffen zu können. Beide Zelllinien wurden 1974 aus Kolonkarzinomen isoliert.

Caco-2-Zellen exprimieren im Gegensatz zu LS180-Zellen bereits konstitutiv das P-Glykoprotein. Liegt lediglich eine Steigerung der Rhodamin 123-Akkumulation bei Caco-2-Zellen, nicht jedoch bei LS180-Zellen vor, so kann von einer Inhibition des P-Glykoprotein-Effluxes ausgegangen werden.

Der Effluxtransporter ist bei Caco-2-Zellen nur über den Vitamin D-Rezeptor (VDR), bei LS180-Zellen noch zusätzlich über den Pregnan X-Rezeptor (PXR) induzierbar. Eine Induktion des P-gp nach einer Inkubationszeit von mindestens 24 h geht aufgrund eines verstärkten Effluxes mit einer Verminderung der Rhodamin 123-Akkumulation einher. Somit können durch Verwendung beider Zelllinien Rückschlüsse gezogen werden, ob und auf welchem Wege eine Induktion des P-gp erfolgt.

4.3.2. Test-Etablierung bei Caco-2-Zellen

RH 123-Akkumulation über die Zeit in Abhängigkeit vom Efflux durch P-Glykoprotein

Um den Einfluss des P-Glykoproteins auf die RH 123-Akkumulation zu untersuchen, wurden 21 d alte Caco-2-Monolayer entweder mit RH 123 allein (Abb.24a) oder RH 123 und Elacridar (Abb.24b), einem P-gp-Inhibitor, versetzt. Die Inkubation fand in Zeitintervallen bis zu 180 min statt. Anschließend wurden die Zellen lysiert und der RH 123-Zellinhalt fluorimetrisch bestimmt.

Akkumulierte RH 123 allein, so fand der stärkste Einstrom in die Zellen innerhalb der ersten 30 min statt. Dann folgte eine plateauähnliche Phase, in der nur noch ein leichter Anstieg der intrazellulären RH 123-Konzentration zu verzeichnen war (Einstrom > Ausstrom), Resultat der Einstellung eines Influx-/Efflux-Gleichgewichts (Abb.24a).

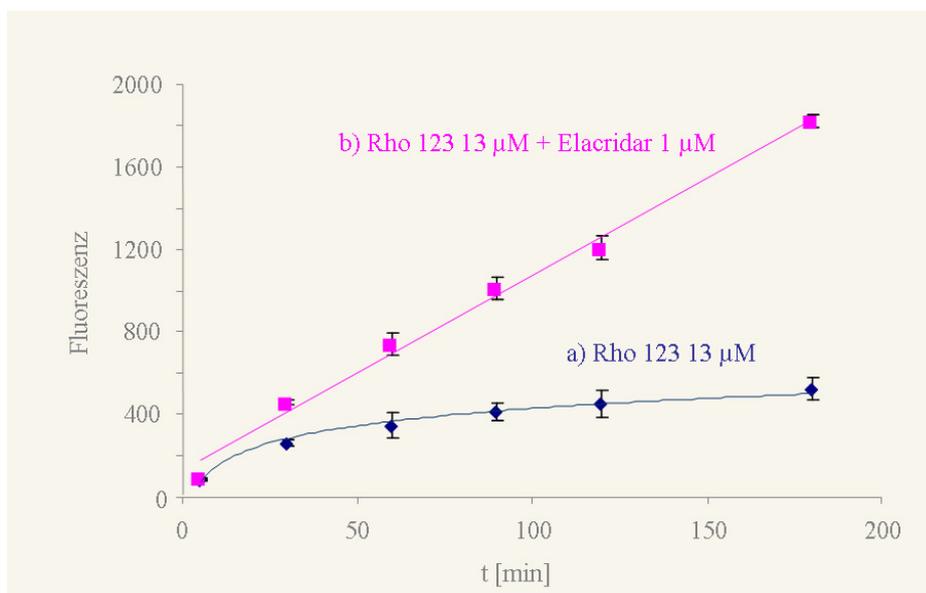


Abbildung 24: RH 123-Akkumulation in Caco-2-Zellen bei Efflux (a) und bei Effluxinhibition (b). 21 d alte Caco-2-Zellen wurden für 90 min entweder mit RH123 (a) oder mit RH 123 + Elacridar (b) inkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD aus 5 Versuchen.

Eine gemeinsame Inkubation mit Elacridar führte zu einer linearen Aufnahme von RH 123 in die Zellen innerhalb von 180 min (Abb.24b). Die intrazelluläre RH 123-Konzentration war gegenüber der Akkumulation ohne Inhibition erhöht. Je länger die Inkubationszeiten gewählt wurden, desto größere prozentuale Unterschiede ergaben sich zwischen den RH 123-Akkumulationen bei Efflux und denen bei Effluxinhibition. Die Höhe des RH 123-Zellinhalts bei Effluxinhibition ist demnach, neben dem Hemmpotential der P-gp-Inhibitoren, abhängig von der gewählten Inkubationsdauer. Ein Vergleich des Hemmpotentials von Testsubstanzen ist nur dann möglich, wenn die Versuchsbedingungen inklusive der Zeitdauer exakt übereinstimmen. Anders bei Effluxstudien: Der Efflux nach Inkubation von RH 123 kann maximal zu 100 % reduziert werden. Somit zeigen Akkumulationsstudien lediglich auf, ob eine Substanz P-gp modulierende Eigenschaften besitzt und ob diese im Vergleich zur RH 123-Akkumulation ohne Testsubstanz als schwach, mittel oder stark einzustufen sind. Eine Inkubationsdauer von 90 min ist für das Testmodell geeignet, um die Fähigkeiten der Testsubstanzen als P-gp-Modulatoren zwischen schwach und stark zu differenzieren.

Einfluss der Ausgangskonzentration auf die RH 123-Akkumulation

Die Ausgangskonzentration und Fluoreszenzwerte als Maß für den RH 123-Zellinhalt verhalten sich direkt proportional. Umso höher die Ausgangskonzentration ist, desto höhere RH 123-Mengen lassen sich im Zellinneren der Caco-2-Zellen finden. Linearität zwischen der Ausgangskonzentration des RH 123 und der Fluoreszenz ist in einem Bereich von 10-50 μM bei Efflux (Abb.25a) und bei Effluxinhibition (Abb.25b) gegeben. Als Standardkonzentration für dieses Testmodell wurde eine Ausgangskonzentration von 13 μM ausgewählt.

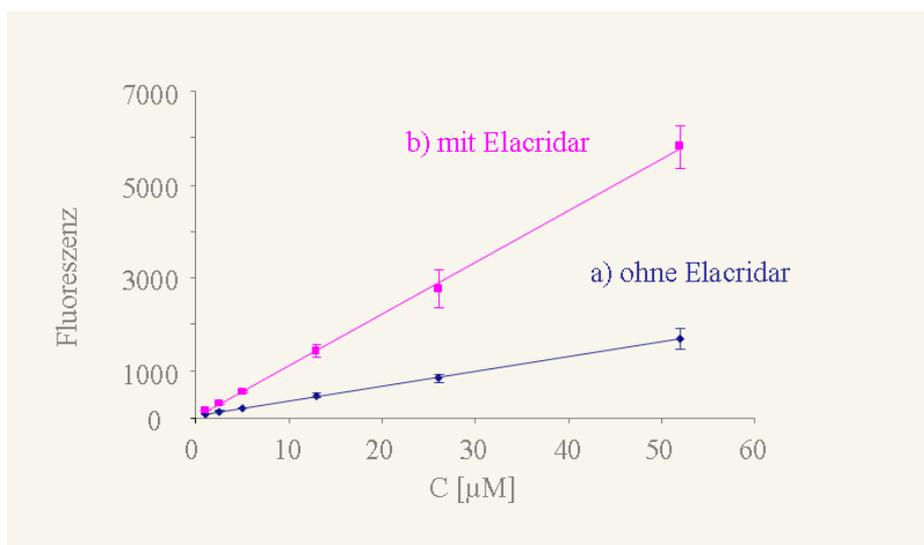


Abbildung 25: Einfluss der Ausgangskonzentration auf die RH 123-Akkumulation bei Efflux (a) und bei Effluxinhibition (b). 21 d alte Caco-2-Zellen wurden für 90 min entweder mit RH123 (a) oder mit RH 123 + Elacridar (b) inkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD aus 5 Versuchen.

Bestimmung der optimalen Einsaatdichte und deren Einfluss auf die RH 123 Akkumulation

Die Einsaatdichte der Zellen ist ein entscheidender Faktor bei der Expression von Transportern und Enzymen. Differenzierung setzt nämlich erst dann ein, wenn die Zelleinsaat Konfluenz erreicht, d.h., die Zellen die gesamte Wachstumsfläche bedecken. Daher können unterschiedliche Zelleinsaaten, trotz gleicher Kultivierungszeit, zu Unterschieden im Differenzierungsstadium und damit zu Unterschieden in Expressionsraten führen. Behrens und Kissel zeigten 2003 eine Korrelation zwischen Einsaatdichte und der P-Glykoprotein-Expression auf.

Zur Ermittlung der optimalen Einsaatdichte wurden 48-Well-Platten mit $0,5 \times 10^4$, $1,5 \times 10^4$ oder mit $2,5 \times 10^4$ Zellen/Well versehen und für 21 d kultiviert. Während der Kultivierung wurden die Zelleinsaaten mikroskopisch betrachtet. Die Zelleinsaaten mit $1,5$ und $2,5 \times 10^4$ Zellen wiesen bereits nach 2-3 d Konfluenz auf, während die niedrigste Zelleinsaat erst nach 5 d Konfluenz zeigte. Generell zeigte sich bei den Wells mit $0,5 \times 10^4$ Zellen Einsaat ein deutlich schlechteres morphologisches Bild. Zudem erschien der Monolayer dünn und zart und wies Bereiche mit unterschiedlichen Differenzierungsstadien auf. Zwischen den Einsaaten von $1,5$ und $2,5 \times 10^4$ Zellen/Well bestand ein Abstand von 2 d im Differenzierungsstadium. Ansonsten zeigte sich in den Wells ein homogenes morphologisches Bild. Nach 21 d waren keine morphologischen Unterschiede mehr zwischen den drei Zelleinsaaten auszumachen. Dieses Bild konnte auch mit dem RH 123-Akkumulationstest bestätigt werden, dessen Ergebnisse in Tabelle 8 dargestellt werden. Bei den untersuchten Zelleinsaaten konnte eine ähnliche intrazelluläre RH 123-Konzentration nach Lyse der Monolayer ermittelt werden. Die Inhibition des P-gp durch $1 \mu\text{M}$ Elacridar führte bei allen Einsaaten zu einer Verdopplung des RH 123-Zellinnenhalts. Somit kann von einem ähnlichen P-gp-Level ausgegangen werden.

Tabelle 8: RH 123-Akkumulation in Caco-2-Zellen nach 90 min in Abhängigkeit von der Einsaatdichte. Der RH 123-Zellinhalt wurde anhand einer Kalibriergerade bestimmt und stellt den Mittelwert \pm SD aus 5 Versuchen dar.

Zelleinsaat/ Well	RH123 Akkumulation [μM]	RH123 Akkumulation [μM] bei Effluxinhibition
$0,5 \times 10^4$	$0,245 \pm 0,004$	$0,508 \pm 0,065$
$1,5 \times 10^4$	$0,241 \pm 0,033$	$0,492 \pm 0,052$
$2,5 \times 10^4$	$0,250 \pm 0,068$	$0,496 \pm 0,089$

Eine Variation der Zelleinsaatdichte von $0,5 \times 10^4$ bis $2,5 \times 10^4$ Zellen/Well nimmt keinen Einfluss auf die RH 123 Akkumulation in Caco-2-Zellen. Aufgrund des homogenen Erscheinungsbildes bei der mikroskopischen Kontrolle ist der Einsaat von mindestens $1,5 \times 10^4$ Zellen/Well den Vorzug zu geben. Abweichungen in der Zellzahl, z.B. durch Fehler in der Zellzahlbestimmung nach Trypsinierung oder ungleichmäßige Einsaat der Zellen, können unberücksichtigt bleiben. Das in mehreren Publikationen beobachtete Phänomen der Multilayerbildung bei höheren Zelleinsaaten wurde in diesem Fall nicht beobachtet (Behrens and Kissel, 2003).

Die Kultivierungszeitdauer wurde nicht untersucht, da bereits zahlreiche Publikationen wissenschaftlich belegt haben, dass eine Kultivierungszeit von 21 d für eine maximale P-gp-Expression essentiell ist (Hosoya et al., 1996; Behrens & Kissel, 2003).

Einfluss der Vorinkubation der Monolayer mit Testsubstanzen

Modulatoren des P-Glykoproteins können sich unter anderem in den Eigenschaften Permeabilität, Affinität zum P-Glykoprotein und Wirkmechanismus voneinander unterscheiden, so dass Differenzen beim Eintritt der Effluxhemmung zu erwarten sind. Würden Zellen bereits vor Testbeginn mit dem jeweiligen Modulator inkubiert werden, so könnte die Vorinkubation diese Differenzen aufheben.

Um den Einfluss der Vorinkubation auf die RH 123-Akkumulation zu untersuchen, wurden Caco-2-Monolayer zum einen 30 min vor Beginn des RH 123-Akkumulationstests mit verschiedenen P-gp-Inhibitoren versetzt, zum anderen akkumulierte RH 123 in Gegenwart verschiedener P-gp-Inhibitoren ohne vorherige Inkubation. Für diesen Versuch wurden Elacridar ($1 \mu\text{M}$), Verapamil ($100 \mu\text{M}$), Gelucire 44/14 ($30 \mu\text{g/ml}$) und Quercetin ($50 \mu\text{M}$) eingesetzt. Elacridar fungierte hierbei als spezifischer, nicht-kompetitiver P-gp-Inhibitor, das Flavonoid Quercetin als kompetitiver Inhibitor und Verapamil als gut permeabler, kompetitiver Inhibitor. Das Tensid Gelucire 44/14 wirkt in Form seiner Unimere indirekt inhibitorisch über eine Hemmung der P-gp-ATPase.

Bei Elacridar und Quercetin wirkt sich eine Vorinkubation von 30 min steigernd auf die RH 123-Akkumulation aus. Am deutlichsten ist der Einfluss der Vorinkubation auf die RH 123-Akkumulation bei Quercetin ausgeprägt. Erst mit Vorinkubation kann der in zahlreicheren Studien beobachtete inhibitorische Effekt beobachtet werden. Mit einer Steigerung der RH 123-Akkumulation auf 124 % ist Quercetin im Vergleich zu Elacridar (206 %) und Verapamil (187 %) jedoch nur als schwacher Inhibitor einzustufen. Bei Gelucire 44/14 und Verapamil spielt die Vorinkubation keine Rolle. Verapamil ist im

Vergleich zu RH 123 sehr gut permeabel, so dass Verapamil als erstes an P-gp bindet und eine Bindung des RH 123 an das P-Glykoprotein verhindert.

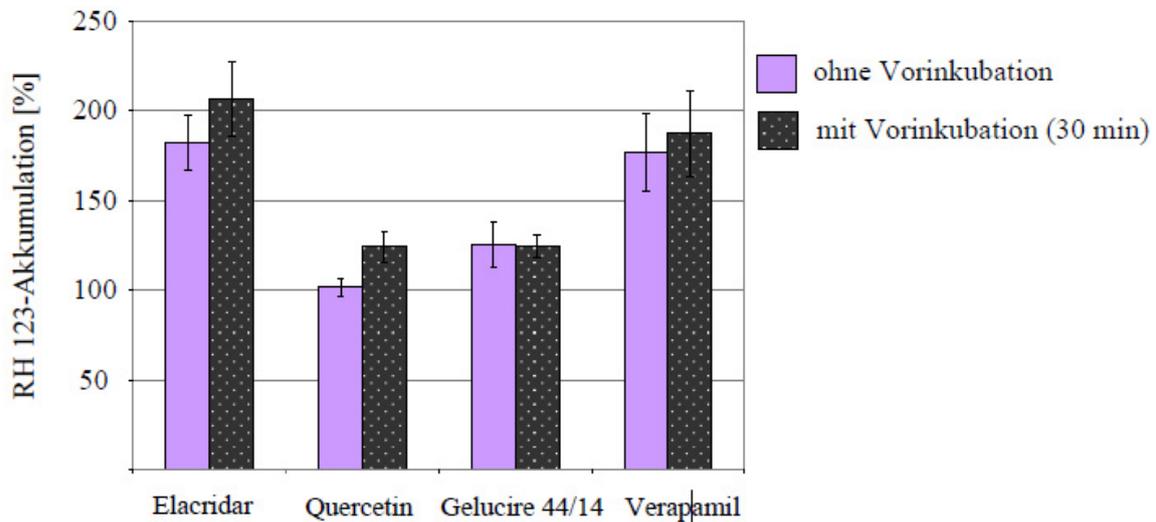


Abbildung 26: RH 123 Akkumulation [%] in Gegenwart verschiedener P-gp-Inhibitoren nach 90 min mit und ohne Vorinkubation. (Mittelwert \pm SD aus 5 Versuchen)

Anhand dieser Ergebnisse kann man schlussfolgern, dass es wichtig ist, die Zellen mit der entsprechenden Testsubstanz 30 min vor dem Teststart zu inkubieren, um auch schwache P-gp-Inhibitoren zu ermitteln und die Wirkstärke verschiedener P-gp-Inhibitoren vergleichen zu können.

4.3.3. Test-Etablierung bei LS180-Zellen

Einfluss der Passagiermethode auf die RH 123-Akkumulation und Bestimmung der optimalen Einsattdichte

LS180-Zellen wurden vor der Einsaat entweder geschabt oder trypsiniert und für 4-15 d kultiviert. Im Diagramm (Abb.27) sind die Ergebnisse aus dem RH 123-Akkumulationstest dargestellt. Darin zeigt sich, dass trypsinierte Zellen den Fluoreszenzfarbstoff RH 123 um ca. 20 % stärker akkumulieren als geschabte Zellen. Die Art der Passagiermethode ist somit entscheidend für das Ausmaß der RH 123-Akkumulation.

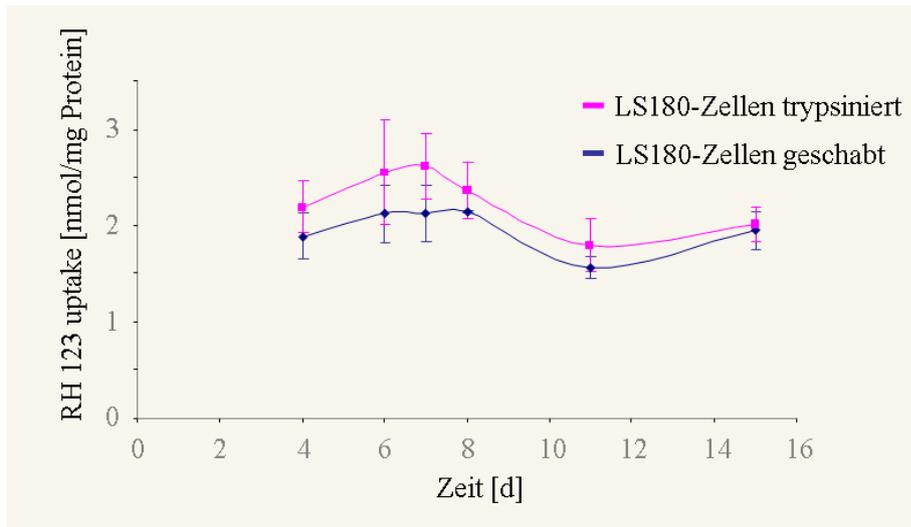


Abbildung 27: Abhängigkeit der RH 123-Akkumulation von der Passagiermethode.

LS180-Zellen wurden für die Einsaat entweder trypsiniert oder geschabt und mit MEM und 10 % FKS für 4-15 Tagen kultiviert (5 Versuche, Mittelwert \pm SD).

Eine Erklärung für diesen Sachverhalt könnte im unterschiedlichen Wachstum bei geschabten bzw. trypsinierten LS180-Zellen liegen. Geschabte LS180-Zellen wachsen in dicht gepackten, kohäsiven Nestern bzw. Kolonien, welche oft Multilayeraggregate ausbilden. Nicht adhärierte, lose Zellen sind durch Schleime mit den Multilayern verbunden. Trypsinierte LS180-Zellen hingegen wachsen einschichtig und zeigen nach 3-4 d Konfluenz. Aufgrund der größeren Oberfläche bei trypsinierten Zellen könnte ein stärkerer Einstrom von RH 123 in die Zellen resultieren. Des Weiteren ist die Schleimproduktion bei geschabten Zellen wesentlich höher als bei trypsinierten Zellen. Eine Schleimanfärbung mit Mucikarmin macht dies deutlich. In der Abbildung 28 ist der Schleim als Violettfärbung erkennbar, wobei die Stärke der Violettfärbung mit der Schleimmenge korreliert.

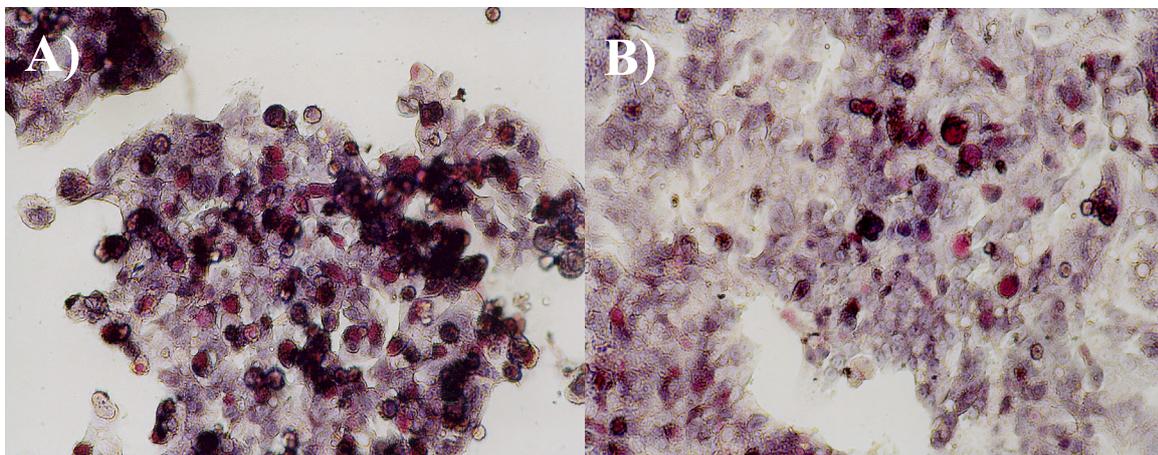


Abbildung 28: Mikroskopische Aufnahme von LS180-Zellen nach Mucikarmin-Färbung. Aufnahme (A) zeigt die violett gefärbte Schleimmenge bei geschabten, Aufnahme (B) bei trypsinierten LS180-Zellen.

Eine höhere Schleimproduktion könnte als Barriere den Einstrom von RH 123 minimieren. Beim RH 123-Akkumulationstest wird vor Testbeginn jedoch 3 x gespült, wodurch der sezernierte Schleim entfernt wird. Daher kann der Schleim als mögliche Ursache vernachlässigt werden. Ein erhöhter P-gp-vermittelter Efflux des RH 123 bei geschabten Zellen ist ebenfalls nicht verantwortlich, da bei Zugabe des P-gp-Inhibitors Elacridar kein Unterschied zwischen geschabten und trypsinieren Zellen ermittelt werden konnte.

Eine weitere Erklärung könnte im Trypsin selbst liegen. Trypsin ist als Serin-Protease ein Ligand des Protease-aktivierten Rezeptors PAR2, der in physiologische Prozesse wie Wachstum, Differenzierung, Entzündungsprozesse usw. involviert ist. Die Protease-aktivierten Rezeptoren PAR1-4 werden im GI-Trakt exprimiert. Eine Aktivierung des PAR2 führt zu einer Herabsetzung der Monolayerintegrität mit einer Erhöhung der parazellulären Permeabilität als Folge (Kunzelmann et al., 2002). Da RH 123 die Membran parazellulär passiert und von der basolateralen Membranseite in die Zelle gelangt, könnte dies einen Einfluss haben.

Trypsinieren als Passagiermethode ist der Vorzug zu geben, da dies eine genauere Zelleinsaat als beim Schaben ermöglicht. Des Weiteren weisen trypsinieren Zellen eine hohe Stabilität bei Spülvorgängen auf, da durch das einschichtige Wachstum alle Zellen am Wellboden adhären sind. Als optimale Zelleinsaat konnte ein Zelleinsaat von $1,5 \times 10^4$ Zellen pro Well ermittelt werden. Nach 7 d Kultivierung bedeckten trypsinieren Zellen den gesamten Wellboden. Daraus ergab sich pro definierte Wellfläche eine bestimmte Zellmenge, so dass eine Bestimmung der Proteinmenge zur Korrektur der RH 123-Zellinhalte bei unterschiedlich hohen Zellmengen entfallen konnte. Zelleinsaat kleiner als 10^4 Zellen bedeckten erst nach 10 d den Wellboden.

RH 123-Akkumulation in Abhängigkeit von der Ausgangskonzentration

Getestet wurde der RH 123-Konzentrationsbereich von 4-400 μM . Die nach 90 min erhaltenen Fluoreszenzwerte sind in der Abbildung 29 dargestellt. Innerhalb der Konzentrationsbereiche von 4-100 μM und 100-400 μM besteht Linearität. Ab einer Konzentration von 100 μM verringert sich jedoch die Steigung, vermutlich aufgrund eines verminderten Einstroms.

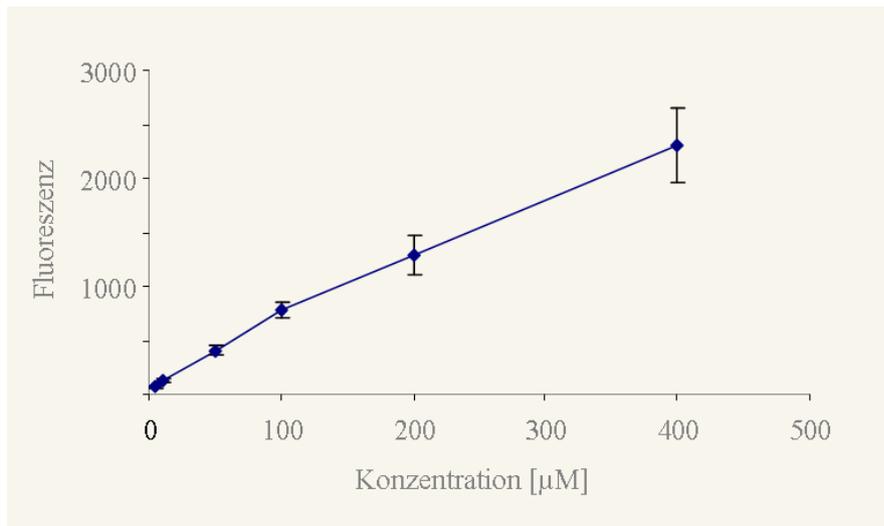


Abbildung 29: Abhängigkeit des RH 123-Zellinhalts von der eingesetzten RH 123-Ausgangskonzentration. Trypsinierte LS180-Zellen wurden für 7 d in MEM (4,5 g/L Glucose) kultiviert, anschließend für 90 min mit der RH 123-Lösung inkubiert und lysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus 5 Versuchen.

Zum besseren Vergleich mit den Ergebnissen bei Caco-2-Zellen wurde die Konzentration von 13 µM für den RH 123-Akkumulationstest gewählt

RH 123-Akkumulation in Abhängigkeit von der Zeit

Lässt man Rhodamin 123 in einem Zeitbereich von 5-180 min akkumulieren, so zeigt sich bei Caco-2- und LS180-Zellen eine exponentielle Abhängigkeit zwischen der Fluoreszenz als Maß für den RH 123-Zellinhalt und der Zeit (Abb. 30). Der stärkste Einstrom findet innerhalb der ersten 60 min statt. Bei Caco-2-Zellen wird innerhalb von 180 min bereits eine plateau-ähnliche Phase als Resultat einer Gleichgewichtseinstellung zwischen Influx und Efflux erreicht.

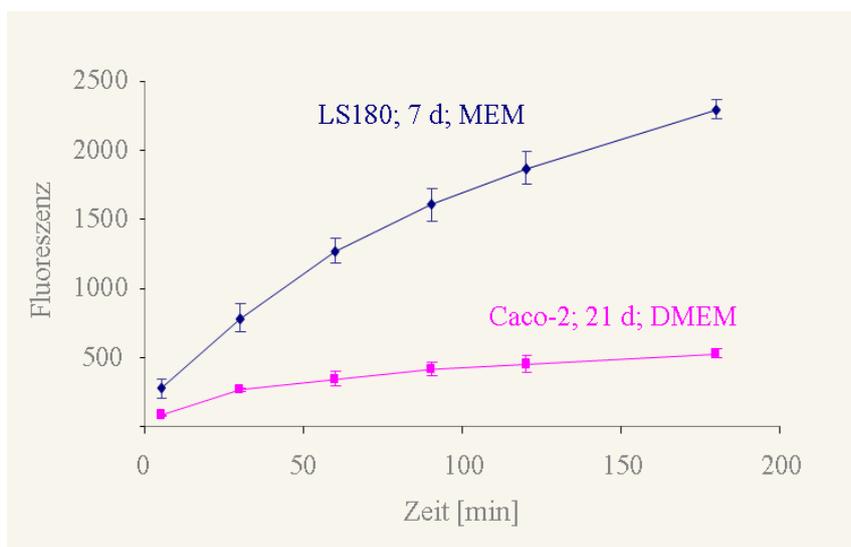


Abbildung 30: Akkumulation von RH 123 in Abhängigkeit von der Inkubationszeit in Caco-2- und LS180-Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus 5 Versuchen.

Bei LS180-Zellen wird keine plateauähnliche Phase eingenommen. Stattdessen steigt der RH 123-Zellinhalt über den Zeitraum von 180 min kontinuierlich, aber langsamer als zu Beginn, an. Da LS180-Zellen nur sehr schwach P-gp exprimieren, kommt es nicht zur Minderung des RH 123-Zellinhalts durch Efflux. Des Weiteren werden nach Lyse der LS180-Zellen höhere Fluoreszenzwerte als bei Caco-2-Zellen bestimmt.

Die bessere Akkumulation in LS180-Zellen ist wahrscheinlich auf das Fehlen des Effluxes und von Tight Junctions zurückzuführen. RH 123 gelangt erst nach parazellulärer Permeation von der basolateralen Membranseite ins Zellinnere, so dass sich die tight junctions bei Caco-2-Monolayer limitierend auf den Einstrom auswirken. LS180-Zellen bilden keinen Monolayer, d.h., geschlossenen Zellverband, aus und besitzen daher keine tight junctions. Bei der Aufnahme des RH 123 ins Zellinnere wird ein bisher unbekannter Transporter an der basolateralen Membranseite diskutiert (Troutman & Thakker, 2003), der bei LS180-Zellen verstärkt exprimiert vorliegen könnte.

RH 123-Akkumulation in Abhängigkeit von der Kultivierungsdauer

Die Expression und Funktionalität von Enzymen und Transportern sind häufig von der Kultivierungsdauer abhängig. Um die Bedeutung der Kultivierungsdauer für den RH 123-Akkumulationstest zu ermitteln, wurden trypsinisierte LS180-Zellen für 4, 6, 7, 8, 11 oder 15 d kultiviert und anschließend die RH 123-Akkumulation getestet. Die höchste Akkumulation fand am Tag 7 statt. Die Kultivierungszeit von 11 Tagen lieferte die niedrigsten Akkumulationswerte. Diese lagen sogar unterhalb der Werte von Tag 4.

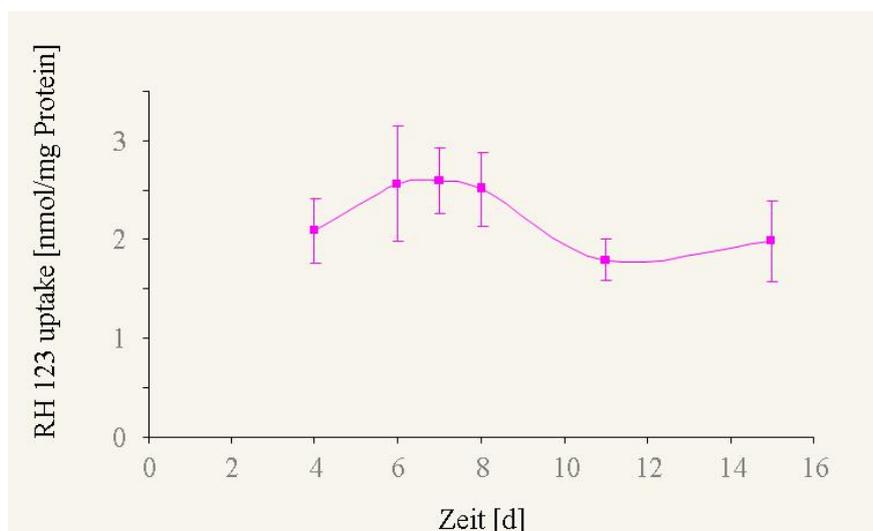


Abbildung 31: Einfluss der Kultivierungsdauer auf die RH 123-Akkumulation in trypsinisierten Zellen. LS180-Zellen wurden mit MEM und 10 % FKS kultiviert. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD aus 5 Versuchen.

Akkumulierte RH 123 in Gegenwart des P-gp-Inhibitors Elacridar so konnte an den Tagen 4, 11 und 15 die Akkumulation lediglich um 20 % gesteigert werden (Abb.32). Demzufolge exprimieren LS180-Zellen nur sehr schwach P-gp. An den Tagen 7 und 8 konnte die RH 123-Akkumulation durch Zugabe des Inhibitors nicht verbessert werden, entweder aufgrund des noch niedrigeren P-gp-Levels oder wegen mangelnder Funktionalität des Transporters. Die beobachteten Unterschiede könnten also mit dem Expressionslevel des P-gp erklärt werden.

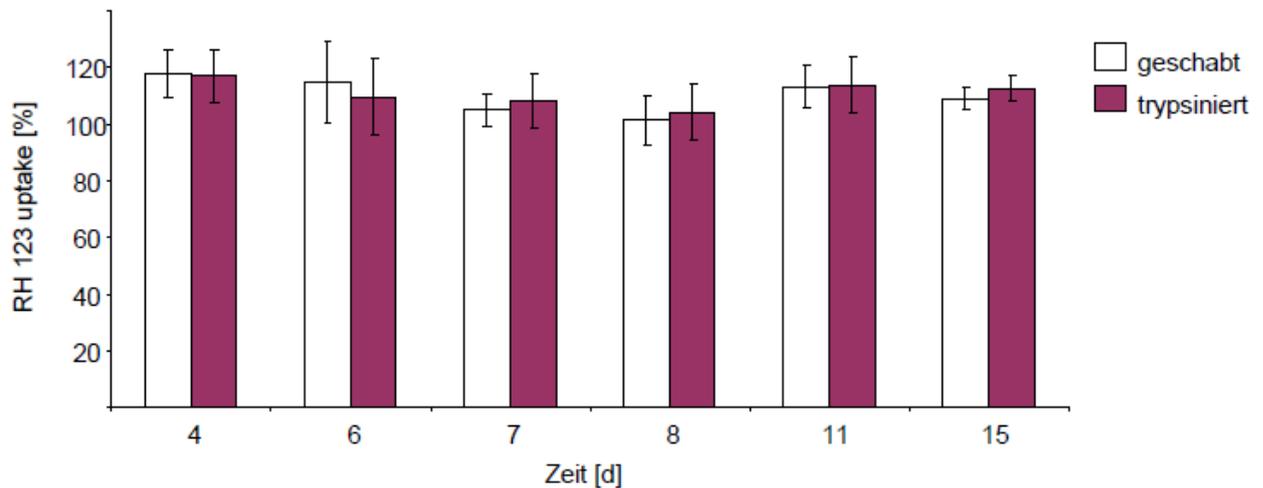


Abbildung 32: Einfluss des P-gp-Inhibitors Elacridar auf die RH 123-Akkumulation [%] in geschabten bzw. trypsinisierten LS180-Zellen an verschiedenen Kultivierungstagen. Die Zellen wurden unabhängig von der Passagemethode in MEM (4,5 g/L Glucose) kultiviert. Die RH 123-Akkumulation erfolgte im Beisein des Elacridars über 90 min.

Generell lässt sich zusammenfassen, dass LS180-Zellen P-gp nur sehr schwach exprimieren und der P-gp vermittelte Efflux daher nur minimalen Einfluss auf die RH 123-Akkumulation besitzt. Diese Ergebnisse wurden gleichermaßen bei geschabten und trypsinisierten Zellen erhalten. LS180-Zellen sind für Inhibitionsversuche ohne vorherige Induktion der P-gp-Expression nicht geeignet. Die LS180-Zelllinie wurde als zweite Zelllinie neben der Caco-2-Zelllinie eingesetzt, um indirekt genauere Aussagen zur Inhibition zu treffen. Caco-2-Zellen exprimieren im Gegensatz zu LS180-Zellen das P-Glykoprotein wesentlich stärker. Wählt man für den RH 123-Akkumulationstest eine Kultivierungszeitdauer von 7 d bei LS180-Zellen, so kann der Einfluss des P-gp auf die RH 123-Akkumulation vernachlässigt werden. Liegt lediglich eine Steigerung der Rhodamin 123-Akkumulation bei Caco-2-Zellen, nicht jedoch bei LS180-Zellen vor, so kann von einer Inhibition des P-Glykoprotein Effluxes ausgegangen werden.

Einfluss des Mediums auf die RH 123-Akkumulation

Unter *in vitro* Bedingungen muss eine Umgebung geschaffen werden, die Proliferation, Wachstum, Differenzierung und Funktionalität von Zellen erlaubt und ermöglicht. Über das Medium werden den Zellen essentielle Substanzen wie Aminosäuren, Vitamine, Salze und Zucker zugeführt. Die Europäische Zellbank (ECACC) empfiehlt für die Kultivierung von LS180-Zellen das Medium MEM, ein Minimalmedium mit Earle-Puffer. Einige Forschungsgruppen kultivieren LS180-Zellen jedoch in Dulbecco's MEM, welches gegenüber MEM doppelt konzentriert an Aminosäuren und vierfach konzentriert an Vitaminen ist. Zur Bestimmung des optimalen Mediums für den RH 123-Akkumulationstest wurden MEM mit 1 oder 4,5g/L Glucose und DMEM mit 4,5g/L Glucose als Medium zur Kultivierung eingesetzt und ihr Einfluss im RH 123-Akkumulationstest ermittelt. Der Akkumulationstest mit RH 123 erfolgte am 7. Tag nach Einsaat von geschabten und trypsinierten Zellen. Als Puffer im RH 123-Akkumulationstest fungierte HBSS mit 1g/L Glucose. Allen Zellen wurde somit während des Tests die gleiche Energiemenge zur Verfügung gestellt.

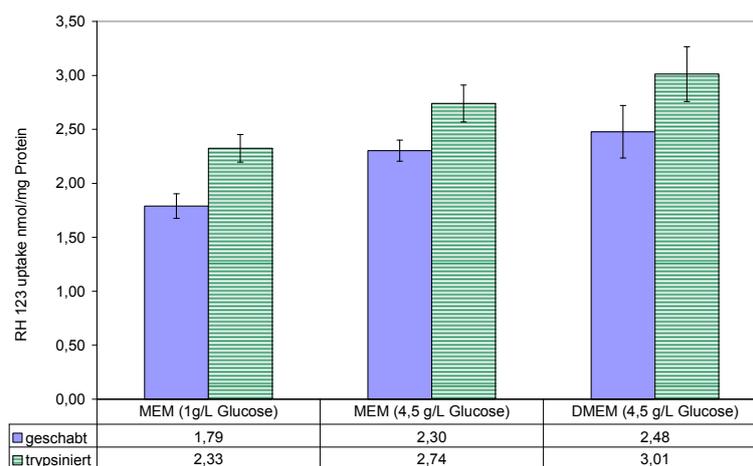


Abbildung 33: Einfluss des Mediums auf die RH 123-Akkumulation bei geschabten und trypsinierten LS180-Zellen. LS180-Zellen wurden entweder mit MEM (1 g/L Glucose), MEM (4,5 g/L Glucose) oder DMEM (4,5 g/L Glucose) für 7 d kultiviert. Der RH 123-Akkumulationstest wurde 5 x wiederholt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD.

Die Wahl des Mediums und die Glucosemenge für die Kultivierung der Dickdarmzelllinie LS180 wies einen signifikanten Einfluss auf die Akkumulation von RH 123 auf. RH 123 akkumuliert am stärksten in den Zellen, welche trypsiniert und mit DMEM (4,5 g/L Glucose) kultiviert wurden. Die niedrigste Akkumulation wurde bei geschabten Zellen unter Kultivierung mit MEM und 1g/L Glucose verzeichnet. Der Unterschied zwischen beiden Ansätzen betrug 67 %. Wurde dem Medium MEM statt 1g/L 4,5g/L Glucose zugesetzt, so steigerte sich die Akkumulation von RH 123 bei geschabten Zellen um 24 % und bei trypsinierten Zellen um 18 %. D'Souza et al. zeigte 2003 mit einer Studie an Caco-2-Zellen,

dass eine Erhöhung der Glucosemenge von 1g auf 4,5g/L die Membranfluidität steigert, was sich in einer Absenkung des TEER-Wertes und einem verbesserten transepithelialen Transport widerspiegelt.

Mikroskopisch betrachtet konnte ein morphologischer Unterschied zwischen geschabten Zellen unter MEM- bzw. unter DMEM-Kultivierung beobachtet werden. Geschabte Zellen mit DMEM als Kulturmedium bildeten einschichtige Zellareale mit großer Ähnlichkeit zu den trypsinisierten Zellen. Beide Medien sind zwar aus den gleichen Bestandteilen zusammengesetzt, jedoch in unterschiedlichen Konzentrationen.

Einfluss der Konzentration von Fötalen Kälberserum auf die RH 123-Akkumulation

Fötale Kälberserum enthält eine Vielzahl von Wachstumshormonen, Serumproteinen, Hormonen etc., die für die Kultivierung von Zellen notwendig sind. Darüber hinaus können Seren Inhibitoren (Bakterientoxine, Lipide) enthalten oder Stoffe, welche mit Zellsekreten toxische Verbindungen bilden. Proteasen in Seren können zudem erwünschte Proteine abbauen. FKS kann also einen Einfluss auf die Morphologie und Funktionalität von Zellen ausüben. Daher wurde das FKS in Konzentrationen von 5, 10 und 20 % als Mediumzusatz eingesetzt, LS180-Zellen für 4-15 d damit kultiviert und der Einfluss auf die RH 123-Akkumulation in LS180-Zellen anschließend untersucht. Der Zusatz von FKS zum Medium erfolgte nur während der Kultivierung, der Test wurde serumfrei mit HBSS durchgeführt.

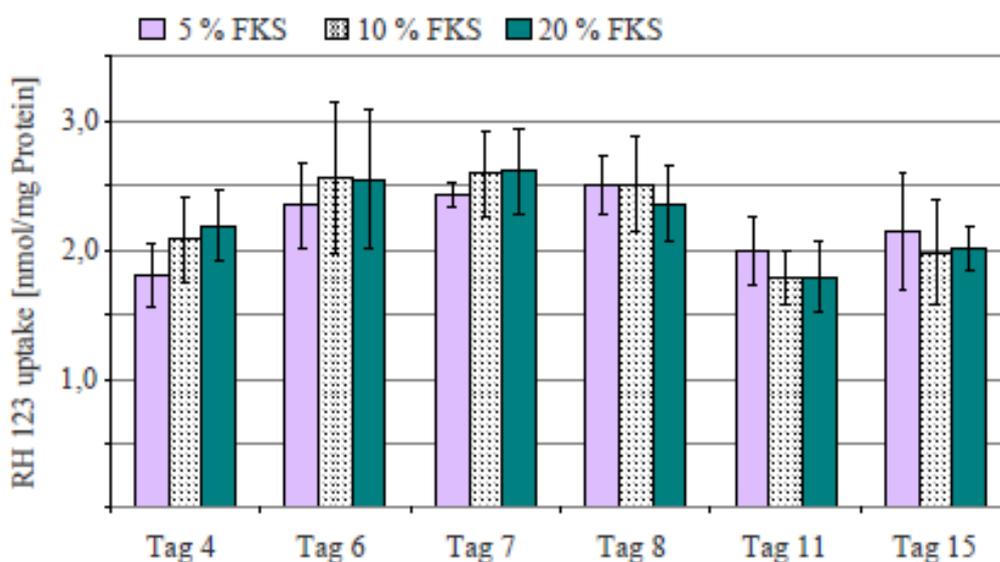


Abbildung 34: RH 123-Akkumulation in trypsinisierten LS180-Zellen in Abhängigkeit von der Kultivierungsdauer und der FKS-Konzentration. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD aus 5 Versuchen.

Die RH 123-Akkumulation erwies sich als unabhängig von der FKS-Konzentration, sowohl bei trypsinisierten als auch bei geschabten Zellen. Auch bei längerer Kultivierungsdauer konnte

kein Unterschied bei den FKS-Konzentrationen ermittelt werden. Dargestellt sind die Ergebnisse aus dem RH 123-Akkumulationstest an trypsinierten Zellen in Abhängigkeit von der Serumkonzentration. Für einen besseren Vergleich der Ergebnisse mit der Caco-2-Zelllinie wurde nachfolgend mit einer Konzentration von 10 % FKS zum Medium gearbeitet. Da FKS ein natürliches Produkt darstellt, differieren die Serum-Inhaltsstoffe sehr stark von Charge zu Charge. Um diesem Problem vorzubeugen, wurde für alle Testungen die selbe Charge verwendet.

RH 123-Akkumulation nach Induktion der P-Glykoprotein-Expression

LS180-Zellen exprimieren konstitutiv P-gp in so schwachem Maße, dass man LS180-Zellen zu den Zelllinien mit fehlender P-gp-Expression zählt. Eine Induktion der P-gp-Expression kann bei LS180-Zellen aber auf zwei Wegen erfolgen. Zum einen wie bei Caco-2-Zellen über den Vitamin D-Rezeptor (VDR), zum anderen über den Pregnan X-Rezeptor (PXR).

Induktion über VDR

Als Induktor wurde das Natriumsalz der Buttersäure in einer Konzentration von 4 mM eingesetzt. Werden LS180-Zellen für 2 d mit Na-Butyrat inkubiert, so lässt sich eine Senkung der RH 123-Akkumulation bei geschabten und bei trypsinierten Zellen im gesamten Kultivierungszeitraum von 4 bis 15 Tagen feststellen. Die stärkste Senkung wird bei den Tagen 4, 7 und 8 beobachtet. Die Inkubation für 48 h führt des Weiteren zu mikroskopisch sichtbaren morphologischen Veränderungen (Abb. 35): Die Zellflächen sind einschichtig und bestehen aus schmalen, spitz zulaufenden, leicht eckigen Zellen. Morphologische Unterschiede zur Kontrolle ohne Na-Butyrat sind bis zum Tag 11 sichtbar.

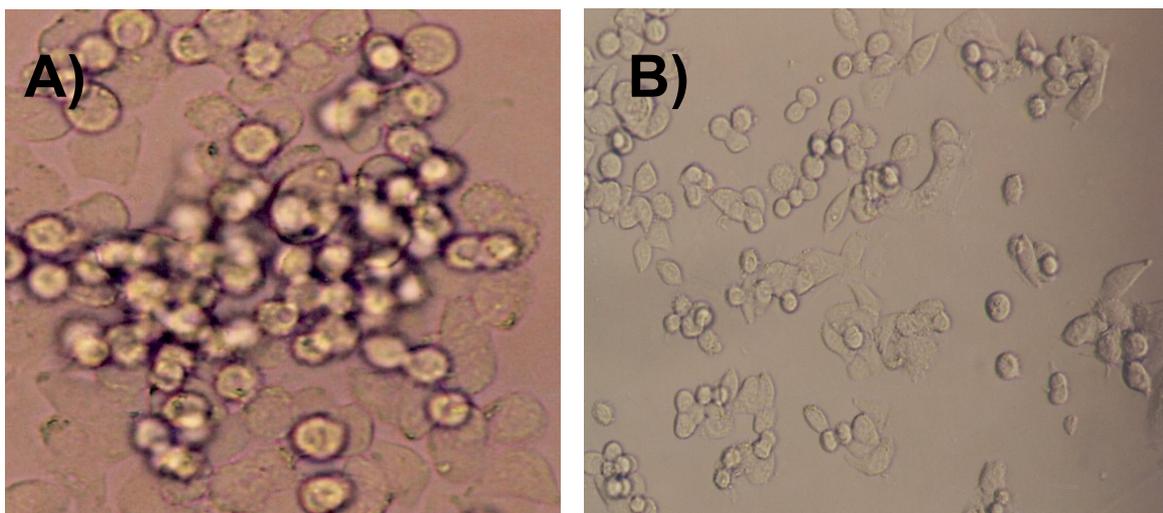


Abbildung 35: Mikroskopische Aufnahme (A) von unbehandelten LS180-Zellen; Aufnahme (B) zeigt differenzierte LS180-Zellen nach Inkubation mit Na-Butyrat für 48 h.

Eine Korrektur der RH 123-Akkumulation ist unter Einbezug der Proteinmenge erforderlich, da Na-Butyrat neben der Stimulation der P-gp-Proteinbiosynthese auch die Zellteilung hemmt.

Geschabte und trypsinierte Zellen verhalten sich unabhängig vom eingesetzten Medium bei 48 h-Inkubation mit Na-Butyrat ähnlich. Die stärkste Absenkung der RH 123-Akkumulation auf 60 % wurde bei geschabten und trypsinierten Zellen gleichermaßen erreicht, wenn das Kulturmedium aus MEM mit 4,5 g/L Glucose bestand. Aus diesem Grund erhielten alle nachfolgenden LS180-Zelleinsaat für den RH 123-Akkumulationstest als Medium MEM mit 4,5 g/L Glucose.

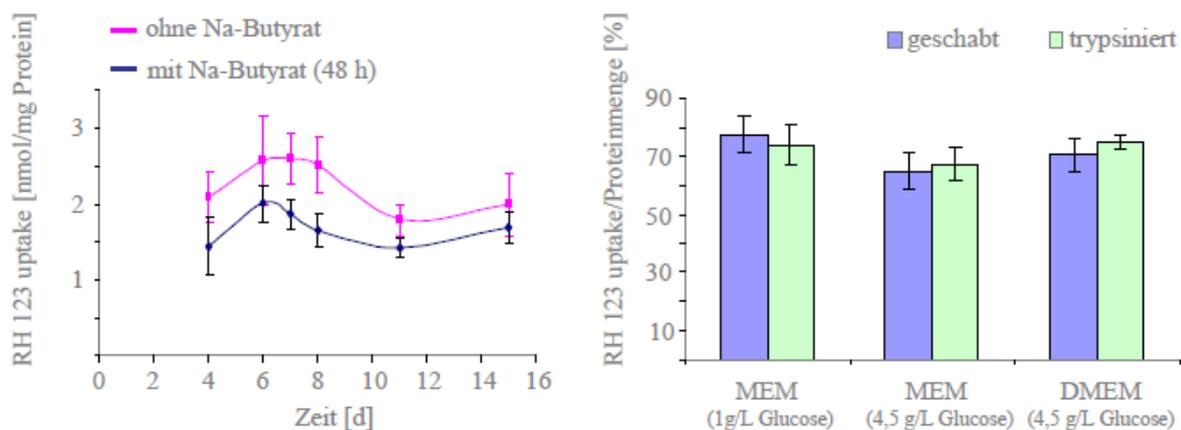


Abbildung 36: RH 123-Akkumulation nach Induktion des P-gp. 48 h vor Testbeginn wurden geschabte bzw. trypsinierte Zellen mit Na-Butyrat inkubiert. Das linke Diagramm zeigt den Einfluss der P-gp-Induktion durch Na-Butyrat in Abhängigkeit von der Kultivierungsdauer in trypsinierten Zellen. Das rechte Diagramm stellt die Wirkstärke von Na-Butyrat in Abhängigkeit von der Passagiermethode und der Wahl des Mediums bei der Kultivierung für 7 d dar. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD aus 5 Versuchen.

Induktion über PXR

Als Ligand des PXR wurde das makrozyklische Antibiotikum Rifampicin eingesetzt.

Werden LS180-Zellen 48 h mit 10 μ M Rifampicin inkubiert, so reduziert sich die RH 123-Akkumulation auf 84 ± 4 %. Eine parallele Applikation von RH 123 und Rifampicin beeinflusste die Akkumulation hingegen nicht. Nach fluorimetrischer Auswertung ergab sich ein RH 123-Zellinhalt von 109 ± 8 %. Somit kann bestätigt werden, dass die verwendete LS180-Zelllinie für Induktionsversuche über VDR und PXR gleichermaßen geeignet ist.

4.3.4. Bewertung des RH 123-Akkumulationstests

Der Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin 123 ist ein Substrat des P-Glykoproteins mit hoher Affinität ($K_m = 13,5 \mu$ M), dessen intrazelluläre Konzentration durch eine einfache Analytik reproduzierbar bestimmt werden kann. Die Linearität des Testsystems ist bis zu einer RH 123-Konzentration von 50 μ M bei Caco-2- und von 100 μ M bei LS180-Zellen innerhalb

von 30 Passagen gewährleistet. Die Durchführung in einer 48-Well-Platte erlaubt eine Austestung von mehreren Testsubstanzen unter Beibehaltung einer guten Handhabung und mikroskopischer Kontrolle.

RH 123 ist nicht nur ein Substrat für das P-Glykoprotein, sondern auch für den Effluxtransporter MRP-1 (Multidrug Resistance-related Protein 1), aber mit geringerer Affinität. Der Anteil vom P-Glykoprotein am Gesamtefflux beträgt nahezu 100 %, da nach Zugabe von Elacridar, einem potenten, spezifischen P-gp Inhibitor, die intrazelluläre RH 123-Konzentration bei Caco-2-Zellen linear ansteigt. MRP-1 ist in Caco-2- und in LS180-Zellen durch eine niedrigere Expressionsrate als *in vivo* nur geringfügig am Efflux beteiligt (Pfrunder et al., 2003; Prime-Chapman et al., 2004). MRP-1-Inhibitoren wie Probenecid zeigten keinen Einfluss auf die RH 123-Akkumulation. (Perloff et al., 2001). Daher kann dieses Testsystem als spezifisch für P-Glykoprotein angesehen werden.

Die Wechselwirkung von Testsubstanzen mit P-gp wird über den RH 123-Zellinhalt nur indirekt erfasst. Die RH 123-Zellaufnahme wird jedoch nicht durch das P-gp limitiert, da RH 123 auf parazellulärem Wege zur basolateralen Membranseite gelangt und von dort mit einem bisher unbekanntem Transporter vermutlich in die Zelle geschleust wird. Anschließend wird RH 123 durch P-gp aus der Zelle heraustransportiert (Troutman & Thakker, 2003). Testsubstanzen können über Modulation der Tight Junctions oder über Komplexierung auch Einfluss auf die RH 123-Absorption ausüben.

Innerhalb der Zelle wird RH 123 keiner Metabolisierung unterworfen (Sweatman, 1990), so dass sich daraus keine weiteren Wechselwirkungen ergeben.

Die Caco-2-Zelllinie ist eine gut untersuchte Zelllinie, die eine große morphologische und funktionelle Ähnlichkeit mit der menschlichen Darmschleimhaut besitzt. Die Expressionsrate von P-gp ist vergleichbar mit der *in vivo* (Yee, 1997; Sun et al., 2002). Die Caco-2-Zelllinie weist am 21. Tag die höchste P-gp-Expression auf, so dass eine Kultivierungsdauer von 21 d für eine vollständige Differenzierung notwendig ist (Hosoya et al., 1996; Behrens & Kissel, 2003). Die regelmäßige Ergänzung und Erneuerung des Medium während dieser Zeit erhöht die Gefahr der Infektion durch Pilze und Bakterien. LS180-Zellen exprimieren das P-Glykoprotein konstitutiv nur in einem sehr geringen Umfang und dienen daher als Negativkontrolle. Führen Testsubstanzen lediglich bei Caco-2-Zellen zu einer Steigerung der RH 123-Zellinnenkonzentration, so kann von einer Inhibition des P-gp ausgegangen werden.

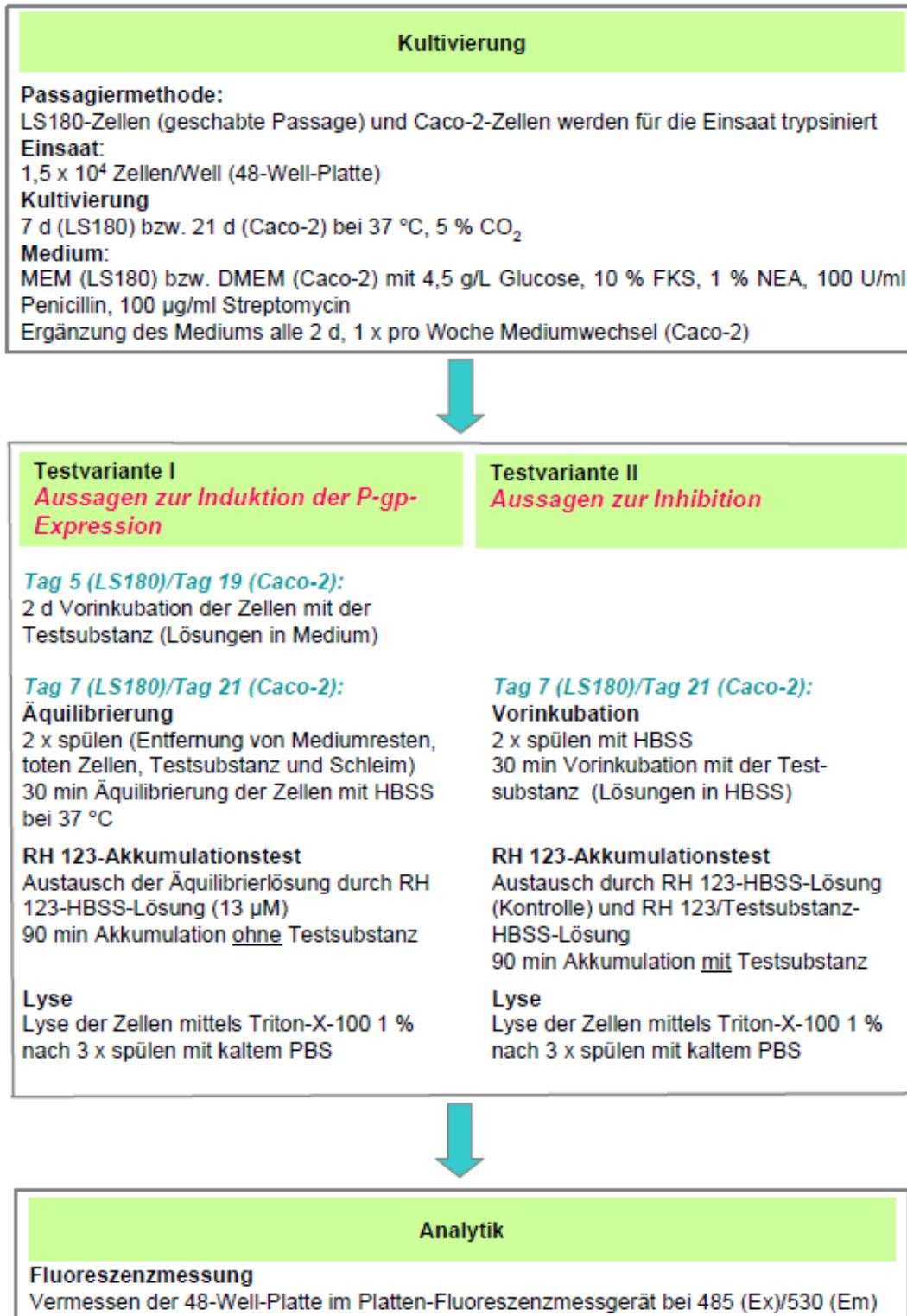
Caco-2-Monolayer exprimieren nicht bzw. nur in sehr geringem Ausmaß PXR, die Induktion der P-gp-Expression über diesen Rezeptor ist somit nicht erfassbar.

Die Expression des P-Glykoproteins erfolgt bei Caco-2-Zellen über den Vitamin D-Rezeptor und ist durch geeignete Verbindungen steigerbar (Pfrunder et al., 2003). Zur Klärung, ob eine Induktion über PXR erfolgt, werden die Testsubstanzen zusätzlich an LS180-Zellen getestet. Durch Vergleich der Ergebnisse aus beiden Zelllinien können Rückschlüsse gezogen werden, ob und auf welchem Wege die Induktion der P-gp-Expression erfolgt.

Das etablierte Testsystem ist für Induktions- und Inhibitionsversuche gleichermaßen geeignet und stellt durch seinen Verzicht auf Transwells eine preiswerte Screeningmethode zur Bestimmung von P-gp-Modulatoren dar. Das Testsystem liefert aber keine Aussagen zur Permeabilität, wie es das Transwellmodell tut. Des Weiteren müssen Substanzen auf Fluoreszenz-Quenching oder Eigenfluoreszenz untersucht werden, um eine Beeinflussung der RH 123-Fluoreszenzmessung auszuschließen.

4.3.4. Protokoll für den RH 123-Akkumulationstest

Die bei der Etablierung gewonnenen Erkenntnisse wurden verwendet, um ein standardisiertes Protokoll für den RH 123-Akkumulationstest an Caco-2- und LS180-Zellen zu erstellen.



4.4. RH 123-Akkumulationstest

4.4.1. Salze kurzkettiger Fettsäuren (SCFAs)

Die beim RH 123-Akkumulationstest eingesetzten Konzentrationen spiegeln die Konzentrationen wieder, wie sie auch *in vivo* vorzufinden sind. Die Gesamt-SCFA-Konzentration im Darm variiert je nach Darmabschnitt und kann Werte zwischen 87-120 mmol/kg Darminhalt annehmen (Cummings et al., 1987). Weiterhin besitzt die Caco-2-Zelllinie eine hohe *in vivo*-Korrelation, so dass die Ergebnisse aus dem RH 123-Akkumulationstest realistische Rückschlüsse auf das Verhalten von kurzkettigen Fettsäuren *in vivo* liefern.

Testung der Salze einzelner kurzkettiger Fettsäuren

Na-Propionat, Na-Butyrat, Na-Valeriat und Na-Isovaleriat

Die Natriumsalze der SCFAs Propionsäure, Buttersäure, Valerian- sowie Isovaleriansäure führen nach einer 48 h-Inkubation, sowohl bei Caco-2-, als auch bei LS180-Zellen, zu einer deutlichen Absenkung der RH 123-Akkumulation (Abb.38, Test I). Akkumuliert RH 123 hingegen in Gegenwart dieser SCFAs ohne vorherige Inkubation von 48 h (Abb.39, Test II), so tritt dieser Effekt nicht auf. Die Senkung der RH 123-Akkumulation ist somit nicht auf eine direkte Wechselwirkung zwischen RH 123 und SCFAs zurückzuführen, ist zudem zeitabhängig und scheint die Folge einer gesteigerten P-Glykoprotein-Expression zu sein. Butyrat stellt das potenteste kurzkettige Fettsäuresalz dar. Bereits ab 1 mM ist der Effekt nachweisbar, der bei 4 mM sein Maximum von 50 % (Caco-2) erreicht. Eine Verzweigung der Kette (Isobutytrat) führt zum Wirkverlust. Die Abbildung 37 zeigt die Akkumulation des Fluoreszenzfarbstoffs RH 123 in unbehandelten und mit Na-Butyrat vorbehandelten (48 h-Inkubation) LS180-Zellen. Eine Abschwächung der RH 123-Akkumulation nach Vorbehandlung der LS180-Zellen mit Na-Butyrat ist deutlich sichtbar.

Propionat senkt die RH 123-Akkumulation signifikant ab 10 mM, bei 25 mM wird die stärkste Absenkung auf 60 % (Caco-2) bzw. auf 69 % (LS180) beobachtet. Valeriat erreicht mit 6 mM die maximale Senkung der RH 123-Akkumulation auf 70 % (Caco-2) bzw. 89 % (LS180). Die verzweigte C5 Fettsäure Isovaleriat (= Methylbutyrat) übt eine schwächere Wirkung auf die RH 123-Akkumulation als Butyrat aus, ist aber in der Wirkstärke vergleichbar mit seiner unverzweigten Form. Die C6-Fettsäure Capronat zeigt keine Wirkung im Konzentrationsbereich 1-10 mM (IC₅₀ 10 mM).

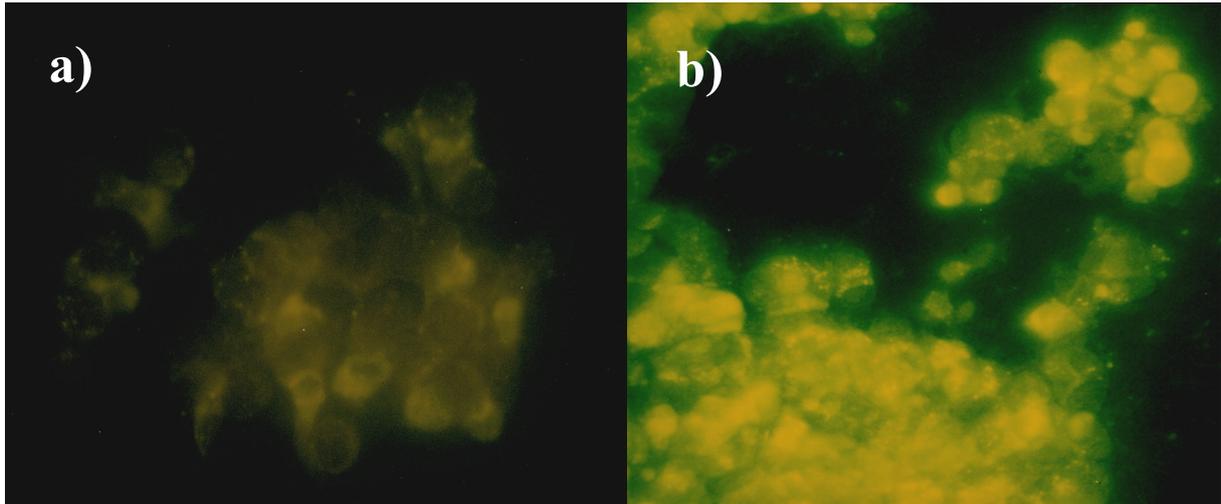


Abbildung 37: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von LS180-Zellen nach Inkubation mit RH 123 für 60 min. (b) zeigt die RH 123-Akkumulation des Fluoreszenzfarbstoffes der unbehandelten Kontrolle, (a) zeigt die RH 123-Akkumulation nach Inkubation der LS180-Zellen mit Na-Butyrat (4 mM) für 48 h.

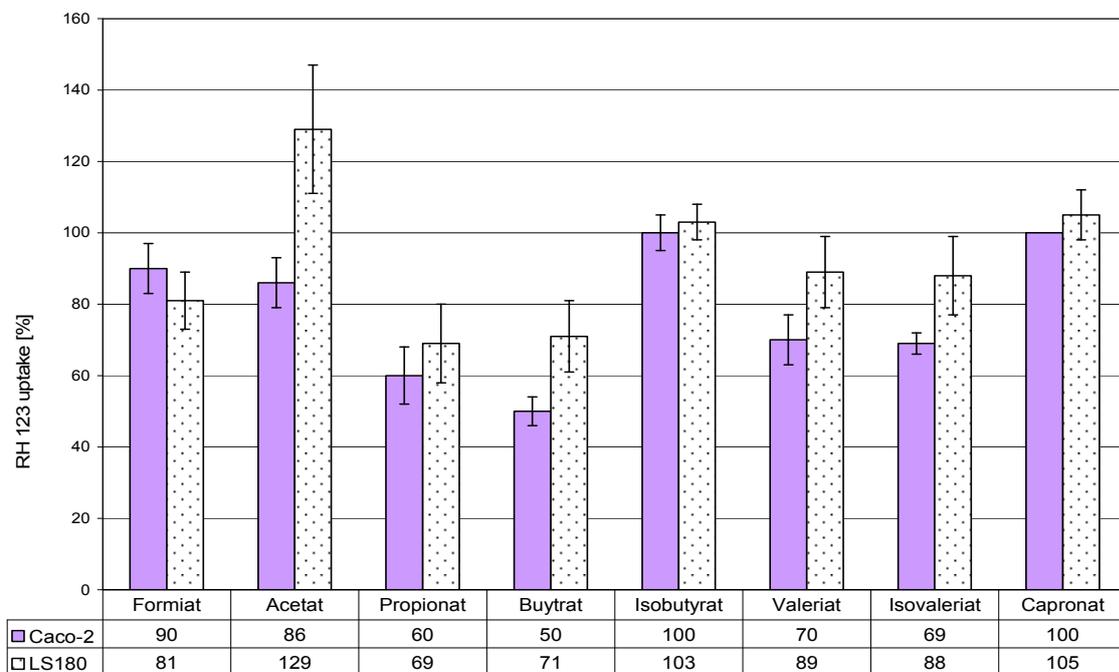


Abbildung 38: Test I: Caco-2- und LS180-Zellen wurden für 48 h mit den Testsubstanzen inkubiert. Die Testkonzentrationen für Formiat, Acetat und Propionat betragen 50 mM, für Butyrat 4 mM und für die restlichen Testsubstanzen 6 mM. Die RH 123-Akkumulation erfolgte ohne Testsubstanz. Dargestellt sind die Mittelwerte [%] \pm SD aus 6 Versuchen mit $n = 4$.

Akkumuliert RH 123 in Gegenwart dieser Fettsäuren (Abb.39, Test II) führen Propionat und Butyrat bei der Caco-2-Zelllinie interessanterweise zu einer Erhöhung des RH 123-Zellinhalts auf 120 %. Da dieses Phänomen bei LS180-Zellen nicht auftritt, könnte dieses als eine schwache P-gp-Inhibition des RH 123-Effluxes gedeutet werden. Dieser vorliegende Effekt

kann *in vivo* nicht zum Tragen kommen, da kurzkettige Fettsäuren durch mikrobielle Fermentation kontinuierlich neu gebildet werden und daher ständig präsent sind.

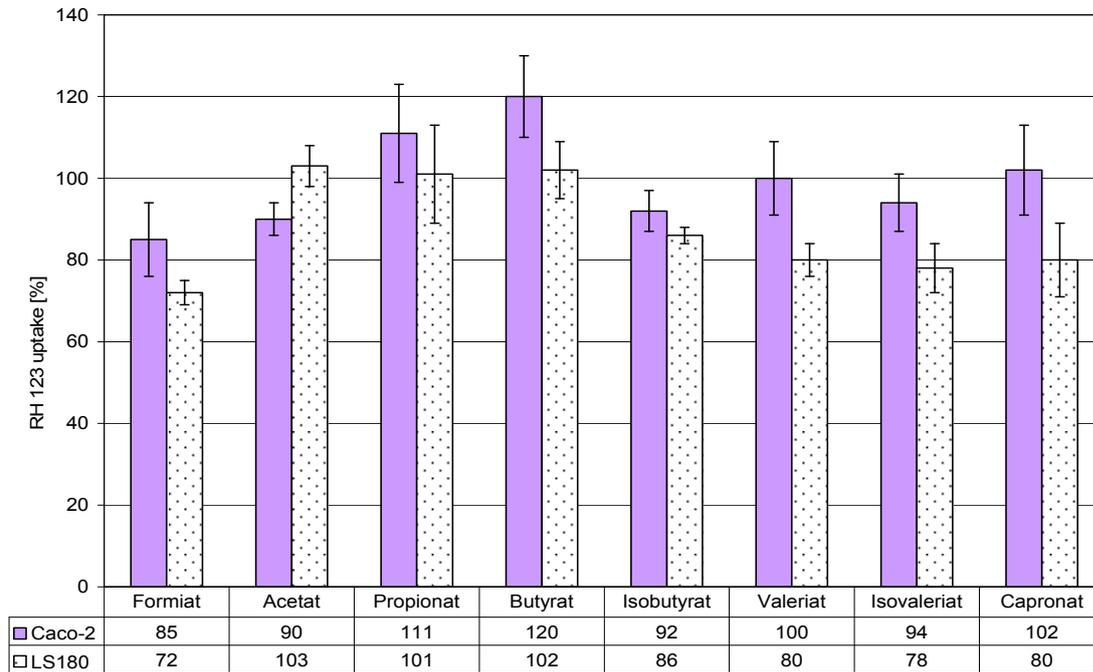


Abbildung 39: Test II: Die RH 123-Akkumulation erfolgte in Gegenwart der Testsubstanzen. Für Formiat, Acetat und Propionat wurde eine Testkonzentration von 50 mM, für Butyrat von 4 mM und für die übrigen Salze der SCFAs von 6 mM verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte [%] \pm SD aus 6 Versuchen mit $n = 4$.

Na-Formiat

Na-Formiat ist ein Phosphatase-Inhibitor. Bei den eingesetzten Testkonzentrationen ist Na-Formiat bereits als Inhibitor wirksam. Durch Hemmung der P-gp-ATP-ase wäre normalerweise eine Erhöhung der intrazellulären RH 123-Konzentration zu erwarten.

Stattdessen führt Na-Formiat zu einer Absenkung des RH 123-Zellinhalts auf 85 % (Caco-2) bzw. auf 72 % (LS180) im gesamten Konzentrationsbereich von 10-100mM.

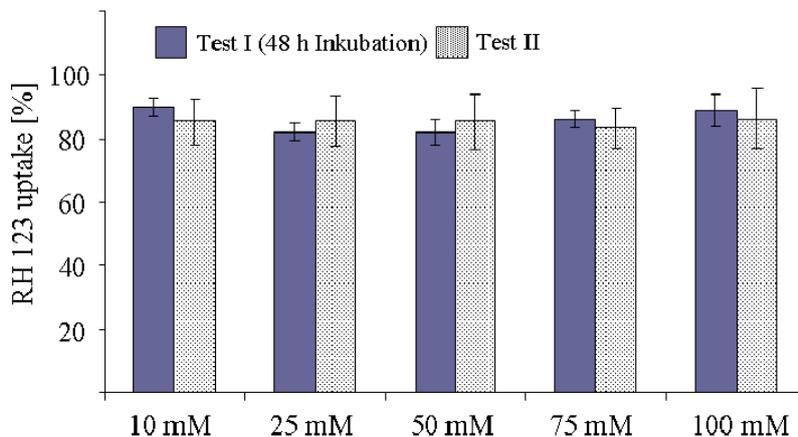


Abbildung 40: Das Diagramm zeigt die Abhängigkeit der RH 123-Aufnahme in Caco-2-Zellen von der Formiat-Konzentration. Caco-2-Zellen wurden entweder für 48 h (Test I) oder für 90 min (Test II) mit Na-Formiat inkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte [%] \pm SD aus 6 Versuchen mit $n = 4$.

Eine Induktion der P-gp-Expression kann als Ursache ausgeschlossen werden, da diese Absenkung sowohl im Test I (48 h-Inkubation) als auch im Test II beobachtet werden kann. Eine Induktion der P-gp-Expression benötigt einen Zeitraum von mindestens 24 Stunden, wobei der maximale Effekt nach 48-72 Stunden erreicht wird. Zytotoxizität ist ebenso auszuschließen, da eine Erhöhung der Konzentration den Effekt nicht weiter steigert, was bei Zytotoxizität aber zu erwarten wäre. Zudem müsste die längere Verweilzeit von 48 h im Gegensatz zu 90 min eine stärkere Absenkung der RH 123-Akkumulation hervorrufen. Das Gegenteil ist aber der Fall.

RH 123 liegt nur in geringer Konzentration im Cytosol vor, da es überwiegend in Mitochondrien eingelagert wird. Demnach könnten Substanzen, die die Einlagerung von RH 123 in Mitochondrien stören, zu einer Erhöhung der RH 123-Konzentration im Cytosol und damit zu einem verstärkten Efflux durch P-gp beitragen.

Na-Acetat

Na-Acetat zeigt bei LS180- und Caco-2-Zellen unterschiedliche Effekte. Bei Caco-2-Zellen tritt nach 48 h-Inkubation eine schwache, aber signifikante Senkung der RH 123-Akkumulation auf 86 % ein. Der Maximaleffekt wird mit einer Konzentration von 50 mM erreicht, eine weitere Konzentrationserhöhung führt zur Abschwächung bis hin zum Wirkverlust bei 100 mM (Abb.41). Ähnlich wie bei Formiat ist der Effekt nach 48 h (Test I) und nach 90 min Inkubation (Test II) zu beobachten und stellt somit keinen induktiven oder zytotoxischen Effekt dar.

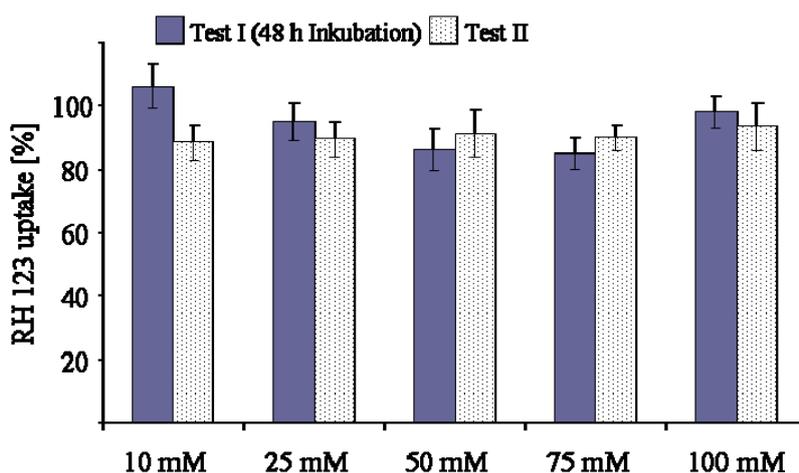


Abbildung 41: Das Diagramm zeigt die Abhängigkeit des RH 123 uptake [%] von der Acetat-Konzentration. Caco-2-Zellen wurden entweder für 48 h (Test I) oder für 90 min (Test II) mit Na-Acetat inkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD aus 5 Versuchen.

Bei LS180-Zellen tritt hingegen nach 48 h-Inkubation eine deutliche Steigerung der RH 123-Akkumulation im Konzentrationsbereich von 10-75 mM zutage (Abb.42). Bei einer Konzen-

tration von 50 mM kann die Akkumulation maximal auf 131 % gesteigert werden. Die Erhöhung auf 100 mM führt zum Wirkverlust. Eine parallele Inkubation von RH 123 mit Na-Acetat (10-100 mM) über 90 min (Test II) übt keinen Einfluss auf RH 123-Akkumulation aus. Der Effekt nach 48 h-Inkubation ist nicht direkt mit der Anwesenheit von Na-Acetat verknüpft. Zudem ist er zeitabhängig und spezifisch für die LS180-Zelllinie. Inhibition des P-gp ist somit auszuschließen, zumal dieser Effekt bei Caco-2-Zellen hätte auftreten müssen. Als Ursache könnten eine höhere Expression des Influxtransporters für RH 123 oder eine veränderte Membranviskosität und damit ein verbesserter Einstrom in die Zellen in Frage kommen.

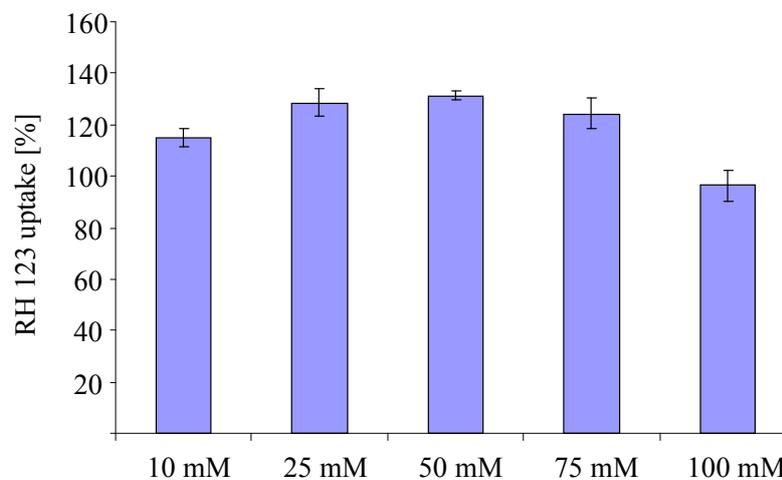


Abbildung 42: Das Diagramm zeigt die RH 123 Akkumulation in LS180-Zellen in Abhängigkeit von der eingesetzten Acetat-Konzentration. LS180-Zellen wurden für 48 h entweder mit 10, 25, 50, 75 oder 100 mM mit Natrium-Acetat inkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte [%] \pm SD aus 6 Versuchen mit $n = 4$.

Kombination der SCFAs

Die SCFAs liegen *in vivo* nie einzeln, sondern stets als Gemisch im Darm vor, wobei Acetat unter den SCFAs mengenmäßig überwiegt. In der Literatur findet man ein ungefähres Mengenverhältnis bei Acetat:Propionat:Butyrat von 60:25:10 beschrieben, welches aber je nach Nahrungszusammensetzung schwankt (Cummings et al, 1987). Insgesamt wird pro Tag mindestens eine Konzentration von 300 mM an Acetat, Propionat und Butyrat gebildet (Cummings 1981, Cummings, Pomare et al. 1987). Um genauere Rückschlüsse für das *in vivo* Verhalten treffen zu können, wurden die einzelnen Salze der SCFAs in verschiedenen Kombinationen an Caco-2- und LS180-Zellen getestet. Als Testmodell diente wieder der RH 123-Akkumulationstest mit den Testvarianten I (mit Vorinkubation) und II (ohne Vorinkubation). Formiat, Acetat und Propionat wurden mit einer Konzentration von 25 mM, Butyrat von 4 und Valeriat von 6 mM getestet.

Kombinierte man die einzelnen Fettsäuren miteinander, so wurde bei beiden Zelllinien weder ein synergistischer noch ein additiver Effekt beobachtet. Stattdessen wurde die RH 123-

Akkumulation nach 48 h-Inkubation zum Teil sogar weniger stark reduziert, als bei den einzelnen SCFAs (Tab. 9a, 10a). Die Kombination aus Propionat oder Butyrat mit Acetat führte bei LS180-Zellen nach 48 h-Inkubation (Tab.9a, Test I) zu einer Abschwächung ihres induktiven Effekts um ca. 10 %. Wurden LS180-Zellen gemeinsam mit Valeriat und Acetat für 48 h inkubiert, so wurde der induktive Effekt von Valeriat gänzlich aufgehoben und nur der akkumulationssteigernde Effekt seitens Acetat war registrierbar.

Bei Caco-2-Zellen entsprach der Wirkeffekt dem Effekt bei Einzeltestung von Propionat, Butyrat oder Valeriat (Tab. 10a). Acetat beeinflusste hier nicht die Effektivität dieser SCFAs. Eine gemeinsame Inkubation von Propionat und Butyrat bei Caco-2-Zellen für 48 h verschlechterte den induktiven Effekt. Die RH 123-Akkumulation wurde nur noch auf 70 % gesenkt (Tab. 9a). Propionat allein erreichte eine Absenkung auf 60 % und Butyrat auf 50 % (Tab. 10a). Die zusätzliche Gabe von Acetat zum Inkubationsgemisch ließ den RH 123-Zellinhalt wieder auf 59 % sinken (Tab. 9a). Wurde Propionat oder Butyrat mit Valeriat kombiniert, so minderte sich der induktive Effekt auf die Wirkstärke von Valeriat allein. Die selben Kombinationen riefen bei LS180-Zellen keinen Unterschied zur Einzeltestung hervor.

Akkumulierte RH 123 in Gegenwart dieser Gemische, so konnte der bei Caco-2-Zellen vermutete inhibitorische Effekt seitens Propionat und Butyrat nicht mehr beobachtet werden (Tab.9b, 10b; Test II).

Tabelle 9: Einfluss der SCFA-Gemische verschiedener Zusammensetzung auf die RH 123-Akkumulation in Caco-2- und LS180-Zellen. Die Tabelle 9a zeigt die RH 123-Akkumulation nach 48 h-Inkubation (Test I) und die Tabelle 9b die RH 123-Akkumulation in Gegenwart der SCFA-Gemische (Test II). Dargestellt sind die Mittelwerte [%] \pm SD aus 6 Versuchen.

(a)

	Mittelwert [%] \pm SD 6 Versuche mit n=4	
	LS180	Caco-2
Acetat + Formiat	113 \pm 8	88 \pm 7
Acetat + Propionat	83 \pm 9	69 \pm 9
Acetat + Butyrat	80 \pm 7	55 \pm 7
Acetat + Valeriat	130 \pm 15	69 \pm 5
Propionat + Butyrat	75 \pm 8	70 \pm 6
Propionat + Valeriat	76 \pm 6	69 \pm 3
Butyrat + Valeriat	65 \pm 6	67 \pm 5
Formiat + Acetat + Propionat	59 \pm 7	57 \pm 9
Acetat + Propionat + Butyrat	67 \pm 5	59 \pm 7
Propionat + Butyrat + Valeriat	67 \pm 7	62 \pm 12

(b)

	Mittelwert [%] \pm SD 5 Versuche mit n=4	
	LS180	Caco-2
Acetat + Formiat	100 \pm 6	98 \pm 6
Formiat + Propionat	77 \pm 1	104 \pm 5
Formiat + Butyrat	96 \pm 7	100 \pm 6
Acetat + Propionat	80 \pm 5	107 \pm 8
Acetat + Butyrat	107 \pm 6	108 \pm 8
Propionat + Butyrat	79 \pm 2	104 \pm 11
Formiat + Acetat + Propionat	77 \pm 9	106 \pm 6
Formiat + Acetat + Butyrat	91 \pm 5	98 \pm 9
Acetat + Propionat + Butyrat	79 \pm 4	112 \pm 8
Formiat + Propionat + Butyrat	82 \pm 4	113 \pm 7

Abbildung 10: Einfluss einzelner Salze kurzkettiger Fettsäuren auf die RH 123-Akkumulation in Caco-2- und LS180-Zellen. Die Tabelle 10a zeigt die RH 123-Akkumulation nach 48 h-Inkubation (Test I) und die Tabelle 10b die RH 123-Akkumulation in Gegenwart einzelner Salze der SCFAs (Test II). Dargestellt sind die Mittelwerte [%] aus 6 Versuchen.

(a)

	Mittelwert [%] ± SD n = 6	
	LS180	Caco-2
Formiat	81	90
Acetat	129	86
Propionat	69	60
Butyrat	71	50
Valeriat	89	70

(b)

	Mittelwert [%] ± SD n = 6	
	LS180	Caco-2
Formiat	72	85
Acetat	103	90
Propionat	101	111
Butyrat	102	120
Valeriat	80	100

4.4.2. Maillardreaktions-Produkte

Die Maillardreaktions-Produkte (MRPs) wurden nach Herstellung entsprechend ihrer Löslichkeit in verschiedene Lösungsmittel-Fractionen getrennt. So ergaben sich die wasserlösliche, die ethanollösliche und die ethanol- und wasserunlösliche Fraktion, die im RH 123-Akkumulationstest auf ihre P-gp modulierenden Eigenschaften an Caco-2- und LS180-Zellen getestet wurden.

Einfluss der Lösungsmittelfraktion auf die RH 123-Akkumulation

I Wasserlösliche MRPs

Die wasserlöslichen MRPs wurden in einer Testkonzentration von 1 mg/ml eingesetzt. Die Testkonzentration von 1 mg/ml erscheint sehr hoch, ist *in vivo* aber realistisch.

Test II (RH 123-Akkumulationstest in Gegenwart der Testsubstanzen)

Akkumuliert RH 123 in Gegenwart wasserlöslicher MRPs, so wird sowohl bei Caco-2-, als auch bei LS180-Zellen eine Absenkung des RH 123-Zellinhalts registriert (Abb.43). Die Minderung des Zellinhalts auf ca. 75 % wird bei fast allen getesteten Maillardprodukt-Gemischen beobachtet. Glucose-Prolin übt als einzige MRP-Mischung bei Caco-2-Zellen keinen Einfluss auf die RH 123-Akkumulation aus.

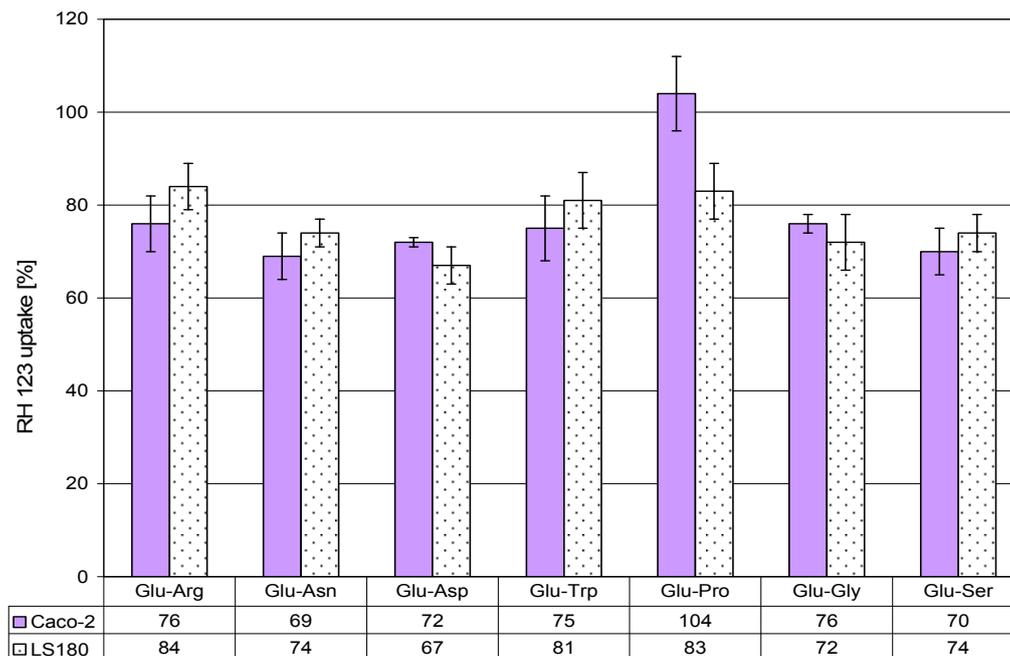


Abbildung 43: Test II, RH 123-Akkumulation in Gegenwart der wasserlöslichen MRPs (1 mg/L). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD aus 6 Versuchen.

Maillardprodukt-Gemische weisen nach der Herstellung bei 125 °C noch Reste von Glucose auf. Die Reduktion des RH 123-Zellinhalts ist aber mit einer erhöhten Glucosebereitstellung, als Energiequelle für den Efflux durch P-gp, nicht erklärbar. Versuche mit 1 mg/ml Glucose zeigten keinen Unterschied zur Kontrolle (Abb.45). Eine Stimulation der P-gp-ATP-ase ist ebenfalls unwahrscheinlich, da der Effekt auch bei LS180-Zellen auftritt, wo die Zellen konstitutiv kein P-gp exprimieren. Eine Komplexierung des Fluoreszenzfarbstoffs durch die parallel applizierten MRPs scheint am wahrscheinlichsten, wodurch der reduzierte RH 123-Zellinhalt die Folge eines verminderten Einstrom sein würde. Diese Vermutung bedarf einer Überprüfung am Transwell-Modell an Caco-2-Zellen.

Test I (48h-Inkubation der Zellen mit MRPs, RH 123-Akkumulationstest ohne MRPs)

Werden Caco-2- und LS180-Zellen für 48 h mit den wasserlöslichen MRPs inkubiert, so zeigt sich im RH 123-Akkumulationstest (Test I) ein sehr unterschiedliches Ergebnis (Abb.44). Während bei der Caco-2-Zelllinie kein Einfluss auf die RH 123-Akkumulation gefunden werden kann, so zeigt sich an LS180-Zellen bei einigen MRPs eine Minderung der RH 123-Akkumulation.

Von den getesteten MRPs zeigen nur die wasserlöslichen Anteile der Maillardgemische Prolin-Glucose, Serin-Glucose und Arginin-Glucose diesen Effekt. Das MRP-Gemisch aus Prolin-Glucose reduziert die RH 123-Akkumulation auf 65 % und ist damit am potentesten.

Dieser Effekt ist durch einen verminderten Einstrom aufgrund Komplexbildung nicht erklärbar, da die Substanzlösung vor dem Test entfernt und die Zellen mehrmals mit HBSS gespült werden. Eventuell wäre ein Anhaften der MRPs an Zellen über den Schleim möglich, aber der Effekt tritt nur bei ausgewählten Maillardprodukt-Gemischen auf und ist somit spezifisch. Toxische Effekte sind auszuschließen, da die gewählte Testkonzentration von 1mg/ml auch bei 48 h-Inkubation keine Zytotoxizität hervorruft und die Zellviabilität nur minimal beeinflusst. Aufgrund der Tatsache, dass der Effekt nicht bei Caco-2- sondern nur bei LS180-Zellen registriert werden kann, scheint eine Induktion der P-gp-Expression über den Pregnan X-Rezeptor die wahrscheinlichste Ursache zu sein.

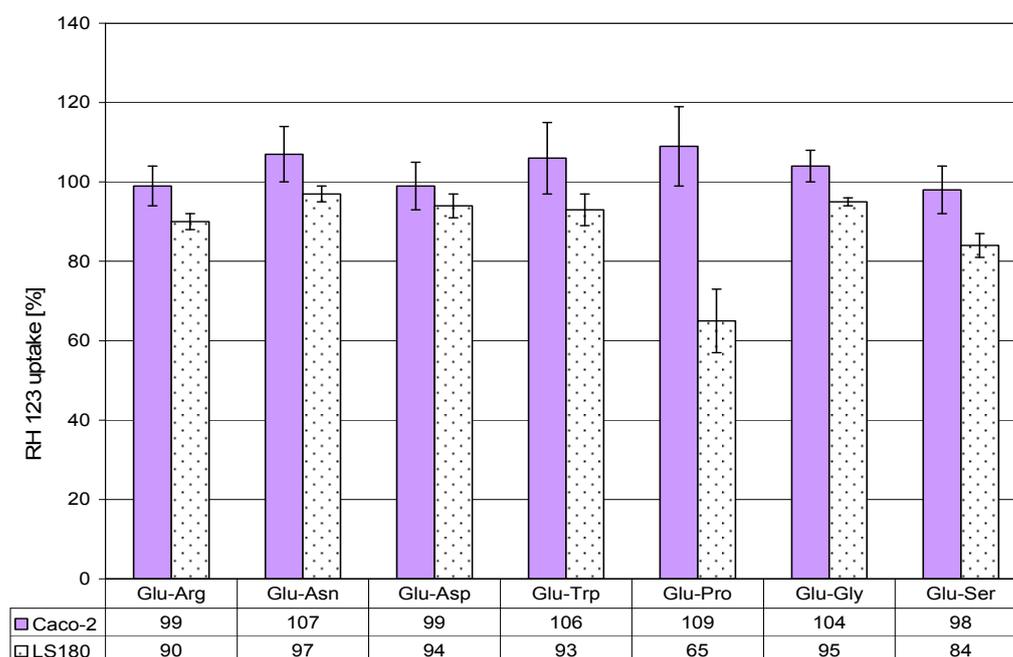


Abbildung 44: Test I: 48 h-Inkubation der Zellen mit wasserlöslichen MRPs (1mg/L), RH 123-Akkumulation ohne MRPs. Dargestellt sind die Mittelwerte [%] \pm SD aus 6 Versuchen.

In weiteren Versuchen wurde geklärt, ob der bei Glucose-Prolin beobachtete Effekt allein auf die hergestellte Maillardprodukt-Mischung zurückzuführen ist oder auch mit Prolin oder Glucose bzw. bei 125 °C erhitztem Prolin oder Glucose ausgelöst werden kann. Alle Proben wurden mit der Konzentration von 1 mg/ml an LS180-Zellen getestet. Nach Auswertung des RH 123-Akkumulationstestes (Abb.45) wird deutlich, dass lediglich die Maillardprodukt-Mischung aus Glucose und Prolin eine Reduktion der RH 123-Akkumulation herbeiführt.

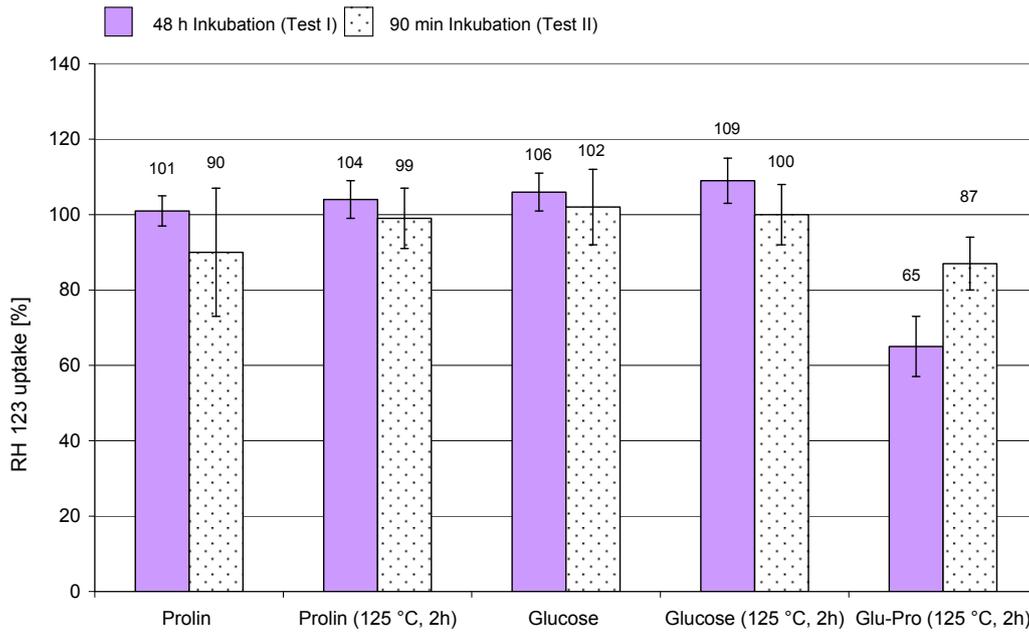


Abbildung 45: RH 123-Akkumulation in LS180-Zellen nach Inkubation für 48 h mit Testsubstanzen (Test I) bzw. in Gegenwart der Testsubstanzen (Test II). Dargestellt sind die Mittelwerte [%] \pm SD aus 5 Versuchen.

Sollte die Reduktion der RH 123-Akkumulation auf einen gesteigerten Efflux zurückzuführen sein, müsste dieser Effekt durch den potenten P-gp-Inhibitor Elacridar aufgehoben werden können. Um dieser Überlegung nachzugehen wurden LS180-Zellen zum einen mit Glucose-Prolin und zum anderen mit Butyrat, als Positivkontrolle für die Induktion der P-gp-Expression, für 48 h inkubiert. Nach Entfernen der Inkubationslösung wurde anschließend der RH 123-Akkumulationstest jeweils mit und ohne Elacridar durchgeführt.

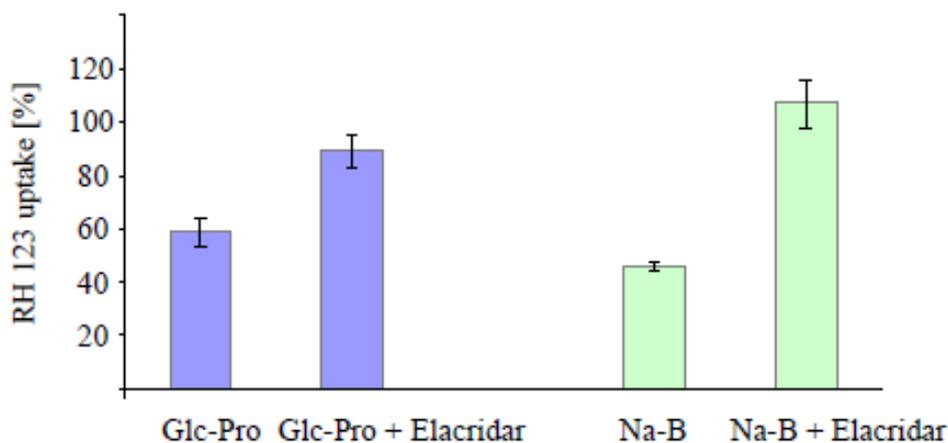


Abbildung 46: LS180-Zellen wurden mit Glc-Pro (1mg/ml) oder mit Na-Butyrat (4 mM) für 48 h inkubiert. Nach Entfernen der Inkubationslösung wurde der RH 123-Akkumulationstest mit und ohne Elacridar durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte [%] \pm SD aus 5 Versuchen.

Natrium-Butyrat senkte infolge einer 48 h-Inkubation den RH 123-Zellinhalt auf 46 %. Elacridar vermochte diesen Effekt komplett zu revidieren.

Die 48 h-Inkubation mit Glucose-Prolin zeigte einen schwächeren Einfluss auf die RH 123-Akkumulation als Butyrat. Elacridar, das selbst keinen Einfluss auf die RH 123-Akkumulation ($102 \% \pm 2$) nahm, konnte den RH 123-Zellinhalt von 59 % auf 88 % erhöhen. Dies ist ein Beweis dafür, dass Glucose-Prolin fähig ist, die P-gp-Expression zu induzieren.

II Ethanollösliche MRPs

Die ethanollöslichen MRPs wurden bei einer Konzentration von 0,1 mg/ml mit einem Ethanolanteil von 0,1 % getestet. Aufgrund der schlechten Löslichkeit in Medium und HBSS konnte die Konzentration nicht auf 1 mg/ml gesteigert werden, um eine bessere Vergleichbarkeit zu den Ergebnissen der wasserlöslichen MRPs zu ermöglichen. Die Ergebnisse aus den RH 123-Akkumulationstestungen sind tabellarisch für die Testvarianten I und II zusammengefasst (Tab.11a und b). Von den Maillardprodukt-Mischungen wurden nur Glucose-Tryptophan, Glucose-Serin und Glucose-Prolin getestet. Glucose-Tryptophan wies nach Herstellung den höchsten Anteil ethanollöslicher MRPs auf. Eine 48 h-Inkubation beider Zelllinien mit den ethanollöslichen MRPs zeigte keinen Einfluss auf die RH 123-Akkumulation. Somit kann eine Induktion der P-gp-Expression ausgeschlossen werden. Erfolgt die RH 123-Akkumulation im Beisein dieser MRPs, so kann nur bei Glucose-Tryptophan eine leichte, aber vernachlässigbare Senkung des RH 123-Zellinhalts bei Caco-2- und LS180-Zellen ermittelt werden. Nach Beurteilung der Ergebnisse kann weder ein induzierender noch ein hemmender Effekt in Bezug auf das P-Glykoprotein gefunden werden.

Tabelle 11: Einfluss ethanollöslicher MRPs auf die RH 123-Akkumulation in Caco-2- und LS180-Zellen. Tab.11a zeigt die RH 123-Akumulation nach 48 h-Inkubation (Test I) und Tab.11b die RH 123-Akkumulation in Gegenwart ethanollöslicher MRPs (Test II). Dargestellt sind die Mittelwerte [%] aus 6 Versuchen.

(a): Test I (48 h-Inkubation)

(b) Test II

	Mittelwert \pm SD 6 Versuche mit n = 4			Mittelwert \pm SD 6 Versuche mit n = 4	
	LS180	Caco-2		LS180	Caco-2
Glucose-Tryptophan	112 \pm 11	106 \pm 2	Glucose-Tryptophan	86 \pm 6	87 \pm 2
Glucose-Serin	104 \pm 8	101 \pm 4	Glucose-Serin	101 \pm 9	92 \pm 6
Glucose-Prolin	100 \pm 6	109 \pm 3	Glucose-Prolin	111 \pm 8	96 \pm 5

III Wasser- und Ethanolunlösliche MRPs

Die Maillardreaktions-Produkte, welche sich in Wasser- und Ethanol gleichermaßen unlöslich zeigten, wurden nicht getestet. Diese MRPs liegen in Medium und HBSS als Suspension vor. Es zeigte sich in Vorversuchen, dass der Fluoreszenzfarbstoff RH 123 sich an diese Partikel anlagert, welche wiederum an der Zelloberfläche anhaften und durch Spülen nur schlecht entfernt werden können. Nach Lyse der Zellen wird so ein höherer RH 123-Zellinhalt als tatsächlich vorhanden detektiert, welcher das Ergebnis verzerrt.

Studien weisen den unlöslichen MRPs nur die Eigenschaft der Komplexierung zu und es wird davon ausgegangen, dass diese *in vivo* nicht resorbiert werden (Ames et al., 1999; Homma & Fujimaki, 1981; Nair et al., 1981; Finot, 1990; Lee et al., 1992).

Einfluss der Zuckerkomponente auf die RH 123-Akkumulation

Laut Studien zeigt die Art der Zuckerkomponente einen Einfluss auf die Maillardreaktion bezüglich des Bräunungsgrads, des Geruchs und der Struktur der gebildeten MRPs (Westpfahl & Kroh, 1985).

Im ersten Versuch wurde Glycin mit den Einfachzuckern Glucose (= Hexose) oder Fructose (= Pentose) kombiniert. Nach thermischer Behandlung bei 125 °C für 2 h konnte ein Unterschied beobachtet werden. Die Maillardprodukt-Mischung aus Glucose und Glycin war wesentlich stärker dunkelbraun gefärbt, schwerer und wies einen doppelt so hohen Anteil an wasserunlöslichen MRPs auf, als die Maillardprodukt-Mischung aus Fructose und Glycin. Dies lässt den Schluss zu, dass bei der Maillardreaktion verschiedene MRPs entstanden sind. In der Tabelle 12 sind die Ergebnisse aus den RH 123-Akkumulationstest für die wasserlöslichen MRPs aufgeführt. Anhand der Ergebnisse wird deutlich, dass die Maillardprodukt-Mischung mit Fructose keinen Unterschied zur Maillardprodukt-Mischung mit Glucose aufzeigt. Weder MRPs aus Glucose noch aus Fructose weisen einen induzierenden Effekt auf die P-gp-Expression auf und sind zudem nicht fähig P-gp zu inhibieren.

Tabelle 12: Einfluss der Zuckerkomponente auf die RH 123-Akkumulation (Test I und II). Dargestellt sind die Mittelwerte [%] ± SD aus 5 Versuchen.

	Test I (48 h-Inkubation)		Test II	
	Caco-2	LS180	Caco-2	LS180
Glucose- Glycin	104 ± 4	95 ± 1	76 ± 6	72 ± 6
Fructose- Glycin	97 ± 6	91 ± 3	69 ± 5	75 ± 5

In einem weiteren Versuch wurden MRPs aus den Aminosäuren Asparagin, Glycin, Prolin und dem reduzierenden Zweifachzucker Lactose nach COST 919 hergestellt. Mit Lactose als

Zuckerkomponente wurden nur wasserlösliche MRPs gewonnen, die einen deutlichen schwächeren Bräunungsgrad als MRPs mit Glucose als Zuckerkomponente aufwiesen.

Im RH 123-Akkumulationstest zeigte sich, dass eine 48 h-Inkubation der Caco-2-Zellen mit wasserlöslichen MRPs aus Lactose keinen Einfluss auf den RH 123-Zellinhalt besitzt (Abb.47). Bei LS180-Zellen wies lediglich die Maillardprodukt-Mischung aus Lactose und Prolin einen reduzierenden Effekt auf, welcher im Gegensatz zur Glucose-Prolin-Mischung (65 %) deutlich geringer ausfällt. Lactose-Prolin vermag die RH 123-Akkumulation nur auf 78 % zu senken. Mit diesem Versuch zeigte sich wiederholt, dass MRPs aus Prolin fähig sind die RH 123-Akkumulation durch eine 48 h-Inkubation deutlich zu senken, wobei die Zuckerkomponente das Ausmaß der Senkung beeinflusst.

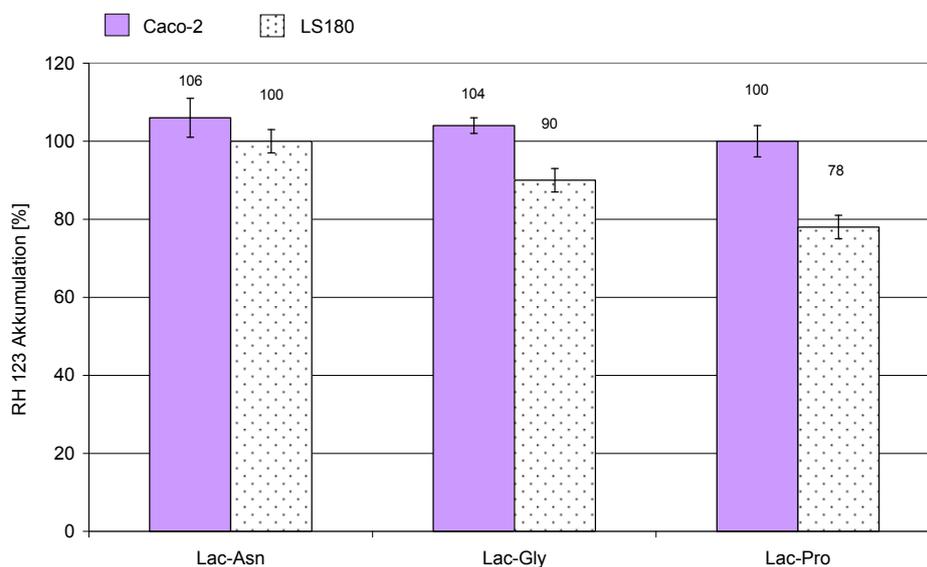


Abbildung 47: Test I: 48 h-Inkubation der Caco-2- und LS180-Zellen mit je 1 mg/ml Lac-Asn, Lac-Gly oder Lac-Pro. Der RH 123-Akkumulationstest wurde mit RH 123 ohne diese MRPs durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte [%] \pm SD aus 6 Versuchen.

Beim Test II wurde eine Senkung des RH 123-Zellinhalts um 10 % in Gegenwart wasserlöslicher MRPs aus Lac-Asn, Lac-Gly und Lac-Pro ermittelt (Abb.48). Die wasserlöslichen MRPs aus Glucose reduzierten hingegen den RH 123-Zellinhalt um 20 bis 30 % (siehe 4.4.2., Abschnitt I). Als Erklärung für die Abnahme des RH 123-Zellinhalts wurde eine Komplexierung des Fluoreszenzfarbstoffs durch MRPs, die zu einem verminderten Einstrom in die Zelle führt, vermutet. Die Fähigkeit RH 123 zu komplexieren, scheint bei MRP-Gemischen aus Lactose schwächer ausgeprägt zu sein.

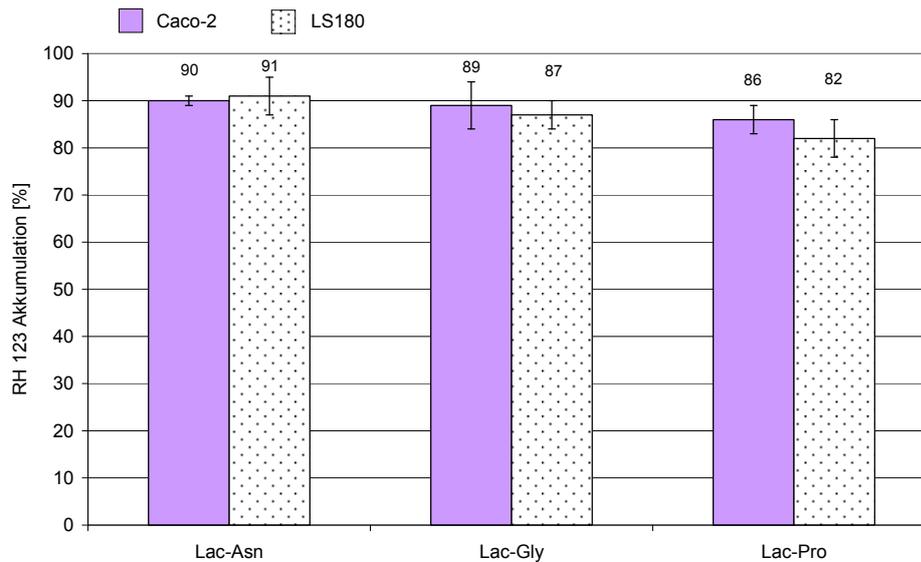


Abbildung 48: Test II: RH 123-Akkumulation in Caco-2- und LS180-Zellen in Gegenwart von 1 mg/ml Lac-Asn, Lac-Gly oder Lac-Pro. Dargestellt sind die Mittelwerte [%] \pm SD aus 6 Versuchen.

Zusammenfassung

Weder die wasserlösliche, noch die ethanollösliche Fraktion der hergestellten MRPs führte zu einer Steigerung der RH 123-Akkumulation bei Caco-2-Zellen. MRPs sind demzufolge nicht fähig, P-gp zu inhibieren. Stattdessen wurde eine Abnahme der intrazellulären RH 123-Konzentration bei beiden Zelllinien um 20 bis 30 % in Gegenwart wasserlöslicher MRPs registriert, die mit einer Komplexbildung des Fluoreszenzfarbstoffs durch MRPs erklärt werden kann.

Für den RH 123-Akkumulationstest I wurden Caco-2- und LS180-Zellen für 48 h mit den jeweiligen MRPs inkubiert und im Anschluss der RH 123-Akkumulationstest mit RH 123 ohne MRPs durchgeführt. Von den wasserlöslichen MRPs zeigten nur die MRPs aus Glucose-Arginin (Glc-Arg), Glucose-Serin (Glc-Ser) und Glucose-Prolin (Glc-Pro) eine Senkung der RH 123-Akkumulation. Dieser Effekt trat lediglich bei LS180-Zellen auf. Der P-gp-Inhibitor Elacridar vermochte zudem den erniedrigten RH 123-Zellinhalt von 65 %, infolge der Inkubation der LS180-Zellen mit Glc-Pro, auf 88 % zu erhöhen. Die Verringerung der intrazellulären RH 123-Konzentration, bedingt durch eine 48 h-Inkubation, ist demnach auf einen RH 123-Efflux durch P-gp zurückzuführen. LS180-Zellen exprimieren erst nach Induktion der P-gp-Expression über VDR oder PXR den Effluxtransporter P-gp. Da die wasserlöslichen MRPs aus Glc-Arg, Glc-Ser und Glc-Pro diesen Effekt nur bei LS180-Zellen ausüben, scheinen diese MRPs die P-gp-Expression über PXR zu induzieren. Eine letztendliche Bestätigung muss jedoch noch durch Bestimmung des P-gp-Proteingehalts über Western Blot erfolgen (siehe Kapitel 4.8.).

4.5. Bidirektionale Transportstudien mit Transwells an Caco-2-Zellen

Zur Überprüfung der Schlussfolgerungen, die sich aus den Ergebnissen der RH 123-Akkumulationstests ergaben, wurden bidirektionale Transportstudien durchgeführt. Als Zelllinie wurde nur die Caco-2-Zelllinie verwendet. LS180-Zellen sind für Transportstudien ungeeignet, da sie keinen Monolayer ausbilden und damit keine Membran darstellen. Effekte die an LS180-Zellen beobachtet wurden, können auf diesem Wege nicht aufgeklärt werden.

4.5.1. Absorptiver und sekretorischer Transport des RH 123

Zur Beurteilung der Einflussnahme der Testsubstanzen auf den absorptiven und sekretorischen Transport von RH 123 wurden zuerst die Permeabilitätskoeffizienten P_{appAB} und P_{appBA} für RH 123 ermittelt.

Der Permeabilitätskoeffizient für den Transport von RH 123 von der apikalen zur basolateralen Seite ($P_{app,AB}$) lag bei $1,4 \times 10^{-6}$ cm/s. Papp-Werte kleiner als 10^{-6} cm/s weisen auf eine Substanz mit schlechter Resorption, Werte von 1 bis 10×10^{-6} auf Substanzen mit mittelmäßiger Resorption und alle Werte größer als 10×10^{-6} auf Substanzen mit guter Resorption hin. In verschiedenen Arbeitsgruppen wurden für RH 123 Werte zwischen $0,36$ und $1,42 \times 10^{-6}$ cm/s ermittelt. Die Substanz wurde überwiegend als schlecht permeabel eingestuft. Die Unterschiede bei den ermittelten Papp-Werten ergeben sich aus Variationen der Parameter Passagezahl, Kulturbedingungen, Arbeitsmethoden, Material sowie Zusammensetzung und pH-Wert des Transportpuffers. Alle diese Parameter besitzen einen Einfluss auf die Resorption und Sekretion. Der hier ermittelte P_{appAB} -Wert von $1,4 \times 10^{-6}$ cm/s ist verglichen mit den $P_{app,AB}$ -Werten aus anderen Studien verhältnismäßig hoch. Im vorliegenden Fall kann von einer mittelmäßigen Resorption des RH 123 an den verwendeten Caco-2-Monolayern ausgegangen werden. Darüber hinaus wurden lediglich TEER-Werte zwischen 400 und $500 \Omega \text{ cm}^2$ bestimmt. In der Literatur finden sich für Caco-2-Monolayer häufig TEER-Werte zwischen 500 - $700 \Omega \text{ cm}^2$. All dies weist auf Caco-2-Monolayer mit weniger dichten Tight Junctions hin.

Für den entgegen gerichteten Transport (basolateral nach apikal, B→A) wurde ein $P_{app, BA}$ -Wert von $6,2 \times 10^{-6}$ cm/s ermittelt, welcher sich in der Literatur gefundenen Spanne von $1,5$ bis $16,2 \times 10^{-6}$ cm/s einfügt (Troutmann and Thakker, 2003). Der P_{app} -Wert des sekretorischen Transports (B→A) war größer als der des absorptiven Transports (A→B). Die Effluxrate wird aus dem Quotient $P_{app,BA} / P_{app,AB}$ bestimmt. Ist die Effluxrate größer 2, so liegt ein Efflux vor.

In diesem Fall lag sie bei 4,4. Dadurch konnte ein aktiver zur apikalen Seite hin gerichteter Transport für das P-gp-Substrat RH 123 nachgewiesen werden.

P-gp beeinflusst den absorptiven und sekretorischen Transport von P-gp-Substraten häufig unterschiedlich, so dass meist zur Beurteilung des P-gp-Einflusses zusätzlich der Absorptions- und der Sekretionsquotient hinzugezogen werden (Troutman and Thakker, 2003). Bei beiden Quotienten fließen neben den $P_{app,BA}$ - bzw. $P_{app,AB}$ -Werten von RH 123 die $P_{app,BA}$ - bzw. $P_{app,AB}$ -Werte von RH 123 in Gegenwart eines potenten P-gp-Inhibitors mit ein (Berechnung siehe Kapitel 3.4.). Als potenter P-gp-Inhibitor wurde Elacridar eingesetzt.

Der Absorptionsquotient betrug für RH 123 0,05, d.h., P-gp nahm lediglich einen Einfluss von 5 % auf den absorptiven Transport von RH 123. Hiermit wurde in Übereinstimmung anderer Studien bestätigt, dass P-gp die Aufnahme von RH 123 in die Zelle nicht limitiert, vermutlich aufgrund des parazellulären Transportwegs des RH 123 (Troutman & Thakker, 2003). Nach Berechnung des Sekretionsquotienten ergab sich ein Wert von 3,22. Der Einfluss des P-gp auf den sekretorischen Transport lag somit bei 322 %.

4.5.2. Salze kurzkettiger Fettsäuren

Die in den Versuchen ermittelten apparenten Permeabilitätskoeffizienten von RH 123 in Abhängigkeit von den parallel applizierten SCFAs sind in Tabelle 13 zusammengefasst.

Tabelle 13: Ermittlung der P_{appAB} - bzw. P_{appBA} -Werte von RH 123 in Gegenwart von Elacridar und den Salzen kurzkettiger Fettsäuren anhand von bidirektionalen Transportstudien an Caco-2-Monolayer. Die P_{app} -Werte stellen die Mittelwerte \pm SD aus 5 Versuchen mit $n = 3$ dar.

Substanz	$P_{app\ A \rightarrow B}$ [$\times 10^{-6}$ cm/s]	$P_{app\ B \rightarrow A}$ [$\times 10^{-6}$ cm/s]	Effluxrate BA/AB
Rhodamin 123	1,40 \pm 0,3	6,22 \pm 0,44	4,4
+ Formiat (10 mM)	1,36 \pm 0,01	5,99 \pm 0,24	4,4
+ Acetat (10 mM)	1,36 \pm 0,02	6,46 \pm 0,28	4,7
+ Propionat (75 mM)	1,34 \pm 0,05	5,88 \pm 0,51	4,4
+ Butyrat (4 mM)	1,39 \pm 0,06	6,07 \pm 0,50	4,4
+ Elacridar (1 μ M)	1,48 \pm 0,07	1,48 \pm 0,67	1

Na-Formiat und Na-Acetat

Der RH 123-Akkumulationstest II zeigte eine leichte Reduktion des RH 123-Zellinhalts, wenn RH 123 in Gegenwart von Na-Formiat und Na-Acetat akkumulierte (siehe Abschnitt

4.4.1). Diese Beobachtung konnte in den Transportstudien nicht bestätigt werden. Weder der absorptive noch der sekretorische Transport wurden verändert.

Propionat und Butyrat

Bei Propionat und Butyrat konnte mit der Testvariante II des Akkumulationstests ein Anstieg des RH 123-Zellinhalts um 20 % detektiert werden. Dieser Effekt wurde lediglich an der Caco-2-Zelllinie beobachtet, während die RH 123-Akkumulation bei LS180-Zellen, die kein P-gp exprimieren, unbeeinflusst blieb. Somit ließ sich eine leichte Inhibition des P-gp vermuten. Aber auch diese Vermutung konnte letztendlich mit den bidirektionalen Transportstudien nicht bewiesen werden. Eine Verminderung des Papp-Wertes (B→A) konnte nicht registriert werden. Elacridar als bekannter potenter P-gp-Inhibitor konnte hingegen den Efflux zu 100 % aufheben, erkennbar an der berechneten Effluxrate von 1.

Zusammenfassung

Die Salze der getesteten SCFAs zeigten weder einen Einfluss auf die Resorption (A→B) noch auf die Sekretion (B→A), werden sie zusammen mit RH 123 appliziert.

4.5.3. Maillard-Reaktionsprodukte

Der 2. Themenbereich der Doktorarbeit ging der Frage nach, ob Maillard-Reaktionsprodukte fähig sind, das P-Glykoprotein zu modulieren. Sowohl an Caco-2- als auch an LS180-Zellen konnte eine Abnahme der RH 123-Akkumulation im Beisein der wasserlöslichen MRPs um 30 % beim RH 123-Akkumulationstest II registriert werden. Da die Testkonzentration von 1 mg/ml die Zellviabilität nicht mindert und Studien den MRPs komplexierende Eigenschaften zusprechen (Powrie et al., 1986; Solyakov et al., 2002), lag die Vermutung nahe, dass der reduzierte RH 123-Zellinhalt durch einen verminderten Einstrom infolge Komplexbildung erklärbar wäre. Dies sollte durch bidirektionale Transportstudien überprüft werden. Im Falle einer Komplexbildung des Fluoreszenzfarbstoffs wäre eine verminderte Permeabilität von der apikalen zur basolateralen Membranseite zu erwarten gewesen. Die Ergebnisse aus den bidirektionalen Transportstudien sind tabellarisch zusammengefasst (Tab.14).

Alle drei der getesteten wasserlöslichen MRPs aus Glucose-Prolin, Glucose-Asparagin und Glucose-Serin verbesserten den Transport durch die apikale Membran um 10 %. Eine Komplexbildung des RH 123 durch MRPs kann somit nicht nachgewiesen werden.

RH 123 passiert auf parazellulärem Wege die apikale Membran, so dass eine Verbesserung der Permeabilität mit einem verbesserten parazellulärem Transportweg einhergehen müsste. Tight Junctions verschließen den Zellzwischenraum und kontrollieren den parazellulären Transport von Molekülen. Demzufolge könnten MRPs fähig sein, Tight Junctions schwach zu

modulieren, z. B. über eine Komplexierung von Ca^{2+} -Ionen. Eine Messung des TEER-Wertes als Maß für die Dichtigkeit der Monolayer über einen Zeitraum von 120 min ergab allerdings keinen Unterschied zur Kontrolle.

Tabelle 14: Ermittlung der P_{appAB} - bzw. P_{appBA} -Werte von RH 123 in Gegenwart der wasserlöslichen MRPs Glc-Pro, Glc-Asn und Glc-Ser anhand von bidirektionalen Transportstudien an Caco-2-Monolayer. Die P_{app} -Werte stellen die Mittelwerte \pm SD aus 5 Versuchen mit $n = 3$ dar.

Substanz	$P_{\text{app A}\rightarrow\text{B}}$ [$\times 10^{-6}$ cm/s]	$P_{\text{app B}\rightarrow\text{A}}$ [$\times 10^{-6}$ cm/s]	BA/AB
Rhodamin 123	1,40 \pm 0,03	6,22 \pm 0,44	4,4
+ Glucose-Prolin (1mg/ml)	1,57 \pm 0,02	5,43 \pm 0,31	3,4
+ Glucose-Asparagin (1mg/ml)	1,54 \pm 0,04	5,31 \pm 0,20	3,5
+ Glucose-Serin (1mg/ml)	1,55 \pm 0,04	6,31 \pm 0,41	4,1

Der RH 123-Transport über die basolaterale Membran (B \rightarrow A) wurde in Gegenwart der MRPs aus Glucose-Prolin und Glucose-Asparagin leicht reduziert. Die Abnahme betrug ca. 14 %. Die für RH 123 berechnete Effluxrate von 4,4 konnte auf 3,4 reduziert werden. Im RH 123-Akkumulationstest II konnte keine Erhöhung der intrazellulären RH 123-Konzentration infolge einer Hemmung des P-gp bei Caco-2-Zellen beobachtet werden. Eine Hemmung des P-gp vermittelten Effluxes nach Eintritt in die Zellen ist somit auszuschließen. Daher müssen Glucose-Prolin und Glucose-Asparagin Einfluss auf den Eintritt von RH 123 in Caco-2-Zellen ausüben. RH 123 gelangt auf transzellulärem Wege über die basolaterale Membran in die Zelle. RH 123 liegt mit den MRPs vielleicht teilweise als Komplex vor, so dass die verminderte RH 123-Konzentration das Konzentrationsgefälle herabsenkt. Andererseits zeigt Glucose-Serin keinen Effekt, obwohl die wässrige Lösung stark gefärbt ist und damit hochmolekulare, konjugierte Verbindungen enthält, denen man komplexierende Eigenschaften zuspricht.

Die MRPs beeinflussen die RH 123-Permeation durch Caco-2-Monolayer nur sehr schwach. Von einer Wirksamkeit *in vivo* ist daher nicht auszugehen. Leider können die Resultate aus den Transportstudien die bei dem RH 123-Akkumulationstest II beobachteten Effekte nicht klären.

4.6. Bestimmung des ATP-Gehalts in Caco-2- und LS180-Zellen

Der P-gp vermittelte Efflux verbraucht pro Transportzyklus 2 Moleküle ATP. Veränderungen des zellulären ATP-Gehalts können somit die Funktionalität von P-gp beeinflussen.

Die Salze kurzkettiger Fettsäuren und ausgewählte wasserlösliche MRPs wurden an Caco-2- und LS180-Zellen getestet, um deren Auswirkung auf den zellulären ATP-Gehalt zu untersuchen. Nach einer Einwirkzeit von 90 min wurde zum einen das freigesetzte ATP im Überstand untersucht, zum anderen wurden die Zellen lysiert, um die intrazelluläre ATP-Konzentration zu quantifizieren. Die Quantifizierung des ATP-Gehalts außerhalb der Zellen sollte der Frage nachgehen, ob eine niedrige intrazelluläre ATP-Konzentration durch eine erhöhte Freisetzung von ATP aus der Zelle zurückzuführen sei. Der Inkubationszeitraum von 90 min wurde gewählt, um die Ergebnisse aus dem RH 123-Akkumulationstest II deuten und erklären zu können. Aus demselben Grund entsprachen die eingesetzten Testkonzentrationen denen aus dem RH 123-Akkumulationstest. Als Inkubationsmedium wurde die Pufferlösung HBSS eingesetzt.

4.6.1. Salze kurzkettiger Fettsäuren

Die mit dem ATP-Assay gewonnenen Daten sind in der Abbildung dargestellt. Unabhängig von der eingesetzten Zelllinie üben Formiat, Acetat, Butyrat, Valeriat und Capronat keinen Einfluss auf die intrazellulären ATP-Gehalte aus.

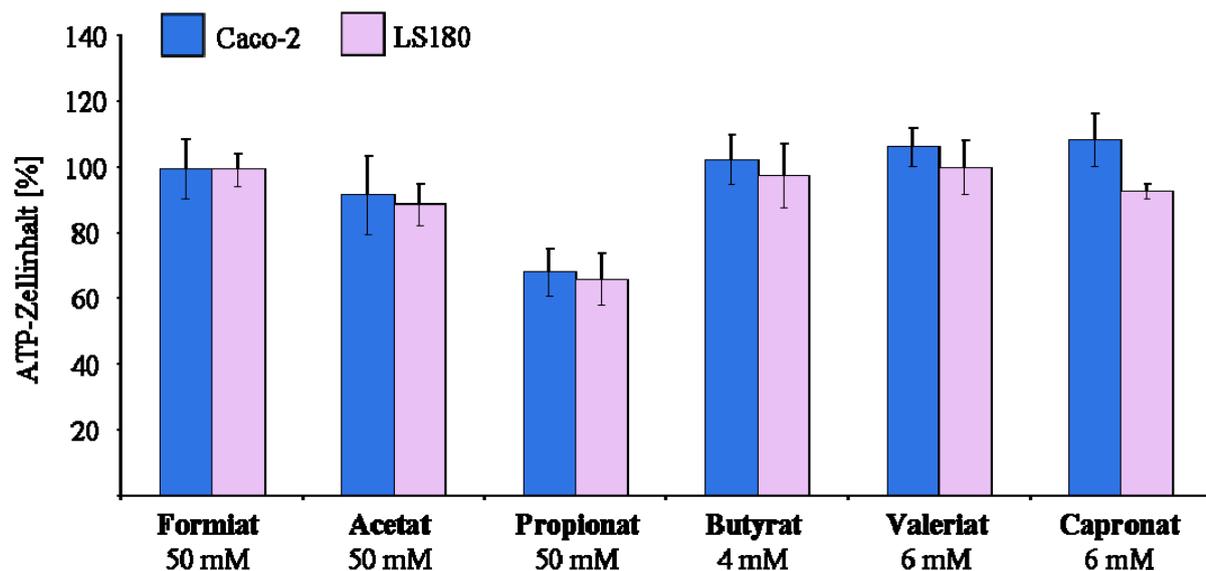


Abbildung 49: ATP-Zellinhalt [%] in Abhängigkeit von SCFAs. Zellen wurden 7 d (LS180) bzw. 21 d (Caco-2) kultiviert und für 90 min mit den jeweiligen SCFAs versetzt. Nach Lyse der Zellen und Zugabe von Luciferin/Luciferase wurde der ATP-Zellinhalt mittels Lumineszenz bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte [%] \pm SD aus 5 Versuchen mit $n=4$.

Propionat hingegen senkt konzentrationsabhängig den ATP-Gehalt beider Zelllinien. Bereits bei 10 mM ist ein Effekt vorhanden. Bei einer Konzentration von 50 mM wird eine Senkung von 30 % erreicht (Abb.50).

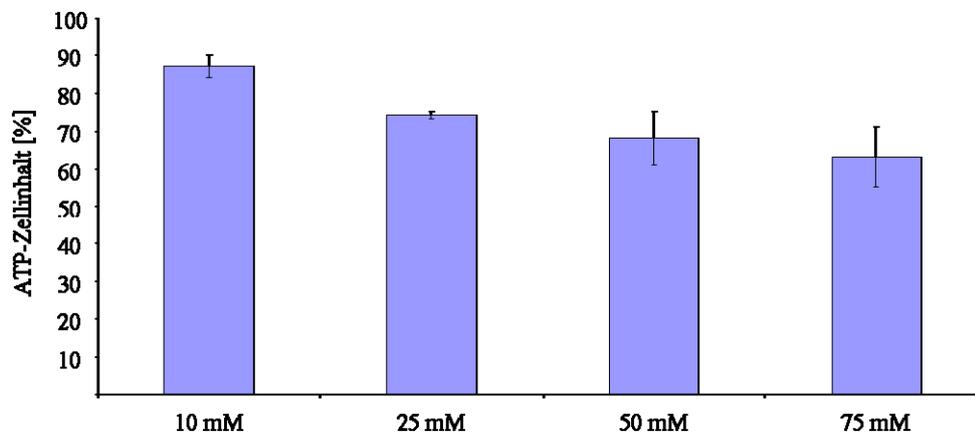


Abbildung 50: Intrazellulärer ATP-Gehalt [%] von Caco-2-Zellen in Abhängigkeit von der Propionat-Konzentration. Dargestellt sind die Mittelwerte [%] \pm SD aus 5 Versuchen mit $n=4$.

Um toxische Effekte auszuschließen wurde zum einen der ATP-Gehalt im Überstand bestimmt, zum anderen nach 90 min-Inkubation ein MTT-Test durchgeführt. Der verwendete Puffer HBSS enthielt kein ATP. Bei Propionat und den übrigen SCFAs konnten keine erhöhten ATP-Gehalte im Überstand der Caco-2-Zellen gefunden werden (Tab. 15). Toxische Effekte, die Defekte im Membranaufbau hervorrufen und zur Freisetzung von ATP aus der Zelle führen, können nahezu ausgeschlossen werden. Es ist zu bedenken, dass die Menge an freigesetzten ATP wesentlich kleiner ist als nach zellulären Aufschluss. Der extrazelluläre ATP-Gehalt wird in einem Volumen von 100 μ l HBSS bestimmt. Mögliche Unterschiede im ATP-Gehalt könnten vorhanden, aber durch die Verdünnung mit dem Assay nicht mehr erfasst werden. Die großen Schwankungen bei der Standardabweichung könnten ebenso leichte Unterschiede zur Kontrolle verbergen, die aber das starke Absinken der ATP-Gehalte auf Werte um 70 % mit Propionat nicht erklären könnten.

Tabelle15: Bestimmung des extrazellulären ATP-Gehalts im Überstand von Caco-2-Zellen nach 90 min Inkubation mit den Salzen der SCFAs. Dargestellt sind die Mittelwerte [%] \pm SD aus 5 Versuchen.

	Kontrolle	Formiat	Acetat	Propionat	Butyrat	Valeriat	Capronat
ATP-Gehalt im Überstand [%]	100 \pm 21	119 \pm 11	103 \pm 6	90 \pm 24	108 \pm 12	122 \pm 31	85 \pm 4

Zusätzlich wurde nach Entfernen der SCFAs ein MTT-Test durchgeführt, wofür die Zellen für 60 min mit MTT inkubiert wurden. Nach Zelllyse wurde der OD-Wert bestimmt, die Zellviabilität berechnet und in Abbildung 51 dargestellt. Der MTT-Test misst die Enzymaktivität

von Dehydrogenasen des Endoplasmatischen Retikulums und der Mitochondrien lebender Zellen. Bei der ATP-Gewinnung sind Dehydrogenasen beteiligt. Keine der Testsubstanzen übte unter den Bedingungen des MTT-Tests einen Einfluss auf Dehydrogenasen aus.

Weder ein Einfluss auf Dehydrogenasen zur ATP-Energiegewinnung noch toxische Effekte, die zur Freisetzung von ATP aus den Zellen führen, können als Ursache für die Absenkung des intrazellulären ATP-Gehalts durch Propionat herangezogen werden.

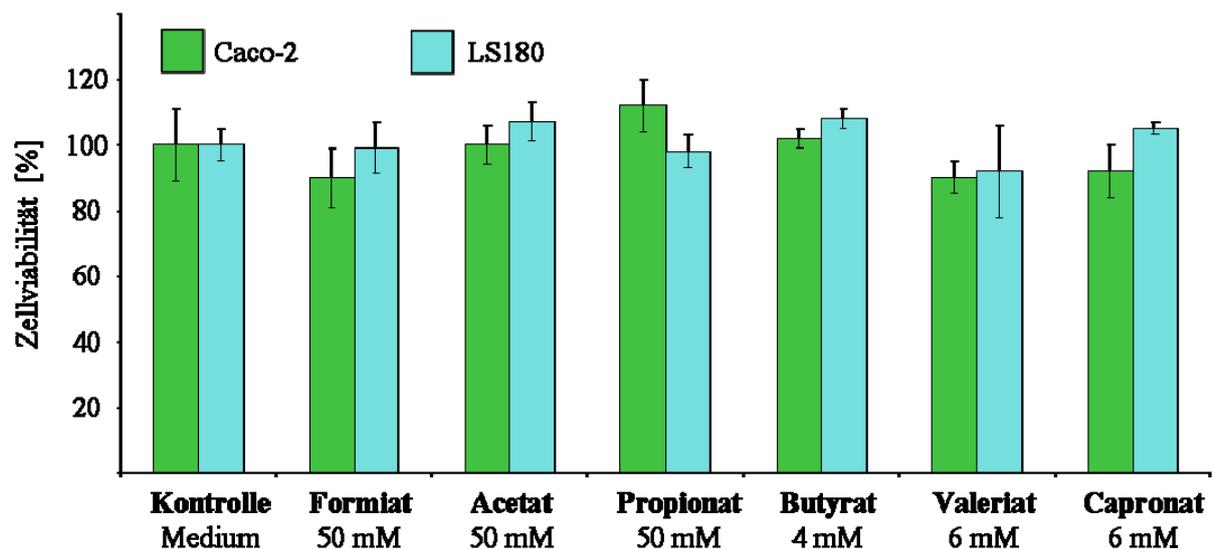


Abbildung 51: Bestimmung der Zellviabilität [%] von Caco-2- und LS180-Zellen mittels MTT-Test. Zellen wurden für 90 min mit den Salzen der SCFAs inkubiert, anschließend für 60 min mit MTT versetzt und lysiert. Anschließend wurde der OD-Wert bestimmt. Dargestellt sind die Mediane aus 3 Versuchen mit $n=4$.

In der Zelle wird Propionat wie alle Fettsäuren unter Verbrauch von 2 mol ATP mit Coenzym A gekoppelt. Acetyl-CoA kann jedoch sofort in den Citratzyklus eingehen, während Propionyl-CoA über Malonyl-CoA erst in Succinyl-CoA umgewandelt werden muss, um im Citratzyklus umgesetzt zu werden. Die Carboxylierungsreaktion von Propionyl-CoA zu D-Methyl-Malonyl-CoA erfolgt in Anwesenheit der Propionyl-CoA-Carboxylase unter Mitwirkung von Biotin. Bei diesem Schritt wird 1 Molekül ATP verbraucht. Die Absenkung der intrazellulären ATP-Spiegel könnte demnach durch einen erhöhten Verbrauch resultieren. Diese Erklärung ist dennoch unbefriedigend, da bereits der Verbrauch von 2 Molekülen ATP bei der Kopplung der SCFAs mit Coenzym A gegenüber den Kontrollwerten nicht registriert werden konnte. Die Glucosemenge von 4,5 g/L im Inkubationspuffer (HBSS) scheint den erhöhten Verbrauch zu kompensieren.

Vermutlich hemmt Propionat die ATP-Gewinnung, so dass die Zellen innerhalb der 90 min ATP verbrauchen, aber keines mehr nachbilden können. Zwar konnte bei Propionat kein Einfluss auf Dehydrogenasen ermittelt werden, aber daneben sind noch weitere Enzyme wie Kinasen, Synthasen und Oxidasen im Citratzyklus und Atmungskette involviert.

4.6.2. Wasserlösliche Maillardreaktionsprodukte

Die Auswirkungen wasserlöslicher MRPs auf den intrazellulären ATP-Gehalt wurden nach einer Inkubationszeit von 90 min an Caco-2- und LS180-Zellen untersucht. Von den hergestellten wasserlöslichen MRPs wurden Glucose-Prolin, Glucose-Serin und Glucose-Asparagin getestet. Zusätzlich wurden die Zellen mit Glucose und für 2 h erhitzte Glucose (Karamellisation) inkubiert (Abb52.).

Glucose vermochte weder bei Caco-2- noch bei LS180-Zellen die intrazelluläre ATP-Konzentration zu steigern. Der Glucose-Anteil von 4,5 g/L im HBSS-Puffer während des Tests scheint den Energiebedarf der Zellen ausreichend zu decken. Eine Steigerung der ATP-Level durch eine Erhöhung der Glucosemenge auf 5,5 g/L konnte nicht beobachtet werden.

Ebenso führten die wasserlöslichen MRPs und erhitzte Glucose im Zeitraum von 90 min zu keinen Veränderungen der intrazellulären ATP-Spiegel. Von einem Einfluss auf die ATP-Gewinnung oder einem ATP-Verbrauch kann daher nicht ausgegangen werden. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass nach längerer Inkubationszeit Veränderungen in der ATP-Menge detektierbar wären.

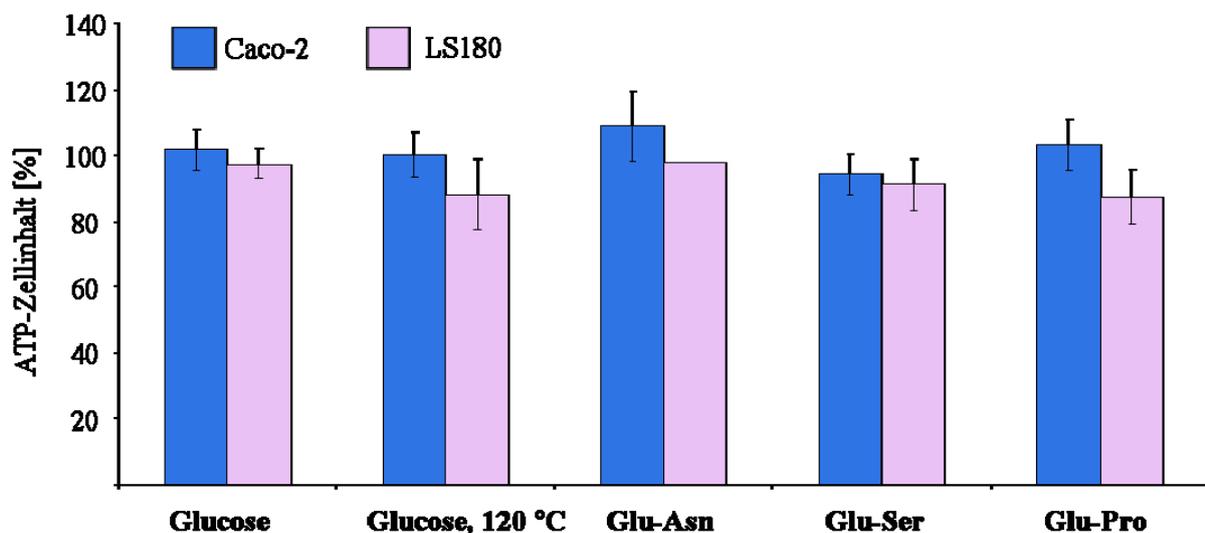


Abbildung 52: Bestimmung des intrazellulären ATP-Gehalts [%] von Caco-2- und LS180-Zellen. Die Zellen wurden 7 d (LS180) bzw. 21 d (Caco-2) kultiviert und für 90 min entweder mit 1 mg/ml Glucose, erhitzte Glucose oder mit den wasserlöslichen MRPs Glc-Asn, Glc-Ser oder Glc-Pro versetzt. Nach Lyse der Zellen und Zugabe von Luciferin/Luciferase wurde der ATP-Zellinhalt mittels Lumineszenz bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte [%] \pm SD aus 5 Versuchen mit $n=4$.

4.7. Zellzyklusanalyse von Caco-2- und LS180-Zellen

Eukaryotische Zellen durchlaufen während ihrer Proliferation eine zyklische Abfolge von Stadien, die streng reguliert und kontrolliert werden und an dessen Ende die Zellteilung steht. Die Gesamtheit der Vorgänge bezeichnet man als Zellzyklus und gliedert sich in Mitose (Kernteilung) und Interphase (Zwischenphase). Die Interphase wiederum teilt sich in G_1 -, S- und G_2 -Phase auf (Abb.53).

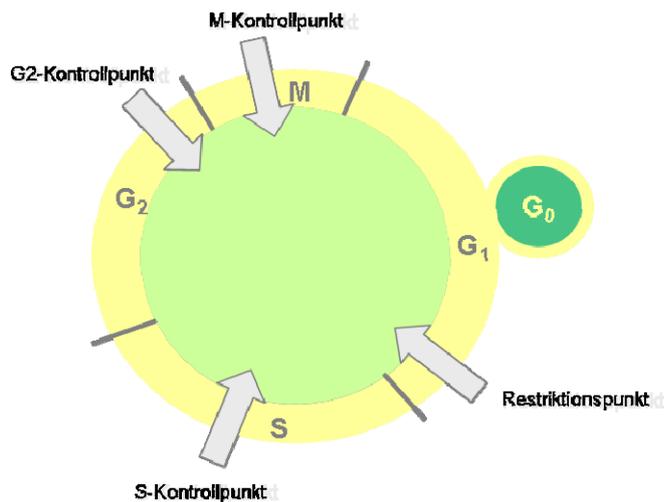


Abbildung 53: Ablauf des Zellzyklus

Die G_1 -Phase ist die Zeit des Zellwachstums nach der Mitose, in der die Protein- und RNA-Synthese in vollem Gang ist. Bei Tumorzellen in Kultur dauert sie um die 8 h. In der sich anschließenden S-Phase wird die DNA repliziert und Histone produziert. Die G_2 -Phase, die 3-4 h dauert, bereitet die Mitose vor. Es kommt zur Kondensierung der Chromosomen und zur Entwicklung des Spindelapparats. Ausgereifte, ausdifferenzierte, nicht mehr teilungsfähige Zellen verbleiben in der G_1 -Phase, die dann als G_0 -Phase bezeichnet wird. Alle Stadien des Zellzyklus werden durch zahlreiche Faktoren fördernd oder hemmend reguliert. Zu den äußeren Faktoren zählen unter anderem die Zellgröße, das Nährstoffangebot, die Anzahl von Nachbarzellen und Wachstumsfaktoren. Dauer und Abfolge der Phasen werden an Kontrollpunkten überwacht. Spezielle Zellzyklusproteine, die so genannten Cycline, werden zu bestimmten Zeitpunkten verstärkt exprimiert, wobei das Konzentrationsmaximum den Kontrollpunkt darstellt. An solchen Kontrollpunkten besteht die Möglichkeit einer Unterbrechung (Arretierung) des Zellzyklus oder auch des Eintritts in die Apoptose.

Caco-2-Zellen differenzieren sich spontan nach Erreichen der Konfluenz. Phänotypisch weisen differenzierte Caco-2-Zellen Microvillien sowie Zottenstrukturen auf und exprimieren typische Enzyme und Proteine des Bürstensaums wie das P-Glykoprotein. LS180-Zellen wiederum differenzieren sich erst nach Zugabe eines Differenzierungsagens. Eine P-Glyko-

protein-Expression findet erst nach Stimulation des VDR oder PXR statt. Die P-Glykoprotein-Expression kann also mit einem Fortschreiten der Differenzierung einhergehen.

Als gegenteiliges Beispiel ist die Überexpression des P-Glykoproteins bei Tumorzellen zu nennen. Bei Tumorzellen kommt es in der Regel im Laufe mehrerer Teilungszyklen zur Entdifferenzierung, welche mit einer Funktionsverminderung oder einem Funktionsverlust der Zelle einhergehen kann. Parallel werden Effluxtransporter, darunter das P-gp, als Schutzmechanismus verstärkt exprimiert und können zum Phänomen der *Multidrug Resistance* führen.

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie sollte der Effekt der SCFAs und ausgewählter wasserlöslicher Maillardreaktionsprodukte auf den Zellzyklus von Caco-2- und LS180-Zellen untersucht werden. Dazu wurden die Zellen für 48 h mit den Testsubstanzen inkubiert. Veränderungen des Zellanteils der G₁-Phase waren dabei von besonderem Interesse, da ein G₁-Phase Arrest häufig mit Differenzierung assoziiert wird (Ding et al. 1998). Ein G₁-Phase-Arrest könnte daher ein Indiz für eine Induktion der P-gp-Expression sein.

4.7.1. Zellzyklus von Caco-2- und LS180-Zellen

Zur Bewertung der Effekte der Testsubstanzen auf den Zellzyklus von Caco-2- und LS180-Zellen wurde der Zellanteil der jeweiligen Zellzyklusphasen beider Zelllinien ohne Testsubstanz bestimmt. Die Ergebnisse dienen als Vergleichskontrolle.

Unterschiede in der Zellhäufigkeit ließen sich in der G₂- und S-Phase zwischen beiden Zelltypen finden (Abb.54). Bei Caco-2- und LS180-Zellen befindet sich der größte Zellanteil in der G₁-Phase. Im Gegensatz zu LS180-Zellen weisen Caco-2-Zellen eine längere S-Phase auf. Dafür ist bei LS180-Zellen ein höherer Zellanteil in der G₂-Phase zu finden.

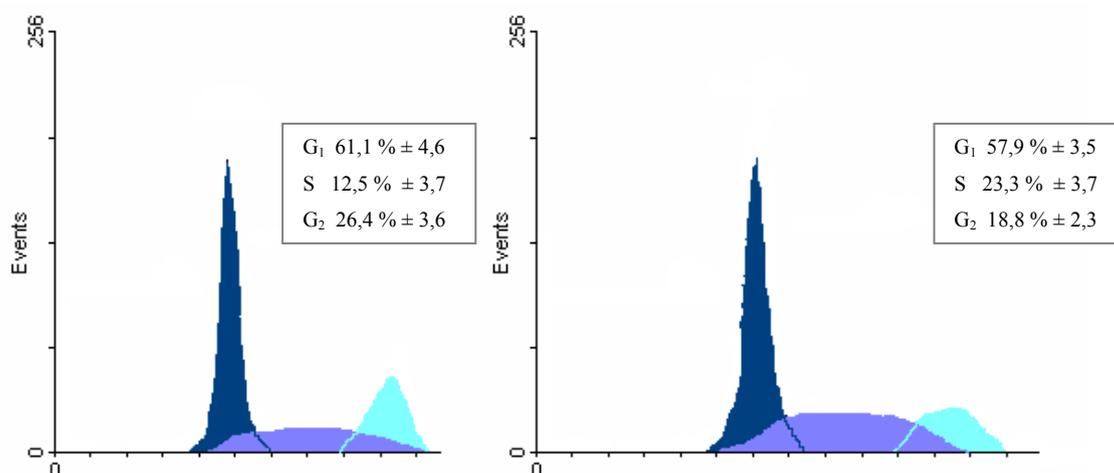


Abbildung 54: Histogramm von LS180-Zellen (linke Abb.) und Caco-2-Zellen (rechte Abb.). Die Zellen wurden 72 h nach der Einsaat trypsiniert und nach Anfärbung mit Propidiumiodid mit dem Durchflusszytometer untersucht.

4.7.2. Einfluss kurzkettiger Fettsäuren auf den Zellzyklus von Caco-2- und LS180-Zellen

Buttersäure ist bisher die am besten untersuchte kurzkettige Fettsäure. Das Salz der C₄-Fettsäure ist in Prozesse wie Proliferation, Differenzierung und Apoptose involviert. In seiner Rolle als Histon-Deacetylase-Inhibitor induziert Butyrat einen G₁-Phase Arrest (Archer et al., 1998; Siavoshian et al., 2000; Chai et al., 2000; Hinnebusch et al., 2002). Unter Verwendung der Durchflusszytometrie wurde der Einfluss der übrigen kurzkettigen Fettsäuren mit einer Kettenlänge von C₂ bis C₆ sowie Formiat auf den Zellzyklus der Kolonkarzinomzelllinien Caco-2 und LS180 bestimmt. Die eingesetzten Konzentrationen entsprachen den Testkonzentrationen aus dem RH123-Akkumulationstest.

Die 48 h-Inkubation mit Formiat, Acetat und Propionat (c = 50 mM) führte bei Caco-2-Zellen zu einer Häufung von Zellen in der G₂-Phase. Im Vergleich zur Kontrolle betrug die Steigerung ca. 30 %, bei Formiat erhöhte sich der Zellanteil der G₂-Phase sogar um 49 %. Bei LS180-Zellen war der G₂-Phase Arrest bei Formiat zwar vorhanden, aber gegenüber Caco-2-Zellen reduziert. LS180-Zellen befanden sich bereits ohne Formiat-Zugabe zu einem größeren Anteil in der G₂-Phase als Caco-2-Zellen, so dass vermutlich der Effekt durch Formiat geringer ausfiel. Bei Propionat war der G₂-Phase-Arrest mit 43 % Zellhäufigkeit im Gegensatz zu 26,7 % der Kontrolle bei LS180-Zellen deutlicher ausgeprägt. Die Erhöhung betrug 74 %. Befinden sich mehr Zellen in der G₂-Phase und damit in der Teilungsphase so kann dies auf eine Stimulation der Proliferation oder auf eine Schädigung der Zellen hindeuten.

Acetat blockierte interessanterweise bei LS180-Zellen den Übergang von der G₁- zur S-Phase und fügt sich damit in eine Reihe mit Butyrat, Valeriat, Isovaleriat und Capronat ein. Ein G₁-Phase-Arrest kann mit Differenzierung (Ding et al., 1998) oder mit einem Eingriff in die Signalkaskade sein. Geschädigte Zellen verbleiben zur DNA-Reparatur oder zur Apoptoseeinleitung ebenfalls in der G₁-Phase. Bei mikroskopischer Betrachtung der LS180-Zellen konnte bei Acetat im Gegensatz zu Butyrat, Valeriat, Isovaleriat und Capronat keine Anzeichen von Differenzierung festgestellt werden. Die eingesetzte Konzentration von 50 mM lag unter dem IC₅₀-Wert von 80 mM für Na-Acetat bei LS180-Zellen. Trotzdem könnten Zellen durch die Anwesenheit von Acetat geschädigt werden mit dem Unterschied, dass sie während des G₁-Blocks repariert werden und nicht absterben.

Butyrat (4 mM) und Valeriat (6 mM) bewirkten einen G₁-Arrest bei Caco-2- und LS180-Zellen. Die Abnahme des Zellanteils in der S-Phase ist damit zu erklären, dass durch den G₁-Arrest die Zellen nicht in die S-Phase überwechseln konnten. Eine Verzweigung der Valeriansäure in Form des Isovaleriat (6 mM) führte zur Abschwächung des Effekts. Die

verzweigte Form der Buttersäure (6 mM) übte keinen Einfluss auf den Zellzyklus von Caco-2- und LS180-Zellen aus.

Na-Propionat wies unterschiedliche Effekte bei den einzelnen Zelllinien auf. Bei Caco-2-Zellen resultierte nach 48 h-Inkubation wie bei Butyrat, Valeriat und Isovaleriat ein G₁-Phase-Arrest mit Reduktion des S-Phase Anteils. Zusätzlich war wie bei Formiat und Acetat ein leichter G₂-Phase-Arrest zu beobachten. Propionat scheint eine Mittelstellung einzunehmen. Bei LS180-Zellen befanden sich 46 % der Zellen in der G₂-Phase, während der Zellanteil in G₁- und S-Phase deutlich minimiert war. Na-Propionat zeigte im MTT-Test bis zu einer Konzentration von 100 mM keine zytotoxischen Effekte bei beiden Zelllinien. Unter dem Lichtmikroskop konnte sowohl bei Caco-2- als auch bei LS180-Zellen Anzeichen einer Differenzierung beobachtet werden.

Das Natriumsalz der C₅-Fettsäure Capronsäure bewirkt lediglich bei der LS180-Zelllinie einen G₁-Arrest mit Halbierung des S-Phase Anteils.

Zusammenfassung

Die getesteten Fettsäuren unterscheiden sich lediglich um ein C-Atom. Trotz alledem wiesen die Salze der SCFAs unterschiedliche Effekte auf den Zellzyklus von Caco-2- und LS180-Zellen aus. Eine Verallgemeinerung in Abhängigkeit der Kettenlänge kann nicht formuliert werden. Besonders Augenmerk galt den Veränderungen des Zellzyklusanteils der Phase G₁. Einen Arrest in der G₁-Phase riefen Propionat, Butyrat, Valeriat und Isovaleriat bei Caco-2-Zellen hervor, wobei Butyrat den stärksten Effekt aufwies. Bei LS180-Zellen hingegen führten Acetat, Butyrat, Valeriat, Isovaleriat und Capronat zu einem G₁-Phase Arrest.

G₁-Phase Arrest kann neben einer verstärkten Differenzierung, einem Eingriff in die Signalkaskade auch durch eine DNA-Schädigung ausgelöst werden. Zytotoxische Untersuchungen wurden im Vorfeld mit dem MTT-Test durchgeführt. Dieser Test detektiert jedoch keine DNA-Schädigungen, sondern misst lediglich die Funktionalität mitochondrialer Reduktasen. Daher wäre die Überprüfung des genotoxischen Potentials der SCFAs mittels eines Standardtests wie dem Mikrokerntest sinnvoll. Eine Häufung von Zellen in der G₁-Phase kann manchmal nicht aufgrund eines Arrests, sondern auch auf eine Synchronisation zurückzuführen sein. Wird ein G₂-Phase Arrest nach erfolgter Reparatur der DNA aufgelöst, so können mehrere Zellen gleichzeitig in die G₁-Phase wechseln. Um diesen Fall auszuschließen müssten zeitabhängige Zellzyklusuntersuchungen durchgeführt werden. Die Abbildungen fassen die Ergebnisse der Zellzyklusuntersuchungen zusammen.

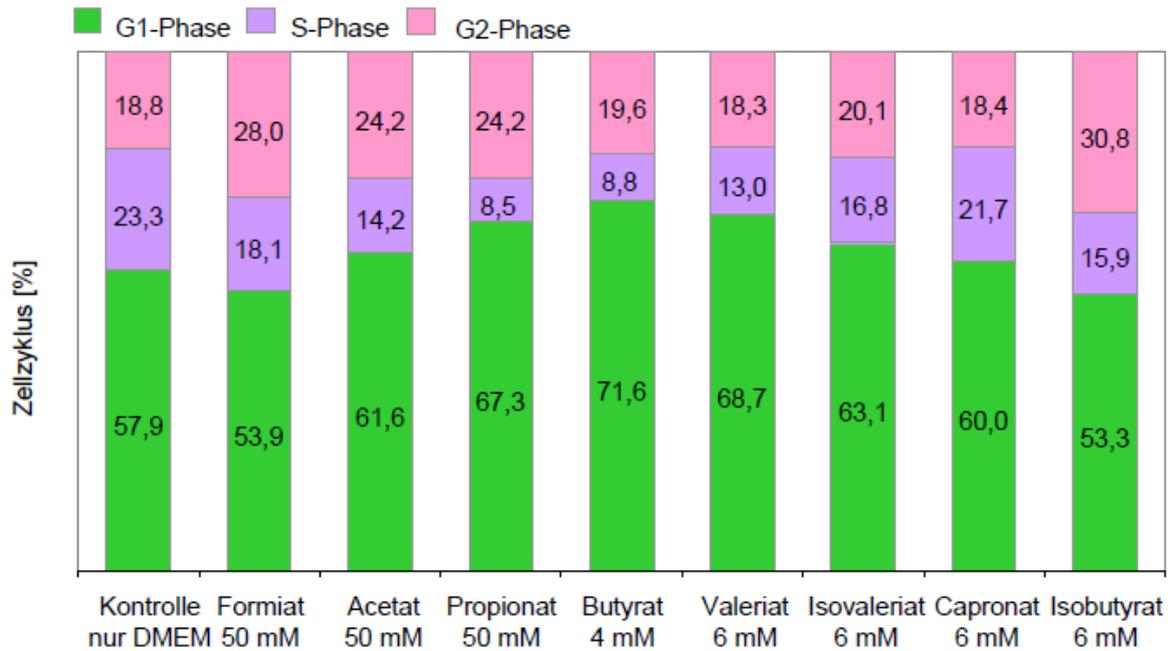


Abbildung 55: Zellzyklusverteilung [%] der Caco-2-Zellen in Abhängigkeit von den Salzen kurzkettiger Fettsäuren. Ein Tag nach Einsaat wurden Caco-2-Zellen für 48 h mit den Salzen kurzkettiger Fettsäuren inkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 6 Versuchen.

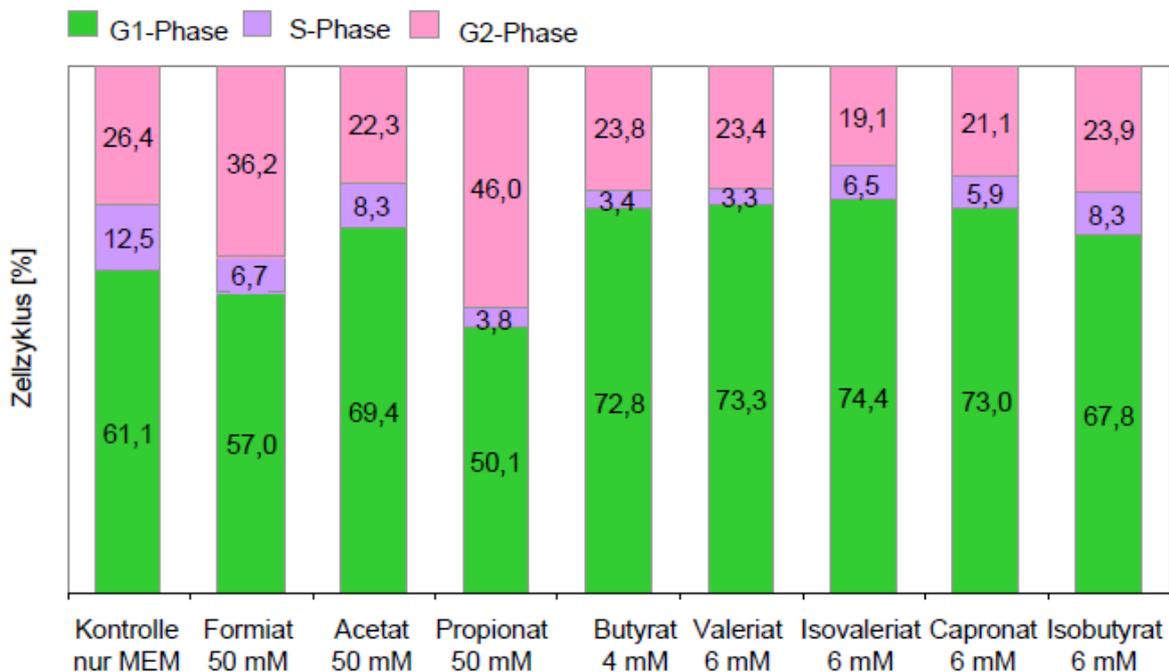


Abbildung 56: Zellzyklusverteilung [%] der LS180-Zellen in Abhängigkeit von den Salzen kurzkettiger Fettsäuren. Ein Tag nach Einsaat wurden LS180-Zellen für 48 h mit den Salzen kurzkettiger Fettsäuren inkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 6 Versuchen.

4.7.3. Einfluss wasserlöslicher Maillard-Reaktionsprodukte auf den Zellzyklus von Caco-2 und LS180 Zellen

Die wasserlöslichen Maillard-Reaktionsprodukte aus Glucose und Prolin zeigten an LS180-Zellen einen deutlichen Einfluss auf die RH 123-Akkumulation. Die Minderung des RH 123-Zellinhalts auf 65 % ergab sich erst nach 48 h-Inkubation und konnte nur an LS180-Zellen beobachtet werden. Daraufhin wurde eine Induktion der P-gp-Expression über PXR vermutet. Eine mikroskopische Betrachtung der Zellen nach Einwirkung von Glc-Pro zeigte wie bei allen anderen MRPs keine Veränderung des morphologischen Bildes. Somit lag die Vermutung nahe, dass MRPs keine Differenzierungsagenzien darstellen. Unter Verwendung der Durchflusszytometrie wurde nach der selben Methode wie bei SCFAs der Einfluss von wasserlöslichen MRPs aus Glc-Pro, Glc-Asn und bei 125 °C erhitztes Prolin auf den Zellzyklus von Caco-2- und LS180-Zellen untersucht. Glc-Asn diente hierbei als Vergleich. Im Gegensatz zu Glc-Pro nahm Glc-Asn nach 48 h-Inkubation keinen Einfluss auf die RH 123-Akkumulation.

Alle drei Substanzproben zeigten weder bei Caco-2-, noch bei LS180-Zellen einen Einfluss auf den Zellzyklus (Abb.57/58). Somit konnte gezeigt werden, dass weder Glc-Pro noch Glc-Asn und erhitztes Prolin die Differenzierung der Zellen fördern.

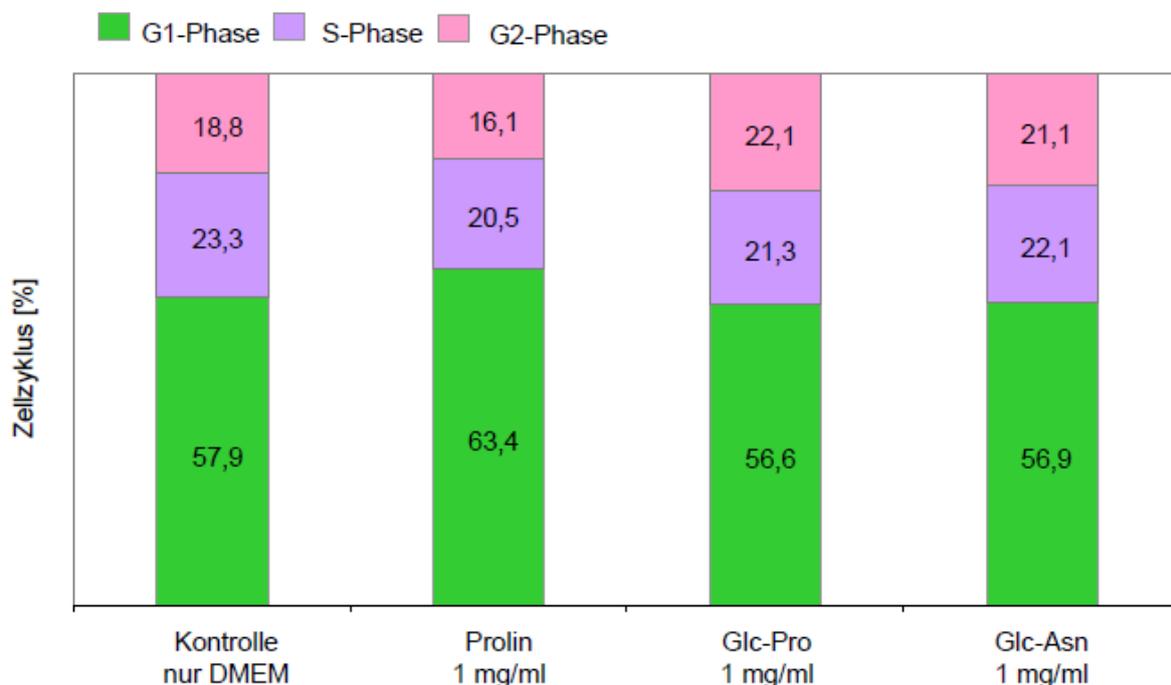


Abbildung 57: Zellzyklusverteilung [%] der Caco-2-Zellen in Abhängigkeit von Prolin und den wasserlöslichen MRPs aus Glucose-Prolin und Glucose-Asparagin. Ein Tag nach Einsaat wurden Caco-2-Zellen für 48 h mit diesen Testsubstanzen inkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 6 Versuchen.

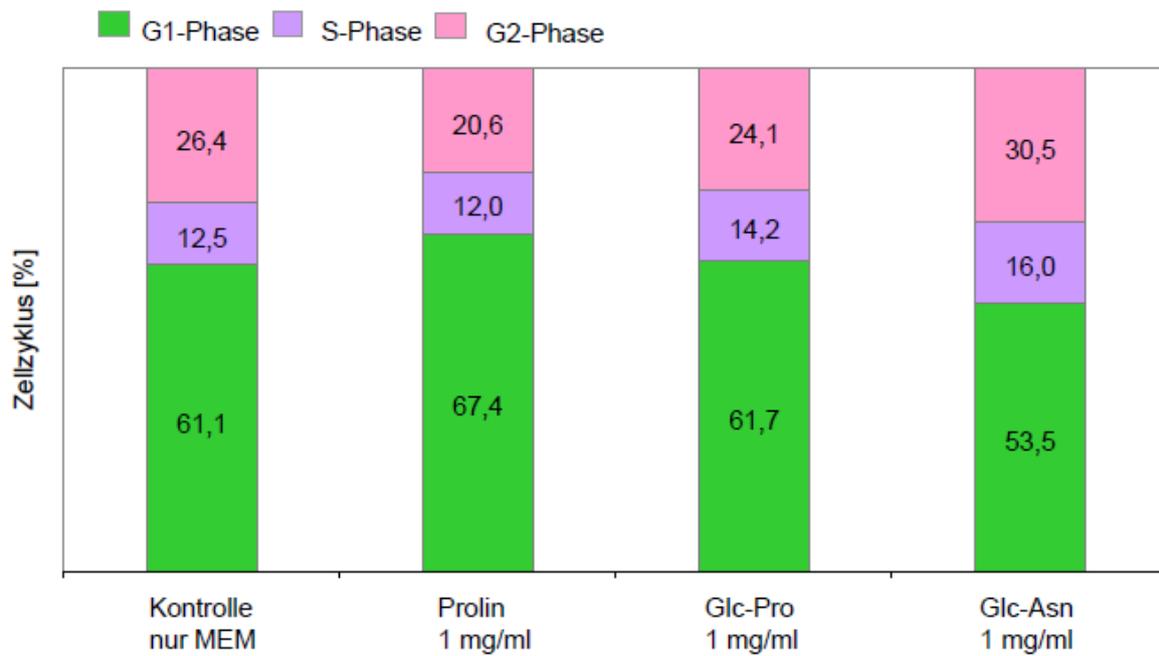


Abbildung 58: Zellzyklusverteilung [%] der LS180-Zellen in Abhängigkeit von Prolin und den wasserlöslichen MRPs aus Glucose-Prolin und Glucose-Asparagin. Ein Tag nach Einsaat wurden LS180-Zellen für 48 h mit diesen Testsubstanzen inkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 6 Versuchen.

4.8. Analyse der P-Glykoprotein-Expression mittels Immunblot

Um genauere Aussagen treffen zu können, ob Testsubstanzen fähig sind die Proteinexpression des P-Glykoproteins anzuregen, wurde der P-gp-Proteingehalt von Zell-Lysaten mittels Western Blot bestimmt. Die Detektion der Proteinbanden erfolgte durch Chemilumineszenz. Bei der Umsetzung von Luminol durch das ans Sekundärantikörper gekoppelte Enzym Meerrettichperoxidase entsteht Licht, das wiederum ein Film belichtet. Die Lichtintensität und damit die Stärke der Bandenfärbung korreliert direkt mit dem Proteingehalt der Proben. Durch Verwendung von Caco-2- und LS180-Zellen konnten Rückschlüsse gezogen werden, ob die Induktion des P-gp über VDR oder PXR verläuft.

Bei beiden Zelllinien konnte P-gp als Proteinbande unter Verwendung des spezifischen Antikörpers *C219 anti P-gp* detektiert werden. Um Proteinbanden bei LS180-Zellen zu visualisieren, mussten die Filme im Vergleich zu Proteinproben der Caco-2-Zellen dreimal so lange belichtet werden. Ein direkter Vergleich der Proteinbanden beider Zelllinien zeigt deutliche Unterschiede in der Intensität (Abb.59). LS180-Zellen exprimieren P-gp demzufolge in deutlich geringerem Ausmaß als Caco-2-Zellen. Dabei korreliert der Proteingehalt nicht automatisch mit der Funktionalität des P-gp.

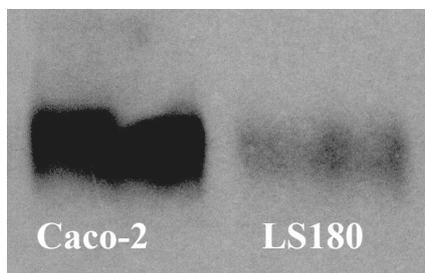


Abbildung 59: Western Blot, Vergleich der P-gp-Proteinmengen von Caco-2- und LS180-Zellen

4.8.1. Salze kurzkettiger Fettsäuren

Die Salze kurzkettiger Fettsäuren führten bei beiden Zelllinien zu den gleichen Ergebnissen. Formiat, Acetat und Capronat wiesen keine Unterschiede zu den Proteinproben unbehandelter Zellen auf (Abb. 60, 61, 63). Alle drei Substanzen vermögen die P-gp-Expression weder über VDR noch über PXR zu induzieren.

Propionat, Butyrat, Valeriat und Isovaleriat hingegen konnten die Proteinmenge an P-gp erhöhen, erkennbar an den dunkler gefärbten Banden (Abb.60, 61, 63). Da dieser Effekt sowohl bei Caco-2-Zellen als auch bei LS180-Zellen auftrat, kann von einer Induktion der P-gp-Expression über den Vitamin D Rezeptor (VDR) ausgegangen werden. Diese Schlussfolgerung deckt sich mit den Ergebnissen aus dem RH 123-Akkumulationstest.

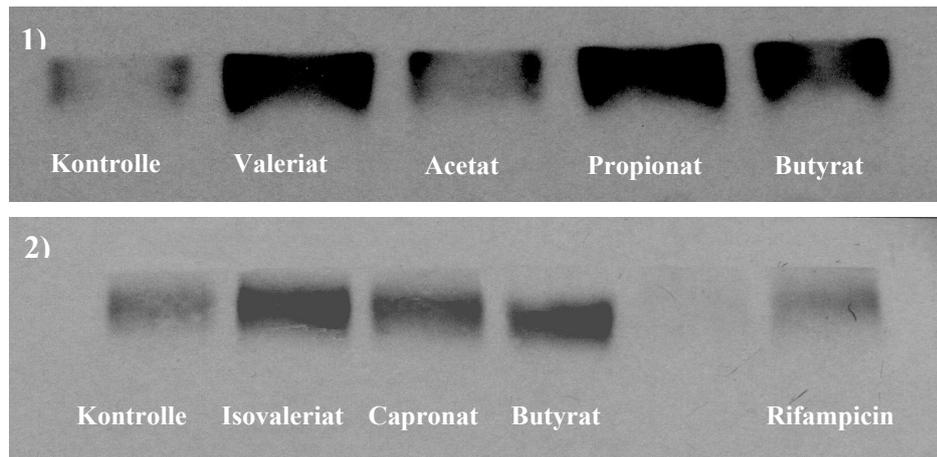


Abbildung 60: Western Blot mit Caco-2-Zelllysaten. Caco-2-Zellen wurden für 48 h mit den Testsubstanzen inkubiert. Die Testkonzentrationen für Acetat und Propionat betragen 50 mM, für Butyrat 4 mM, für Valeriat, Isovaleriat und Capronat 6 mM und für Rifampicin 10 μ M.

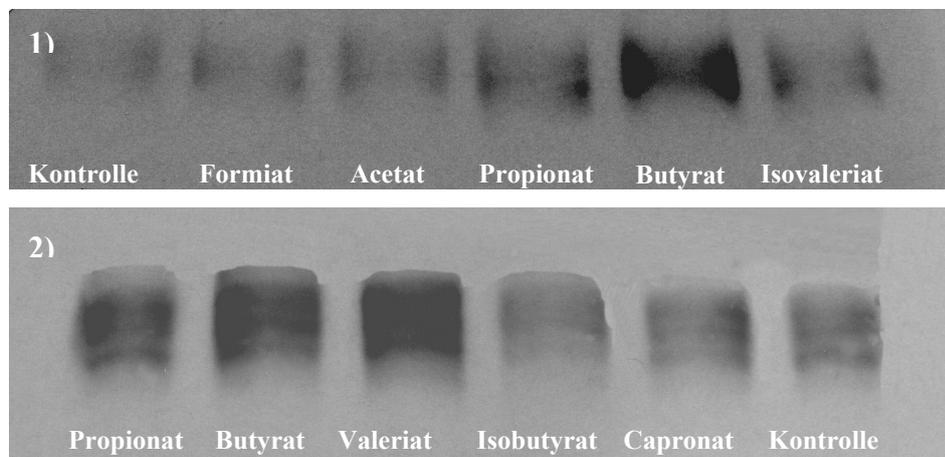


Abbildung 61: Western Blot mit LS180-Zelllysaten. LS180-Zellen wurden für 48 h mit den Testsubstanzen inkubiert. Die Testkonzentrationen für Formiat, Acetat und Propionat betragen 50 mM, für Butyrat 4 mM, für Valeriat, Isovaleriat und Capronat 6 mM.

4.8.2. Maillard-Reaktionsprodukte (MRPs)

Von den hergestellten MRPs wurden nur Glucose-Prolin (Glc-Pro), Lactose-Prolin (Lac-Pro), Glucose-Serin (Glc-Ser) und Glucose-Asparagin (Glc-Asn) als Testsubstanzen eingesetzt. Als Positivkontrolle für die P-gp-Expression wurde der PXR-Ligand Rifampicin verwendet. Während Rifampicin bei Caco-2-Zellen erwartungsgemäß zu keiner Veränderung der P-gp-Proteinmenge führte (Abb.60 + 63), konnte bei LS180-Zellen eine deutliche Erhöhung des P-gp-Proteingehalts detektiert werden (Abb.62). Glc-Asn und Glc-Ser zeigten keinen Einfluss auf den P-gp-Proteingehalt in LS180-Zellen (Abb.62). Lediglich die Maillard-Reaktionsprodukte, welche aus der Aminosäure Prolin als Edukt gebildet wurden, steigerten den Proteingehalt von P-gp in LS180-Zellen (Abb.62). Glc-Pro zeigte gegenüber Lac-Pro einen höheren Wirkeffekt. Wurden hingegen Caco-2-Zellen für 48 h mit Glc-Pro versetzt, so wurde der Proteingehalt nicht verändert (Abb.63). Der für LS180-Zellen spezifische Effekt von Glc-Pro lässt auf eine Induktion der P-gp-Expression über PXR schlussfolgern. Die

Vermutung einer Induktion der P-gp-Expression über PXR, die aufgrund der Ergebnisse aus dem RH 123-Akkumulationstest gezogen werden konnte, kann für die Maillard-Reaktionsprodukte Glc-Pro und Lac-Pro angenommen werden.

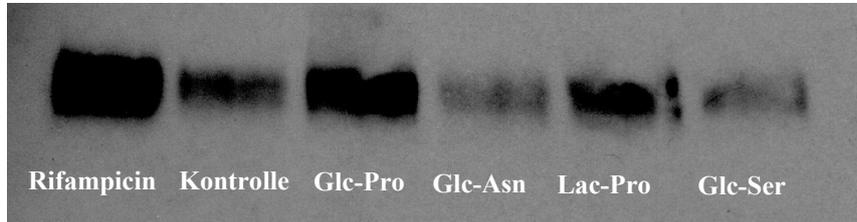


Abbildung 62: Western Blot mit LS180-Zelllysaten. LS180-Zellen wurden für 48 h mit den Testsubstanzen inkubiert. Die Testkonzentrationen für die wasserlöslichen MRPs betragen 1 mg/ml und für Rifampicin 10 μ M.

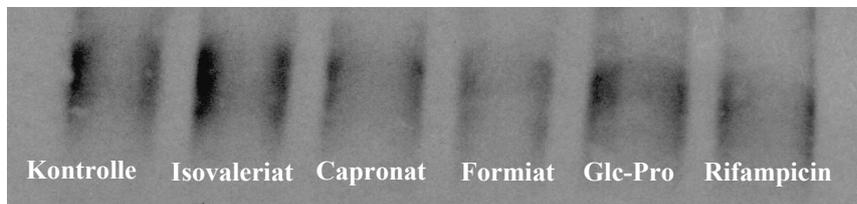


Abbildung 63: Western Blot mit Caco-2-Zelllysaten. Caco-2-Zellen wurden für 48 h mit den Testsubstanzen inkubiert. Die Testkonzentration für Formiat betrug 50 mM, Isovaleriat und Capronat 6 mM, für Glc-Pro 1 mg/ml und für Rifampicin 10 μ M.