

## 5. Zusammenfassung

### Maillard-Reaktionsprodukte

Maillard-Reaktionsprodukte sollten auf ihre Fähigkeit untersucht werden, P-Glykoprotein zu hemmen oder die P-gp-Expression zu steigern.

Die Maillard-Reaktionsprodukte wurden nach der Herstellungsvorschrift der COST-Action 919 im wasserfreien Milieu gewonnen. Von den 23 proteinogenen Aminosäuren wurden die L-Aminosäuren Arginin, Asparagin, Asparaginsäure, Glycin, Prolin, Serin und Tryptophan aufgrund unterschiedlicher funktioneller Gruppen für die Maillard-Reaktion ausgewählt. Asparagin wurde zudem ausgewählt, da bei hohen Temperaturen und geringem Wassergehalt als Maillard-Reaktionsprodukt Acrylamid entsteht. Acrylamid ist eingestuft als krebserzeugend, erbgutverändernd und fortpflanzungsgefährdend. Als reduzierende Zucker wurden die beiden Monosaccharide Glucose (Hexose) und Fructose (Pentose) und als Disaccharid Lactose eingesetzt. Je nach Art der Aminosäure und des verwendeten Zuckers sind Maillardproduktgemische entstanden, die sich im Geruch, im Bräunungsgrad und in ihrer Löslichkeit in Wasser und Ethanol deutlich voneinander unterscheiden.

Eine gaschromatographische Analyse der hergestellten Maillard-Reaktionsprodukte zeigte ein Vorhandensein von Essigsäure und Ameisensäure in einigen wasserlöslichen MRP-Proben auf. Ameisen- und Essigsäure entstehen im Zuge der Maillard-Reaktion in hoher Konzentration. Jedoch betrug der Gehalt an diesen Säuren in 1 mg/ml MRP-Proben weniger als 10 mM. Der Großteil der Säuren entwich bereits während der Herstellung. Ameisen- und Essigsäure zeigten in Zellkulturversuchen erst ab einer Konzentration von 10 mM Effekte. Effekte der MRPs bedingt durch das Vorhandensein der C<sub>1</sub>- und C<sub>2</sub>-Säuren sind daher nicht zu erwarten.

Das zytotoxische Potenzial der MRPs Glc-Asn, Glc-Pro und Glc-Ser wurde stellvertretend für die hergestellten MRPs mittels MTT-Test untersucht. Die wasserlöslichen und ethanollöslichen MRPs führten selbst bei hohen Konzentrationen von 1-2 mg/ml nicht zum Absterben von Caco-2- und LS180-Zellen und minderten die Zellviabilität verhältnismäßig schwach. Selbst die MRPs aus Glucose und Asparagin, die Acrylamid als MRP aufweisen, verringerten die Zellviabilität von Caco-2-Zellen nicht mehr als 20 %. Daher konnte als Testkonzentration 1 mg/ml gewählt werden, wobei diese im Verhältnis zur täglichen Nahrungsaufnahme von MRPs steht. Ebenso konnte keine Einflussnahme auf den Zellzyklus von Caco-2- und LS180-Zellen bestimmt werden. Nach mikroskopischer Beobachtung und Auswertung der Zellzyklusuntersuchungen ergaben sich keine Hinweise auf eine Stimulation der Zelldifferenzierung.

Caco-2-Monolayer verfügen bereits konstitutiv über den Effluxtransporter P-gp, während LS180-Zellen P-gp erst nach Induktion über den Vitamin D- oder den Pregnan X-Rezeptor exprimieren. Eine Steigerung der RH 123-Akkumulation bei Caco-2-Zellen, die auf eine Inhibition des P-gp-Effluxes schließen lassen würde, konnte bei wasserlöslichen- und ethanollöslichen MRPs nicht beobachtet werden. Die Testung am Transwell-Modell konnte ebenso keine Hinweise auf eine Inhibition des P-gp liefern. MRPs sind demzufolge unfähig P-gp zu inhibieren.

Stattdessen wurde eine Reduktion der RH 123-Akkumulation in Gegenwart wasserlöslicher MRPs bei beiden Zelllinien beobachtet. Die stärkste Absenkung der RH 123-Akkumulation um 20-30 % konnte mit wasserlöslichen MRPs erreicht werden, bei denen zur Herstellung Glucose verwendet wurde. Wurde hingegen Lactose verwendet, so sank die RH 123-Akkumulation lediglich auf Werte von 90 bis 82 %. MRP-Gemische enthalten nach Ablauf der Maillard-Reaktion noch Reste von Zuckern, die in Zellen über die Glykolyse zu ATP abgebaut werden können. Eine erhöhte Glucosebereitstellung als Energiequelle für den Effluxtransporter erwies sich aber nicht als Ursache für diese Beobachtung. Die RH 123-Akkumulation blieb in Gegenwart von 1 mg/ml Glucose unbeeinflusst. Darüber hinaus zeigten MRPs weder einen Einfluss auf intrazelluläre ATP-Spiegel noch auf die Aktivität mitochondrialer Dehydrogenasen, die in Prozesse zur ATP-Gewinnung involviert sind. Denkbar wäre eine Beeinflussung der P-gp-ATPase-Aktivität. Die P-gp-ATPase bedingt die Funktionalität des P-gp durch die Hydrolyse von ATP-Molekülen. Eine Hemmung dieses Enzyms würde den Efflux von P-gp-Substraten herabsetzen. Diese Möglichkeit müsste mit einem P-gp-ATPase-Assay geklärt werden. Die Herabsetzung der RH 123-Akkumulation fand nur in Gegenwart der MRPs statt. Wurden die wasserlöslichen MRPs nach einer Inkubation für 48 h für den RH 123-Akkumulation entfernt (Test I), trat dieser Effekt nicht auf. Dies könnte auf einen verminderten RH 123-Einstrom infolge einer Komplexierung des Fluoreszenzfarbstoffs durch MRPs hindeuten. Komplexierende Fähigkeiten werden vor allem den Melanoidinen zugesprochen. Eine intensive Bräunung bei MRP-Gemischen gibt Hinweise auf eine erhöhte Bildung von Melanoidinen. Maillard-Reaktionsprodukt-Gemische mit Lactose als Zuckerkomponente weisen eine deutliche hellere Braunfärbung als Gemische mit Glucose auf. Tatsächlich wurde mit MRP-Gemischen aus Lactose eine schwächere Absenkung der RH 123-Akkumulation ermittelt. Ethanollösliche MRP-Fractionen bestehen vor allem aus hochmolekularen Melanoidinen. Jedoch führten die ethanollöslichen MRPs nicht zu einer Verminderung des RH 123-Zellinhalts nach 90 min. Die Testkonzentration der ethanollöslichen MRPs betrug, bedingt durch deren schlechte Löslichkeit im Medium und

Puffer, nur ein Zehntel der Konzentration wasserlöslicher MRPs. Die Unterschiede in der Testkonzentration könnten eine Erklärung für den fehlenden bzw. nicht registrierbaren Effekt sein. Um Auswirkungen der MRPs auf den absorptiven und sekretorischen RH123-Transport zu bestimmen, wurden wasserlösliche MRPs in bidirektionalen Transportstudien getestet. Bei der Auswertung ergaben sich aber keine deutlichen Hinweise auf eine Komplexierung des Fluoreszenzfarbstoffs durch MRPs.

Des Weiteren stellte sich die Frage, ob Maillard-Reaktionsprodukte die P-gp-Expression induzieren bzw. steigern können. Dafür wurden Caco-2- und LS180-Zellen für 48 h mit wasserlöslichen oder ethanollöslichen MRPs inkubiert. Von allen getesteten MRPs riefen nur die wasserlöslichen MRPs Glc-Arg, Glc-Ser und Glc-Pro eine Senkung des RH 123-Zellinhalts hervor. Dieser Effekt trat am deutlichsten bei Glc-Pro und ausschließlich bei LS180-Zellen auf. Glc-Pro erreichte eine Absenkung des RH 123-Zellinhalts auf 65 %. Das wasserlösliche Maillard-Reaktionsprodukt-Gemisch aus Lactose und Prolin vermochte ebenfalls die RH 123-Akkumulation zu senken, führte aber nur zu einer Absenkung auf 78 %. Dies zeigt das die Aminosäurekomponente Prolin für die Wirkung entscheidend ist und die Zuckerkomponente lediglich das Ausmaß der Senkung bestimmt. Die ethanollöslichen Fraktionen dieser Aminosäure-Zucker-Gemische riefen keinen Effekt auf die RH 123-Akkumulation hervor. Sollte die Reduktion der RH 123-Akkumulation auf einen gesteigerten P-gp-Efflux zurückzuführen sein, so müsste dieser Effekt durch den P-gp-Inhibitor Elacridar aufgehoben werden können. Tatsächlich vermochte Elacridar den erniedrigten RH 123-Zellinhalt von 65 % infolge einer Inkubation mit Glc-Pro, auf 88 % zu steigern.

Die Ergebnisse aus dem RH 123-Akkumulationstest lassen vermuten, dass wasserlösliche MRPs ausgewählter Aminosäuren die P-gp-Expression über den Pregnan X-Rezeptor zu induzieren vermögen. Um diese Vermutung zu bestätigen wurde der P-gp-Proteingehalt von Zell-Lysaten mittels Western Blot bestimmt. Caco-2- und LS180-Zellen wurden im Vorfeld für 48 h mit den wasserlöslichen MRPs Glc-Asn, Glc-Ser, Glc-Pro und Lac-Pro inkubiert. Zusätzlich wurde der PXR-Ligand Rifampicin als Positivkontrolle eingesetzt. Nur Rifampicin und die Maillard-Reaktionsprodukte mit Prolin als Aminosäure-Komponente steigerten den P-gp-Proteingehalt in LS180-Zellen. Die P-gp-Proteinmenge in Caco-2-Zellen blieb unverändert. Glc-Asn und Glc-Ser zeigten weder bei Caco-2- noch bei LS180-Zellen einen Einfluss auf den P-gp-Proteingehalt. Die Senkung des RH 123-Zellinhalts im RH 123-Akkumulationstest durch Glc-Ser ist nicht auf eine Induktion der P-gp-Expression zurückzuführen. Die wasserlöslichen MRP-Gemische Glc-Pro und Lac-Pro steigerten

hingegen den P-gp-Proteingehalt. Somit kann von einer Induktion der P-gp-Expression bei LS180-Zellen ausgegangen werden.

Um genau zu prüfen, ob der erhöhte P-gp-Proteingehalt auf eine verstärkte Expression des MDR-1-Gens zurückzuführen ist, müsste der P-gp-mRNA-Gehalt in LS180-Zellen mittels RT-PCR untersucht werden. Sind sowohl die P-gp-mRNA-Gehalte als auch die P-gp-Proteinmengen erhöht, so spricht dies für eine verstärkte Expression des MDR-1-Gens. Ein unveränderter P-gp-mRNA-Gehalt bei gleichzeitig erhöhten P-gp-Proteinmengen hingegen würde auf eine Verbesserung der mRNA-Stabilität schließen lassen. Der Effekt von Glc-Pro deutet mehr auf eine verstärkte Expression hin, da der Effekt für die LS180-Zelllinie spezifisch ist. Die bei LS180-Zellen erhöhten P-gp-Proteinmengen müssen auf ein Mechanismus zurückzuführen sein, welcher lediglich bei diesem Zelllinientyp vorhanden ist. Ob dieser Effekt tatsächlich auf eine Beeinflussung des PXR beruht, müssen weiterführende Tests klären. Denkbar wäre eine Bestimmung des PXR-Gehalts in LS180-Zellen nach einer Inkubation mit Glc-Pro sowie PXR-Ligand-Bindungs-Studien. Darüber hinaus wäre es sinnvoll zu testen, ob Glc-Pro neben der P-gp-Expression auch die CYP3A4-Expression beeinflusst, da P-gp und CYP3A4 über PXR koreguliert werden.

Zusätzlich wäre es interessant, die Wirkkomponente bzw. die Wirkkomponenten unter den wasserlöslichen MRPs von Glc-Pro zu identifizieren. Zwar bestimmt das Gemisch in seiner Komplexität den Wirkeffekt, aber durch geeignete Herstellungsbedingungen könnte die Wirkkomponente im Gemisch angereichert werden.

Inwiefern dieser induktive Effekt *in vivo* eine Rolle spielt, müssen *in vivo*-Studien zeigen. Denkbar wäre eine Abschwächung des Effekts, da *in vivo* komplexere Verhältnisse als in *in vitro*-Studien herrschen und sich dieser Effekt mit denen von Modulatoren und Induktoren des P-gp überlagern könnte.

Zusammenfassend lässt sich formulieren, dass wasserlösliche MRPs aus Prolin nach einer Inkubation für 48 h den P-gp-Proteingehalt in LS180-Zellen erhöhen und zu einer deutlichen Verminderung der RH 123-Akkumulationen führen. Dieser Effekt beruht wahrscheinlich auf einer Einflussnahme der P-gp-Expression über den Pregnan X-Rezeptor. Eine Verstärkung der Barrierefunktion der Darmschleimhaut *in vivo* wäre somit denkbar. Eine Inhibition des P-Glykoproteins konnte bei allen hergestellten MRPs nicht ermittelt werden.

Bis zu diesem Zeitpunkt existierte kein Wissen darüber, ob Maillard-Reaktionsprodukte Transportsysteme beeinflussen können. Es waren lediglich Studien über veränderte Enzymaktivitäten infolge von Glykierungsreaktionen und Crosslinks vorhanden.

### Salze kurzkettiger Fettsäuren

Na-Butyrat ist ein bekannter Induktor der P-Glykoprotein-Expression. Inwiefern Formiat und die übrigen Natriumsalze kurzkettiger Fettsäuren: Acetat, Propionat, Isobutyrat, Valeriat, Isovaleriat und Capronat einen Einfluss auf die Aktivität von P-Glykoprotein (P-gp) nehmen, wurde als zweiter Themenbereich hinreichend untersucht.

Zur Ermittlung des P-gp-Einflusses sollten Formiat und die Salze kurzkettiger Fettsäuren im RH 123-Akkumulationstest als Testsubstanzen eingesetzt werden. Zuvor wurde das zytotoxische Potential von allen Salzen der SCFAs, inklusive Na-Formiat, bei Caco-2- und LS180-Zellen bestimmt, um eine geeignete Testkonzentration für den RH 123-Akkumulationstest zu bestimmen. Die Inkubation der Zellen mit den Salzen der SCFAs führte bei allen Testsubstanzen zu einer konzentrationsabhängigen Verminderung der Zellviabilität, die nach 48 h mittels MTT-Test ermittelt wurde. Hinsichtlich der Zelllinien ergaben sich Unterschiede. Während Formiat, Acetat und Propionat sich bei Konzentrationen  $\geq 150$  mM als zytotoxisch für Caco-2-Zellen erwiesen, wurden LS180-Zellen lediglich in ihrer Zellteilung beeinflusst. Ab Konzentrationen  $\geq 8$  mM führte Butyrat ebenfalls nur bei Caco-2-Zellen durch zytotoxische Effekte zum Absterben einzelner Zellen. Valeriat, Isovaleriat und Capronat reduzierten selbst bei 10 mM die Zellviabilitäten von Caco-2- und LS180-Zellen nur schwach. In Anbetracht der Ergebnisse des MTT-Tests wurden für Formiat, Acetat und Propionat eine Testkonzentration von 50 mM, für Butyrat von 4 mM und für die übrigen Testsubstanzen eine Testkonzentration von 6 mM festgelegt.

Im RH 123-Akkumulationstest erwiesen sich SCFAs der Kettenlänge von C<sub>3</sub> bis C<sub>5</sub> als fähig, die RH 123-Akkumulation in Caco-2- und LS180-Zellen nach 48 h-Inkubationszeit zu mindern, wobei die unverzweigte Kette mit 4 C-Atomen den stärksten Einfluss besaß. Vergleich man die Wirkstärken der SCFAs bei den verwendeten Zelllinien untereinander, so wurde deutlich, dass SCFAs bei Caco-2-Zellen stärker wirksam waren als bei LS180-Zellen. SCFAs liegen bei physiologischem pH ionisiert vor und sind aufgrund ihrer verminderten Lipophilie auf spezifische Transportmechanismen angewiesen, um in die Zellen zu gelangen. SCFAs werden überwiegend mit dem Monocarboxylat-Transporter MCT1 transportiert, welcher in undifferenzierten Zellen wie den LS180-Zellen nur schwach exprimiert vorliegt und die Aufnahme in die Zellen daher limitiert. Die verringerte intrazelluläre Konzentration an SCFAs bei LS180-Zellen könnte der Grund für den schwächeren Wirkeffekt sein.

Akkumulierte der Fluoreszenzfarbstoff im Beisein von Propionat oder Butyrat so wurde eine Steigerung des RH 123-Zellinhalts auf 120 % ermittelt. Da dieser Effekt nur bei Caco-2-Zellen auftrat, ergab sich als Vermutung eine schwache P-gp-Inhibition.

Kombinierte man die einzelnen Fettsäuren miteinander, so wurde bei beiden Zelllinien weder ein synergistischer noch ein additiver Effekt beobachtet. Stattdessen wurde die Akkumulation nach 48 h-Inkubation zum Teil sogar weniger stark reduziert (subadditiv), als bei den einzelnen SCFAs. 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. Die Salze kurzkettiger Fettsäuren besitzen alle eine unterschiedliche Affinität zum Influxtransporter MCT1. Durch Konkurrenz um freie Bindungsstellen könnte die intrazelluläre Konzentration einzelner SCFAs durchaus minimiert werden. Generell muss *in vivo* von einem abgeschwächten induktiven Effekt seitens Propionat, Butyrat, Valeriat und Isovaleriat durch das gleichzeitige Vorkommen von SCFAs ausgegangen werden.

Der absorptive und sekretorische RH 123-Transport wurde in Gegenwart der Fettsäuresalze in bidirektionalen Transportstudien am Transwell<sup>®</sup>-Modell untersucht. Keine der Testsubstanzen zeigte einen Einfluss auf die Resorption und die Sekretion von RH 123. Die Vermutung einer P-gp-Inhibition seitens Propionat und Butyrat konnte nicht bestätigt werden. Bis auf Propionat nahmen Salze kurzkettiger Fettsäuren keinen Einfluss auf die intrazellulären ATP-Gehalte in Caco-2- und LS180-Zellen. Propionat senkte in Abhängigkeit von der Konzentration den ATP-Gehalt beider Zelllinien. Wurden die Zellen für 90 min mit 50 mM Propionat inkubiert, so konnte eine Absenkung des intrazellulären ATP-Gehalts auf 70 % registriert werden. Propionat führte aber nicht über eine Freisetzung von ATP aus der Zelle zur Minderung des intrazellulären ATP-Gehalts. Darüber hinaus konnte kein Einfluss auf mitochondriale Dehydrogenasen, die in Prozesse zur ATP-Gewinnung involviert sind, gefunden werden. Daneben existieren noch Kinasen, Synthasen und Oxidasen, die im Citratzyklus und in der Atmungskette zur ATP-Gewinnung beitragen. Vielleicht nimmt Propionat über diese Enzymgruppen Einfluss auf die ATP-Gewinnung.

Es ist bekannt, dass Butyrat als Histon-Deacetylase-Inhibitor einen G<sub>1</sub>-Phase-Arrest auslöst und darüber Prozesse wie Proliferation, Differenzierung und Apoptose steuert. Im Zuge der Differenzierung bewirkt Butyrat eine verstärkte P-gp-Expression. Aufgrund dieses Wissens über Butyrat sollte der Einfluss der übrigen Fettsäuresalze auf den Zellzyklus von Caco-2- und LS180-Zellen mittels der Durchflusszytometrie ermittelt werden. Besonderes Augenmerk galt den Veränderungen des Zellanteils der G<sub>1</sub>-Phase. Die Fettsäuresalze führten teilweise zu unterschiedlichen Effekten auf den Zellzyklus von Caco-2- und LS180-Zellen. Einen Arrest in der G<sub>1</sub>-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 G<sub>1</sub>-Phase Arrest. Ein Einfluss auf den Zellzyklus in Abhängigkeit von der Kettenlänge der SCFAs konnte nicht beobachtet werden. Zusätzlich zur Zellzyklusuntersuchung wurde in Caco-2- und LS180-Zelllysaten der P-gp-Proteingehalt mit der Methode des Western Blots bestimmt. Nach einer Zellinkubation für 48 h mit Propionat, Butyrat, Valeriat oder Isovaleriat konnte eine Zunahme der P-gp-Proteinmenge in Caco-2- und LS180-Zellen gefunden werden. Da diese Zunahme bei beiden Zelllinien auftrat, kann eine Induktion der P-gp-Expression über den Vitamin D-Rezeptor angenommen werden.

Butyrat ist die bisher am besten untersuchte kurzkettige Fettsäure. Als Inhibitor der Histon-Deacetylase (HDAC) führt Butyrat zu einer Histon-Deacetylierung. Als Folge verändert sich die Chromatinstruktur der DNA, so dass die DNA letztendlich leichter für verschiedene Transkriptionsfaktoren zugänglich wird. Na-Butyrat ist in der Literatur bereits als Induktor für die P-Glykoprotein-Expression bekannt. Durch Histon-Deacetylierung kommt es zu einer gesteigerten Expression des Vitamin D-Rezeptors, der wiederum die P-gp-Expression aktiviert. Eine gemeinsame Inkubation von Na-Butyrat mit 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> bewirkte bei Caco-2-Zellen einen synergistischen Effekt bezüglich Differenzierung und P-Glykoprotein-Expression (Gaschott et al. 2001; Gaschott, Stein 2003). Propionat, Butyrat und Valeriat zählen ebenso zu den die Histon-Deacetylase-Inhibitoren (HDAC-Inhibitoren), Formiat, Acetat und Capronat hingegen nicht. Die Minimierung des RH 123-Zellinhalts und die Zunahme der P-gp-Proteinmengen nach 48 h-Inkubation mit Propionat, Butyrat, Valeriat und Isovaleriat können daher als Folge einer Induktion der P-Glykoprotein-Expression angesehen werden. Die Induktion der P-Glykoprotein-Expression wird hierbei nicht über den Pregnan X-Rezeptor vermittelt, da die Absenkung des RH 123-Zellinhalts nicht nur bei LS180- sondern auch bei Caco-2-Zellen zu beobachten war. SCFAs nutzen in Caco-2- und in LS180-Zellen den Induktionsweg über den Vitamin D-Rezeptor, welcher in beiden Zelllinien exprimiert wird.

Eine Inhibition des P-Glykoproteins durch Salze kurzkettiger Fettsäuren konnte nicht beobachtet werden.