

# Curcumin: Zelluläre Verteilung, Metabolismus und toxische Effekte

Zur Erlangung des akademischen Grades eines  
DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. nat.)

der Fakultät für Chemie und Biowissenschaften der  
Universität Karlsruhe (TH)

vorgelegte

DISSERTATION

von

Diplom-Lebensmittelchemikerin  
Julia Dempe  
aus Berlin

Dekan:

Referent:

Korreferent:

Tag der mündlichen Prüfung:

Prof. Dr. Stefan Bräse

Prof. Dr. Dr. Manfred Metzler

Priv.-Doz. Dr. Stefan O. Müller

22. April 2009



*Für meine Eltern und meinen Mann Sebastian*



# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>V</b>
<b>1 Einleitung und theoretische Grundlagen</b>	<b>1</b>
1.1 Curcuminoide . . . . .	1
1.1.1 Strukturen und Stabilität . . . . .	1
1.1.2 Vorkommen und Verwendung . . . . .	3
1.1.3 Metabolismus . . . . .	4
1.1.4 Pharmakokinetik und Verteilung . . . . .	6
1.1.5 Verbesserung der Bioverfügbarkeit . . . . .	9
1.1.6 Biologische Wirkung . . . . .	10
1.2 Caco-2 Zellen als Modell für die intestinale Barriere . . . . .	12
1.2.1 Caco-2 Zellen . . . . .	12
1.2.2 Die Übertragbarkeit des Caco-2 Systems auf die <i>in vivo</i> -Situation . . . . .	15
1.2.3 Sekretion von Lipoproteinen durch die Caco-2 Zellen . . . . .	17
<b>2 Problemstellung</b>	<b>19</b>
<b>3 Ergebnisse und Diskussion</b>	<b>21</b>
3.1 Stabilität und Metabolismus von Curcumin in den verwendeten Zelllinien . . . . .	22
3.2 Toxikologische Endpunkte . . . . .	24
3.2.1 CUR schränkt die Zellviabilität ein . . . . .	26
3.2.2 CUR hemmt das Wachstum von Ishikawa und V79 Zellen . . . . .	28
3.2.3 Einfluss der Curcuminoide auf die Zellzyklusverteilung . . . . .	29
3.2.4 Mikrokern-Test mit CUR . . . . .	38
3.2.5 MTP-Bindung von CUR . . . . .	45
3.2.6 Zusammenfassung der zellulären Wirkungen von CUR . . . . .	48
3.3 Akkumulation von CUR in humanen Zellen . . . . .	50
3.3.1 Aufnahme von CUR in die Zellen . . . . .	50
3.3.2 Aufnahme von Hexahydrocurcumin in die Zellen . . . . .	53
3.3.3 Akkumulation von CUR in den Membranen des ER . . . . .	56
3.4 Wirkungen von CUR im Verdauungstrakt . . . . .	59
3.4.1 Das Millicell <sup>®</sup> System . . . . .	59
3.4.2 Resorption von Coffein . . . . .	61
3.4.3 Stabilität und Metabolisierung der Curcuminoide im Millicell <sup>®</sup> System . . . . .	63
3.4.4 Bilanzierung der Curcuminoide . . . . .	65
3.4.5 Resorption von CUR . . . . .	67
3.4.6 Resorption von HHC . . . . .	70
3.4.7 Resorption von Bisdemethoxycurcumin . . . . .	73
3.4.8 Die Permeabilitätskoeffizienten der Curcuminoide . . . . .	73
3.4.9 Zusammenfassung der Aufnahme der Curcuminoide . . . . .	76
3.4.10 Untersuchungen zur Sekretion von Lipoproteinen durch Caco-2 Zellen . . . . .	78
3.4.11 Metabolismus durch intestinale Bakterien . . . . .	80

3.4.12	Metabolismus des Säugerylignans Matairesinol . . . . .	81
3.4.13	Metabolismus von CUR und HHC . . . . .	84
3.4.14	Zusammenfassung der intestinalen Metabolisierung . . . . .	90
<b>4</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>93</b>
<b>5</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>97</b>
5.1	Geräte und Hilfsmittel . . . . .	97
5.2	Verbrauchsmaterial . . . . .	99
5.3	Chemikalien . . . . .	100
5.3.1	HPLC/DAD . . . . .	102
5.3.2	HPLC/UV . . . . .	104
5.3.3	HPLC-UV/MS . . . . .	104
5.3.4	GC/FID . . . . .	106
5.4	Methoden in der Zellkultur . . . . .	106
5.5	Zellfraktionierung . . . . .	109
5.6	Zelldurchmesser- und Zellvolumenbestimmung . . . . .	110
5.7	Kolorimetrische <i>in vitro</i> -Cytotoxizitätstests . . . . .	112
5.7.1	MTT-Test . . . . .	112
5.7.2	SRB-Test . . . . .	114
5.8	Messung der Zellzyklusverteilung . . . . .	115
5.9	Immunologische Färbungen . . . . .	116
5.10	MTP-Präparation aus Pferdehirn . . . . .	119
5.11	Bestimmung der MTP-Konzentration . . . . .	121
5.12	Mikrotubuli-Polymerisation . . . . .	122
5.13	Das Millicell <sup>®</sup> System . . . . .	123
5.13.1	Kultivierung der Caco-2 Zellen im Millicell <sup>®</sup> System . . . . .	124
5.13.2	Qualitätskontrolle der Monolayer . . . . .	125
5.13.3	Qualitätskontrolle der Caco-2 Zellen . . . . .	127
5.13.4	Versuche zur Reduktion im Medium . . . . .	129
5.13.5	Sulfatierung . . . . .	130
5.13.6	Inkubationsversuche . . . . .	130
5.13.7	Berechnung des Permeabilitätskoeffizienten . . . . .	133
5.13.8	Inkubationsversuche mit gemischten Micellen . . . . .	134
5.13.9	Auftrennung der Lipoproteine durch Ultrazentrifugation . . . . .	135
5.14	Proteinbestimmung nach Bradford . . . . .	137
5.15	Metabolismus durch intestinale Bakterien . . . . .	138
5.15.1	Chemische Synthese von CUR-Metaboliten . . . . .	138
5.15.2	Benzylierung des 3,4-Dihydroxy-Benzaldehyds . . . . .	140
5.15.3	Säulenchromatographische Trennung der CUR-Derivate . . . . .	140
5.15.4	Katalytische Hydrierung . . . . .	141
5.15.5	Bakteriengewinnung aus Rattenfäzes . . . . .	141
5.15.6	Bakteriengewinnung aus humanem Fäzes . . . . .	141
5.15.7	Inkubationsbedingungen . . . . .	141
5.15.8	Stabilität von CUR bei anaerober Inkubation . . . . .	143

<b>6</b>	<b>Literatur</b>	<b>145</b>
<b>A</b>	<b>Anhang</b>	<b>161</b>
A.1	Externe Kalibrierungen . . . . .	161
A.2	IC <sub>50</sub> -Werte für die Curcuminoide . . . . .	162
A.3	Bindungsspektren von CUR und in Puffer . . . . .	162
A.4	Bindungsspektren von CUR mit verschiedenen Proteinen . . . . .	163
A.5	Bilanzierungsversuche . . . . .	164
A.6	Versuche zur Reduktion im Kulturmedium . . . . .	166
A.7	Basolaterale Inkubation von CUR und HHC . . . . .	167
A.8	P <sub>app</sub> -Werte von BDMC . . . . .	169
<b>B</b>	<b>Publikationen und Poster</b>	<b>170</b>
<b>C</b>	<b>Danksagung</b>	<b>173</b>





---

## Abkürzungsverzeichnis

AIP	Alkalische Phosphatase
BDMC	Bisdemethoxycurcumin
BSA	Bovine Serum Albumin
Col	Colchicin
Chol	Cholesterin
CM	Chylomikronen
COMT	Catechol- <i>O</i> -methyltransferase
CUR	Curcumin
CREST	Akronym aus <b>C</b> alcinosis cutis, <b>R</b> aynaud-Phänomen, <b>M</b> otilitätsstörung des <b>E</b> sophagus, <b>S</b> klerodaktylie und <b>T</b> eleangiektasien
CYP	Cytochrom P450
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DMC	Demethoxycurcumin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	Endoplasmatisches Retikulum
F12	Ham 's F-12 Nutrient Mixture
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FID	Flammenionisationsdetektor
FKS	Fetales Kälberserum
g	Erdbeschleunigung
GC	Gaschromatographie
GC/MS	Gaschromatographie/Massenspektrometrie
Gluc	Glucuronid
GSH	Glutathion
GST	Glutathion- <i>S</i> -transferase

h	Stunde
HBSS	Hank's Buffered Salt Solution
HDL	High Density Lipoprotein
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HPLC/MS	Gekoppelte Flüssigkeitschromatographie/Massenspektrometrie
HHC	Hexahydrocurcumin
HHBDMC	Hexahydrobisdemethoxycurcumin
iso-CUR	Isocurcumin
iso-HHC	Hexahydro-Isocurcumin
iso-OHC	Octahydro-Isocurcumin
IS	Interner Standard
Kap.	Kapitel
KBr	Kaliumbromid
LDL	Low Density Lipoprotein
LPC	Lyso-Phosphatidylcholin
LY	Lucifer Yellow
MAT	Matairesinol
mAU	milli Absorption Units (Milliabsorptionseinheiten)
MeOH	Methanol
MN	Mikrokerne (micronuclei)
MO	Mono-Olein
MTP	Mikrotubuliproteine
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
MW	Mittelwert
m/z	Masse-Ladungsverhältnis
NQO	4-Nitrochinolin-1-oxid
OA	Ölsäure
OHC	Octahydrocurcumin
OHBDMC	Octahydrobisdemethoxycurcumin
OT	Objektträger
$P_{app}$	apparent permeability coefficient, scheinbarer Permeabilitätskoeffizient

---

PA	Palmitinsäure
PAPS	3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat
PBS	Phosphate buffered saline, Phosphat-gepufferte Salzlösung
PC	Phosphatidylcholin
PET	Polyethylenterephthalat
P/S	Penicillin/Streptomycin
RFU	relative fluorescence unit, Relative Fluoreszenzeinheit
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
rpm	Umdrehungen/Minute (rotations per minute)
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
$S_f$	Svedberg-Konstante
SD	Standardabweichung
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
SULT	Sulfotransferase
SRB	Sulforhodamin B
SW	Spannweite
TC	Taurocholat
TEER	Transepithelialer elektrischer Widerstand (transepithelial electrical resistance)
THC	Tetrahydrocurcumin
TMBPA	3,5,3',5'-Tetramethylbisphenol A
TMSH	Trimethylsulfoniumhydroxide
$t_r$	Retentionszeit
U	Units (Enzymeinheiten)
uAU	ultra Absorption Units (Ultraabsorptionseinheiten)
UDP	Uridin-5'-diphosphat
UGT	Uridin-5'-diphosphoglucuronyltransferase
UV	Ultraviolett
UZ	Ultra-zentrifugation
VLDL	Very Low Density Lipoprotein



---

# 1 Einleitung und theoretische Grundlagen

Sekundäre Pflanzenstoffe gelten als Hoffnungsträger in der Vorbeugung und Medikation von kanzerösen und degenerativen Erkrankungen wie Morbus Alzheimer. Besonders den seit Jahrhunderten im asiatischen Raum verwendeten Inhaltsstoffen des Currypulvers wird viel Bedeutung beigemessen. Als vielversprechend gilt hierbei die farbgebende Substanzgruppe der Curcuminoide. In den folgenden Kapiteln sind Struktur, Metabolismus und ausgewählte Wirkungen der Muttersubstanz Curcumin (CUR) aufgeführt, die im Zusammenhang mit der vorliegenden Arbeit stehen.

## 1.1 Curcuminoide

### 1.1.1 Strukturen und Stabilität

Curcuminoide sind sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe, die in Rhizomen verschiedener *Curcuma*-Gewächse, wie z.B. *Curcuma longa* vorkommen und für zahlreiche positive Wirkungen verantwortlich gemacht werden. Diese Pflanzen bilden hauptsächlich CUR, in geringeren Mengen kann Demethoxycurcumin (DMC) und Bisdemethoxycurcumin (BDMC) nachgewiesen werden. Die Curcuminoide, chemisch als konjugierte Diarylheptanoide klassifiziert, unterscheiden sich lediglich in der Anzahl ihrer Methoxygruppen. Die Strukturformeln sind in Abbildung 1 dargestellt.

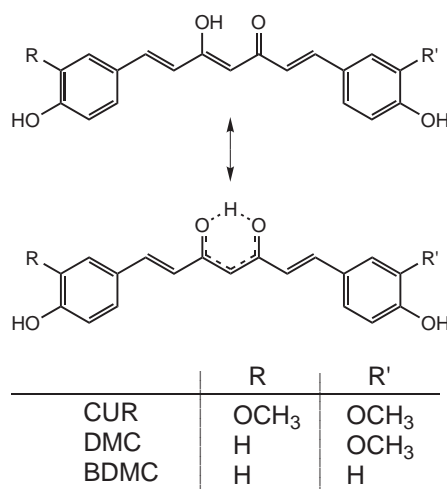


Abbildung 1: Chemische Struktur der Curcuminoide.

Die intensive Gelbfärbung der Curcuminoide wird zurückgeführt auf ihr konjugiertes Doppelbindungssystem, bei dem der aliphatische Molekülteil ein  $\beta$ -Diketo-Strukturelement enthält. Dadurch unterliegen die Curcuminoide einer Keto-Enol-Tautomerisierung, das heißt in gelöstem und festem Zustand liegen die Diketone ausschließlich in ihrer Enol-Form vor [Dietze et al., 1997; Matthes et al., 1980; Price und Buescher, 1997; Roughley und Whiting, 1973; Sharma et al., 2005; Tønnesen et al., 1982]. Die bevorzugte Enolisierung wird durch die Ausbildung von Resonanzstrukturen sowie intramolekulare Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert und durch diese energetisch begünstigt. Hierdurch wird ein pseudo-aromatischer Zustand ausgebildet [Cooper et al., 1994; Unterhalt, 1980].

Aufgrund seiner Keto-Enol-Struktur ist das CUR-Molekül in seiner Struktur instabil und zerfällt pH- und konzentrationsabhängig. Bei neutralen und basischen Bedingungen werden folgende Produkte aus dem CUR-Molekül gebildet: Ferulasäure, Feruloylmethan, Vanillin und Aceton [Tønnesen et al., 1986; Tønnesen und Karlsen, 1985a,b] (Abbildung 2). Neben diesen Produkten werden Kondensationsprodukte des Feruloylmethans gefunden [Tønnesen, 1992]. Der Zerfall von CUR im alkalischen Milieu ist sehr komplex und die Struktur aller Zerfallsprodukte ist nicht abschließend geklärt. In Anwesenheit von Proteinen wird der Zerfall im Phosphat-Puffer ( $\text{pH} > 7$ ) verringert [Wang et al., 1997].

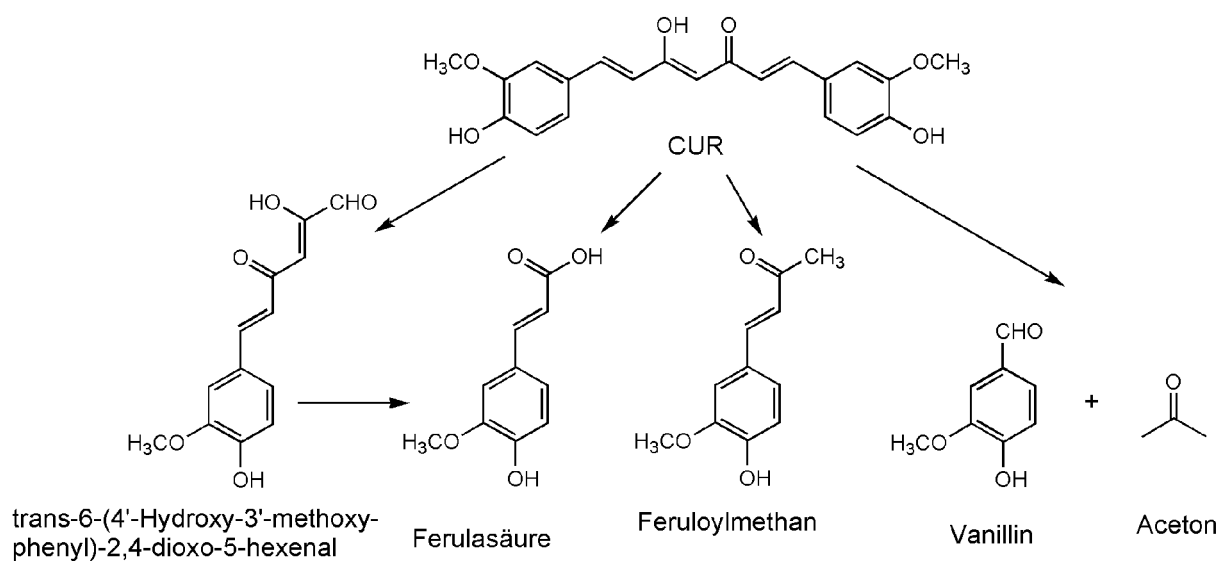


Abbildung 2: Zerfallsprodukte von CUR in wässriger Lösung ( $\text{pH} > 7$ ) [Tønnesen und Karlsen, 1985a; Wang et al., 1997].

CUR bindet an diverse Proteine wie Rinderserumalbumin (BSA) [Barik et al., 2003] und humanes Serumalbumin (HSA) [Pulla Reddy et al., 1999; Zsila et al., 2003a]. Eine vollständige Ablösung von diesen Proteinen durch Extraktion ist nicht möglich [Jaruga et al., 1998].

Zusätzlich zu den von Pflanzen gebildeten Curcuminoiden wurde das synthetische iso-CUR in dieser Arbeit verwendet, um strukturelle Unterschiede beim Metabolismus und toxikologischen Endpunkten zu untersuchen. Iso-CUR weist im Gegensatz zu CUR vertauschte Methoxy- und Hydroxygruppen auf (Abbildung 3).

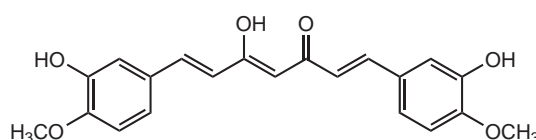


Abbildung 3: Chemische Struktur von iso-CUR.

### 1.1.2 Vorkommen und Verwendung

Aus den Rhizomen verschiedener *Curcuma*-Gewächse wurden bereits zahlreiche sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe isoliert, wobei das Hauptaugenmerk auf CUR liegt. Die Gattung *Curcuma* gehört zur Pflanzenfamilie der *Zingiberaceae* (Ingwergewächse). Viele Arten gehören dieser Pflanzenfamilie an, wie z. B. *Curcuma longa*, *Curcuma xanthorrhiza*, *Curcuma aromatica* und *Curcuma zedoaria* [Aggarwal et al., 2007; Lao et al., 2006]. Beheimatet sind sie in asiatischen Ländern wie Indien, Indonesien und China. Durchschnittlich sind in den Rhizomen etwa 2 - 5 % Curcuminoide enthalten, welche für die gelb-orange Farbe verantwortlich sind. Durch Extraktion aus den Rhizomen können die Farbpigmente gewonnen werden, dabei ist CUR der Hauptbestandteil des Extrakts mit ca. 50 - 60 %, DMC (20 - 30 %) und BDMC (7 - 20 %) sind Nebenbestandteile [Anand et al., 2007; Govindarajan, 1980]. Kommerziell vertriebenes Curcumin enthält ebenfalls DMC und BDMC als Minorbestandteile [Tønnesen, 1992]. Zur Anwendung kommt meistens das getrocknete und gemahlene Rhizom in Pulverform. Die intensive gelbe Farbe der Curcuminoide wird als Farbstoff in Kosmetika und Textilien eingesetzt [Scartezzini und Speroni, 2000]. CUR ist in Deutschland im Rahmen der Zusatzstoffzulassungsverordnung als Farbstoff für bestimmte Lebensmittel zu-

gelassen (E100). Durch ihren scharfen Geschmack werden Curcuminoide auch als Gewürz eingesetzt. So verleihen sie beispielsweise Currypulver und Speisesenf deren charakteristische Farbe und Geschmack [Unterhalt, 1980].

### 1.1.3 Metabolismus

#### Phase I-Metabolismus:

Die vier vorhandenen Doppelbindungen der Heptatrionkette im CUR-Molekül werden sukzessive durch ein endogenes Reduktasen-System reduziert (Abbildung 4). Tetrahydrocurcumin (THC) und Hexahydrocurcumin (HHC) stellen in den meisten Studien die wichtigsten Metabolite dar [Asai und Miyazawa, 2000; Holder et al., 1978; Ireson et al., 2001; Pan et al., 1999], während Dihydrocurcumin und Octahydrocurcumin (OHC, auch als Hexahydrocurcuminol bezeichnet) nur Nebenprodukte darstellen oder nicht gebildet werden. Die verantwortlichen Reduktasen sind im Cytosol von Leber- und Darmgewebe lokalisiert und schließen die Alkoholdehydrogenasen mit ein [Ireson et al., 2002].

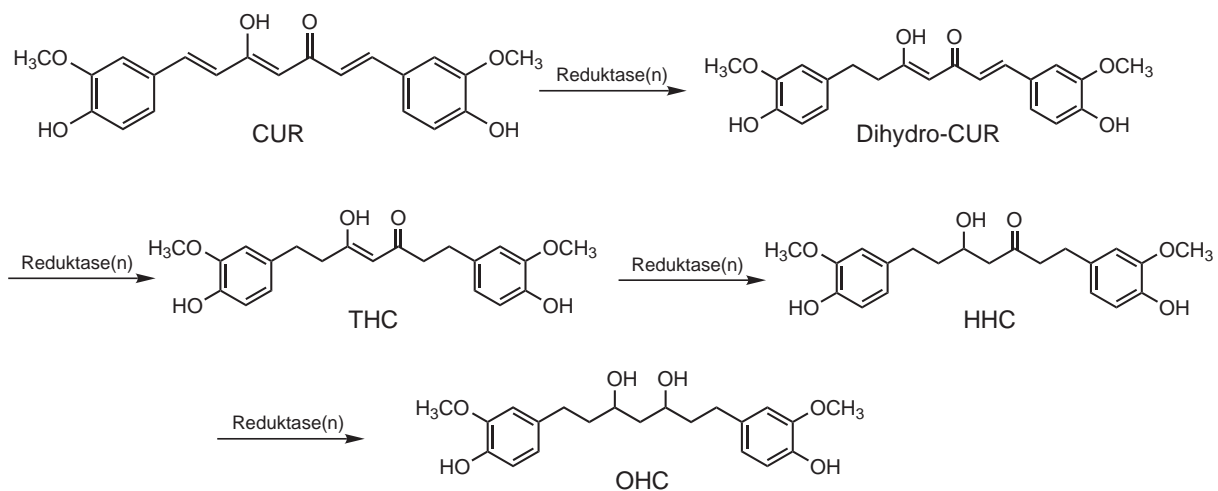


Abbildung 4: Reduktiver Phase I-Metabolismus von CUR [Asai und Miyazawa, 2000; Holder et al., 1978; Ireson et al., 2001; Pan et al., 1999].

#### Phase II-Metabolismus:

CUR kann verschiedentlich konjugiert werden. Durch die membrangebundenen Uridin-5'-diphosphoglucuronyltransferasen (UGT), welche auf der luminalen Seite des Endoplasmatischen Retikulums (ER) lokalisiert sind, kann CUR mit aktivierter UDP- $\alpha$ -Glucuronsäure als



Cosubstrat konjugiert werden. Hierbei entstehen zwei CUR-Glucuronide. Die Übertragung der Glucuronsäure auf das nukleophile Substrat ist dabei sowohl am aliphatischen als auch am phenolischen Molekülteil des CUR möglich. Bevorzugt wird das phenolische CUR-Glucuronid gebildet, das noch leichter als CUR selbst in wässriger Lösung zerfällt [Hoehle et al., 2007; Pfeiffer et al., 2007]. *In vivo* spielt die Glucuronidierung eine wichtige Rolle [Ireson et al., 2001, 2002; Okada et al., 2001; Ravindranath und Chandrasekhara, 1980; Sharma et al., 2001b, 2004]. Eine weitere Möglichkeit zur Konjugation stellt die Sulfatierung dar. Hierbei wird durch die im Cytosol lokalisierten Sulfotransferasen (SULT) aktiviertes Sulfat in Form von 3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat (PAPS) als Cosubstrat auf CUR übertragen. Die Sulfatierung am aromatischen Ring wird meistens beschrieben [Ireson et al., 2001, 2002; Marczylo et al., 2007; Okada et al., 2001; Ravindranath und Chandrasekhara, 1980; Sharma et al., 2001b, 2004]. Eine geringere Rolle spielt die Konjugation mit Glutathion (GSH). CUR interagiert mit GSH spontan bzw. in Anwesenheit der Glutathion-*S*-transferase (GST). Dabei wird eine Michael-Addition des nucleophilen GSH mit dem ungesättigten Chromophor des CUR angenommen [Mathews und Rao, 1991] und es werden zwei diastereoisomere GSH-Addukte des CUR gebildet. Die GSH-Adduktbildung wurde bisher lediglich in Zellkulturexperimenten oder mit Lebermitochondrien beobachtet [Iersel et al., 1996; Usta et al., 2007; van Iersel et al., 1997; Wortelboer et al., 2003]. In einer *in vivo*-Studie mit Ratten konnte keine signifikante Metabolisierung mit GSH detektiert werden [Piper et al., 1998]. Abbildung 5 zeigt die Strukturformeln der gebildeten CUR-Konjugate:

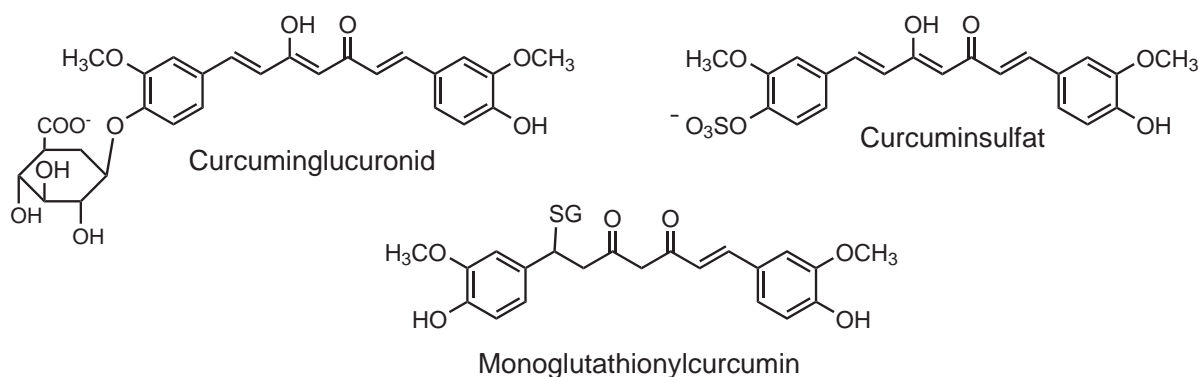


Abbildung 5: Phase II-Metabolite von CUR. SG: GSH-Addukt.

Abbildung 6 gibt einen Gesamtüberblick über die wichtigsten Phase I- und Phase II-Metabolismuswege:

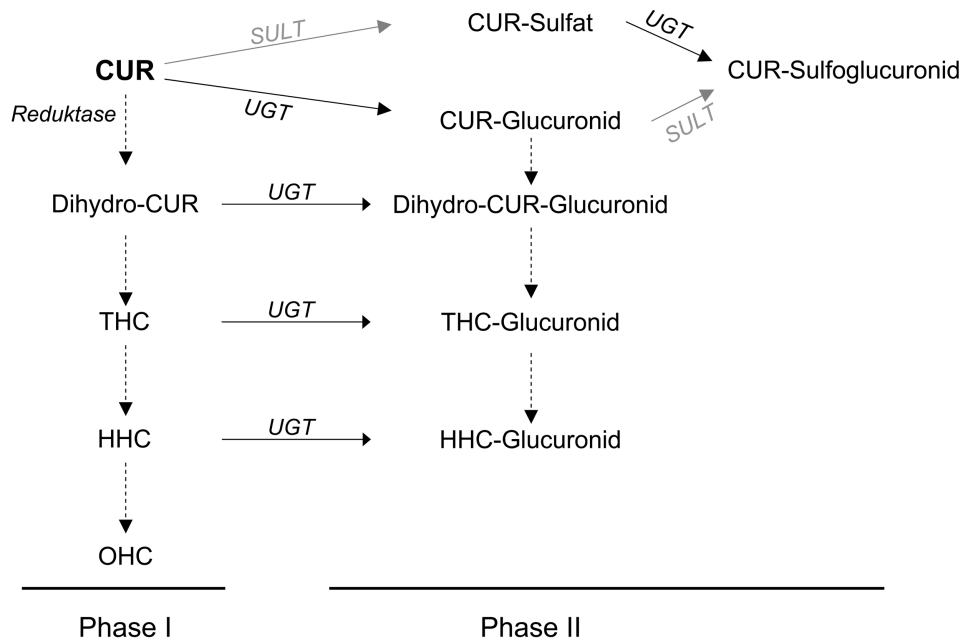


Abbildung 6: Phase I- und Phase II-Metabolite von CUR. Metabolismuswege aus *in vivo*-Studien mit Nagern und *ex vivo*-Studien mit Zellfraktionen und Hepatozyten von Ratte und Mensch [Asai und Miyazawa, 2000; Ireson et al., 2001; Pan et al., 1999]. UGT: UDP-Glucuronyltransferase, SULT: Sulfotransferasen.

#### 1.1.4 Pharmakokinetik und Verteilung

Die Pharmakokinetik und der Metabolismus von CUR wurden bisher in zahlreichen Tiermodellen und in Humanstudien untersucht.

##### Pharmakokinetik *in vitro*:

Mit steigender Dosis von CUR (bis zu 1000  $\mu\text{g}/10$  ml Inkubationsmedium) wurde die Aufnahme im isolierten Rattendarm immer weiter verringert. Bei einer Inkubation von 100  $\mu\text{g}$  wurden 82,9 % resorbiert, bei der Inkubationsmenge von 1000  $\mu\text{g}$  wurden nur noch 40 % resorbiert [Suresh und Srinivasan, 2007]. Bei ähnlichen Versuchen mit radioaktiv-markiertem CUR wurde nach Inkubation mit 50  $\mu\text{g}$  kein CUR wiedergefunden, wobei die wiedergefundene Radioaktivität bei 100 % lag. Es wird davon ausgegangen, dass CUR komplett metabolisiert wurde [Ravindranath und Chandrasekhara, 1981]. Mit Hilfe der *in vivo*-ähnlichen Technik

der Leberpräzisionsgewebeschnitte konnte gezeigt werden, dass CUR in der Leber sowohl einem reduktiven Phase I-Metabolismus unterliegt, also auch gemäß Phase II-Metabolismus konjugiert wird [Hoehle et al., 2006].

### **Tiermodelle:**

*In vivo*-Studien mit Ratten zeigten, dass CUR nach oraler Gabe im Darm nur schlecht resorbiert wird. So lag der Serumspiegel nach Applikation von CUR (2 g/kg) bei 1 µg/ml und 5 h später bereits unterhalb der Nachweisgrenze [Shoba et al., 1998]. Zudem konnte in weiteren Studien gezeigt werden, dass im Intestinaltrakt die höchsten CUR-Konzentrationen erreicht werden, wobei im Gegensatz dazu in Leber und Niere nur unbedeutende Mengen gemessen werden konnten [Ravindranath und Chandrasekhara, 1980; Sharma et al., 2001a].

Im Plasma von Ratten, die 2 % CUR mit der Nahrung für einen Zeitraum von zwei Wochen erhielten, konnten nach Herzpunktion oder Entnahme aus der Leberportalvene weder CUR noch dessen Metaboliten gefunden werden. Im Gegensatz dazu wurde durch Verabreichung der Dosis per Schlundsonde ein detektierbarer CUR-Plasmaspiegel erreicht [Sharma et al., 2001a].

Der reduktive Phase I-Metabolismus wurde nur in wenigen Studien berücksichtigt. Es konnten nach oraler Gabe von CUR im Plasma Spuren von THC und HHC sowie deren Sulfate in der Darmmukosa und der Leber nachgewiesen werden. Im Plasma und in Urinproben konnten keine reduzierten Metaboliten gefunden werden [Sharma et al., 2001b].

### **Humanstudien:**

Patienten, die an verschiedenen Tumorarten (vor allem des Kolons) erkrankt waren, wurden verschiedene Dosen (bis zu 12 g CUR/Tag) verabreicht. Die hierbei maximale beobachtete Serumkonzentration wurde nach 1 - 2 h erreicht und lag im niedrigen nanomolaren Bereich [Cheng et al., 2001; Garcea et al., 2004]. Das CUR-Glucuronid war im Blutplasma nachweisbar [Cheng et al., 2001]. Im Urin konnten wie im Tierversuch nur Spuren an CUR und seinen Konjugaten detektiert werden [Garcea et al., 2004; Sharma et al., 2004]. Selbst

in sehr hohen Dosen konnten keine adversen Effekte ausgemacht werden. Daher wird in diesen Studien geschlussfolgert, dass die verwendeten CUR-Mengen nicht toxisch sind, was möglicherweise an der geringen Bioverfügbarkeit liegt [Garcea et al., 2004; Kelloff et al., 1997; Sharma et al., 2001b, 2004, 2005; Vareed et al., 2008; Wahlstrom und Blennow, 1978]. Bei einer Phase I-Studie an gesunden Probanden lag der Serumspiegel an CUR nach einmaliger oraler Aufnahme von 2 g/kg unter der Nachweisgrenze [Shoba et al., 1998].

In den Humanstudien wurden HHC und OHC nur in Spuren in der Leber nachgewiesen. CUR und seine beiden Konjugate konnten dagegen nicht in der Galle bzw. im Lebergewebe gefunden werden. Im Blut wurden 1 h nach einer einmaligen Dosis von 0,45 bzw. 1,8 g weder CUR noch dessen Konjugate detektiert [Garcea et al., 2004].

CUR ist in der Lage die Blut-Hirn-Schranke zu überschreiten [Anand et al., 2008a; Balasubramanian, 2006; Garcia-Alloza et al., 2007; Yang et al., 2005].

CUR wird hauptsächlich billiär ausgeschieden [Holder et al., 1978; Pan et al., 1999; Ravindranath und Chandrasekhara, 1982; Wahlstrom und Blennow, 1978]. Im Urin konnten nur Spuren an CUR nachgewiesen werden, allerdings wurden sowohl das CUR-Glucuronid als auch das CUR-Sulfat gefunden [Ravindranath und Chandrasekhara, 1980].

Durch die geringe Resorptionsrate und die schnelle Metabolisierung besitzt das CUR eine geringe orale Bioverfügbarkeit, die Ausscheidung erfolgt zügig über die Galle in Form von konjugierten Metaboliten.

### **Pharmakokinetik von DMC und BDMC:**

Für die beiden Nebenbestandteile DMC und BDMC sowie die Metaboliten HHC oder OHC wurden bisher wenige *in vivo*-Studien durchgeführt. Lediglich DMC und BDMC wurden berücksichtigt, wenn in den Studien *Curcuma longa*-Extrakte verwendet wurden, die Spuren an DMC und BDMC enthielten. Dabei wird ein ähnlicher Metabolismus wie bei CUR angenommen [Hoehle et al., 2006]. In einer Tierstudie mit Ratten wurden sowohl glucuronidierte

als auch sulfatierte Konjugate im Plasma und in der Darmmukosa gefunden [Marczylo et al., 2007].

### 1.1.5 Verbesserung der Bioverfügbarkeit

Um die Bioverfügbarkeit im Tier bzw. in Humanstudien oder auf zellulärer Ebene zu verbessern, wurden verschiedene CUR-Komplexe und Formulierungen gebildet. Ein aus CUR und Sojaphospholipiden bestehender Komplex verdoppelte die Bioverfügbarkeit in Ratten von 100 mg/kg CUR nach oraler Gabe. Die Halbwertszeit des CUR im Plasma war nach Gabe des Komplexes im Gegensatz zu freiem CUR um das 1,5-fache erhöht [Liu et al., 2006]. Bei einer Formulierung von CUR mit Phosphatidylcholin (PC) konnte eine signifikant verbesserte CUR-Aufnahme beobachtet werden, wobei 2 h nach Substanzverabreichung allerdings ebenfalls kein CUR mehr im Plasma detektierbar war. Die insgesamt nachgewiesenen Serumspiegel waren aber zu niedrig um eine pharmakologische Wirkung zu erreichen. Die Formulierung beeinflusste das Metabolisierungsschema des CUR nicht [Marczylo et al., 2007]. Bei einem Zusatz von Piperin konnten sowohl in einer Tierstudie an Ratten als auch in einer Humanstudie nach ca. 0,75 h höhere Serumkonzentrationen an CUR detektiert werden als ohne Piperinzusatz. Der Zeitverlauf der CUR-Serumkonzentration wurde durch das Piperin nicht beeinflusst [Kunwar et al., 2006; Shoba et al., 1998]. Wurde CUR in Liposomen (sind kugelförmig und bestehen aus einer oder mehreren konzentrischen Lipiddoppelschichten aus Phospholipiden mit wässrigem Innenraum) verpackt, zeigte dieses keine Effektsteigerung in der Induktion von Apoptose und der antiproliferativen Wirkung gegenüber freiem CUR. Die Bioverfügbarkeit war dabei nicht Ziel dieser Studie [Li et al., 2005]. Bei Untersuchungen an kultivierten Zellen konnte gezeigt werden, dass liposomalverpacktes CUR effektiver aufgenommen werden konnte als aus einer wässrigen Lösung (mit 0,1 % Dimethylsulfoxid (DMSO)) [Kunwar et al., 2006; Li et al., 2007]. Die Ausbildung eines HSA-CUR-Komplexes steigerte die zelluläre CUR-Aufnahme dagegen nicht [Kunwar et al., 2006]. Bei Inkubationen mit isoliertem Rattendarm wurde die Aufnahme von CUR aus Micellen, die aus PC und Natriumdeoxycholat bestanden, um 8 % erhöht im Gegensatz zu CUR in wässrigem Kulturmedium [Suresh und Srinivasan, 2007]. Weitere Untersuchungen mit Micellen erhöhten die CUR-Konzentration im Plasma von Ratten um das Doppelte, somit war CUR über einen Zeitraum von bis zu 24 h nachweisbar. Im Gegensatz hierzu wurde bei einer Formulierung von

CUR mit Polyethylenglykol keine Verbesserung der Bioverfügbarkeit erreicht, da die CUR-Konzentration nach ca. 2 h unter die Nachweisgrenze fiel. CUR wurde zudem in den Micellen stabilisiert, wodurch *in vitro* eine CUR-Freisetzung über mehrere Tage beobachtet werden konnte. Insgesamt wurden alle pharmakokinetischen Parameter erhöht (Verteilung 70-fach, Clearance 3-fach und Halbwertszeit 162-fach) [Ma et al., 2007]. Eine CUR-Verwendung in Nanopartikeln ist ein neuer Ansatz zur Verbesserung der Bioverfügbarkeit von CUR. Zusätzlich kann dadurch die chemische Stabilität verbessert werden. Diese werden *in vitro* von den Zellen aufgenommen und es wurde keine Toxizität für die Partikel mit der durchschnittlichen Größe von 50 nm beschrieben. Die antiproliferativen Effekte entsprachen jenen aus einer wässrigen CUR-Lösung [Bisht et al., 2007]. Erste *in vivo*-Applikationen führten an gesunden Probanden nach CUR-Gabe in Nanopartikeln zu einer Verbesserung des Hautbildes [Tiyaboonchai et al., 2007].

### 1.1.6 Biologische Wirkung

Den Inhaltsstoffen der *Curcuma*-Pflanzen werden seit Jahrhunderten in der traditionellen indischen Medizin eine Vielzahl an Wirkungen zugeschrieben. Auf sehr verschiedenen Gebieten wurde versucht eine positive Wirkung vor allem von der Hauptsubstanz CUR zu zeigen. Eine Auswahl an Wirkungen wird in diesem Kapitel aufgezeigt.

CUR wirkt unter anderem:

- antiviral [Romero et al., 2005].
- antimutagen [Barta et al., 2006; Scartezzini und Speroni, 2000].
- antioxidativ [Masuda et al., 2001, 1999; Menon und Sudheer, 2007] und als Radikalfänger für diverse reaktive Sauerstoffspezies (ROS) bzw. NO [Barclay et al., 2000; Mahakunakorn et al., 2003; Sumanont et al., 2004; Sun et al., 2004].
- senkend auf die Lipidperoxidation [Maiti et al., 2007; Naidu und Thippeswamy, 2002; Sharma, 1976].
- antiproliferativ durch diverse Mechanismen, z.B. Apoptoseinduktion [Belakavadi und Salimath, 2005; Chen et al., 2005; Chen und Huang, 1998; Gupta et al., 2006; Hanif et al., 1997; Magalska et al., 2006; Mehta et al., 1997; Verma et al., 1998].

- antibakteriell [Kumar et al., 2001].
- antirheumatisch [Deodhar et al., 1980].
- als Topoisomerase II-Gift [Snyder und Arnone, 2002].
- gegen Morbus Alzheimer [Balasubramanian, 2006; Lim et al., 2001; Yang et al., 2005].
- als Inhibitor der Angiogenese [Bhandarkar und Arbiser, 2007].

### **Tumorprävention:**

CUR wirkt chemopräventiv gegen diverse Tumorerkrankungen [Anand et al., 2008a; Surh und Chun, 2007], vor allem im Darm [Chen et al., 2006a; Hanif et al., 1997; Jaiswal et al., 2002; Lev-Ari et al., 2005; Rao et al., 1995, 1999; Sharma et al., 2001b], in der Brust [Choudhuri et al., 2002; Ramachandran und You, 1999; Shao et al., 2002; Verma et al., 1997], in der Haut [Kakar und Roy, 1994] sowie in Leukämie-Zellen *in vitro* [Anand et al., 2008a; Anto et al., 2002; Chen et al., 2005; Conney et al., 1997; Kuo et al., 1996; Wolanin et al., 2006]. Die Wirkung kann dabei die Promotions-/Progressionsphase [Huang et al., 1995, 1997; Inano et al., 1999; Kakar und Roy, 1994; Kawamori et al., 1999; Lin et al., 2000] oder die Initiationsphase [Inano et al., 2000; Lin und Lin-Shia, 2001; Manson et al., 2000] bei der Krebsentstehung betreffen.

### **Apoptotische Wirkung von CUR:**

Eine vieldiskutierte Wirkung des CUR ist die Fähigkeit durch verschiedene Mechanismen Apoptose zu induzieren. So wird beispielsweise die Bildung von ROS durch CUR dafür verantwortlich gemacht [Woo et al., 2003]. Dabei wird die Kaspase 3 aktiviert und führt durch Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien zum Schrumpfen der Zellen und zur DNA-Fragmentierung. In humanen Brustkarzinomzellen wurde eine p53-abhängige Induktion von Apoptose beobachtet [Bharti et al., 2003; Choudhuri et al., 2002; Mishra et al., 2005]. Morphologische Zellveränderungen wie Chromatin-Kondensation, apoptotische Körperchen und charakteristische DNA-Leiter-Bildung können durch Inkubation mit CUR beobachtet werden [Kuo et al., 1996]. Neben der Reinsubstanz CUR wurden ebenfalls nach Inkubation

mit *Curcuma*-Extrakten morphologische Veränderungen, wie z.B. Brüche und Disintegration der Chromatiden, Mikrokernbildung, Rückgang des Mitoseindex und fragmentierte Metaphasekerne gefunden [Ma et al., 2007].

### **Beeinflussung von Mikrotubuli durch CUR:**

Nach Inkubation von humanen Brustkrebszellen mit CUR wurde eine Störung der Mitosespindelorganisation beobachtet, die zur Ausbildung monopolarer Spindeln führte. Dazu kommt die Bildung einer Vielzahl von Mikrokernen [Holy, 2002]. CUR hemmt im Gegensatz zu seinem Glucuronid die Polymerisation von isolierten Mikrotubuliproteinen (MTP) nicht [Pfeiffer et al., 2007]. In einer *in vitro*-Untersuchung wurde beschrieben, dass CUR die Tubulinpolymerisation in zwei kultivierten Zelllinien derart stört, dass der Spindelapparat zusammenbrach und nur wenige, kürzere Mikrotubuli nachgewiesen werden konnten. Die MTP wurden in den Zellen aggregiert. Allerdings konnte in zellfreier Umgebung dieser Untersuchung keine Polymerisationshemmung gefunden werden, obwohl CUR an das Mikrotubuligerüst bindet und während der Polymerisation in die Mikrotubuli eingebaut wird [Gupta et al., 2006].

### **Der Einfluss von CUR auf die Zellzyklusverteilung:**

Die Beeinflussung von CUR in der Zellzyklusverteilung wurde besonders häufig mit einem G2- bzw. G2/M-Arrest beschrieben [Chen et al., 1999; Choudhuri et al., 2002, 2005; Jaiswal et al., 2002; Koo et al., 2004; Mehta et al., 1997; Ramachandran und You, 1999; Simon et al., 1998], der sowohl p53-abhängig als auch -unabhängig sein kann. Seltener wurde eine Arretierung in der S-Phase des Zellzyklus [Chen et al., 1999; Shishodia et al., 2005] und in der G0/G1-Phase beobachtet [Hour et al., 2002].

## **1.2 Caco-2 Zellen als Modell für die intestinale Barriere**

### **1.2.1 Caco-2 Zellen**

Um die Aufnahme von Xenobiotika aus dem Darm zu simulieren, können die humanen Kolonkarzinomzellen Caco-2 verwendet werden. Obwohl sie aus dem Kolon stammen, haben



sie die besondere Eigenschaft mit Erreichen der Konfluenz innerhalb von 21 Tagen auszdifferenzieren und dabei auf mikroporösen Membranen aus unterschiedlichen Materialien dem Dünndarmepithel ähnliche Eigenschaften auszubilden [Levy et al., 1995]. Die Ausdifferenzierung erfolgt dabei bevorzugt auf den oben genannten Membranen, auf reinen Plastikkultur-schalen erfolgt sie in geringerem Ausmaß [Hillgren et al., 1995]. Nach ca. 6 Tagen bilden die Caco-2 Zellen eine einschichtige, undurchlässige Zellschicht, den so genannten Monolayer und erreichen damit Konfluenz. Nach der Ausbildung des Monolayers entstehen die sogenannten “Domes“. Dabei wachsen die Zellen teilweise sehr schnell übereinander und innerhalb von 24 h können zwischen 100 und 120 Domes pro  $\text{cm}^2$  entstehen. Die stationäre Phase ist nach ca. 9 Tagen erreicht, die Anzahl der Domes nimmt wieder stark ab und bleibt mit ca. 50 Domes pro  $\text{cm}^2$  konstant. In Tabelle 2 ist ein Überblick über die Höhe und Breite der Caco-2 Zellen sowie der Länge der Domes im Vergleich zu menschlichen Bürstensaumzellen (Enterozyten) gegeben.

Tabelle 2: Vergleich morphologischer Eigenschaften von menschlichen Enterozyten und Caco-2 Zellen.

Zelltyp	Tage nach dem Ausstreuen	Höhe [ $\mu\text{m}$ ]	Zellbreite [ $\mu\text{m}$ ]	Länge der Domes Mikrovilli [ $\mu\text{m}$ ]
menschliche Enterozyten		$\sim 25$	$\sim 8$	$\sim 1,4$
Caco-2 Zellen auf Polycarbonatfiltern	3	6	11	$\sim 0,3$
	6	14	10	0,7
	16	30	6	1,4

Durch die Ausbildung funktionsfähiger Tight Junctions [Hillgren et al., 1995; Levy et al., 1995; Traber et al., 1987], den Mikrovilli entsprechenden Domes [Gres et al., 1998; Levy und Bendayan, 2000; Traber et al., 1987; Wilson et al., 1990], Desmosomen [Delie und Rubas, 1997] und kleiner Lipidtröpfchen im Cytosol [Traber et al., 1987], wird die morphologische Ähnlichkeit zwischen den Caco-2 Zellen und den menschlichen Enterozyten deutlich. Alle diese morphologischen Besonderheiten können mit Hilfe von elektronenmikroskopischen Aufnahmen sichtbar gemacht werden.

Die Zellen des Caco-2 Monolayers bilden verschiedene aktive Transportprozesse für Aminosäuren, Nukleotide, Gallensäuren und Vitamine aus [Bailey et al., 1996; Hidalgo und Li, 1996]. Dadurch können ein passiver transzellulärer und ein parazellulärer Transport sowie auch Carrier-vermittelte Influx- und Efflux-Mechanismen simuliert werden [Shah et al., 2006]. Zudem erfolgt eine Expression des MDR1-Transporters, allerdings in geringerem Ausmaß als in menschlichen Enterozyten [Hidalgo und Li, 1996; Seithel et al., 2006; Shah et al., 2006].

Mit steigender Differenzierung nehmen die Enzymaktivitäten zu und erreichen ca. 15 bis 21 Tage nach der Konfluenz ihr Maximum [Delie und Rubas, 1997]. Die charakteristischen Enzyme der Bürstensaummembran des Dünndarmepithels (Aminopeptidase, alkalische Phosphatase (ALP), Saccharose-isomaltase und  $\gamma$ -Glutamyltranspeptidase) werden exprimiert, die auch als Marker für die Ausdifferenzierung verwendet werden können [Hillgren et al., 1995; Levy et al., 1995]. Pinto et al. [1983] verglichen die Aktivitäten dieser Enzyme während des Wachstums der Zellen mit denen im Dünndarm und Kolon (Tabelle 3). Bis zum 5. Tag der Proliferationsphase sind die Enzymaktivitäten gering und unterscheiden sich kaum von denen in Kolonzellen. Während der Differenzierung allerdings steigt die Enzymaktivität und erreicht nach 2 bis 3 Wochen ein Plateau. Am Tag 19 ähneln die Enzymaktivitäten der Caco-2 Zellen jenen der Dünndarmmukosa. Andere humane Kolonkarzinomzellen wie die HT29 Zellen besitzen nicht die Fähigkeit zur Ausdifferenzierung und Expression bestimmter Enzyme (s. Tabelle 3) und können daher nicht zu Simulation der Aufnahme von Xenobiotika verwendet werden [Pinto et al., 1983].

Neben den Enzymen aus Tabelle 3 werden auch induzierbare Enzyme des Phase I-Metabolismus (mikrosomale Cytochrom P 450-haltige Monooxygenasen (CYP) 1A1 und CYP der 3A Familie) [Fisher et al., 1999; Hochman et al., 2000; Schmiedlin-Ren et al., 1997] und Phase II-Metabolismus (UGT, GST und SULT) ausgebildet [Abid et al., 1995; Baranczyk-Kuzma et al., 1991; Galijatovic et al., 2000, 2001; Hillgren et al., 1995; Paine und Fisher, 2000; Shah et al., 2006]. Auch die Enzymaktivitäten dieser Enzyme sind zeitabhängig. Eine Form von GST, charakteristisch für Kolonzellen, wird bei frisch ausgestreuten Zellen und bei Zellen bis zu 4 Tagen nach Erreichen der Konfluenz exprimiert. Durch eine stetige Zunahme der Aktivität nach der Konfluenz wird eine Form der GST exprimiert, die

Tabelle 3: Aktivitäten von Enzymen der Bürstensaummembran von Caco-2 Zellen im Vergleich zur menschlichen Dünndarm- und Kolonmukosa [Pinto et al., 1983].  
<sup>a</sup>: Einheiten in milli-Units (mU)/mg Bürstensaummembran, AIP: Alkalische Phosphatase.

	AIP <sup>a</sup>	Saccharose-isomaltase <sup>a</sup>	Aminopeptidase <sup>a</sup>
Kolonmukosa	93,4 ± 33	3,6 ± 2,9	46,7 ± 18,7
Dünndarmmukosa	1793 ± 381	460,6 ± 120	1047 ± 130
HT29 Zellen (20 Tage in Kultur)	5,1 ± 1,5	0,2 ± 0,1	12,6 ± 0,1
Caco-2 Zellen (5 Tage in Kultur)	67,2 ± 3,6	1,1 ± 1	3,8 ± 1,7
Caco-2 Zellen (19 Tage in Kultur)	764 ± 110	220,4 ± 0,1	101,4 ± 9,3

dem Enzym in Dünndarmzellen ähnelt [Delie und Rubas, 1997]. Baranzyk-Kuzma et al. [1991] zeigten die Sulfatierung von Dopamin und *p*-Nitrophenol durch Caco-2 Zellen, wobei die Expression der SULT mit Erreichen des 14. Tages stark ansteigt. Für die UGT konnte mit Quercetin als Substrat ein Anstieg der Aktivität bis zum 20. Wachstumstag erreicht werden [Kruhl, 2005]. Mit Hilfe des Antioxidans *t*-Butylhydrochinon kann die Expression von UGT 1A, 1A9 und 2B7 induziert werden [Bock-Hennig et al., 2002; Munzel et al., 1999]. Diese Enzymsysteme stellen im Gegensatz zur physikalischen Barriere der Tight Junctions eine biochemische Barriere dar [Shah et al., 2006].

Auf zellulärer Ebene kann mit dem Caco-2 System die Resorption, der Metabolismus und der Transport von Xenobiotika durch die intestinale Mucosa erfasst werden. Die gebildeten Tight Junctions zwischen den Zellen ähneln dabei mehr denen des Dickdarms als jenen des Dünndarms. Allerdings werden keine muzinproduzierenden Caco-2 Zellen gebildet. Somit ist die Extrapolation auf die humane Resorption nur begrenzt möglich [Gan, 1997].

### 1.2.2 Die Übertragbarkeit des Caco-2 Systems auf die *in vivo*-Situation

Um die Permeabilität einer Zellschicht für eine bestimmte Substanz zu ermitteln, kann der sogenannte "scheinbare Permeabilitätskoeffizient" (apparent permeability coefficient,  $P_{app}$ )

berechnet werden. Der  $P_{app}$ -Wert vieler Substanzen im Caco-2 Modell entspricht der prozentualen oralen Dosis, die im Menschen resorbiert wird. Zwischen der oralen Aufnahme von Xenobiotika im Menschen und den dazugehörigen  $P_{app}$ -Werten wurde der Zusammenhang bestimmt [Artursson und Karlsson, 1991; Gres et al., 1998; Shah et al., 2006]. Dabei wurden die Werte für 20 verschiedene Substanzen mit unterschiedlichen strukturellen Eigenschaften errechnet. Durch die Auftragung der prozentual resorbierten Substanzmenge nach oraler Applikation als Funktion der  $P_{app}$ -Werte ergibt sich die in Abbildung 7 dargestellte sigmoide Kurve.

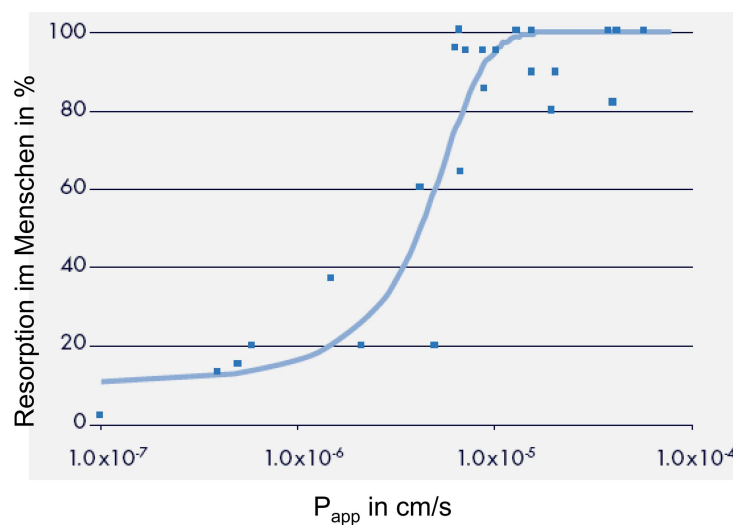


Abbildung 7: Zusammenhang zwischen oraler Aufnahme von Substanzen und dem  $P_{app}$ -Wert, modifiziert nach [Bailey et al., 1996].

In Tabelle 4 ist die Beziehung zwischen den  $P_{app}$ -Werten und der Resorption einer Substanz nach oraler Gabe im Menschen dargestellt.

Tabelle 4: Beziehung zwischen den  $P_{app}$ -Werten aus Caco-2 Studien und der *in vivo*-Resorption im Menschen [Yee, 1997].

<i>in vitro</i> $P_{app}$ -Wert	Bereich der erwarteten <i>in vivo</i> -Resorption
$P_{app} \leq 10^{-6}$ cm/s	niedrig (0 - 20 %)
$10^{-6}$ cm/s < $P_{app} \leq 10 \times 10^{-6}$ cm/s	mittel (20 - 70 %)
$P_{app} > 10 \times 10^{-6}$ cm/s	hoch (70 - 100 %)

Hohe  $P_{app}$ -Werte wurden für Testosteron ( $72,3 \times 10^{-6}$  cm/s), Ibuprofen ( $52,5 \times 10^{-6}$  cm/s) und Acetylsalicylsäure ( $30,7 \times 10^{-6}$  cm/s) berechnet, die Resorption im Menschen nach ora-

ler Applikation ist bei Doxorubicin ( $0,16 \times 10^{-6}$  cm/s) und Mannitol ( $0,65 \times 10^{-6}$  cm/s) dagegen niedrig [Yee, 1997].

Da die Tight Junctions der Caco-2 Zellen allerdings dichter sind als die von normalen humanen Enterozyten, ist die Aussage des  $P_{app}$ -Wertes nur begrenzt übertragbar [Hillgren et al., 1995].

### 1.2.3 Sekretion von Lipoproteinen durch die Caco-2 Zellen

Caco-2 Zellen sind in der Lage nach Ausdifferenzierung Lipoproteine in das basolaterale Kompartiment zu sezernieren. Dabei konnten folgende Lipoproteine gefunden werden: Chylomikronen (CM), Very Low Density Lipoproteine (VLDL), Intermediate Density Lipoproteine (IDL) und Low Density Lipoproteine (LDL) [Hughes et al., 1987]. Diese sind aufgrund ihrer unterschiedlichen Dichte mit Hilfe von Ultrazentrifugation im Dichtegradienten auftrennbar. Die Zusammensetzung der gebildeten Lipoproteinklassen, die von den Caco-2 Zellen produziert und sezerniert werden, ist abhängig von der Art und der Konzentration des eingesetzten Substrates bei Inkubation [Levy et al., 1995]. Die Rate der Produktion und Sekretion der Lipo- und Apolipoproteine ist dabei vergleichbar zu der von isolierten Rattenenterozyten [Delie und Rubas, 1997]. Tabelle 5 gibt einen Überblick über die Zusammensetzung der Lipoproteine des Menschen.

Tabelle 5: Zusammensetzung der Lipoproteine im Menschen [Voet et al., 2002]

	Einheit	CM	VLDL	IDL	LDL	HDL
Dichte	$\text{g} \times \text{cm}^3$	0,95	1,006	1,006-1,019	1,019-1,063	1,063-1,21
PartikelØ	nm	75-1 200	30-80	25-35	18-25	512
Partikelmasse	kD	400 000	10 000-80 000	5 000-10 000	2 300	175-360
Protein <sup>a</sup>	%	1,5-2,5	5-10	15-20	20-25	40-55
Phospholipide <sup>a</sup>	%	7-9	15-20	22	15-20	20-35
freies Chol <sup>a</sup>	%	1-3	5-10	8	7-10	3-4
Triglyceride <sup>b</sup>	%	84-89	50-65	22	7-10	3-5
Chol-Ester <sup>b</sup>	%	3-5	10-15	30	35-40	12
Apolipoproteine		A-I,II, B-48, C-I,II,III, E	B-100, C-I,II III, E	B-100 C-III, E	B-100	A-I,II, C-I II,III, D, E

a Bestandteile der Oberfläche; b Lipide im Inneren

Abhängig vom verwendeten Caco-2 Klon werden unterschiedliche Lipoproteinklassen an das basolaterale Kompartiment abgegeben. So wurde beispielsweise beschrieben, dass Caco-2 Zellen vor allem CM und VLDL an das basolaterale Medium abgeben [van Greevenbroek et al., 2000] und nur nach Anregung mit gesättigten Fettsäuren wie Palmitinsäure in der Lage sind IDL und HDL zu sezernieren [Bateman et al., 2007; van Greevenbroek et al., 1995, 1996]. Durch eine Mischung aus Ölsäure (OA) und Taurocholat (TC) werden vermehrt kleine CM an das basolaterale Kompartiment abgegeben [Luchoomun und Hussain, 1999], ebenso wurde durch Inkubation mit Linolsäure die CM-Bildung angeregt [van Greevenbroek et al., 2000]. Werden die Fettsäuren zudem in Form von gemischten Micellen, die eine postprandiale duodenale Zusammensetzung besitzen, zu den Zellen gegeben, wird die Triglycerid-Sekretion vor allem in der VLDL-Fraktion erhöht [Chateau et al., 2005; Tsuzuki, 2007]. Im Gegensatz zur oben genannten Studie wurde ebenfalls gezeigt, dass Caco-2 Zellen vermehrt LDL und HDL abgeben, während nur wenig VLDL gefunden wurde [Hughes et al., 1987]. Mit Ölsäure wiederum kann die Bildung von VLDL angeregt werden [Levy et al., 1995]. Allgemein wird übereinstimmend beschrieben, dass eine Inkubation mit gesättigten Fettsäuren die Bildung und Sekretion von IDL und LDL beschleunigt, wohingegen eine Anregung der CM- und VLDL-Bildung durch ungesättigte Fettsäuren erreicht wird [Levy et al., 1995, 1999; Luchoomun und Hussain, 1999; van Greevenbroek et al., 1995, 1996].

In den Lipoproteinklassen werden zusätzlich noch diverse humane Apolipoproteine (A-I, A-IV, B-48, B-100, C und E) an das basolaterale Kompartiment abgegeben [Levy et al., 1995; Levy und Bendayan, 2000].

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse eine gewisse Inhomogenität, die bei einer intakten Lipoproteinproduktion der Caco-2 Zellen eine defekte Sekretion dieser vermutet lässt [Levy et al., 1999]. Diskutiert wird ebenfalls die Fähigkeit der Caco-2 Zellen nach Stimulation durch verschiedene Substrate die Sekretion der Lipoproteine anzuregen [Levy et al., 1995; van Greevenbroek et al., 1995].

---

## 2 Problemstellung

Den sekundären Inhaltsstoffen der *Curcuma*-Pflanze, den Curcuminoiden, werden aufgrund von vielfältigen *in vitro*- und *in vivo*-Studien zahlreiche gesundheitsfördernde Wirkungen zugeschrieben. CUR wird dabei in den meisten Studien verwendet. Vor allem eine antikanzerogene Wirkung im Darm wird dem CUR dabei zugesagt. Allerdings werden nach oraler Aufnahme nur sehr niedrige Plasmaspiegel selbst nach hohen Dosen erzielt. Da CUR für eine Vielzahl zellulärer Wirkungen verantwortlich gemacht wird, stellt sich die Frage, wie es aufgenommen wird, ob es im Blut ankommen kann und wie es sich im Körper verteilen kann.

Um in anderen Organen als dem Hirn eine protektive Wirkung zu erreichen, wie z. B. bei der verringerten Entstehung von Alzheimer Plaques, muss CUR im Körper verteilt werden. Nach oraler Gabe wird es dabei im Plasma so gut wie nicht detektiert. Es ist bis heute unzureichend geklärt, wie CUR in die Zellen des Darms aufgenommen wird, im Blut transportiert wird und ob es möglicherweise durch Bakterien im Darm metabolisiert wird und in Form anderer Strukturen oder Metaboliten aufgenommen wird.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Charakterisierung des Einflusses der Curcuminoide, im Besonderen von CUR, auf das Wachstum, die Morphologie und die zellulären Wirkungen von kultivierten Zellen. Neben den Untersuchungen auf die Morphologie der Zellen sollte die zelluläre Aufnahme und Akkumulation von CUR in diesen Zellen untersucht werden. Weiterhin sollte die Resorption von CUR im etablierten Caco-2 Millicell<sup>®</sup> System und die Metabolisierung von CUR durch humane Darmbakterien untersucht werden.





---

### 3 Ergebnisse und Diskussion

In dieser Arbeit wurde die Interaktion von CUR auf zelluläre Abläufe in kultivierten Zellen untersucht. Im Gegensatz zu vielen Arbeiten mit CUR, die in der Literatur gefunden werden, wurden hierbei keine Extrakte aus dem Rhizom der *Curcuma longa* oder Curcuminoidmischungen, die ebenfalls DMC und BDMC als Nebenbestandteile enthalten, verwendet, sondern reines CUR, das am Institut synthetisiert wurde. Je nach Fragestellung wurden die weiteren synthetischen Reinsubstanzen BDMC, HHC und iso-CUR in die jeweiligen Versuche mit einbezogen (s. Abbildung 8).

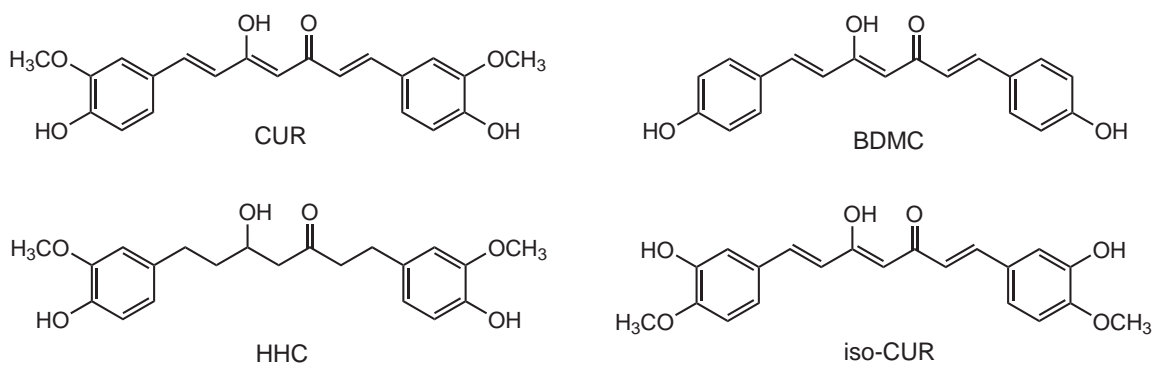


Abbildung 8: Chemische Struktur der verwendeten Curcuminoiden.

Für die Untersuchungen dieser Arbeit wurden fünf verschiedene permanente Zelllinien verwendet. Dabei handelte es sich um vier humane Karzinomzelllinien und eine Hamsterzelllinie:

- Caco-2: Zelllinie aus einem Adenokarzinom des humanen Kolons
- HepG2: Zelllinie aus einem humanen Hepatom
- HT29: Zelllinie aus einem humanen Adenomkarzinom des Kolons
- Ishikawa: Zelllinie aus einem Adenokarzinom des humanen Endometriums
- V79: Zelllinie aus Lungenfibroblasten des Chinesischen Hamsters

Für die unterschiedlichen Fragestellungen wurden die Zelllinien wie folgt verwendet:

- Für die Untersuchung der toxikologischen Effekte von CUR und seinen Metaboliten wurden HepG2, HT29, Ishikawa und V79 Zellen benötigt.

- Die zelluläre Verteilung von CUR wurde mit Hilfe der drei humanen Zelllinien HepG2, HT29 und Ishikawa bestimmt.
- Um die Resorption von CUR durch die intestinale Barriere zu untersuchen, wurden ausschließlich die Caco-2 Zellen benutzt.

### 3.1 Stabilität und Metabolismus von Curcumin in den verwendeten Zelllinien

Zunächst wurde die Stabilität von CUR im Inkubationsmedium sowie die Metabolisierung von CUR in den verwendeten Zelllinien untersucht. Im DMEM/F12-Medium wurde die CUR-Konzentration bei unterschiedlichen Inkubationsbedingungen nach Extraktion mit Hilfe von HPLC/DAD-Analyse quantifiziert. Wie in Abbildung 9 ersichtlich, nimmt innerhalb von 21 h die wiedergefundene CUR-Menge bei allen Inkubationsbedingungen deutlich ab.

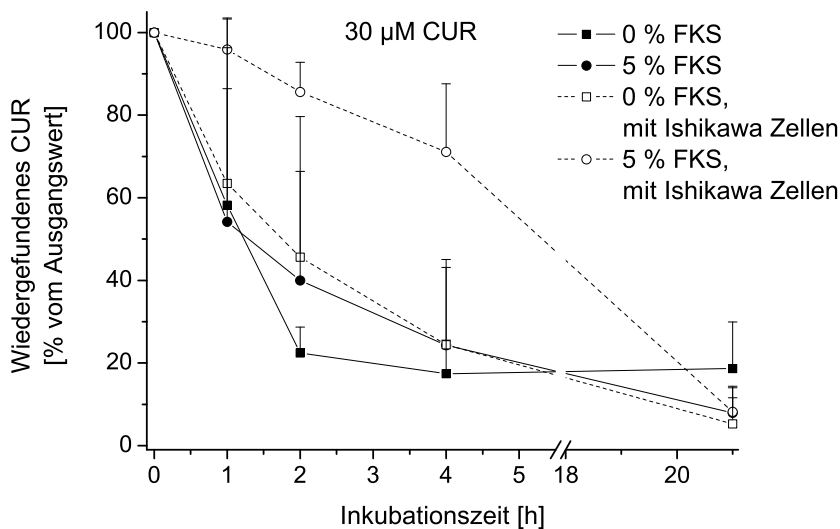


Abbildung 9: Abnahme von 30  $\mu\text{M}$  CUR in Kulturmedium mit verschiedenen FKS-Konzentrationen mit und ohne Ishikawa Zellen bei 37 °C inkubiert. FKS: Fetales Kälberserum.

Klar erkennbar ist die Abnahme der CUR-Konzentration in zellfreiem Medium. Bereits nach einer Inkubationszeit von 1 h sind nur noch 58 % mit fetalem Kälberserum (FKS) bzw.

54 % CUR des Ausgangswertes ohne FKS vorhanden. Bei einer FKS-freien Inkubation mit Ishikawa Zellen wurden 63 % wiedergefunden. Die Reduzierung der CUR-Konzentration bei der Inkubation von Ishikawa Zellen mit 5 % FKS war zeitlich verzögert. Nach 1 h Inkubation waren noch ca. 95 % CUR vorhanden, nach 4 h noch 71 %. Bei allen Inkubationsbedingungen zeigte sich insgesamt ein Rückgang der CUR-Wiederfindung auf unter 20 %. CUR ist unter diesen Inkubationsbedingungen instabil.

Zur Identifizierung der Zerfallsprodukte wurde nach 21 h CUR-Inkubation das Kulturmedium mit Ethylacetat extrahiert, der Rückstand in Methanol (MeOH) gelöst und ein Aliquot mittels HPLC/DAD analysiert. Mit Hilfe zusätzlicher GC/MS-Analysen und verschiedener Vergleichssubstanzen konnten drei Zerfallsprodukte identifiziert werden: Ferulasäure, Vanillin und Feruloymethan. Abbildung 10 stellt ein charakteristisches HPLC-Chromatogramm mit den identifizierten und unidentifizierten Substanzen dar.

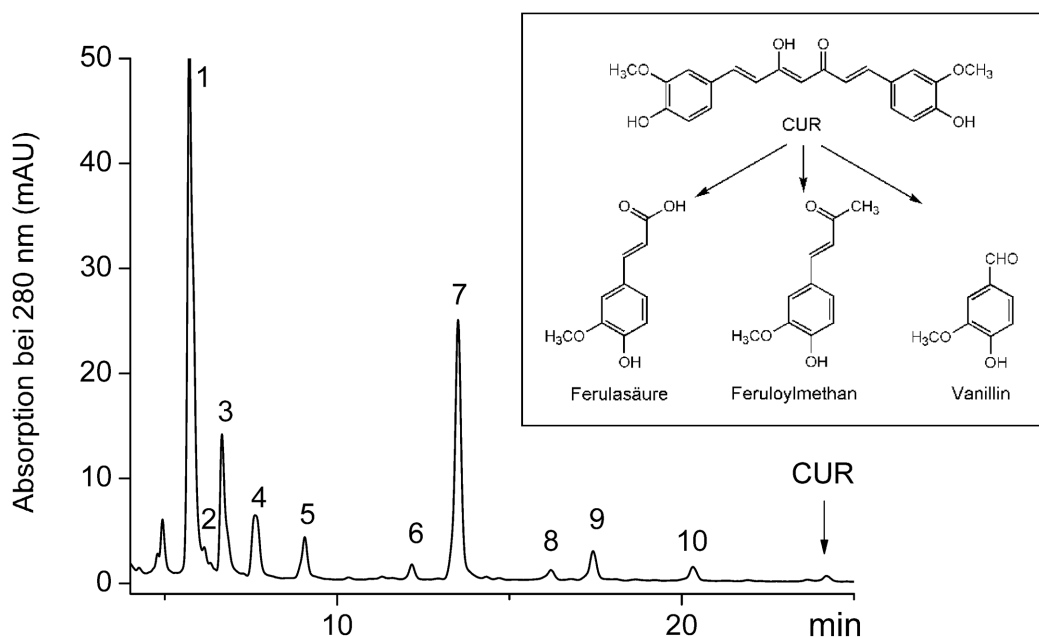


Abbildung 10: Repräsentatives HPLC-Chromatogramm der Abbauprodukte von CUR nach 21 h Inkubation bei 37 °C in Kulturmedium. Identifiziert sind die Peaks 2: Ferulasäure, 3: Vanillin, 5: Feruloymethan. Das Insert zeigt die Strukturformeln der identifizierten Abbauprodukte. mAU: milli Absorption Units

Die Instabilität des CUR in wässrigen Pufferlösungen und einige seiner Abbauprodukte wurden bereits charakterisiert [Pfeiffer et al., 2003; Wang et al., 1997].

Zur Untersuchung des Metabolismus wurden die verschiedenen Zelllinien mit CUR inkubiert. Die entstandenen Metaboliten wurden aus dem Inkubationsmedium der jeweiligen Zelllinie extrahiert, mit Hilfe von HPLC/DAD-Analyse und Referenzsubstanzen identifiziert und mittels Kalibrierung quantifiziert (Kalibriergeraden s. Tabelle 21 im Anhang). Die verwendeten Zelllinien zeigen reduzierte und konjugierte Metabolite, aber keinerlei oxidativen Metabolismus. Die gebildeten Glucuronide konnten nicht direkt erfasst werden, da diese nicht komplett extrahierbar sind. Die Glucuronidanalyse erfolgte deshalb indirekt nach enzymatischer Hydrolyse mit  $\beta$ -Glucuronidase aus der Rinderleber. Im Folgenden ist der Metabolismus von CUR in den einzelnen Zelllinien aufgeführt:

- HepG2 reduzierten CUR vor allem zu HHC und OHC und bildeten nur wenig glucuronidierte Metaboliten.
- HT29 erwiesen sich besonders effizient in der Glucuronidierung und bildeten ausschließlich glucuronidierte, aber keinerlei reduzierte Metaboliten wie HHC und OHC.
- Ishikawa zeigten einen reduktiven Metabolismus und bildeten sowohl HHC als auch OHC. Jedoch konnten keinerlei konjugierte Metaboliten detektiert werden.
- V79 reduzierten CUR ausschließlich, bildeten dabei aber noch THC als Vorstufe des HHC, zeitlich verzögert entstanden HHC und OHC.

Auffallend war, dass mit den verwendeten Zelllinien bei keiner CUR-Inkubation dessen Zerfallsprodukte detektiert werden konnten. Extrahierte Zellysat- oder Proteinpellets blieben nach zweifacher Extraktion mit verschiedenen Lösungsmitteln (z.B. Ethylacetat, Heptan, Folch-Reagenz etc.) gelb gefärbt. Dies lässt darauf schließen, dass die Bindung des CUR an Proteine stark ist und deshalb keine vollständige Extraktion möglich ist. Auch in der Literatur wird beschrieben, dass CUR an verschiedene Proteine (z.B. BSA) und Lipide binden kann [Barik et al., 2003].

## 3.2 Toxikologische Endpunkte

Um die Auswirkungen von Curcuminoiden auf die untersuchten Zellen und isoliertes Tubulin zu zeigen, wurden verschiedene toxikologische Assays durchgeführt. Für die Bestimmung der

Cytotoxizität, der Zellzyklusverteilung und der Veränderung der Zellmorphologie nach CUR-Inkubation wurden folgende Tests durchgeführt:

- Der 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT)-Test zeigt den Einfluss der Curcuminoide auf die Viabilität von kultivierten Zellen. Dazu wurde 2 h vor Ablauf der Inkubationszeit die gelbe ionische Ausgangssubstanz MTT zu den Zellen gegeben, die das MTT nach Endozytose in das blaue Formazan umwandeln. Die Intensität der Blaufärbung korreliert mit der Viabilität einer Zellpopulation [Liu et al., 1997; Vistica et al., 1991].
- Der Sulforhodamin B-Test (SRB) bestimmt die Auswirkung des CUR auf das Wachstum der Zellen. Nach Ablauf der Inkubationszeit von 72 h werden die Zellen am Kulturplattenboden fixiert und die Proteine unspezifisch mit Hilfe des SRB-Farbstoffs angefärbt. Die Absorption des gebundenen Farbstoffes ist ein Maß für die Viabilität der Zellen [Skehan et al., 1990].
- Die Bestimmung der Zellzyklusverteilung ermittelt den jeweiligen Anteil an Zellen in der G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-, der S- und der G<sub>2</sub>/M-Phase des Zellzyklus. Nach Anfärbung der Desoxyribonukleinsäure (DNA) der lysierten Zellen mit dem interkalierenden Farbstoff 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) kann mit Hilfe eines Durchflusscytometers nach dem Prinzip des Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS) der jeweilige prozentuale Zellanteil in den verschiedenen Phasen des Zellzyklus ermittelt werden [Lehmann et al., 2005].
- Der Mikrokern-Test erfasst die veränderte Morphologie von inkubierten Zellen, nach immunfluorimetrischer Anfärbung des Mikrotubuligerüsts, der Kinetochorproteine und der DNA mit Hilfe von spezifischen fluoreszenzmarkierten Antikörpern bzw. DAPI. Damit eine Zelle Mikrokerne bilden kann, muss nach gesetztem Schaden ein vollständiger Zellzyklus durchlaufen werden. Es kann dabei zwischen Mikrokerneln, die ein komplettes Chromosom oder nur ein Chromosomenfragment enthalten, unterschieden werden [Eisenbrand und Metzler, 2002]. Dies ist mit Hilfe des CREST-Antikörpers möglich, der die Kinetochorproteine der Chromosomen anfärbt [Tan et al., 1980]. Daher werden die Mikrokerne, die ein ganzes Chromosom enthalten und mit Hilfe des

Antikörpern angefärbt werden als CREST-positiv, Mikrokerne, die nur ein Chromosomenfragment enthalten als CREST-negativ bezeichnet. Eine Substanz, die als Klastogen wirkt und eine chromosomenbrechende Wirkung besitzt, ist 4-Nitrochinolin-1-oxid (NQO) [Schuler et al., 1997; Valentin-Severin et al., 2003; Yamada et al., 1993]. Als Aneugen wird dagegen eine Substanz bezeichnet, welche die numerische Chromosomenverteilung stört, dazu zählt z. B. das Alkaloid der Herbstzeitlose Colchicin (Col) [Frackowiak et al., 1986; Majone et al., 1992]. Col verhindert vor allem die Polymerisation von Tubulin und führt somit zur Bildung einer nicht-intakten Mitosespindel [Guha und Bhattacharyya, 1997]. Daher kommt es zur Fehlverteilung der Chromosomen. Im Mikrokern-Test können zudem durch die Verwendung von spezifischen Tubulinantikörpern morphologische Veränderungen am Tubulingerüst erkannt werden.

- Die Interaktion des CUR mit isolierten MTP wurde untersucht, um eine mögliche Hemmung der Tubulinpolymerisation zu erkennen.

Die folgenden Kapitel zeigen die Ergebnisse für CUR und die anderen Curcuminoide mit den untersuchten Zelllinien HepG2, HT29, Ishikawa und V79. Bei einigen Experimenten wurden zusätzlich die Positivkontrollen NQO und Col verwendet.

#### 3.2.1 CUR schränkt die Zellviabilität ein

Beim MTT-Test wurden die Zellen mit der zu untersuchenden Substanz inkubiert und 2 h vor Beendigung der Inkubation MTT zugegeben, welches zum blaugefärbten Formazan umgewandelt wurde (s. Kap. 5.7.1). Die Messung erfolgte photometrisch bei 570 nm. Aus den Messergebnissen wurde der  $IC_{50}$ -Wert bestimmt, der die mittlere inhibitorische Konzentration darstellt, bei der 50 % der Zellen abgestorben sind. Berechnet werden kann dieser über den Wendepunkt der sigmoiden Kurve, die über die ermittelten Werte gelegt wird (genaue Berechnung siehe 5.7.1). Tabelle 6 zeigt die  $IC_{50}$ -Werte für CUR in allen untersuchten Zelllinien zu verschiedenen Inkubationszeiten und -bedingungen.

Bei den **V79 Zellen** war zu erkennen, dass mit zunehmender Inkubationszeit die viabilitätsvermindernde Wirkung anstieg. Zum frühen Zeitpunkt von 6 h lag der  $IC_{50}$ -Wert bei 60  $\mu$ M, dieser sank auf weniger als ein Drittel des Wertes bei einer Inkubationszeit von 24 h (17,5  $\mu$ M, s. Tabelle 6).

Tabelle 6: Ergebnisse des MTT-Test bei der Inkubation mit CUR: Dargestellt sind die Mittelwerte (MW)  $\pm$  Standardabweichungen (SD) von drei unabhängigen Messungen.  $> 100 \mu\text{M}$ : kein Rückgang der Viabilität unter 50 %. <sup>a)</sup>: Substanzinkubation in Medium ohne FKS

Zelllinie	Inkubationszeit	Nachinkubationszeit	IC <sub>50</sub> -Wert $\pm$ SD
V79	6 h <sup>a)</sup>	0 h	61,1 $\pm$ 7,8 $\mu\text{M}$
	12 h	0 h	20,2 $\pm$ 9,9 $\mu\text{M}$
	24 h	0 h	17,5 $\pm$ 14,0 $\mu\text{M}$
Ishikawa	6 h <sup>a)</sup>	0 h	40,2 $\pm$ 3,2 $\mu\text{M}$
	6 h	0 h	$> 100 \mu\text{M}$
	24 h	0 h	75,2 $\pm$ 1,5 $\mu\text{M}$
	24 h	24 h	33,0 $\pm$ 12,9 $\mu\text{M}$
HepG2	24 h	0 h	56,9 $\pm$ 16,9 $\mu\text{M}$
	24 h	24 h	29,4 $\pm$ 2,7 $\mu\text{M}$
HT29	24 h	0 h	46,4 $\pm$ 8,9 $\mu\text{M}$
	24 h	24 h	33,9 $\pm$ 3,0 $\mu\text{M}$

In **Ishikawa Zellen** wurde der Unterschied einer Inkubation ohne und mit FKS untersucht. Die Bindung des CUR an das FKS minderte die cytotoxische Wirkung des CUR, da weniger CUR für die Zellen zur Verfügung stand. Bei einer Inkubationszeit von 6 h mit FKS konnte kein IC<sub>50</sub>-Wert bestimmt werden; ohne FKS inkubiert, lag er bei 40,2  $\mu\text{M}$ . Mit steigender Inkubationszeit und einem Zellzyklus substanzfreier Nachinkubation fiel der Wert auf 33,0  $\mu\text{M}$  ab.

Die **HepG2 Zellen** zeigten nach 24 h Inkubation einen IC<sub>50</sub>-Wert von 57  $\mu\text{M}$ . Bei der 24-stündigen substanzfreien Nachinkubation näherte sich der IC<sub>50</sub>-Wert mit 29,4  $\mu\text{M}$  dem der Ishikawa Zellen an.

Bei den **HT29 Zellen** entwickelte sich die cytotoxische Wirkung erst im Laufe der Zeit. Bei 3 und 6 h konnte kein IC<sub>50</sub>-Wert berechnet werden, da keinerlei Abnahme der Viabilität der Zellen messbar war. Nach 24 h Inkubation mit CUR und einer substanzfreien Nachinkubation von 24 h erreichte der IC<sub>50</sub>-Wert mit 33,9  $\mu\text{M}$  einen vergleichbar niedrigen Wert wie bei den HepG2 und die Ishikawa Zellen.

Bei den drei humanen Zelllinien Ishikawa, HepG2 und HT29 wurden die  $IC_{50}$ -Werte nach einer Inkubationszeit von zusätzlichen 24 h substanzfrei weiter verstärkt. Der gesetzte Schaden von CUR ist somit irreversibel.

Ishikawa und V79 Zellen wurden zusätzlich mit weiteren Curcuminoiden und dem Metaboliten HHC inkubiert (s. Tabelle 23 im Anhang). Bei der Inkubation der Ishikawa Zellen mit den Curcuminoiden BDMC, iso-CUR und HHC konnte kein  $IC_{50}$ -Wert ermittelt werden. Die Viabilität bei HHC sank bei 250  $\mu$ M nur auf 74 %, bei BDMC und iso-CUR sank die Viabilität ebenfalls nicht unter 50 %. Die V79 Zellen zeigten die gleiche Empfindlichkeit auf BDMC wie auf CUR. Iso-CUR erwies sich hingegen als toxischer im Vergleich zu CUR. Eine CUR-Inkubation für 6 h ohne FKS zeigte einen identischen  $IC_{50}$ -Wert wie die 24-stündige iso-CUR-Inkubation. Für HHC konnte in den V79 Zellen ebenfalls kein  $IC_{50}$ -Wert bestimmt werden. Die Viabilität sank bis zu einer Konzentration von 250  $\mu$ M HHC knapp auf 50 %.

#### 3.2.2 CUR hemmt das Wachstum von Ishikawa und V79 Zellen

Im SRB-Test wurden nur die Ishikawa und V79 Zellen untersucht. Der Farbstoff SRB bindet an die mit Trichloressigsäure gefällten Proteine und die Absorption des Farbstoffes wird bei 570 nm photometrisch vermessen (Durchführung s. Kap. 5.7.2). Über eine sigmoide Kurvenauswertung wurden ebenfalls die  $IC_{50}$ -Werte bestimmt. Eine signifikante Wachstumsverzögerung konnte für eine Inkubationszeit von 72 h bei den Ishikawa und V79 Zellen beobachtet werden. Der  $IC_{50}$ -Wert der Ishikawa Zellen für CUR liegt bei  $33,1 \pm 2,8 \mu$ M; bei  $40,2 \pm 5,1 \mu$ M für die V79 Zellen.

Der Nachweis im SRB-Test ist unspezifisch, da nur die absolute Proteinmenge bestimmt wird. Wenn abgestorbene Zellen sich noch nicht abgekugelt haben, ist trotzdem ein positiver Proteinnachweis dieser Zellen möglich. Der Schaden der durch CUR einmal gesetzt worden ist, scheint von den Zellen nicht mehr repariert zu werden. Die berechneten  $IC_{50}$ -Werte für CUR im SRB-Test und im MTT-Test sind in etwa identisch. Die Zellen reagierten somit in beiden Testsystemen gleich empfindlich, obwohl die Nachinkubationszeit unterschiedlich lang war.



Für iso-CUR konnte im Gegensatz dazu weder bei den Ishikawa noch bei den V79 Zellen ein  $IC_{50}$ -Wert bestimmt werden. Das bedeutet, dass das Wachstum der Zellen im SRB-Test nicht gehemmt wurde.

### 3.2.3 Einfluss der Curcuminoide auf die Zellzyklusverteilung

Für die Erfassung der Auswirkungen einer CUR-Inkubation auf die Zellzyklusverteilung wurden die prozentualen Zellanteile in der jeweiligen Zellzyklusphase mit Hilfe eines Durchflusscytometers ermittelt. Zudem konnte damit die Gesamtzellzahl bestimmt werden (s. Kap. 5.8). Als Positivkontrolle wurde das Aneugen Col verwendet, das verschiedene Zelllinien in der G2/M-Phase des Zellzyklus arretiert [Majone et al., 1992; Shin et al., 2008].

#### Positivkontrolle Col:

Ishikawa Zellen wurden mit steigenden Col-Konzentrationen für 24 h inkubiert und die Auswirkung einer substanzfreien Nachinkubation mitbestimmt. In Abbildung 11 ist die Zellzyklusverteilung und die Zellzahlentwicklung bei unterschiedlichen und gleichbleibenden Col-Konzentrationen mit zunehmender Inkubationszeit dargestellt.

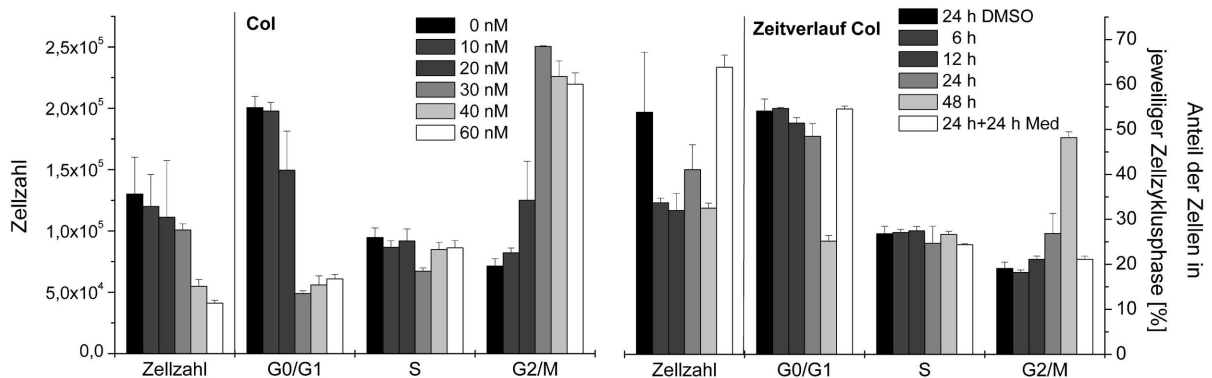


Abbildung 11: Ausbildung des G2/M-Arrestes in Ishikawa Zellen nach Inkubation mit steigenden Col-Konzentrationen für 24 h (links) und zunehmender Inkubationszeit bei 20 nM Col (rechts). Dargestellt sind die MW  $\pm$  SD aus einer Messung mit drei unabhängigen Wells.

Mit steigender Col-Konzentration ist ein stark ausgeprägter G2/M-Arrest zu erkennen bei gleichzeitiger Zellzahlabnahme. Zusätzlich wurde der Zeitverlauf des Arrests beobachtet, dazu wurde bis zu 48 h mit 20 nM Col inkubiert. Je länger die Inkubationszeit dauerte, desto

ausgeprägter war der G2/M-Arrest bei gleichzeitiger Zellzahlabnahme in der G0/G1-Phase. Wird nach der Inkubation mit 20 nM Col für weitere 24 h substanzfrei inkubiert, erholt sich sowohl die Zellzahl als auch die Zellzyklusverteilung.

#### **Messung der Zellzyklusverteilung nach CUR-Inkubation:**

Der Effekt von CUR auf die Zellzyklusverteilung wurde in den humanen Zelllinien HepG2, HT29 und Ishikawa Zellen bestimmt. In Abbildung 12 sind die Ergebnisse dargestellt.

Insgesamt zeigten alle humanen Zelllinien bei einer Inkubationszeit von einem Zellzyklus (24 h) einen konzentrationsabhängigen G2/M-Arrest und einen Rückgang der Zellanteile in der G0/G1-Phase. Die drei Zelllinien verhielten sich äquivalent, da alle Zellen bei ähnlichen CUR-Konzentrationen arretiert wurden. Zusätzlich zum G2/M-Arrest nahm, bedingt durch die cytotoxische Wirkung des CUR, die Zellzahl bei allen durchflusscytometrischen Bestimmungen signifikant ab (Abbildung 12).

Zur Klärung der Frage wie lange der G2/M-Arrest anhält, wurden Ishikawa Zellen 24 h mit CUR inkubiert und anschließend 24 h substanzfrei nachinkubiert. Durch die Nachinkubationszeit eines Zellzyklus konnte weder der G2/M-Arrest aufgehoben, noch eine Erholung der Zellzahl beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

In den drei untersuchten Zelllinien war CUR somit in der Lage den Zellzyklus in der G2/M-Phase zu arretieren und bewirkte gleichzeitig einen Rückgang der Zellzahl. Die Zellen regenerierten sich auch nicht bei substanzfreier Nachinkubation von 24 h. Diese Beobachtungen konnten durch die Ergebnisse aus dem MTT- und SRB-Test bestätigt werden (s. Kap. 3.2.1 und 3.2.2). Im MTT-Test erholten sich die mit CUR inkubierten Zellen ebenfalls bei einer 24-stündigen Nachinkubation nicht und auch beim SRB-Test konnte die Wachstumshemmung von CUR bei einer 72-stündigen Inkubation nicht aufgehoben werden.

Im Gegensatz zur Inkubation mit Col, bei der sich sowohl die Zellzahl als auch die Zellzyklusverteilung der Zellen wieder normalisierte, konnte dies bei einer Inkubation mit CUR nicht beobachtet werden.

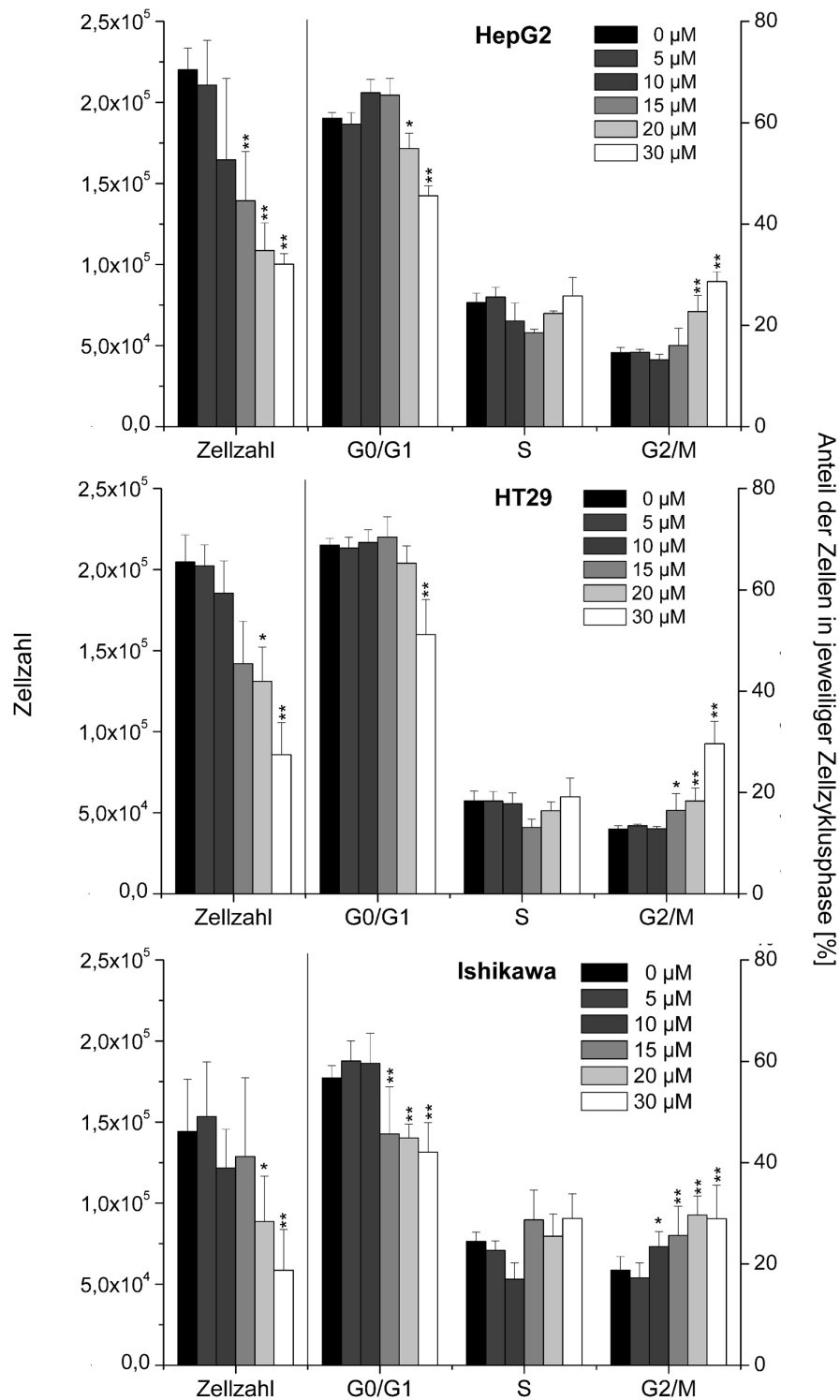


Abbildung 12: Einfluss einer 24-stündigen Inkubation mit steigenden CUR-Konzentrationen auf die Zellzahl (links) und die Zellzyklusverteilung (rechts) der drei humanen Zelllinien HepG2, HT29 und Ishikawa. Dargestellt sind die MW  $\pm$  SD von drei unabhängigen Versuchen. Statistische Signifikanz wurde mit Hilfe des Student's t-Test ermittelt. \*: Signifikanzniveau 99 %; \*\*: Signifikanzniveau 99,9 %.

**Zeitverlauf des G2/M-Arrests untersucht an V79 Zellen:**

Um die zeitliche Entwicklung der G2/M-Arretierung durch CUR zu untersuchen, wurden Zellzyklusbestimmungen mit V79 Zellen durchgeführt. Diese weisen eine kürzere Verdopplungszeit (12 h) auf; die Wirkung von CUR auf den Zellzyklus und die Regeneration kann mit kürzeren Inkubationszeiten erfasst werden. Metabolisch verhalten sie sich ähnlich wie die Ishikawa Zellen: CUR wird reduziert, jedoch nicht konjugiert. In Abbildung 13 ist die Zellzyklusverteilung für die V79 Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten gezeigt.

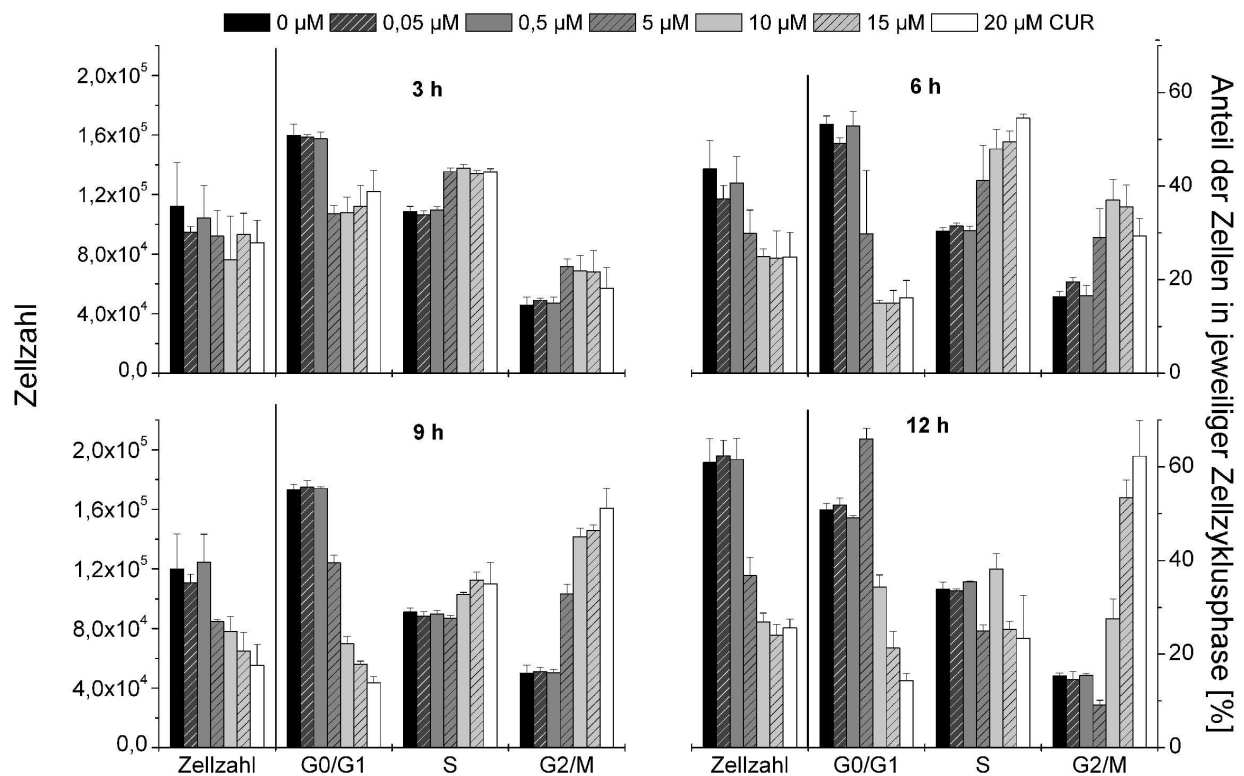


Abbildung 13: Zeitverlauf der Zellzyklusverteilung von V79 Zellen nach Inkubation mit steigenden CUR-Konzentrationen. Dargestellt sind die MW ± SD von einem Inkubationsversuch mit drei unabhängigen Wells.

Bei einer dreistündigen Inkubation war ein leichter Anstieg der S- und der G2/M-Phase erkennbar und der Arrest in der G2/M-Phase prägte sich im Verlauf der Inkubationszeit immer stärker aus. Nach 12 h Inkubation war der Zellzyklusarrest komplett ausgebildet.

Der Arrest trat im Gegensatz zu den humanen Zelllinien bereits ab einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  auf. Nicht abgebildet ist das Ergebnis bei einer Inkubationszeit von 24 h. Hier war ab einer Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  CUR kein auswertbares Signal bei der Messung am Durchfluscytometer mehr zu erhalten, da die Zellen so stark geschädigt waren, dass sie keiner eindeutigen Zellzyklusphase mehr zugeordnet werden konnten bzw. sich bereits abgelöst hatten und bei der Aufarbeitung nicht miterfasst werden konnten.

Die Ergebnisse der Zellzyklusverteilung bei unterschiedlich andauernden Nachinkubationszeiten sind nicht gezeigt, da bei einer geeigneten Nachinkubationszeit der G2/M-Arrest vollständig aufgehoben werden konnte. Bei einer Substanzinkubation von 12 h und mit zunehmenden Nachinkubationszeiten von 3 bis 12 h regenerierte sich die Zellzyklusverteilung, wobei die Zellzahl unverändert niedrig blieb. Ab einem gewissen Grad der Schädigung konnten die Zellen sich nicht mehr vollständig erholen und starben ab. Weniger geschädigte Zellen verließen die G2/M-Arretierung, um wieder eine normale Mitose zu durchlaufen. Bei einer Inkubationszeit von 9 h und einer Nachinkubationszeit von 15 h zeigte sich ein leichter G0/G1-Arrest. Dieser zeigte sich, da die Zellen begannen, sich wieder zu erholen. Zellen, die sich im G2/M-Arrest befanden, starben ab und daher war eine Verschiebung der Zellzyklusverteilung zu beobachten.

Der durch CUR induzierte G2/M-Arrest erschien erst bei längerer Substanzinkubation. Nach der Aspiration von CUR von den Zellen konnten die nicht zu stark geschädigten Zellen sich schnell regenerieren. Bei einer Inkubation von 3 h mit CUR und einer Nachinkubation von 15 h waren bereits alle Zellen wieder in ihrer ursprünglichen Zellzyklusphase, wobei die Zellzahl bei allen Nachinkubationszeiten erniedrigt blieb.

### **CUR ist verantwortlich für den Zellzyklusarrest in der G2/M-Phase:**

Bedingt durch seine Instabilität bildet CUR Zerfallsprodukte. Um die Beteiligung dieser am G2/M-Arrest in Ishikawa Zellen zu untersuchen, wurde die Zellzyklusverteilung mit verschiedenen Konzentrationen an Zerfallsprodukten (Ferulasäure, Vanillin und Feruloylmethan, s. Kap. 3.1) ermittelt. CUR wurde für 24 h bei 37 °C im Kulturmedium zellfrei inkubiert, um

die bekannten Zerfallsprodukte zu erhalten. Diese Lösung wurde 24 h zusätzlich mit Ishikawa Zellen inkubiert. Eine Mischung aus den drei bekannten Zerfallsprodukten wurde in den Konzentrationen von je 15 und 30  $\mu\text{M}$  hergestellt. Zusätzlich wurden hohe Konzentrationen des reduzierten Metaboliten HHC (bis 200  $\mu\text{M}$ ) mitgeführt. Die Zellzyklusverteilungen mit den Zerfallsprodukten und HHC sind in Abbildung 14 dargestellt.

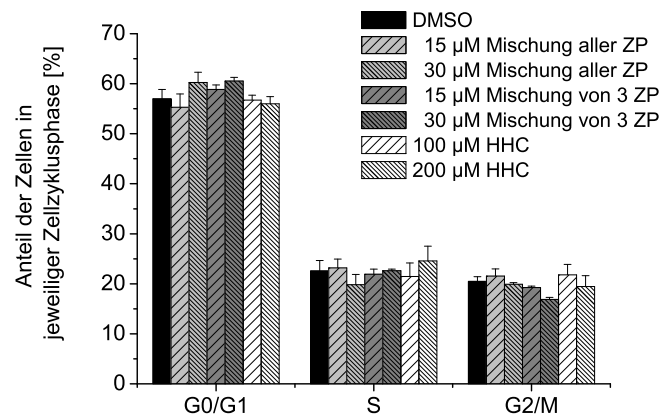


Abbildung 14: Zellzyklusverteilung in Ishikawa Zellen nach Inkubation mit CUR-Zerfallsprodukten und HHC. Dargestellt sind die MW  $\pm$  SD von drei unabhängigen Wells aus einem Versuch. ZP: Zerfallsprodukte

Nach einer Inkubationszeit von 24 h zeigten alle drei Ansätze keinen Effekt auf die Zellzyklusverteilung. Damit kann ausgeschlossen werden, dass die Zerfallsprodukte oder der Metabolit HHC zum G2/M-Arrest führen. Die Muttersubstanz CUR selbst ist für den Rückgang der Zellzahl und den Arrest der Zellen in der G2/M-Phase des Zellzyklus verantwortlich.

### Zellzyklusverteilung nach Inkubation mit den Curcuminoiden:

Um die Effizienz der Curcuminoiden DMC, BDMC und iso-CUR zu vergleichen, wurden Ishikawa Zellen mit steigenden Konzentrationen inkubiert und wie in 5.8 durchflusscytometrisch vermessen. In Abbildung 15 sind die Abnahme der Zellzahl und der steigende G2/M-Arrest bei der Inkubation von zunehmenden Konzentrationen an BDMC, DMC und iso-CUR aufgezeigt.

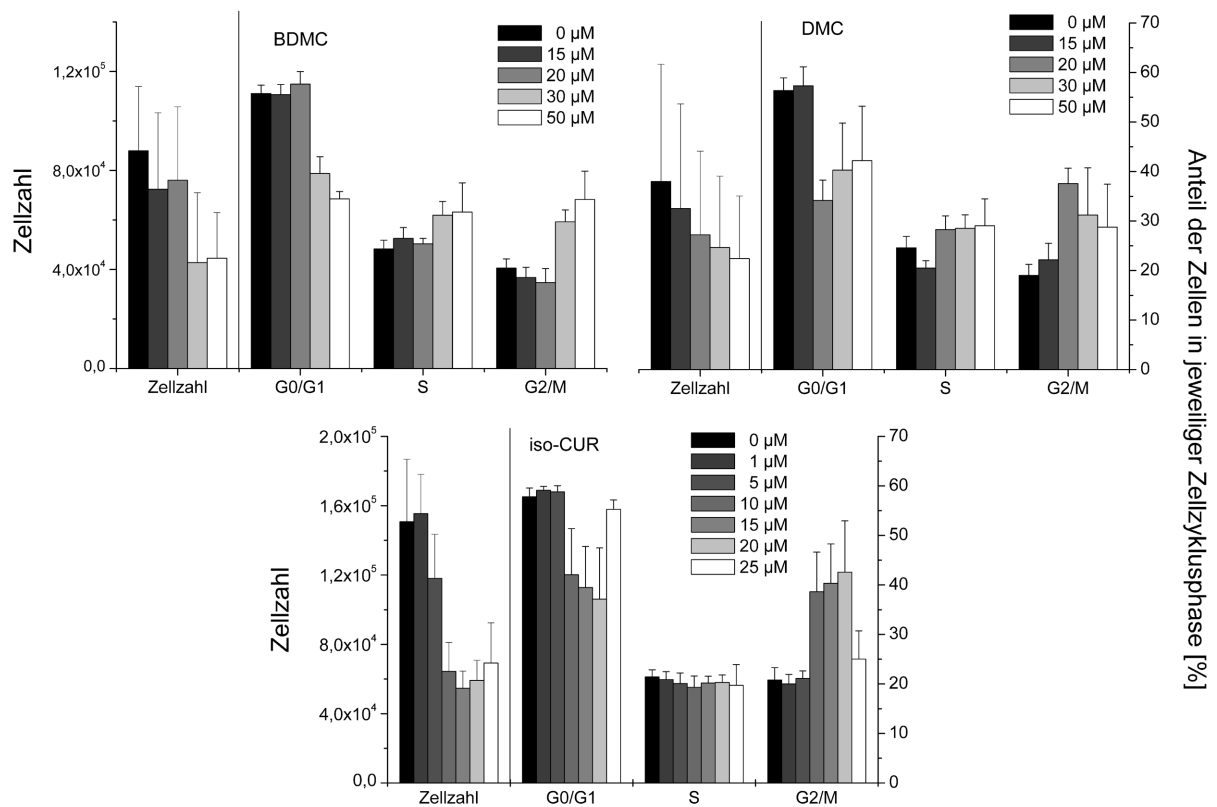


Abbildung 15: Einfluss einer 24-stündigen Inkubation mit steigenden Konzentrationen an BDMC, DMC und iso-CUR auf die Zellzahl (links) und die Zellzyklusverteilung (rechts) von Ishikawa Zellen. Dargestellt sind die MW  $\pm$  SD von drei unabhängigen Versuchen.

Verglichen mit BDMC, zeigte DMC eine deutlichere Wirkung den Zellzyklus in der G2/M-Phase zu arretieren, da der Arrest bei 20  $\mu\text{M}$  bereits ausgeprägt war, wobei BDMC erst bei 30  $\mu\text{M}$  zu einer Arretierung führte. Iso-CUR verminderte in einer geringen Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  die Zellzahl und arretierte die Ishikawa Zellen in der G2/M-Phase. Bei Nachinkubationszeiten von 24 h mit den Curcuminoiden DMC und BDMC bzw. substanzfrei waren weder eine Steigerung oder Abschwächung des Arrests noch eine Erholung der Zellzahl erkennbar. Der Verlauf der Zellzahlen nach unterschiedlichen Inkubationszeiten mit CUR, DMC und BDMC ist in Abbildung 16 dargestellt.

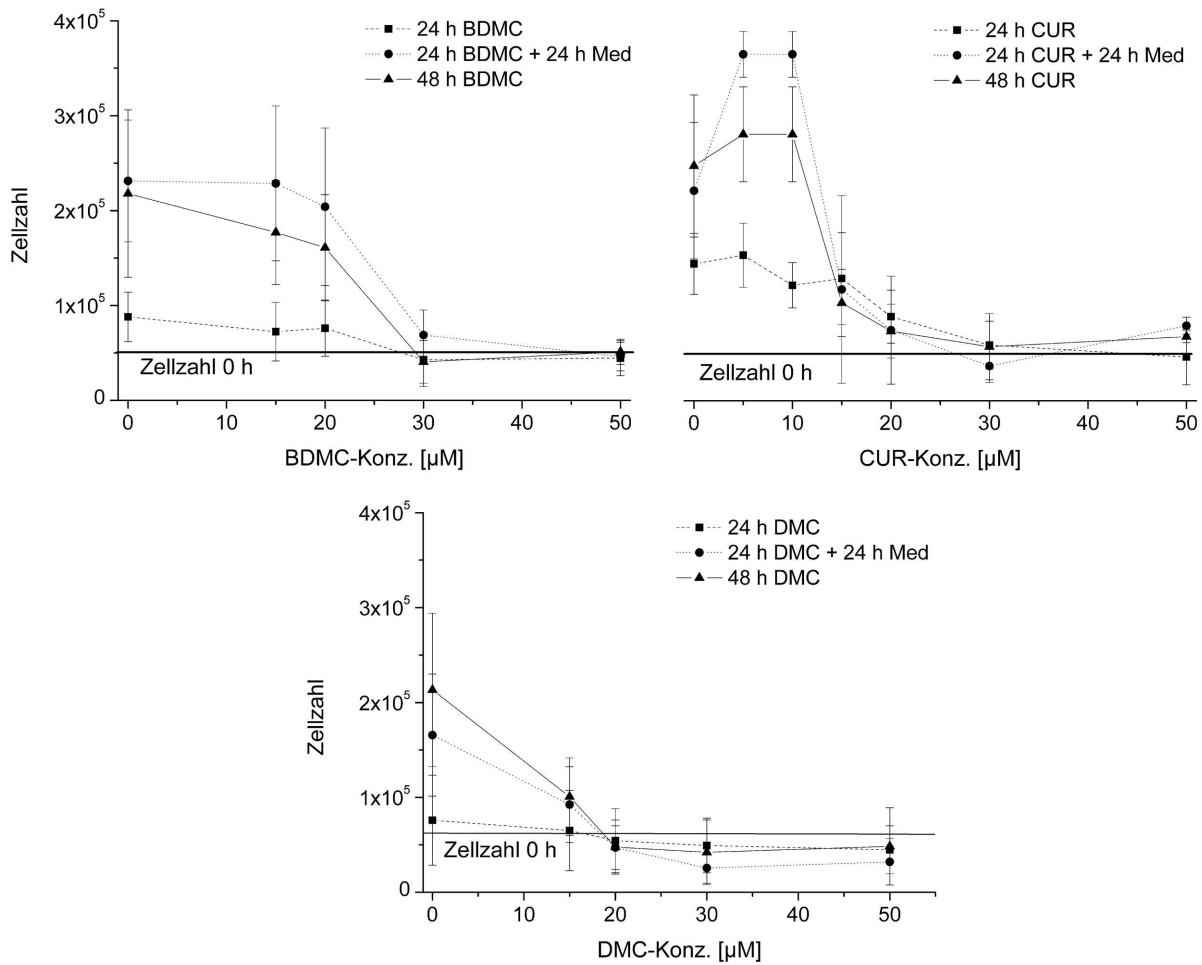


Abbildung 16: Zellzahlentwicklung bei Zellzyklusverteilung nach verschiedenen Inkubationszeiträumen für BDMC, CUR und DMC. Dargestellt sind die MW  $\pm$  SD von drei unabhängigen Bestimmungen.

Zusammenfassend zeigte sich, dass die drei weiteren Curcuminoide BDMC, DMC und iso-CUR ebenfalls fähig waren wie CUR die humanen Zellen in der G2/M-Phase zu arretieren und gleichzeitig einen Rückgang der Zellzahl zur Folge hatten. Bei 24-stündiger substanzfreier Nachinkubation war auch hier keine Erholung der Zellzahl erkennbar.

CUR besitzt negative Auswirkungen auf die Zellzyklusverteilung von diversen kultivierten Zelllinien. In der Literatur wurden dazu für verschiedene Zelllinien kontroverse Beobachtungen gemacht:

- humane Magenadenomzellen AGS wurden in der G2/M-Phase des Zellzyklus arretiert [Koo et al., 2004].



- in verschiedenen knockout-Zellen der humanen Kolonkrebszelllinie HCT-116 wurde gezeigt, dass diese durch CUR-Inkubation einen p53- und p21-unabhängigen G2/M-Arrest aufweisen [Jaiswal et al., 2002].
- im Gegensatz dazu wird ein G1/S-Arrest für die humanen Mantellymphomzellen SP-53 beschrieben [Shishodia et al., 2005].
- in vielen weiteren Arbeiten wird aber vor allem der Arrest in der G2-Phase des Zellzyklus beschrieben [Ramachandran und You, 1999; Simon et al., 1998].

CUR arretiert die Zelllinien HepG2, HT29, Ishikawa und V79 in der G2/M-Phase des Zellzyklus. Dieser Effekt ist im Gegensatz zu einer mit Col-induzierten Arretierung irreversibel. Die Störung, die CUR in der Mitosephase verursacht, ist so schwerwiegend, dass keine zelleigenen Reparaturmechanismen greifen, die eine Überwindung des Schadens ermöglichen. Dies bedingt, dass die derart geschädigte Zelle keine normale und vollständige Mitose mehr durchlaufen kann. Vermutlich werden die Zellen gezielt in den Zelltod geschickt. Ob hierbei eine festgelegte Reihenfolge von Schritten wie bei der Apoptose abläuft oder die Zellen un gelenkt in die Nekrose gehen, ist aus diesen Untersuchungen nicht zu erkennen. Zudem konnte gezeigt werden, dass die Substanzenentfernung nicht ausreichend für eine Erholung der Zellen war. Entweder bleibt ein einmal gesetzter Schaden erhalten oder es befindet sich noch eine ausreichend große Menge an Curcuminoid in den Zellmembranen. Die Zellzahl nimmt trotz Substanzenentfernung weiter ab, wie in Abbildung 16 klar erkennbar.

Mit zunehmender Länge der Substanzinkubation stieg die Arretierung der Zellen in der G2/M-Phase. Das bedeutet, dass CUR erst in genügend hoher Menge von den Zellen aufgenommen werden musste und erst dann der Arrest erkennbar wurde, sobald die Zellen versuchten sich normal mitotisch zu teilen.

Die vier untersuchten Zelllinien zeigten eine ähnliche Empfindlichkeit gegenüber CUR. Die Metabolisierung von CUR beeinflusste die Zellzahlentwicklung und den G2/M-Arrest nicht, da die Muttersubstanz CUR selbst für den Arrest verantwortlich gemacht werden konnte. Ob CUR von den Zellen bevorzugt reduziert (HepG2, Ishikawa und V79 Zellen) oder glucuronidiert (HT29 Zellen) wurde, es konnte keine Änderung der Konzentration

erkannt werden, ab der die Arretierung ausgebildet war. Einzig die V79 Zellen zeigten einen ersten G2/M-Arrest bereits bei niederen Dosen, was mit ihrer kürzeren Verdopplungszeit zusammenhängen könnte.

Da alle vier untersuchten Curcuminoide den selben Arrest in der G2/M-Phase des Zellzyklus aufwiesen, ist ein struktureller Unterschied auszuschließen. Einige Veröffentlichungen machen die Stellung und das Vorhandensein der Methoxy- und Hydroxygruppen für diverse Wirkungen wie z.B. die antioxidativen Eigenschaften verantwortlich [Deng et al., 2006; Portes et al., 2007; Venkateswarlu et al., 2005]. Für die Arretierung des Zellzyklus kann ein Zusammenhang zwischen Position und Art der Substitution am aromatischen Ring ausgeschlossen werden.

#### 3.2.4 Mikrokern-Test mit CUR

Der Effekt von CUR auf die Morphologie, die Mitoserate und die Mikrokernbildung der Zelllinien wurde mit Hilfe des Mikrokern-Tests untersucht. Ishikawa, HepG2, HT29 und V79 Zellen wurden auf Objektträger (OT) ausgestreut, mit steigenden CUR-Konzentrationen für 24 h inkubiert und einen Zellzyklus substanzfrei nachinkubiert. Die Nachinkubationszeit wurde eingehalten, um den Zellen Zeit für eine vollständige Mitose zu ermöglichen, da diese für die Bildung von Mikrokernen benötigt wird. Die Zellen wurden mit Hilfe von fluoreszenzmarkierten Antikörpern wie in 5.9 gefärbt. Die OT wurden optisch mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops ausgewertet und pro OT 2 000 Zellen gezählt.

Um eine Kontrolle für die Mikrokernbildungsrate der Ishikawa und V79 Zellen zu erhalten, wurde mit Hilfe der Positivkontrollen Col und NQO die Mitoserate und der Anstieg der Mikrokerne bestimmt. Tabelle 7 zeigt die ermittelten Mitose- und Mikrokernraten für beide Zelllinien.

Bei Col handelt es sich um ein Aneugen, das durch Auflaufen der Zellen in der M-Phase zu einem Mitosearrest führt. Bei substanzfreier Nachinkubation verlassen die Zellen die M-Phase und es kommt zur Bildung von CREST-positiven Mikrokernen. Bei den Ishikawa Zellen wurde im Vergleich zur DMSO-Kontrolle eine erniedrigte Mitoserate, bei gleichzeitig erhöhter Mikrokern-Zahl beobachtet. Zum Zeitpunkt der Zellfixierung auf dem OT hatte

Tabelle 7: Positivkontrollen des Mikrokern-Testes. Pro OT wurden 2 000 Zellen ausgezählt und die Anteile auf Zellen, die sich in der Mitose befinden, fragmentierte Zellkerne, Mikrokerne und zerstörte Mikrotubuli berechnet. Die Zellen wurden 24 h mit Col bzw. NQO und 24 h substanzfrei inkubiert. Dargestellt sind die MW  $\pm$  SD aus drei unabhängigen Versuchen. MN: Mikrokerne, neg.: negativ, pos.: positiv.

pro 2 000 Zellen	Positivkontrollen		
	0 $\mu$ M	25 nM Col	0,5 $\mu$ M NQO
<b>Ishikawa Zellen</b>			
Zellen in Mitose	66,3 $\pm$ 7,51	23,7 $\pm$ 31,01	14,3 $\pm$ 12,10
Fragmentierte Zellkerne	-	-	+
CREST-neg. MN	4,7 $\pm$ 3,51	7,7 $\pm$ 2,89	34,3 $\pm$ 15,17
CREST-pos. MN	1,7 $\pm$ 1,15	27,3 $\pm$ 16,19	5,7 $\pm$ 2,51
<b>V79 Zellen</b>			
Zellen in Mitose	141,0 $\pm$ 15,62	67,3 $\pm$ 11,59	52,3 $\pm$ 29,74
Fragmentierte Zellkerne	-	++	+
CREST-neg. MN	3,3 $\pm$ 2,08	6,0 $\pm$ 1,73	44,3 $\pm$ 9,45
CREST-pos. MN	1,3 $\pm$ 0,58	95,7 $\pm$ 35,36	5,7 $\pm$ 1,53

ein Teil der Zellen den Arrest bereits überwunden, während ein anderer die Mitosephase noch nicht vollendet hat. Bei der Inkubation mit 0,5  $\mu$ M NQO kommt es zur Bildung von CREST-negativen Mikrokernen, da NQO klastogenes Potential hat. Diese Aussage kann in den V79 Zellen bestätigt werden. Col bildet vermehrt CREST-positive Mikrokerne, bei gleichzeitig erniedrigter Mitoserate, und NQO bildete CREST-negative Mikrokerne und verringerte ebenfalls die Anzahl der Zellen, die sich in der Mitose befanden.

HT29 Zellen wurden auch mit diesen beiden Substanzen inkubiert, bildeten aber keine Mikrokerne. Daher eignen sich diese Zellen nicht für Aussagen von Substanzen auf Mikrokernbildung und bieten nur eine Aussagekraft im Bezug auf die Mitoserate.

Tabelle 8 zeigt eine Zusammenfassung der Ergebnisse des Mikrokern-Tests für CUR in den untersuchten Ishikawa, HepG2, HT29 und V79 Zellen.

Tabelle 8: Ergebnisse des Mikrokern-Testes. Pro OT wurden 2000 Zellen ausgezählt und die Anteile auf Zellen, die sich in der Mitose befinden, fragmentierte Zellkerne, Mikrokerne und zerstörte Mikrotubuli berechnet. Die Zellen wurden 24 h mit steigenden CUR-Konzentrationen und 24 h substanzfrei inkubiert. Dargestellt sind die MW  $\pm$  SD aus drei unabhängigen Versuchen. MN: Mikrokerne, neg.: negativ, pos.: positiv. Statistische Signifikanz wurde ermittelt mit Student's t-Test, \*: Signifikanzniveau 99,9 %.

pro 2000 Zellen	CUR-Konz. [ $\mu$ M]			
	0	10	20	30
<b>Ishikawa Zellen</b>				
Zellen in Mitose	55,0 $\pm$ 4,58	63,7 $\pm$ 13,05	14,4 $\pm$ 5,59*	1,7 $\pm$ 2,08*
Fragmentierte Zellkerne	-	+++	++	++
CREST-neg. MN	10,7 $\pm$ 2,08	22,0 $\pm$ 10,00	10,4 $\pm$ 6,08	6,0 $\pm$ 2,00
CREST-pos. MN	5,0 $\pm$ 4,36	16,3 $\pm$ 4,16	12,8 $\pm$ 7,90	4,3 $\pm$ 1,53
Zerstörte Mikrotubuli	-	+	++	+++
<b>HepG2 Zellen</b>				
Zellen in Mitose	64,8 $\pm$ 9,98	10,0 $\pm$ 5,20*	1,3 $\pm$ 1,53*	0*
Fragmentierte Zellkerne	-	++++	+++	++
CREST-neg. MN	16,0 $\pm$ 10,52	12,3 $\pm$ 0,58	21,0 $\pm$ 5,57	10,3 $\pm$ 6,81
CREST-pos. MN	8,3 $\pm$ 4,27	51,0 $\pm$ 7,55	41,3 $\pm$ 22,03	13,7 $\pm$ 5,51
Zerstörte Mikrotubuli	-	+	++	+++
<b>HT29 Zellen</b>				
Zellen in Mitose	69,7 $\pm$ 7,51	56,0 $\pm$ 27,18	7,3 $\pm$ 3,51*	0,7 $\pm$ 0,58*
Fragmentierte Zellkerne	-	+	+	(+)
CREST-neg. MN	0,3 $\pm$ 0,58	0	0,7 $\pm$ 1,15	0,7 $\pm$ 0,58
CREST-pos. MN	0,3 $\pm$ 0,58	1,3 $\pm$ 1,15	1,0 $\pm$ 1,00	2,3 $\pm$ 0,58
Zerstörte Mikrotubuli	-	(+)	+	++
<b>V79 Zellen</b>				
Zellen in Mitose	129 $\pm$ 3,61	38 $\pm$ 23,51	17 $\pm$ 18,68*	1 $\pm$ 1,00*
Fragmentierte Zellkerne	-	++	+++	+
CREST-neg. MN	0,7 $\pm$ 0,58	48,7 $\pm$ 18,15	21,7 $\pm$ 7,64	4,7 $\pm$ 5,03
CREST-pos. MN	4,3 $\pm$ 1,53	9,0 $\pm$ 3,61	8,3 $\pm$ 2,31	1,7 $\pm$ 2,08
Zerstörte Mikrotubuli	-	+	++	+++

Die verwendeten Zelllinien verhielten sich vergleichbar. V79 Zellen zeigten durch ihren kürzeren Zellzyklus bedingt, eine hohe Mitoserate (130 Zellen/2 000 Zellen). Bei den humanen Zelllinien ist diese nur halb so hoch (zwischen 50 und 70 Zellen/2 000 Zellen). Die Mitoserate nahm bei allen Zelllinien mit steigender CUR-Konzentration soweit ab, bis sich bei 30  $\mu$ M CUR keine Zellen mehr in der Mitose befanden.

Die Unterscheidung der Mikrokerne in CREST-positive und -negative Mikrokerne ergab für die Inkubationen mit CUR kein einheitliches Bild. Bei Ishikawa und V79 Zellen nahmen die CREST-negativen Mikrokerne mit steigender CUR-Konzentration zu, im Gegensatz dazu stiegen die CREST-positiven Mikrokerne bei den HepG2 Zellen an. Für die HT29 Zellen ließ sich keine Aussage machen, da diese so gut wie keine Mikrokerne bildeten. Dies liegt eventuell daran, dass die geschädigten HT29 Zellen nicht so gut auf den OT haften bleiben wie die geschädigten Zellen der anderen Zelllinien. Eine eindeutige Zuordnung, ob es sich bei CUR um ein Aneugen oder eine klastogene Substanz handelt, kann auf Grund der Uneinheitlichkeit der Ergebnisse für die Bestimmung der CREST-positiven und -negativen Mikrokerne nicht getroffen werden.

Zudem konnte eine Schädigung des Mikrotubuligerüsts fluoreszenzmikroskopisch beobachtet werden. Mit steigender CUR-Konzentration nahm die Intensität der Schäden zu. So war beispielsweise das Mikrotubuligerüst der Zellen nicht mehr geordnet, sondern entweder zerrissen oder erschien kondensiert. Es konnten Zellen mit drei Mitosespindeln und mit völlig zerstörtem Mikrotubuligerüst gefunden werden. Einige Aufnahmen von verschieden stark geschädigten Zellen in Abbildung 17 sollen diese Beobachtungen verdeutlichen.

Wie bereits bei den Untersuchungen der Zellzyklusverteilung (in Kap. 3.2.3) gezeigt, hatte HHC keinen Einfluss auf die Phasen des Zellzyklus. Bei den Mikrokernversuchen mit HHC konnten in Ishikawa Zellen keinerlei Hinweise auf eine mögliche Schädigung durch den reduzierten Metaboliten des CUR gefunden werden. Weder war die Mitoserate erniedrigt, noch konnten Mikrokerne detektiert werden oder waren Störungen am Mikrotubuligerüst erkennbar.

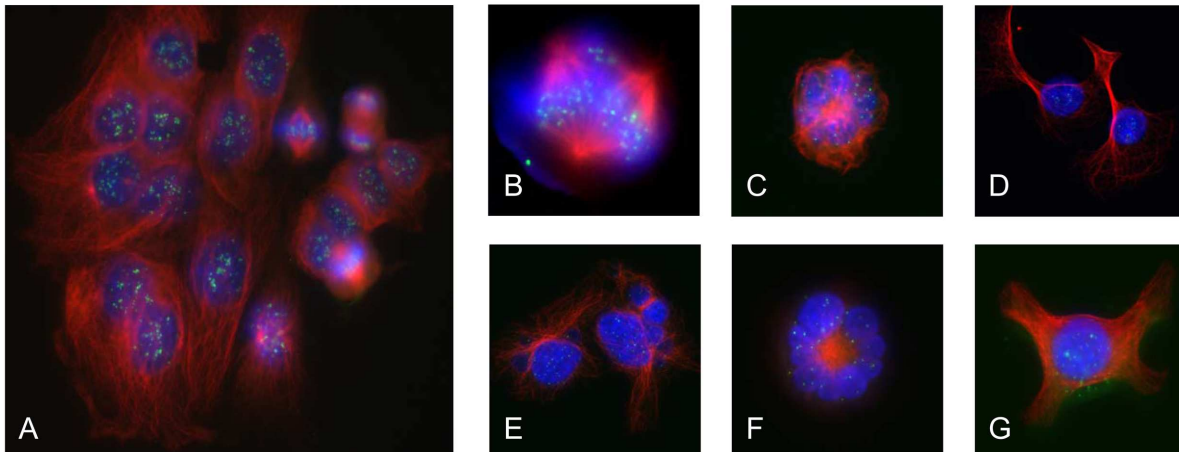


Abbildung 17: Fluoreszenzmarkiertes Erscheinungsbild der angefärbten Zellen; blau: DNA; grün: Kinetochore; rot: Mikrotubuli. Bilder **A**, **B** und **D** zeigen Ishikawa Zellen; Bilder **C**, **E** und **F** zeigen V79 Zellen; Bild **G** zeigt eine HT29 Zelle. **A**: unbehandelte Zellen; **B**: dreipolige Mitosespindel nach Inkubation mit 30  $\mu\text{M}$  CUR, **C**: fragmentierter Zellkern nach CUR-Behandlung (20  $\mu\text{M}$ ); **D**: gestörtes Tubulingerüst (30  $\mu\text{M}$ ); **E**: CREST-positive Mikrokerne nach Behandlung mit 25 nM Col; **F**: fragmentierter Zellkern (10  $\mu\text{M}$  CUR); **G**: Störung des Mikrotubulingerüsts nach Inkubation mit 20  $\mu\text{M}$  CUR.

Nach Vergleich der Ergebnisse des Mikrokern-Tests zeigt sich, dass die V79 Zellen aufgrund ihrer hohen Mitoserate am besten geeignet sind für diese Untersuchung. Da V79 Zellen allerdings über wenig metabolische Aktivität verfügen, können auch die HepG2 Zellen für diesen Endpunkt verwendet werden. Die HepG2 Zellen waren gegenüber CUR empfindlicher als die beiden anderen humanen Zelllinien. Der Vergleich zwischen HepG2 und V79 Zellen zeigte ähnliche Werte für die Gesamtmikrokernzahl. In Bezug auf die Bildung fragmentierter Zellkerne haben die ermittelten Werte für die Ishikawa und HepG2 Zellen im Gegensatz zu den V79 Zellen weniger Aussagekraft, da die V79 Zellen erheblich mehr gestörte Kerne gebildet hatten. Zieht man die Ergebnisse der Zellzyklusverteilungsexperimente hinzu, liegt der Schluss nahe, dass die kultivierten Zellen in der G2-Phase arretiert sein müssen, da die Mitoserate nicht ansteigt, sondern bei 30  $\mu\text{M}$  CUR die Mitose komplett zum Erliegen kommt. CUR bildete keine klassischen Mikrokerne, da diese schon innerhalb der Mitosephase auftraten. Bei einer Inkubation mit CUR kam es zusätzlich bereits in der Mitose zur Fragmentierung der Zellkerne, die morphologische Ähnlichkeit zu Mikrokernen aufwies. Die Zellen zeigten teilweise eine Vielzahl an Zellkernfragmenten, die ein komplettes Chromosom oder nur ein Chromosomenfragment besaßen. Bildet eine Substanz klassischer-

weise Mikrokerne, kommt es meist zur Ausbildung von ein bis zwei Mikrokernen, die sich in der Nähe des Zellkerns befinden und erst nach dem Durchlaufen der vollständigen Mitose auftreten. Bei CUR wurden im Gegensatz dazu die gebildeten Zellkernfragmente verstreut gefunden, so dass zum Teil eine Identifizierung des Hauptkern nicht mehr möglich war. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass bei einer Inkubation der Zellen mit CUR beide Arten von Mikrokernen gebildet werden: Mikrokerne, die ein komplettes Chromosom besitzen und Mikrokerne, die nur ein Chromosomenbruchstück besitzen. Col bildet im Gegensatz zu CUR als klassisches Aneugen in den beiden Zelllinien Ishikawa und V79 fast ausschließlich CREST-positive Mikrokerne, die klastogene Substanz NQO vorwiegend CREST-negative Mikrokerne.

CUR störte die Ordnung des Mikrotubuligerüsts der untersuchten Zelllinien, in dem es die Mikrotubuli im strukturierten Gerüst entweder kondensierte oder zerteilte. Eine Aussage, ob dabei die Polymerisation oder Depolymerisation gestört wurde, kann nicht getroffen werden. Durch diese Störung konnte keine funktionsfähige Mitosespindel ausgebildet werden und die Zellen konnten keine intakte Mitose durchlaufen. Möglicherweise war die fehlende Ausbildung der Mitosespindel für die Fragmentierung des Zellkerns verantwortlich. Die Zellen bereiteten sich auf die Mitose vor und begannen in der Prophase mit der Kondensation der replizierten Chromosomen. Die Mitosespindel begann sich auszubilden [Alberts et al., 2004]. Wenn die Chromosomen kondensiert sind, aber keine intakte Mitosespindel ausgebildet wurde, können die Chromosomen nicht aus der Äquatorialebene zu den Zellpolen transportiert werden. Dies könnte zur Fragmentierung des Zellkerns führen.

Bereits die Ergebnisse der Zellzyklusexperimente deuten auf einen langfristigen, irreversiblen Schaden hin. Zusammengefasst sprechen die Ergebnisse für einen Arrest in der G2-Phase, allerdings zeigen die oben erwähnten Beobachtungen, dass die Zellen die Mitose normal beginnen und erst hierbei die verschiedenen Fehler auftreten. Bei einem Arrest in der Meta-Phase sollten Zellen erkennbar sein, die kondensierte Chromosomen aufweisen. Dies war aber nicht der Fall.

Diese Beobachtungen zeigen, dass CUR die Zellen durch die Mechanismen der mitotischen Katastrophe abtötet, jedoch nicht direkt durch jene der Apoptose. Es kommt zur Bildung von multiplen Mikrokernen, zu Abnormalitäten bei der Bildung der Mitosespindel und der anschließenden Fehlverteilung der Chromosomen in der Mitose.

CUR wurde in bisherigen Veröffentlichungen eine apoptotische Wirkung zugeschrieben [Chen et al., 1999; Choudhuri et al., 2002; Jaiswal et al., 2002; Piwocka et al., 2001]. Neuere Veröffentlichungen beschreiben für CUR einen anderen Mechanismus für den Zelltod und zwar den der mitotischen Katastrophe [Wolanin et al., 2006]. Eine genaue Beschreibung des Mechanismus ist noch nicht vorhanden, aber zumeist wird diese Katastrophe als Fehler bei der Mitose nach DNA-Schaden durch akkumulierte, defekte G1 und G2 Zellzyklus-Kontrollpunkte beschrieben [Roninson et al., 2001]. Diese Situation führt durch wiederholte “abortive Zellteilungszyklen ohne abschließende, koordinierte mitotische Zellteilung zu Tetraploidie oder sogar zu massiver Polyploidie “ [Ganten, 2008]. Es gibt allerdings keine allgemein gültige Definition für die mitotische Katastrophe, die sich dennoch von der Apoptose unterscheidet. Die überwiegende Meinung ist, dass die mitotische Katastrophe von der Apoptose gefolgt wird (Cytochrom c Freisetzung, Kaspase 3 Aktivierung, DNA-Degradation) [Magalska et al., 2006; Wolanin et al., 2006]. Die mitotische Katastrophe wird als eine Form des Zelltods beschrieben, bei der es zur Bildung von deutlich größeren Zellen mit sehr vielen Mikrokernen mit variablem Chromosomengehalt kommt. Morphologisch kann dieses von der Apoptose, Nekrose und Autophagie abgegrenzt werden [Magalska et al., 2006; Okada und Mak, 2004; Roninson et al., 2001]. Ebenfalls kommt ein möglicher Mechanismus mit Mikrotubuli-schädigenden Agentien in Frage, durch die es zu Abnormalitäten bei der Ausbildung der Mitosespindel und der Chromosomenverteilung kommt. Diskutiert wird dabei eine Herunterregulierung von Survivin, einem Inhibitor der Apoptose [Magalska et al., 2006; Wolanin et al., 2006]. Die Zellen besitzen viele Mikrokerne, zudem ist das Chromatin kondensiert und es bildet sich keine apoptotische DNA-Leiter aus [Castedo et al., 2004; Roninson et al., 2001; Wolanin et al., 2006]. Die mitotische Katastrophe ist im Gegensatz zur Apoptose nicht durch Bcl-2 hemmbar und kaspasenunabhängig [Ganten, 2008]. Diese morphologischen Veränderungen wurden in diversen Studien für CUR beschrieben [Castedo et al., 2004; Hanif et al., 1997; Wolanin et al., 2006].



Holy [2002] beschreibt, dass CUR viele Zellen in der M-Phase akkumuliert, die viele große Mikrokerne aufweisen und deren Centrosomenorganisation gestört ist. Diese Zellen bilden keine bipolare Mitosespindel wie die Kontrollzellen aus, sondern zeigen nur monopolare Spindelapparate. Die M-Phase kann jedoch von den Zellen ohne Segregation der Chromosomen verlassen werden und diese Zellen sind dann noch für kurze Zeit lebensfähig. Dadurch kommt es zur Ausbildung von sowohl Kinetochor-positiven als auch -negativen DNA-Fragmenten, wobei Zellen detektiert wurden, die entweder nur Kinetochor-positive oder nur Kinetochor-negative Mikrokerne besaßen. Zudem wurde keine erhöhte Apoptose rate gefunden [Holy, 2002]. Vergleichbare Beobachtungen konnten in den Untersuchungen zur Mikrokernbildung der vorliegenden Arbeit gemacht werden.

Ein Vergleich der morphologischen Zellveränderungen nach CUR-Inkubation weist einige Parallelen mit der mitotischen Katastrophe auf. Nach der Inkubation mit CUR kam es in der Mitosephase zur Ausbildung einer Vielzahl von Mikrokernen bzw. zur Fragmentierung des Zellkerns. Außerdem war die Ausbildung der Mitosespindel gestört. Diese Ergebnisse stimmen mit denen aus der Literatur überein, so dass der Schluss nahe liegt, dass CUR in den verwendeten Zelllinien die mitotische Katastrophe als eine Vorstufe der Apoptose hervorruft.

### 3.2.5 MTP-Bindung von CUR

Nachdem im Mikrokern-Test nach einer Inkubation mit niedriger CUR-Konzentration deutliche Schäden am Mikrotubuligerüst und der Mitosespindel beobachtet wurden und es zur Bildung von CREST-positiven Mikrokernen kam, sollte gezeigt werden, wie CUR aufgereinigte MTP beeinflusst. Um die Auswirkung von CUR auf MTP bzw. die Hemmung der Polymerisation des Mikrotubuligerüsts zu untersuchen, wurden aus frischem Pferdehirn MTP isoliert (s. Kap. 5.10). Dazu wurden die Bindungsspektren von 30  $\mu\text{M}$  CUR mit isolierten MTP zu verschiedenen Zeitpunkten aufgezeichnet. Um zusätzlich die Frage nach der Stabilität von CUR im Puffersystem zu untersuchen, erfolgte zunächst eine zeitabhängige Aufnahme der Bindungsspektren.

#### **Stabilität in Puffer mit und ohne Proteinzugabe:**

Die zeitliche Konzentrationsabnahme an CUR wurde in Phosphat- und REA-Puffer beobachtet. Dazu wurden die Bindungsspektren im Bereich von 380 bis 500 nm zu verschiedenen Zeitpunkten (0 - 120 min) untersucht (Abbildung 44 im Anhang). Im Phosphatpuffer war der größte Zerfall von CUR bereits nach 5 min zu erkennen. Dagegen wurde CUR im REA-Puffer über einen Inkubationszeitraum von 120 min stabilisiert. Im Phosphatpuffer konnte CUR durch eine Zugabe von BSA bzw. MTP deutlich stabilisiert werden, wobei MTP sich hier als effizienter erwies.

#### **Bindung von CUR an MTP:**

Da CUR gemäß Barik et. al [2003] mit den apolaren Stellen des BSA-Moleküls interagiert und die Bindung im Inneren der Tertiärstruktur stattfindet, sollte CUR durch Denaturierung des Proteins freizusetzen sein. Keine Art der Denaturierung mit Natrium-Dodecylsulfat (SDS), Harnstofflösung bzw. Hitzedenaturierung bestätigte diese Vermutung, da entweder der Zerfall dadurch beschleunigt wurde, oder eine weitere Extraktion nicht mehr möglich war. Da sich eine Extraktion mit Hilfe von Ethylacetat bzw. Folch-Reagenz als ungeeignet erwies, wurden im Folgenden die Bindungsspektren aufgezeichnet.

Durch die Aufzeichnung der Bindungsspektren konnte gezeigt werden, dass CUR an MTP bindet. Ein Vergleich wurde mit BSA bzw. Lysozym, welches keine reaktiven Thiolgruppen besitzt, durchgeführt. Bei BSA und MTP konnte photometrisch eine Verschiebung des Absorptionsmaximums zu niedrigeren Wellenlängen beobachtet werden, was auf eine Bindung von CUR an das jeweilige Protein hindeutet. Bei einer Inkubation mit Lysozym dagegen konnte keine Verschiebung des Absorptionsmaximums beobachtet werden, folglich bindet CUR nicht an Lysozym (Abbildungen 45 und 46 im Anhang).

Um den Einfluss von CUR auf die Polymerisation der MTP zu Mikrotubuli zu untersuchen wurde der Polymerisationsassay, wie in Kap. 5.12 beschrieben, durchgeführt. Dabei erwies sich allerdings die Eigenabsorption des CUR als störend, so dass keine abschließende Aussage über die Beeinflussung der Polymerisation gemacht werden konnte.

CUR bindet folglich an MTP, aber es kann über die Beeinflussung der Tubulinpolymerisation keine Aussage getroffen werden. In früheren ähnlichen Untersuchungen am Institut konnte gezeigt werden, dass CUR die Polymerisation der MTP nicht beeinflusst, hingegen das CUR-Glucuronid eine deutliche Hemmung bewirkt [Pfeiffer et al., 2007].

Im Mikrokern-Test konnte eine starke Störung des Mikrotubuligerüsts gesehen werden. Die Zellen waren augenscheinlich nicht mehr in der Lage intakte Mitosespindeln auszubilden, und dadurch wurde der gesamte Mitosevorgang gestört. Im zellfreien System konnte nun nicht eindeutig gezeigt werden, ob CUR den Polymerisations- bzw. Depolymerisationszyklus beeinflusst. Da aber CUR-Glucuronid die Polymerisation hemmt und der bevorzugte Metabolismusweg in HT29 Zellen die Glucuronidierung ist, können die Mikrotubulistörung und Zellkernfragmentierung bei diesen Zellen damit erklärt werden. Allerdings konnte bei HT29 Zellen keine erhöhte Empfindlichkeit der Zellen gegenüber CUR im Vergleich zu den anderen drei Zelllinien beobachtet werden. HT29 Zellen erwiesen sich sogar als besonders ungeeignet für die Untersuchungen der morphologischen Veränderungen durch CUR, da sie selbst mit den Positivkontrollen Col und NQO keine Mikrokerne ausbildeten.

Gupta et al. [2006] zeigten, dass in Gegenwart von 25  $\mu\text{M}$  CUR die Interphasemikrotubuli von humanen HeLa und MCF-7 Zellen signifikant depolymerisierten. Die Spindelapparate schienen in Anwesenheit von CUR zu kollabieren. Insgesamt waren die Mikrotubuli in CUR-behandelten Zellen deutlich kürzer und in ihrer Anzahl reduziert im Vergleich zu den Kontrollzellen. Selbst eine Aggregation des Tubulins war teilweise erkennbar. Durch weitere zellfreie Experimente konnte eine Einlagerung von CUR in die Mikrotubuli beobachtet werden, wobei CUR die Polymerisation nicht wie Col hemmt. Möglicherweise ist der CUR-Einbau in das Tubulingerüst für eine konformationale oder geometrische Änderung verantwortlich und die Polymerisationshemmung durch CUR hat verglichen mit Col einen anderen Mechanismus [Gupta et al., 2006].

Der genaue Mechanismus wie CUR die Tubulinpolymerisation stört, bleibt damit ungeklärt. Die Auswirkungen sind die defekte oder unvollständige Ausbildung der Mitosespindeln in kultivierten Zellen, was zur Folge hat, dass diese die Mitose nicht mehr unversehrt durchlaufen können, der Zellkern fragmentiert wird und die Zellen durch die mitotische Katastrophe absterben.

#### 3.2.6 Zusammenfassung der zellulären Wirkungen von CUR

CUR ist eine instabile Substanz, die durch Inkubation mit Zellen oder FKS stabilisiert werden kann. Dabei erfolgt aber in den meisten Fällen eine Bindung an die verwendeten Proteine, die nicht mehr vollständig gelöst werden kann. Diverse Extraktionsmöglichkeiten (Ethylacetat, Folch-Reagenz oder andere Lösungsmittel) oder Hitzedenaturierung der Proteine erwiesen sich als nicht ausreichend zur Entfernung von CUR aus proteinhaltigen Lösungen. Die Bindung an verschiedene Proteine, wie BSA [Barik et al., 2003] oder HSA [Kunwar et al., 2006; Pulla Reddy et al., 1999; Zsila et al., 2003b] und die schlechte Extrahierbarkeit [Jaruga et al., 1998] wurden auch in anderen Veröffentlichungen beschrieben.

Die Zerfallsprodukte des CUR spielen in wässriger Pufferlösung ( $\text{pH} > 7$ ) eine große Rolle. Es entstehen dabei identifizierte Aldehyde und Carbonsäuren wie Ferulasäure, Vanillin und Feruloylmethan [Wang et al., 1997]. Die Bildung weiterer unidentifizierter Zerfallsprodukte mit eventuell reaktiven Gruppen ist nicht abschließend geklärt. Inwieweit diese Zerfallsprodukte eine negative Wirkung auf Zellen haben, wurde bisher nicht ausreichend untersucht. Für Vanillin wurden zwar antioxidative Eigenschaften und die Fähigkeit als Radikalfänger zu fungieren, beschrieben [Maurya et al., 2007], aber ebenso konnte eine DNA-Schädigung im Comet-Assay nachgewiesen werden [King et al., 2007]. Ferulasäure besitzt antimikrobielle und antioxidative Wirkungen, jedoch ist insgesamt über die Pharmakokinetik bzw. -dynamik wenig bekannt [Ou und Kwok, 2004; Zhao und Moghadasian, 2008]. Inwieweit die Zerfallsprodukte für Wirkungen verantwortlich sind, die dem CUR zugeschrieben werden, ist noch nicht klar. Erste Hinweise, dass ihr Einfluss möglicherweise gering ist, geben die Ergebnisse der Zellzyklusverteilung. Die Zerfallsprodukte hatten im Gegensatz zu CUR keinen Zellzyklusarrest in der G2/M-Phase zur Folge. Leu et al. [2002] verglichen die Fähigkeit der Induktion von Phase II-Enzymen durch CUR, Vanillin und

Ferulasäure. Verglichen mit CUR zeigten beide Zerfallsprodukte dabei keine Wirkung [Leu und Maa, 2002].

In dieser Arbeit konnten bei Inkubationen der verschiedenen Zelllinien mit CUR nach Extraktion des Inkubationsmediums keine Zerfallsprodukte detektiert werden. Es besteht die Möglichkeit, dass bei den vorgenommenen Untersuchungen keine Zerfallsprodukte entstanden sind oder dass diese durch ihre hohe Reaktivität (funktionelle Gruppen wie Aldehyd- bzw. Carbonsäure-Gruppe) mit Mediumsbestandteilen des FKS oder sogar mit den Zellmembranen reagierten und damit nicht erfasst werden konnten.

CUR schränkte das Wachstum von kultivierten Zelllinien ein. Dies konnte im MTT- und SRB-Test, als auch mit Hilfe der Untersuchungen zur Zellzyklusverteilung gezeigt werden. Sobald eine Inkubation mit CUR erfolgte, stagnierte die Zellzahl im verwendeten Testsystem oder verringerte sich sogar. Ein gesetzter Schaden kann selbst bei einer 24 h andauernden Nachinkubationszeit durch zelleigene Reparatursysteme nicht mehr behoben werden. Die Zellen gehen in eine Form von programmiertem Zelltod über. CUR arretiert alle verwendeten Zelllinien in der G2-Phase des Zellzyklus, wobei sich eine einmal geschädigte Zelle nicht mehr erholen kann und abstirbt. Mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops ist eine Fragmentierung des Zellkerns zu erkennen. Dies bedeutet, dass die Zellen die G2-Phase des Zellzyklus erreichen und in die Mitose übertreten. Dabei kommt es zur Kondensation der replizierten Chromosomen und zur Vorbereitung der Aufteilung auf die beiden Tochterzellen. Gleichzeitig stört CUR in einer noch nicht eindeutig geklärten Art die Polymerisation des Mikrotubuligerüsts. Infolge dessen kommt es zu einer fehlerhaften Ausbildung der Mitosespindeln. Diese sind aber essentiell für die Ausrichtung und Auftrennung der Chromosomen, indem sie an die Kinetochore der Chromosomen binden, um die jeweiligen Schwesterchromatiden zu den Zellpolen zu transportieren [Joshi, 1998]. Liegt nun keine intakte Mitosespindel vor, werden nur einzelne oder eventuell keines der Chromosomen an den richtigen Platz gezogen. Anschließend geht die Zelle in eine besondere Vorstufe der Apoptose, die sogenannte mitotische Katastrophe [Magalska et al., 2006; Wolanin et al., 2006]. Im Gegensatz dazu steht jedoch, dass selbst bei länger andauernden Inkubationszeiten charakteristische Apoptoseproteine wie Bcl-2 oder p53 nicht beeinflusst wurden [Mehta et al., 1997].

Welcher Mechanismus genau das Gleichgewicht zwischen Polymerisation und Depolymerisation stört, ist noch nicht geklärt. Verschiedene Wege werden diskutiert: CUR wird in die Mikrotubulifasern eingebaut und stört dadurch die Konformation und die Struktur. Das Gerüst wird instabil und kollabiert [Gupta et al., 2006]. CUR könnte die Funktion und Expression des Proteins Kinesin beeinflussen, so dass keine normale Mitose mehr ablaufen kann. Kinesin ist verantwortlich für die Ausbildung einer bipolaren Mitosespindel [Holy, 2002]. Ein Angriff direkt an der Mitosespindel durch eine Inhibition von Survivin wird ebenfalls diskutiert [Magalska et al., 2006].

CUR zeigt damit einen effektiven Mechanismus um Zellen in ihrem Wachstum einzuschränken bzw. über die mitotische Katastrophe in die Apoptose zu schicken. Da in den meisten Publikationen humane Krebszelllinien verwendet worden sind und sich bei diesen kein signifikanter Unterschied im Konzentrations- und Wirkungsspektrum zeigte, könnte CUR einen potenten Hemmstoff für das Wachstum von Krebszellen darstellen. Es gibt bereits erste Hinweise, dass Brustkrebszellen empfindlicher auf CUR reagieren als normale Brustzellen [Kunwar et al., 2008; Ramachandran et al., 2002].

## 3.3 Akkumulation von CUR in humanen Zellen

### 3.3.1 Aufnahme von CUR in die Zellen

Damit in kultivierten Zellen die oben diskutierten Wirkungen auftreten, muss CUR in die Zellen gelangen. Daraus ergab sich die Frage, ob CUR an Zellmembranen von humanen Zellen bindet und wie es sich in der Zelle verteilt. Zahlreiche Untersuchungen beschreiben zelluläre Effekte, wobei bisher nicht eindeutig gezeigt wurde, ob CUR überhaupt in die Zelle aufgenommen wird und wie es sich dort verteilt. Zur Klärung der Aufnahme von CUR wurden die drei humanen Zelllinien Ishikawa, HepG2 und HT29 wie in Kap. 5.5 mit CUR inkubiert, mittels Ultrazentrifugation (UZ) in Fraktionen des ER, des Cytosols und des Zelldebris aufgetrennt und der Zeitverlauf der CUR-Gehalte über 30 h in den einzelnen Zellfraktionen und im Inkubationsmedium nach Extraktion durch HPLC/DAD-Analyse bestimmt. In Abbildung 18 sind die Stoffmengen an CUR, HHC, OHC und CUR-Glucuronid im jeweiligen Inkubationsmedium und in den Fraktionen des ER und Cytosols aufgezeigt.

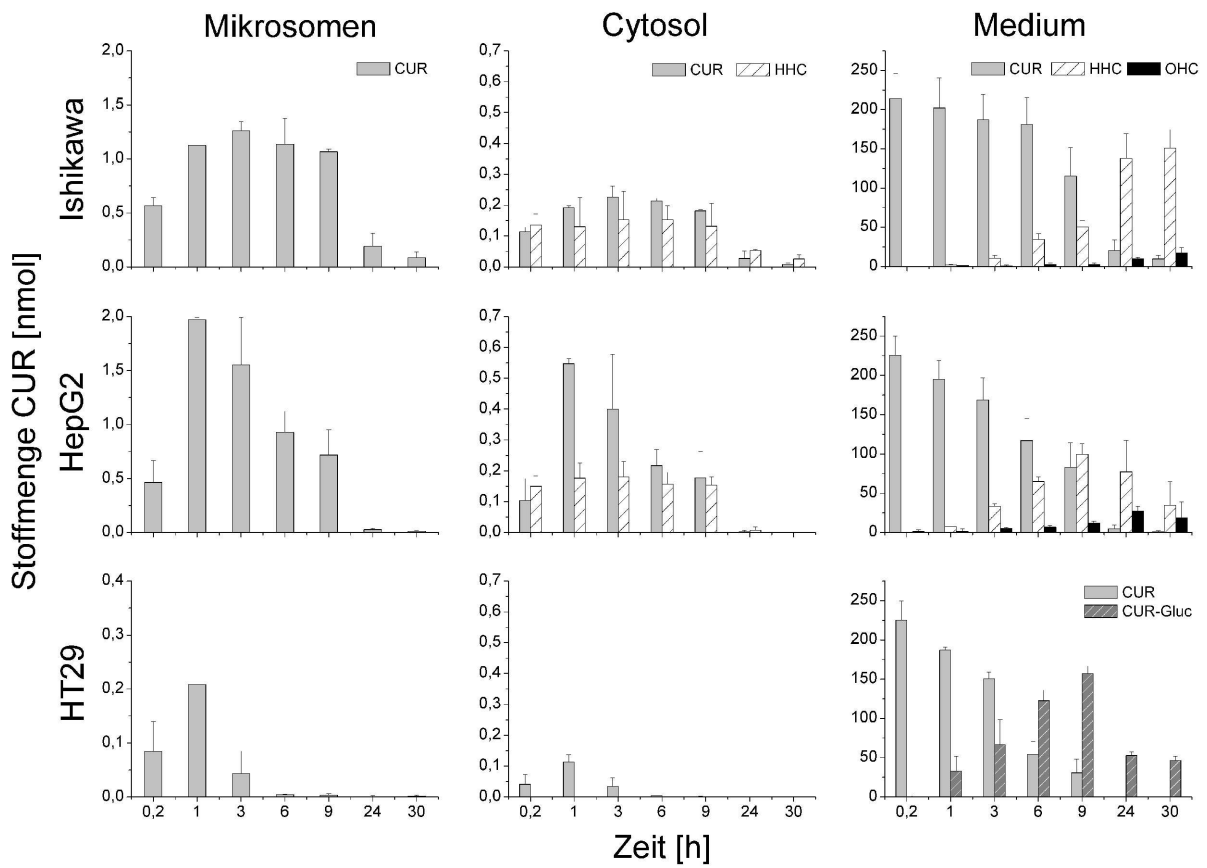


Abbildung 18: Verteilung von CUR und seinen Metaboliten in Ishikawa, HepG2 und HT29 Zellen nach Inkubation mit 30 µM CUR in Kulturmedium bis zu 30 h. Gezeigt ist die Stoffmenge an CUR, HHC, OHC und CUR-Glucuronid (CUR-Gluc) in den extrahierten Zellfraktionen der Membranen des ER (Mikrosomen) und des Cytosols sowie im Inkubationsmedium. Dargestellt sind jeweils die MW  $\pm$  SD aus drei unabhängigen Versuchen.

Nach der Inkubation mit CUR konnte beobachtet werden, dass CUR an die Zellen bindet, da die Zellpellets während der Aufarbeitung stark gelb gefärbt waren. CUR war in sehr hohen Gehalten im Zelldebris (welches eine Reihe unterschiedlicher Membranen beinhaltet) aller untersuchten Zellen zu finden. Es konnte in dieser Fraktion aber keine Unterscheidung zwischen außen an den Zellen anhaftendem CUR und wirklich in die Zellmembranen eingelagertem CUR gemacht werden. Daher sind die Daten hierzu nicht gezeigt. Die Aufnahme von CUR in alle drei Zelllinien erfolgte sehr schnell, da bereits nach 12 min Inkubations- und Aufarbeitungszeit mit 0,5 nmol CUR ein erheblicher Teil der maximal erreichbaren CUR-Menge in den Membranen des ER detektiert werden konnte. Die höchsten Mengen an CUR konnten in den Membranen des ER von HepG2 und den HT29 Zellen nach 1 h

bzw. in denen der Ishikawa Zellen nach 3 h gefunden werden. Die CUR-Gehalte in den Membranen des ER waren dabei drei- bis sechsmal höher als die in den Fraktionen des Cytosols. Sogar in der cytosolischen Fraktion der HepG2 Zellen wurde etwa 0,55 nmol CUR gefunden, in den Ishikawa Zellen lag das Maximum nach 3 h bei 0,25 nmol CUR, in den HT29 Zellen lag der höchste Gehalt nach 1 h bei ca. 0,1 nmol. In den HT29 Zellen war bereits nach 3 h kein CUR mehr im Cytosol nachweisbar. Bei der Inkubation von HepG2 und Ishikawa Zellen konnte sowohl im Inkubationsmedium als auch in den Fraktionen, die Cytosol enthielten, der reduzierte Metabolit HHC, im Kulturmedium zudem das weiter reduzierte OHC gefunden werden. Bei den HT29 Zellen konnten dagegen weder reduzierte noch glucuronidierte Metaboliten im Cytosol detektiert werden (s. Kap. 3.1).

Das Inkubationsmedium wurde ebenfalls zu allen Zeitpunkten aufgearbeitet und die Gehalte an CUR und den Metaboliten quantifiziert. Dadurch konnte der Zeitverlauf des Metabolismus der Zelllinien gezeigt werden (s. Abbildung 18). Die Reduktion von CUR zu HHC erfolgte durch lösliche Reduktasen im Cytosol und die reduzierten Metaboliten wurden an das Inkubationsmedium abgegeben. In den Ishikawa und HepG2 Zellen verlief die Reduktion im Vergleich zur Glucuronidierung des CUR durch HT29 Zellen langsamer und begann erst nach 3 h. Der Nachweis von Glucuroniden durch HT29 Zellen war bereits nach 1 h möglich. Die Ishikawa Zellen bildeten nach 3 h zunächst HHC, wobei verzögert eine Bildung von OHC nachgewiesen werden konnte. Bei den HepG2 Zellen kam es ab 9 h zur Abnahme der HHC-Konzentration und zur vermehrten OHC-Bildung. Die Instabilität des CUR-Glucuronid (s. Kap.1.1.3 [Pfeiffer et al., 2007]) bzw. eine mögliche Interaktion mit Proteinen könnte die geringen Mengen an CUR im Inkubationsmedium der HT29 Zellen nach Ablauf der Inkubationszeit von 30 h erklären.

Die Anreicherung von CUR in den drei Zelllinien konnte durch die Lyse, Fraktionierung und Extraktion der Zellfraktionen und des Inkubationsmediums nachgewiesen werden. In keiner der extrahierten Fraktionen konnte zu einem Zeitpunkt eines der bekannten Zerfallsprodukte detektiert werden. Die Bildung der Zerfallsprodukte wurde zwar nicht nachgewiesen, eine Entstehung und Reaktion dieser mit zellulären Proteinen konnte aber nicht ausgeschlossen werden. CUR wurde durch die Zellen stabilisiert und metabolisiert. Bevorzugt wurde CUR



in die Membranen des ER eingelagert, in geringerem Umfang im Cytosol gefunden. Im Medium konnten die abgegebenen Metaboliten direkt oder nach enzymatischer Hydrolyse mit Glucuronidase mit Hilfe von HPLC/DAD-Analysen quantifiziert werden.

#### 3.3.2 Aufnahme von Hexahydrocurcumin in die Zellen

Da bei der Inkubation von Ishikawa und HepG2 Zellen nach den oben genannten Inkubationszeiten von bis zu 30 h etwa 50 % des CUR zu HHC metabolisiert wurde, sollte geklärt werden, welche Einlagerungsfähigkeit in die Membranen des ER HHC besitzt. Darum wurden die drei Zelllinien Ishikawa, HepG2 und HT29 ebenfalls wie in Kap. 5.5 inkubiert, fraktioniert und die Extrakte mittels HPLC/DAD-Analyse quantifiziert.

Der reduzierte Metabolit HHC erwies sich verglichen mit CUR als deutlich stabiler und konnte bei vergleichbaren Inkubationsversuchen von 21 h im Kulturmedium wie in Kap. 3.1, Abbildung 9 nach Ablauf der Inkubationszeit zu fast 100 % wiedergefunden werden. Bei einer Inkubation mit Zellen blieb es stabil oder wurde von den Zellen metabolisiert. Auch hier konnte bei der Inkubation mit HHC zu keinem Zeitpunkt ein Hinweis auf entstehende Zerfallsprodukte gefunden werden.

In der Abbildung 19 sind die Substanzgehalte an HHC im extrahierten Inkubationsmedium der drei Zelllinien gezeigt.

HHC wurde durch Ishikawa Zellen langsamer zu OHC reduziert als durch HepG2 Zellen, während HT29 Zellen nur HHC-Glucuronid bildeten, welches über den Inkubationszeitverlauf von 30 h stabil blieb. In Abbildung 19 ist auch erkennbar, dass bei den jeweiligen 0,2 h-Werten der verschiedenen Zelllinien bereits OHC detektiert werden konnte. HHC wurde aus CUR durch katalytische Hydrierung gewonnen und dabei erfolgte eine Weiterreduktion zum OHC. Der reduzierte Metabolit OHC wurde durch HT29 Zellen ebenfalls gut glucuronidiert. Die Ergebnisse der extrahierten Inkubationsmedien mit HHC bestätigten die Resultate der Inkubation mit CUR für den Metabolismus der Zellen.

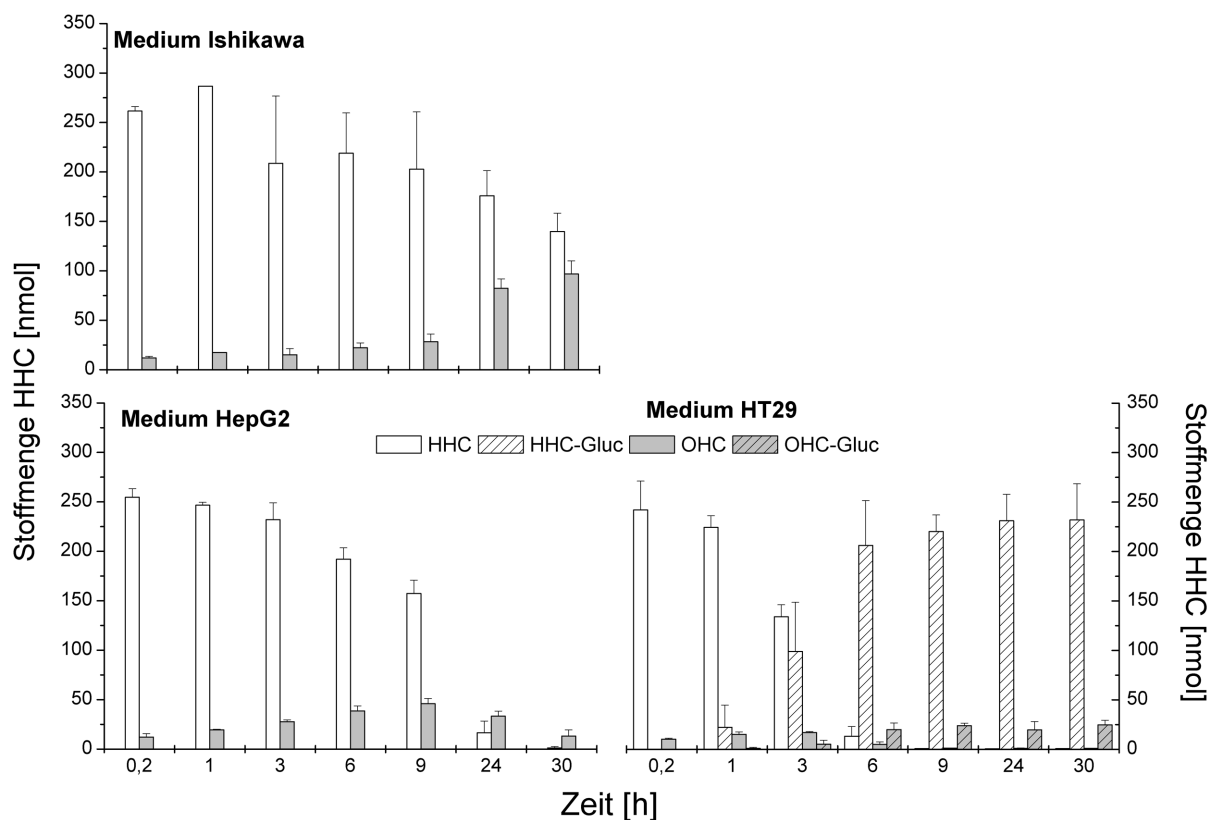


Abbildung 19: Kinetik von HHC und seinen Metaboliten in Ishikawa, HepG2 und HT29 Zellen nach Inkubation mit  $30 \mu\text{M}$  HHC in Kulturmedium bis zu 30 h. Dargestellt ist die Menge an HHC, HHC-Glucuronid (HHC-Gluc), OHC und OHC-Glucuronid (OHC-Gluc) des extrahierten Inkubationsmediums in nmol. Gezeigt sind die MW  $\pm$  Spannweiten (SW) von zwei unabhängigen Versuchen.

Abbildung 20 zeigt die Menge an HHC und OHC in der cytosolischen Fraktion der Ishikawa Zellen aus der Zellfraktionierung.

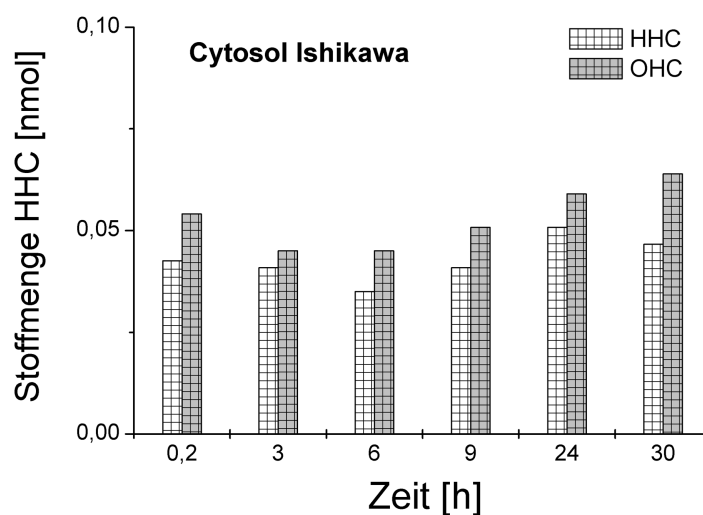


Abbildung 20: Verteilung von HHC und OHC in der cytosolischen Fraktion von Ishikawa Zellen. Die Stoffmenge ist in nmol angegeben. Gezeigt sind die Werte für einen repräsentativen Versuch.

HHC konnte in der cytosolischen Fraktion der Ishikawa Zellen nur in Spuren gefunden werden. Die Gehalte an HHC in den cytosolischen Fraktionen der anderen Zelllinien HepG2 und HT29 sowie in der ER-Fraktion der Ishikawa Zellen lagen unterhalb der Nachweisgrenze.

Durch die HHC-Inkubation analog der CUR-Versuche und der Fraktionierung der Zellen mittels UZ konnte gezeigt werden, dass HHC nicht in die Membranen des ER eingelagert wurde und nur in geringer Menge im Cytosol der Zellen vorkam ( $< 0,1$  nmol). In den HT29 Zellen wurde HHC vollständig glucuronidiert. Nach der gesamten Inkubationszeit von 30 h war HHC nach enzymatischer Hydrolyse der Glucuronide komplett nachweisbar.

Für die Curcuminoide iso-CUR und BDMC wurde ein Inkubationsversuch unter gleichen Inkubations- und Aufarbeitungsbedingungen durchgeführt. Nach 3 h konnten bei beiden Substanzinkubationen geringe Spuren an BDMC bzw. iso-CUR in den Membranfraktionen des ER detektiert werden.

### 3.3.3 Akkumulation von CUR in den Membranen des ER

Zur Abschätzung der intrazellulären CUR-Konzentration in den untersuchten Fraktionen der Zellen wurde die Konzentration mit Hilfe von Zellzahl- und -volumenbestimmungen berechnet. Der, wie in Kapitel 5.6 beschrieben, ermittelte durchschnittliche Zelldurchmesser lag bei den drei Zelllinien im gleichen Größenbereich. Als prozentuale Verteilung wurde gemäß Alberts et al. [2004] angenommen, dass das Cytosol 50 % der Zelle ausfüllt und die Membranen des ER 10 % der Zelle ausmachen. Die absolute Stoffmenge ermittelt aus Kap. 3.3.1 wurde auf diese Volumina bezogen, wobei die Ausgangskonzentration im Medium 30  $\mu\text{M}$  CUR war. Tabelle 9 führt die ermittelten Konzentrationen an CUR und HHC in den einzelnen Fraktionen auf.

Tabelle 9: Berechnete Konzentrationen an CUR und HHC im ER und Cytosol von Zellen, inkubiert mit 30  $\mu\text{M}$  CUR. n.d.: nicht detektierbar.

Zelllinie	Ishikawa	HepG2	HT29
Volumen pro Zelle (l)	$1,54 \times 10^{-12}$	$1,77 \times 10^{-12}$	$1,57 \times 10^{-12}$
Volumen von $2,5 \times 10^6$ Zellen (l)	$3,85 \times 10^{-6}$	$4,42 \times 10^{-6}$	$3,94 \times 10^{-6}$
Konzentration an CUR ( $\mu\text{M}$ )			
Im ER nach 1 h	2900	4400	530
Im ER nach 9 h	2800	1600	9
Konzentration von CUR/HHC ( $\mu\text{M}$ )			
Im Cytosol nach 1 h	100/70	250/80	60/n.d.
Im Cytosol nach 9 h	94/70	80/70	n.d.

Bereits nach einer Inkubationszeit von 1 h erreichte die Konzentration an CUR in den Membranen des ER 2,9 mM in den Ishikawa und 4,4 mM in den HepG2 Zellen. In den Ishikawa Zellen blieb diese Konzentration über die Inkubationszeit von bis zu 9 h konstant. Bei den HepG2 Zellen war demgegenüber noch ca. ein Drittel der Substanzkonzentration nach 9 h vorhanden. Im Gegensatz dazu erreichte die Konzentration in den HT29 Zellen nur 530  $\mu\text{M}$  nach 1 h und sank nach 9 h unter die Nachweisgrenze.

Auch die Konzentration im Cytosol war unterschiedlich: die HepG2 Zellen wiesen mit 250  $\mu\text{M}$  die höchste Menge an CUR auf. Im Gegensatz dazu blieb die Konzentration an CUR im Cytosol der Ishikawa Zellen wiederum konstant (ca. 100  $\mu\text{M}$ ). In den HT29 Zellen

konnte nur zu Beginn (1 h) 60  $\mu\text{M}$  CUR nachgewiesen werden, im Verlauf der Inkubationszeit fiel die CUR-Konzentration unter die Nachweisgrenze. Nachdem im Inkubationsmedium der Zellen eine sehr große Menge an HHC gefunden werden konnte, wurde ebenfalls der Gehalt an HHC im Cytosol berechnet. HHC wird im Cytosol durch lösliche Reduktasen gebildet. Erwartungsgemäß konnte in dieser Fraktion der HT29 Zellen kein HHC detektiert werden, da diese CUR nicht reduzierten. In den Ishikawa und HepG2 Zellen konnten konstante Mengen von etwa 70  $\mu\text{M}$  HHC bis zu einer Inkubationszeit von 9 h gefunden werden.

CUR wurde von den drei untersuchten Zelllinien unterschiedlich schnell aufgenommen und in verschiedenem Maße akkumuliert. Die Konzentrationen waren in den Fraktionen des ER drei- bis sechsmal höher als in den Fraktionen, die Cytosol enthielten. Die Anreicherung erreichte in den Membranen des ER Werte von bis zum 150-fachen der CUR-Ausgangskonzentration von 30  $\mu\text{M}$  im Inkubationsmedium; im Cytosol wurden immerhin noch 8-fach höhere CUR-Gehalte gefunden. Die Ishikawa Zellen zeigten über einen Zeitraum von 9 h konstante Gehalte. Die Konzentrationen an CUR in den HepG2 Zellen stiegen zu Beginn stärker an und betrugen nach 9 h noch ein Drittel des Ausgangswertes. Die Akkumulation in den HT29 Zellen war am geringsten und nach 9 h waren nur noch Spuren an CUR im Cytosol und in den Membranen des ER nachweisbar. Dennoch wurde CUR von den HT29 Zellen effizient aufgenommen, obwohl keine eindeutige Akkumulation verglichen mit den Ishikawa und HepG2 Zellen erfolgte.

CUR erreichte nach zellulärer Aufnahme in den Membranen sowie im zellinneren Kompartiment des ER sehr hohe Konzentrationen. Diese Konzentrationen sind nötig, um zelluläre Effekte zu erzielen. Da die Membranen der humanen Zellen sowohl Proteine als auch Lipide besitzen, kann keine Unterscheidung gemacht werden, an welche Bestandteile CUR bindet. Eine Proteinbindung wurde bereits für BSA [Barik et al., 2003], HSA [Kunwar et al., 2006; Pulla Reddy et al., 1999; Zsila et al., 2003b] oder Tubulin [Gupta et al., 2006; Holy, 2002] gezeigt. Eine Bindung an Lipide wurde hingegen noch nicht ausführlich charakterisiert. Erste Hinweise für eine Bindung an lipidreiche Liposomen [Kunwar et al., 2006] und PC [Maiti et al., 2007] wurden jedoch hierzu beschrieben.

Kunwar et al. [2008] untersuchten die zelluläre CUR-Aufnahme mit Hilfe von Zellfraktionierung und anschließender photometrischer Konzentrationsbestimmung. Eine verbesserte Aufnahme von CUR durch Tumorzellen gegenüber normalen Zellen konnte dabei bestätigt werden. Das lipophile CUR interagiert mit der Zellmembran und gelangt in der Zelle bis zum Kern. Eine Rolle bei der unterschiedlichen Aufnahme von CUR durch Krebs- bzw. normale Zellen könnte deren Membranstruktur, Proteinzusammensetzung und die Zellgröße spielen [Kunwar et al., 2008].

Jaruga et al. [1998] konnten zeigen, dass CUR mit der Zellmembran isolierter Erythrozyten interagieren kann. Das hat eine Störung des Membranaufbaus sowie eine erhöhte Permeabilität und Fluidität der Membranen zur Folge. Möglicherweise führt dieser Verlust einer intakten Zellmembran zum apoptotischen Zelltod. Unklar ist dabei allerdings die Übertragbarkeit auf Zellen, die einen Zellkern besitzen [Jaruga et al., 1998].

Die Akkumulation von CUR hat daher vielfältige Angriffspunkte:

- Eine Einlagerung in die Zellmembran könnte durch Erhöhung deren Permeabilität und Fluidität zur Apoptose führen [Jaruga et al., 1998].
- Eine erhöhte CUR-Konzentration beeinflusst die Polymerisationseigenschaften der MTP und stört somit einen geregelten Transport der Zellkompartimente mit Hilfe des Cytoskeletts sowie den vollständigen Ablauf der Mitose [Gupta et al., 2006; Holy, 2002].
- CUR kann den Zellkern erreichen, dies wurde mit Hilfe von Zellfraktionierung gezeigt [Kunwar et al., 2008]. Um Effekte auf die Transkription und Translation zu erzielen, muss CUR in den Zellkern transportiert werden. Ein Einfluss von CUR auf zahlreiche Gene und Proteine wurde beschrieben, wie z.B. Gene für Enzyme des Phase II-Metabolismus, für Tubulin, für p53 und Metallothionein [Breithofer et al., 1998; Chen et al., 2006a; Leu und Maa, 2002; Van Erk et al., 2004].

Die Wirkung von CUR auf zellulärer Ebene erscheint daher ein komplexes Zusammenspiel verschiedener Effekte zu sein. Vermutlich kann keine Differenzierung der einzelnen Auswir-

kungen getroffen werden, sondern es wird immer eine Mischung aller sein, da CUR keinen bevorzugten spezifischen Angriffspunkt besitzt.

## 3.4 Wirkungen von CUR im Verdauungstrakt

Die Bioverfügbarkeit von CUR ist gering [Anand et al., 2008b; Sharma et al., 2005], aber über den genauen Mechanismus der Resorption ist bisher wenig bekannt. Anhand des etablierten Caco-2 Millicell<sup>®</sup> Systems sollte die Aufnahme, Metabolisierung und Verteilung von CUR *in vitro* untersucht werden. Als Positivkontrolle wurde Coffein verwendet, dieses wird im Millicell<sup>®</sup> System gut resorbiert.

Neben der geringen Bioverfügbarkeit von CUR kommt eine Metabolisierung durch humane Fäzesbakterien in Betracht, so dass nicht CUR selbst, sondern bestimmte Metaboliten aufgenommen werden können. Über den Metabolismus von CUR durch intestinale Bakterien ist bisher nichts bekannt. Um die Methode zu etablieren, wurden die Pflanzeninhaltsstoffe der Leinsamen, die sogenannten Lignane untersucht. Für diese ist der Metabolismus durch humane Darmbakterien bekannt [Heinonen et al., 2001; Wang et al., 2000]. Den Metaboliten wird eine andere Wirkung zugeschrieben als der Muttersubstanz. Da CUR strukturell den Säugerlignanen ähnelt, sollte überprüft werden, ob es mit anaeroben Fäzesbakterien analoge Reaktionen zeigt.

In den folgenden Kapiteln ist die Resorption von den Curcuminoiden in den Caco-2 Zellen und der untersuchte Metabolismus von CUR und HHC durch intestinale anaerobe Darmbakterien dargelegt.

### 3.4.1 Das Millicell<sup>®</sup> System

Das Modell der Caco-2 Zellen dient zur Simulation der Aufnahme und Metabolisierung verschiedener Xenobiotika im Darm. Unter konventionellen Zellkulturbedingungen und nach dem Erreichen der Konfluenz auf mikroporösen Polyethylenterephthalat (PET) Membranen differenzieren Caco-2 Zellen spontan zu Enterocyten und ähneln somit dem Dünndarmepithel. Verschiedene aktive Transportprozesse werden von den Zellen ausgeführt und En-

zyme der humanen Bürstensaummembran werden exprimiert, z.B.: AIP oder Saccharoseisomaltase (s. Kap. 1.2.1). Die Membranen aus PET werden auch als Inserts bezeichnet und teilen das Medium in zwei Kompartimente. Das obere wird apikales Kompartiment genannt und bezeichnet die Seite, die zum Darmlumen zeigt. Das untere Kompartiment wird dabei als basolaterales bezeichnet und zeigt zur Blutseite. Bei der Substanzinkubation kann überprüft werden, auf welche Seite – apikal oder basal – des Darmes eine Substanz möglicherweise abgegeben wird. Abbildung 21 gibt einen schematischen Überblick über ein Well mit Insert.

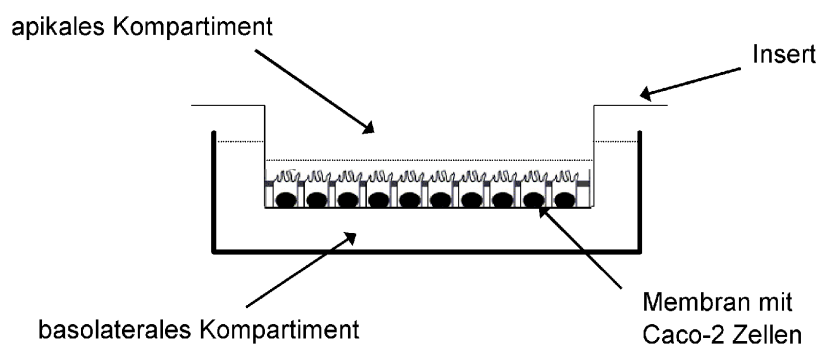


Abbildung 21: Schematische Darstellung eines Wells mit Insert, auf dem sich der Caco-2 Monolayer befindetet.

Die Caco-2 Zellen werden auf dünnen PET-Membranen ausgesät. Nach der vollständigen Adhäsion der Zellen beginnen sie nach ca. 7 Tagen auszudifferenzieren. Dabei bilden sich zwischen den Zellen Tight Junctions aus, so dass ein dichter Zellrasen entsteht. Mit Hilfe der Messung des transepithelialen elektrischen Widerstands (transepithelial electrical resistance, TEER) kann die Intaktheit des Rasens bestimmt werden. Ab einer Zahl von  $300 \Omega \times \text{cm}^2$  gilt die Platte als dicht und die Versuche können durchgeführt werden. Der intakte Monolayer ist ab ca. dem 21. Tag erreicht (Durchführung s. Kap. 5.13.2). Im Anschluss an die Substanzinkubation wird deren Einfluss auf den Monolayer überprüft. Dazu wird der Zellmonolayer mit dem Markermolekül Lucifer Yellow (LY) apikal inkubiert und gemessen, welche Farbstoffmenge basolateral nach 1 h detektiert werden kann (s. Kap. 5.13.2). In den folgenden Kapiteln sind die Ergebnisse der Inkubationen im Caco-2 Millicell<sup>®</sup> System aufgeführt.



Einige Vorversuche wurden durchgeführt, um den Metabolismus von CUR und die Empfindlichkeit der Zellen auf die Substanz zu überprüfen. Dabei zeigten die Caco-2 Zellen sowohl die Fähigkeit zur Reduktion als auch zur Glucuronidierung und zur Sulfatierung. Die konjugierten Metaboliten wurden indirekt nach enzymatischer Hydrolyse erfasst (s. Kap. 5.13.6).

### 3.4.2 Resorption von Coffein

Coffein wird aufgrund seiner gut charakterisierten Resorptionseigenschaften als Markermolekül im Caco-2 System verwendet [Kuwayama et al., 2007; Liang et al., 2000]. Zur Überprüfung des verwendeten Systems verglichen mit den Daten der Literatur wurden Transportexperimente mit Coffein durchgeführt. Die Resorption von Coffein im 6-Well und im 24-Well System ist in Abbildung 22 dargestellt.

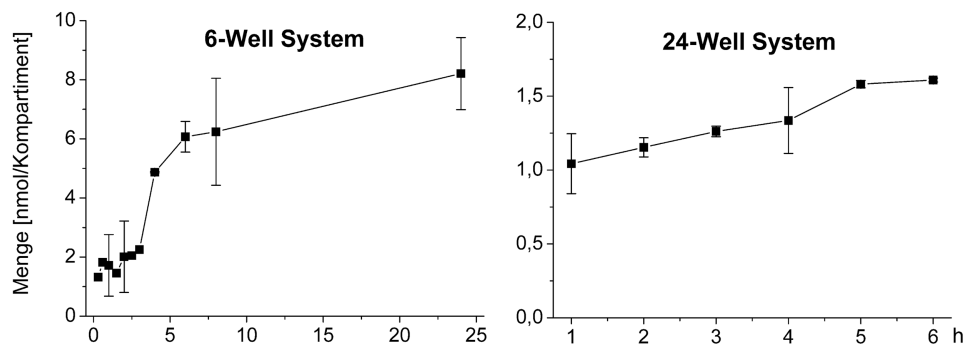


Abbildung 22: Resorption von Coffein im 6-Well und im 24-Well System. Dargestellt sind die MW  $\pm$  SD bzw. SW. Die Ergebnisse des 6-Well Systems stammen aus drei, die des 24-Well Systems aus zwei unabhängigen Bestimmungen.

Im 6-Well System wurde Coffein nach apikaler Inkubation bis zum Zeitpunkt von 8 h in großer Menge auf die basolaterale Seite transportiert und dieser Transport stieg danach kaum weiter an. Weniger steil verlief der Anstieg der Resorption im 24-Well System. Tabelle 10 zeigt die prozentualen Anteile an Coffein auf der basolateralen Seite. Erkennbar ist, dass die Substanzmenge im basolateralen Kompartiment mit der Zeit zunimmt. Im 24-Well System war zu jedem Zeitpunkt basolateral mehr Coffein vorhanden als im 6-Well System.

In der Literatur liegen die  $P_{app}$ -Werte für Coffein zwischen  $23 \times 10^{-6}$  und  $53 \times 10^{-6}$  cm/s [Young et al., 2006]. Bezogen auf die von Artursson und Karlsson [1991] aufgestellte Beziehung zwischen dem  $P_{app}$ -Wert und der Resorption im Menschen entsprechen diese Werte einer hohen Aufnahme nach oraler Gabe.

Tabelle 10: Prozentualer Anteil an Coffein auf der Akzeptorseite nach unterschiedlichen Inkubationszeiten.

Zeit [h]	Menge in % im 6-Well	Menge in % im 24-Well
1	9	26
6	30	40
24	41	nicht bestimmt

Die berechneten  $P_{app}$ -Werte waren für die beiden Systeme unterschiedlich, da die Resorption im 6-Well und im 24-Well System nicht in gleichem Maße erfolgte. Im 24-Well System wurde zu allen Zeitpunkten ein höherer Wert als im 6-Well System erhalten. Nach 1 h betrug der  $P_{app}$ -Wert im 6-Well System  $10,6 \times 10^{-6} \pm 6,4 \times 10^{-6}$  cm/s und im 24-Well System  $41,4 \times 10^{-6} \pm 8,1 \times 10^{-6}$  cm/s. Auch in der Literatur wird dieser Unterschied bei verschiedenen Membranoberflächen beschrieben. Bei einer Membranoberfläche von  $4,7 \text{ cm}^2$  pro Well wurde für Coffein ein  $P_{app}$ -Wert von  $31 \times 10^{-6}$  cm/s [Gan, 1997] sowie bei  $2,45 \text{ cm}^2$  ein  $P_{app}$ -Wert von  $30,8 \times 10^{-6}$  cm/s erreicht [Liang et al., 2000]. Im Gegensatz dazu wurde bei einer Membranoberfläche von  $0,83 \text{ cm}^2$  pro Well ein Wert von  $51 \times 10^{-6}$  cm/s ermittelt [Yee, 1997]. Möglicherweise ist der Grund dafür die große Oberfläche im 6-Well System. Die Resorption und Abgabe einer Substanz bei der großen Fläche von  $4,52 \text{ cm}^2$  verläuft eventuell nicht so gleichmäßig wie auf der kleineren Fläche mit  $0,7 \text{ cm}^2$ .

Mit zunehmender Inkubationszeit konnte bei beiden Insertgrößen auch ein Abfall des  $P_{app}$ -Wertes beobachtet werden (Abbildung 23). Die Resorption war somit zu Beginn der Inkubation am höchsten und fiel danach kontinuierlich ab.

Der aus diesen Versuchen ermittelte  $P_{app}$ -Wert im 24-Well System liegt genau im Bereich der Literaturwerte. Im 6-Well System ist der berechnete Wert etwas niedriger als die Literaturangaben. Verglichen mit der sigmoiden Kurve von Artursson und Karlson [1991] ergeben aber beide berechneten  $P_{app}$ -Werte eine hohe Resorption im Menschen nach oraler Gabe.

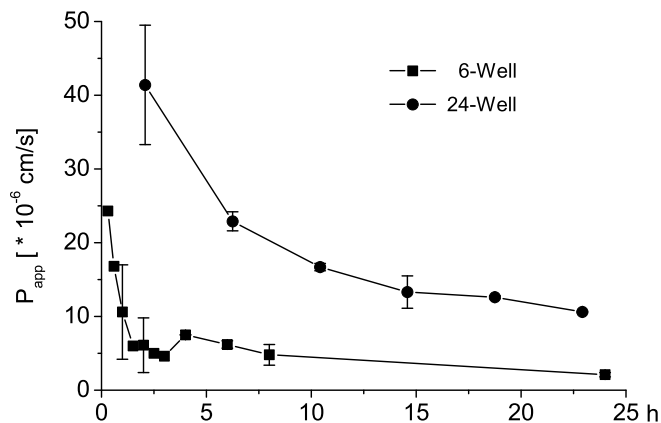


Abbildung 23: Verlauf des  $P_{app}$ -Wertes für Coffein mit der Zeit. Dargestellt sind die  $MW \pm SD$  von drei unabhängigen Bestimmungen.

Die Transportversuche wurden in der Literatur entweder in DMEM/F12-Medium oder Hank's Buffered Salt Solution (HBSS) durchgeführt. Mit Hilfe eines Transportversuches mit Coffein wurde überprüft, ob das Inkubationsmedium einen Einfluss auf die Resorption hat. Der gleiche Ansatz im 6-Well System wurde mit einer Coffeinkonzentration von  $10 \mu\text{M}$  im apikalen Kompartiment und Probenentnahme auf der basolateralen Seite zwischen 2 und 24 h jeweils in DMEM/F12-Medium oder in HBSS durchgeführt. Dabei war kein Unterschied für den Verlauf der Coffeinresorption zwischen Medium und Puffer erkennbar.

### 3.4.3 Stabilität und Metabolisierung der Curcuminoide im Millicell<sup>®</sup> System

#### Stabilität in HBSS:

Zur Überprüfung der Stabilität der Curcuminoide im Inkubationspuffer HBSS wurden CUR, BDMC und iso-CUR über einen Inkubationszeitraum von bis zu 6 h in HBSS bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  zellfrei inkubiert und extrahiert. Abbildung 24 zeigt die wiedergefundene Substanzmenge über die Zeit.

CUR war unter diesen Inkubationsbedingungen bereits nach etwa 1 h zu 75 % zerfallen und konnte nach 6 h nur noch in Spuren (3 %) detektiert werden, wohingegen BDMC und iso-CUR über den gesamten Inkubationszeitraum stabil blieben. In DMEM/F12-Medium (s. Kap. 3.1) war nach 1 h Inkubationszeit im Gegensatz zur Inkubation in HBSS noch 54 % des CUR detektierbar. Eine Inkubation in HBSS beschleunigt somit den CUR-Zerfall.

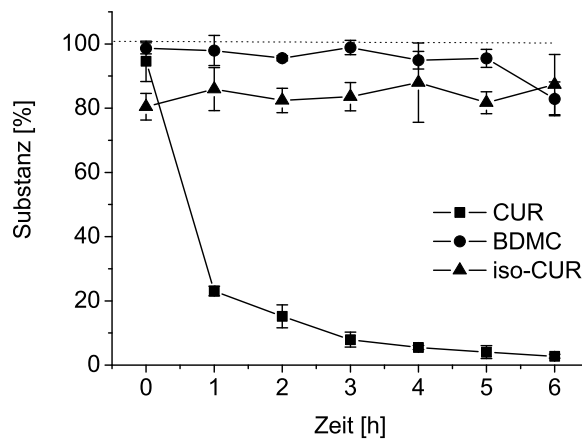


Abbildung 24: Zeitabhängiger Substanzverlust von CUR, BDMC und iso-CUR in HBSS. Die Substanzkonzentration betrug jeweils  $50 \mu\text{M}$ . Dargestellt sind die MW  $\pm$  SW von zwei unabhängigen Bestimmungen.

#### Reduktion durch basolateral abgenommenes Medium:

Die Reduktion der Curcuminoide erfolgte schnell und effizient, so dass überprüft werden sollte, ob die Caco-2 Zellen unspezifische Reduktasen an das Kulturmedium abgeben, die eine Bildung der reduzierten Metaboliten außerhalb der Zellen ermöglichten. Dazu wurden die Zellen normal kultiviert und am 21. Tag nach dem Ausstreuen das apikale und das basolaterale Kultivierungsmedium abgenommen (es war zu diesem Zeitpunkt ca. 2 Tage auf den Monolayern) und es wurde bis zu 3 h mit CUR sowie HHC inkubiert (s. Kap. 5.13.4). Abbildung 47 im Anhang zeigt, dass es bei CUR zwar zu einer leichten Konzentrationsabnahme kam, gleichzeitig aber war kein Konzentrationsanstieg an HHC oder OHC zu erkennen. Bei einer Inkubation mit HHC konnte ebenfalls keine Reduktion zu OHC beobachtet werden. Die reduzierten Metaboliten werden deshalb nicht durch apikal oder basolateral abgegebene Enzyme gebildet.

#### Sulfatierung der Curcuminoide:

Die Sulfatierung ist eine wichtige Konjugationsreaktion der Caco-2 Zellen, die durch lösliche Sulfotransferasen katalysiert wird. Die gebildeten Sulfate wurden indirekt nach Spaltung mit Sulfatase aus *Acetobacter aerogenes* nachgewiesen. Zur Überprüfung, ob diese gefundenen Sulfate tatsächlich gebildet werden, wurden die hydrierten Curcuminoide HHC,

HHBDMC und iso-HHC mit aktiviertem Sulfat (PAPS) als Cosubstrat und cytosolischem Protein aus der Rattenleber nach 5.13.5 umgesetzt und die Retentionszeiten mit denen der Kontrolle (ohne PAPS) verglichen. Zur Erfassung der Sulfate wurde dem Eluenten bei der HPLC/DAD-Analyse ein Ionenpaar-Reagenz zugesetzt. Dieses drängt die starke Dissoziation der Sulfatgruppe bei der Messung zurück. Ein Teil der Probe wurde mit Sulfatase hydrolysiert.

Alle drei reduzierten Curcuminoide wurden sulfatiert und im HPLC-Chromatogramm konnten nach der Umsetzung mit Rattenlebercytosol und PAPS vier neue Peaks detektiert werden. Nach enzymatischer Hydrolyse mit Sulfatase waren diese Peaks nicht mehr erkennbar. Es handelt sich vermutlich um drei monosulfatierte Konjugate (Sulfatierung am aromatischen Ring und an den beiden OH-Gruppen im  $\beta$ -Diketo-Strukturelement) und ein disulfatiertes Konjugat. Bei der Inkubation mit den Caco-2 Zellen spielt die Position der Sulfatgruppe keine Rolle, da hier ebenfalls vor der HPLC-Analyse eine enzymatische Spaltung mit Sulfatase durchgeführt wurde. Dabei wurde aus der Differenz zwischen ungespaltener und enzymatisch gespaltener Probe der Gehalt an Sulfat bestimmt. Der Umsatz war bei allen drei reduzierten Curcuminoiden vergleichbar.

#### 3.4.4 Bilanzierung der Curcuminoide

Um den Substanzverlust bei Inkubationen mit CUR, HHC, BDMC und iso-CUR abschätzen zu können, wurden in 6-Well Platten ohne Inserts Bilanzierungsversuche durchgeführt. Die Inkubation erfolgte am 21. Tag mit einer Substanzkonzentration von 50  $\mu$ M in HBSS für 3 h. Dazu wurden das Inkubationsmedium und das Zelllysat der abgeschabten Zellen analysiert und die ermittelten Stoffmengen quantifiziert (siehe Kap. 5.13.6).

Da sich CUR in HBSS als instabiler erwies als im DMEM/F12-Medium, wurden diese Versuche für CUR sowohl in HBSS als auch in DMEM/F12 durchgeführt.

Tabelle 11 zeigt, dass die Addition der Gehalte von CUR, seiner Metaboliten und deren Menge in den Zellen eine Wiederfindung von 18 % nach der Inkubation in HBSS ergab. Für HHC wurden nach der Addition der HHC-Gehalte in HBSS und im Monolayer 46,6 % wiedergefunden.

Tabelle 11: Bilanzierung der Inkubation mit 50  $\mu\text{M}$  CUR oder HHC in HBSS in einer 6-Well Platte ohne Inserts für 3 h. Die MW  $\pm$  SW stammen aus zwei unabhängigen Versuchen. Die Absolutmenge ist im Medium auf nmol/4 ml und bei den Zellen auf nmol/Insert bezogen. n.d.: nicht detektiert.

Substanz	Absolutmenge		Menge in %	
	bei Inkubation mit CUR	HHC	bei Inkubation mit CUR	HHC
CUR	1,51 $\pm$ 0,87	-	1,50 $\pm$ 0,96	-
HHC	2,61 $\pm$ 0,25	6,68 $\pm$ 5,05	2,69 $\pm$ 0,16	7,43 $\pm$ 5,53
OHC	0,96 $\pm$ 0,43	6,31 $\pm$ 6,13	1,00 $\pm$ 0,48	7,00 $\pm$ 6,74
CUR-Gluc	0,19 $\pm$ 0,22	-	0,19 $\pm$ 0,22	-
HHC-Gluc	1,26 $\pm$ 0,01	0,92 $\pm$ 1,29	1,30 $\pm$ 0,06	1,04 $\pm$ 1,46
OHC-Gluc	0,05 $\pm$ 0,06	0,11 $\pm$ 0,16	0,05 $\pm$ 0,07	0,12 $\pm$ 0,18
CUR-Sulfat	n.d.	-	n.d.	-
HHC-Sulfat	5,83 $\pm$ 0,22	11,64 $\pm$ 5,26	6,03 $\pm$ 0,00	13,07 $\pm$ 6,10
OHC-Sulfat	4,76 $\pm$ 2,97	15,64 $\pm$ 2,31	4,99 $\pm$ 3,26	17,52 $\pm$ 2,87
CUR im Zelllysate	0,04 $\pm$ 0,01	-	0,04 $\pm$ 0,01	-
HHC im Zelllysate	0,03 $\pm$ 0,03	0,04 $\pm$ 0,05	0,03 $\pm$ 0,03	0,04 $\pm$ 0,05
OHC im Zelllysate	0,20 $\pm$ 0,02	0,34 $\pm$ 0,24	0,20 $\pm$ 0,03	0,38 $\pm$ 0,26
			$\Sigma = 18,02$	$\Sigma = 46,60$

Mögliche Ursache für die geringe Wiederfindung von CUR könnte die Instabilität von CUR (Abbildung 24) in HBSS und eine mögliche Nichtdetektion einiger Metaboliten sein. In der Literatur ist beschrieben, dass CUR zwei GSH-Addukte bildet [Usta et al., 2007]. Diese konnten aber in diesem System nicht erfasst werden. Bei einer Inkubation von CUR in DMEM/F12 konnten 24 % des eingesetzten CUR wiedergefunden werden. Dies deckt sich mit den Ergebnissen der Stabilität. Die Ergebnisse der Bilanzierungsversuche von CUR und HHC in DMEM/F12 sind in der Tabelle 24 im Anhang aufgelistet. Die Wiederfindung ist mit 53 % für HHC bei dieser Inkubation nur geringfügig besser verglichen mit den oben genannten Ergebnissen in HBSS.

Im Gegensatz zu CUR erwiesen sich iso-CUR und BDMC in HBSS als deutlich stabiler (s. Kap. 3.4.3), aber es konnten in den Bilanzierungsversuchen verglichen mit CUR ähnlich nied-

rige Werte wiedergefunden werden. Wie in den Tabellen 25 und 26 im Anhang zu erkennen, lagen die Wiederfindungen ebenfalls nur bei 19,5 % für iso-CUR und bei 33,4 % für BDMC in HBSS.

Obwohl iso-CUR wie in Kap. 3.4.3 gezeigt, gut sulfatiert wurde, konnten bei den Bilanzierungsversuchen keine Hinweise auf sulfatierte Konjugate gefunden werden. Der Substanzverlust kann nicht in Einklang mit der Stabilität gebracht werden, daher wurden vermutlich nicht alle gebildeten Metaboliten im Inkubationsmedium und im Zellysat erfasst.

### 3.4.5 Resorption von CUR

Da sich eine CUR-Konzentration von 30  $\mu\text{M}$  als zu niedrig für eine ausreichende Detektion erwies, wurde im Folgenden die Inkubation im Millicell<sup>®</sup> System mit 50  $\mu\text{M}$  CUR durchgeführt. Die Inkubationen erfolgten sowohl von der apikalen als auch von der basolateralen Seite über einen Zeitraum von bis zu 6 h. Die Proben wurden wie in Kap. 5.13.6 aufgearbeitet.

#### **Inkubation mit CUR von der apikalen Seite:**

Die Ergebnisse der apikalen Inkubation mit CUR zeigt Abbildung 25.

Nach Zugabe von CUR konnten nur geringe Mengen unmetabolisiertes CUR auf der basolateralen Seite detektiert werden, obwohl die Konzentration an CUR auf der apikalen Seite deutlich abnahm. Nach 1 h waren im Bezug auf den Anfangswert noch ca. 11 % CUR vorhanden und der Gehalt sank im Verlauf der Inkubationszeit auf 1 %. Das CUR-Glucuronid wurde fast ausschließlich in das basolaterale Kompartiment transportiert. Mit steigender Inkubationszeit wurde mehr CUR-Glucuronid als reine Muttersubstanz basolateral abgegeben. CUR wurde nur in geringem Maß sulfatiert und ausschließlich auf der basolateralen Seite detektiert. Wie bereits beschrieben (s. Kap. 3.4.1), wurden reduzierte Metabolite gebildet, die zudem glucuronidiert oder sulfatiert wurden. Die reduzierten Metaboliten HHC und OHC wurden überwiegend im apikalen Kompartiment gefunden. Insgesamt lagen bilanziert nach 1 h ca. 10 % des CUR als reduzierte Metaboliten vor, jedoch konnten basolateral nur geringe Mengen an reduzierten Metaboliten (hauptsächlich sulfatiert) detektiert werden. Der Gehalt an HHC-Sulfat lag zwischen 1 und 3 %, der des OHC-Sulfates bei etwa 1 %. Bis zu 0,5 % HHC-Sulfat konnten auch apikal gefunden werden.

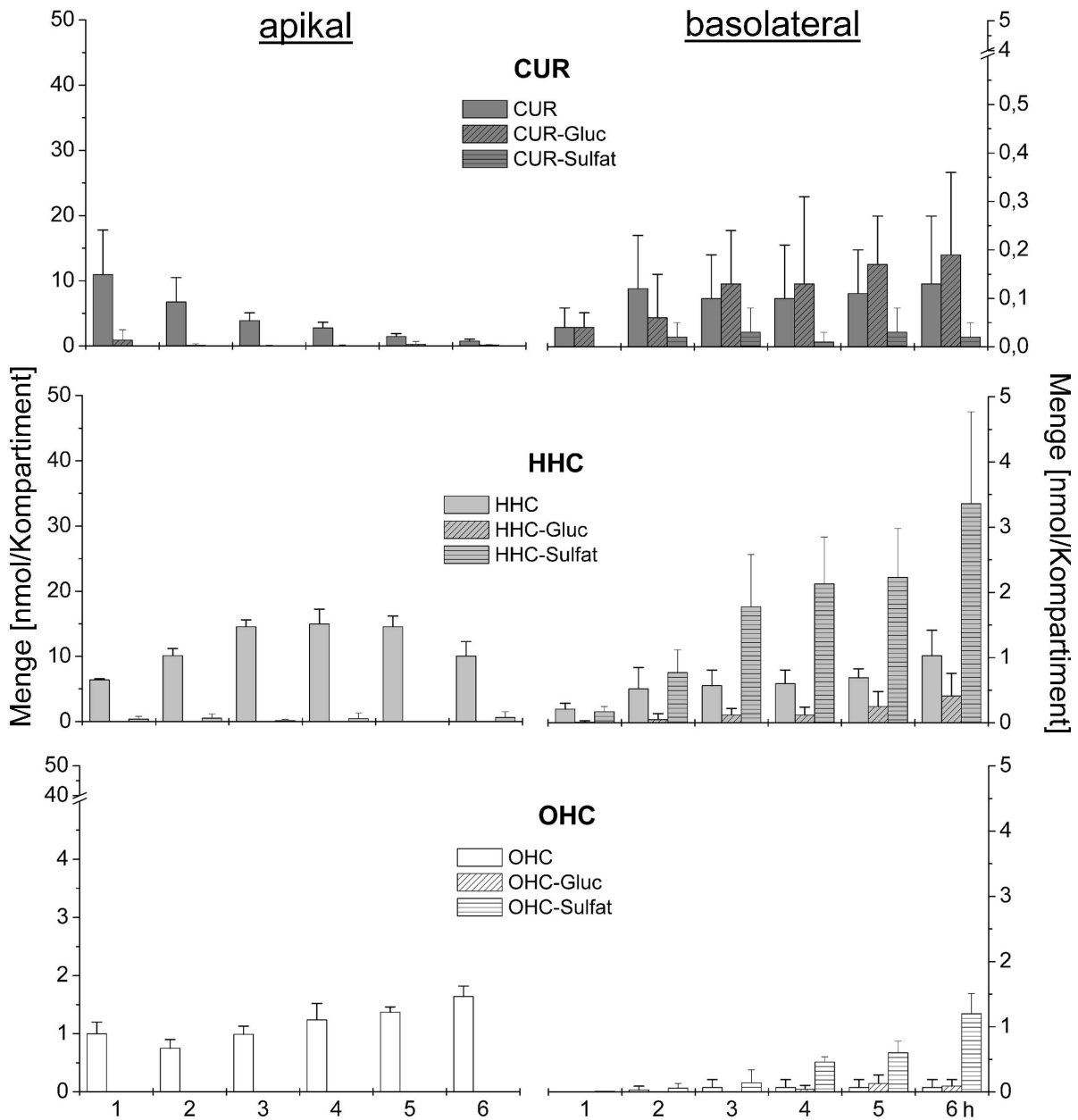


Abbildung 25: Zeitverlauf der Metabolisierung und Abgabe der Metaboliten an das jeweilige Kompartiment nach Inkubation der Caco-2 Zellen mit 50  $\mu$ M CUR in HBSS von der apikalen Seite bis zu 6 h. Dargestellt sind die MW  $\pm$  SD aus drei unabhängigen Versuchen.



Glucuronide von HHC und OHC waren apikal nicht und nur in Spuren auf der basolateralen Seite zu detektieren.

Um den Verbleib von CUR in den Caco-2 Zellen zu überprüfen, wurden die Zellen mit den Inserts ausgeschnitten, das gesamte Insert mit Folch-Reagenz extrahiert und die Extrakte per HPLC/DAD analysiert. Mit der in Kap. 5.13.6 beschriebenen Methode können aber nur CUR, HHC und OHC erfasst werden, nicht jedoch die nichtextrahierbaren Sulfate und Glucuronide. Abbildung 26 gibt die gefundene Menge an CUR, HHC und OHC im Monolayer der Caco-2 Zellen an.

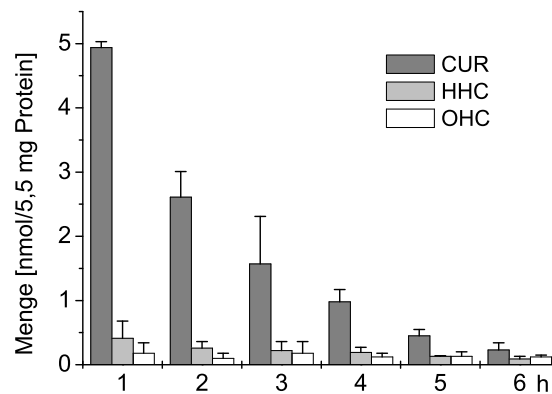


Abbildung 26: Menge an CUR, HHC und OHC in den Caco-2 Zellen nach Inkubation mit 50  $\mu$ M CUR in HBSS von der apikalen Seite bis zu 6 h. Dargestellt sind die MW  $\pm$  SW aus zwei unabhängigen Versuchen.

CUR wurde, wie auch in den anderen untersuchten Zelllinien (s. Kap. 3.3.1), zu Beginn der Inkubationszeit von 1 h sehr stark akkumuliert. Nach 1 h wurden 5 % des inkubierten CUR in den Zellen detektiert und diese Menge nahm mit der Zeit wieder ab. HHC und OHC reicherten sich dagegen in den Zellen kaum an (0,4 und 0,2 %).

#### **Inkubation mit CUR von der basolateralen Seite:**

Wenn der Caco-2 Monolayer basolateral inkubiert wurde, gelangten nur 0,01 % CUR ins apikale Kompartiment (s. Abbildung 48 im Anhang). Nach einer Inkubationszeit von 1 h waren auf der basolateralen Seite noch 9 % CUR vorhanden, die Menge von 4 % CUR blieb über den weiteren Inkubationszeitraum konstant. Auf der Donorseite wurden etwa 15 %

CUR-Glucuronid und ca. 5 % CUR-Sulfat gefunden. Die reduzierten Metaboliten wurden ebenfalls fast ausschließlich auf der Donorseite gefunden, davon 5 % als HHC und 1 % als OHC. HHC wurde wiederum sulfatiert und das HHC-Sulfat war in beiden Kompartimenten mit weniger als 0,3 % zu finden. Das Sulfat von OHC war nur in Spuren im apikalen Kompartiment detektierbar.

Zusammengenommen wurde CUR nach Inkubation von beiden Kompartimenten schlecht resorbiert, schnell reduziert und die reduzierten Metaboliten konjugiert. CUR wurde nur wenig im Akzeptorkompartiment gefunden, HHC und OHC wurden an das Donorkompartiment abgegeben. Konjugierte Metabolite wurden ebenfalls vorwiegend an die basolaterale Seite abgegeben. In einer Arbeit, in der die Resorption mit dem Caco-2 System untersucht wurde, konnte gezeigt werden, dass die Zellen mit CUR GSH-Addukte bildeten. Aber es wurden keine konjugierten oder reduzierten Metaboliten des CUR detektiert [Usta et al., 2007].

#### 3.4.6 Resorption von HHC

##### **Inkubation mit HHC von der apikalen Seite:**

Um die Resorptionsergebnisse des CUR mit denen seines Hauptmetaboliten zu vergleichen, wurden dieselben Resorptionsversuche mit 50  $\mu$ M HHC bis zu 6 h durchgeführt. Die Inkubation erfolgte wie für CUR in HBSS vom apikalen und basolateralen Kompartiment. Abbildung 27 zeigt die Ergebnisse der apikalen Inkubation.

Bei der Inkubation nahm die HHC-Menge im apikalen Kompartiment deutlich langsamer ab als bei den Versuchen mit CUR. Nach einer einstündigen Inkubation waren noch 67 % HHC und nach 6 h 25 % HHC auf der apikalen Seite vorhanden. Über den gesamten Inkubationszeitraum gelangten nur zwischen 3 und 4 % unmetabolisiertes HHC ins basolaterale Kompartiment. Diese Menge blieb über die gesamte Zeit unverändert. HHC-Sulfat wurde auf die Donorseite nur wenig abgegeben, während auf der basolateralen Seite sowohl HHC-Glucuronid als auch Sulfat zu finden war. Dabei trat das Glucuronid nur in Spuren von etwa 1 % auf, wohingegen die Sulfatmenge mit der Zeit von 1 auf 4 % zunahm. Der reduzierte Metabolit des HHC, OHC wurde zu beiden Seiten, jedoch vermehrt auf die

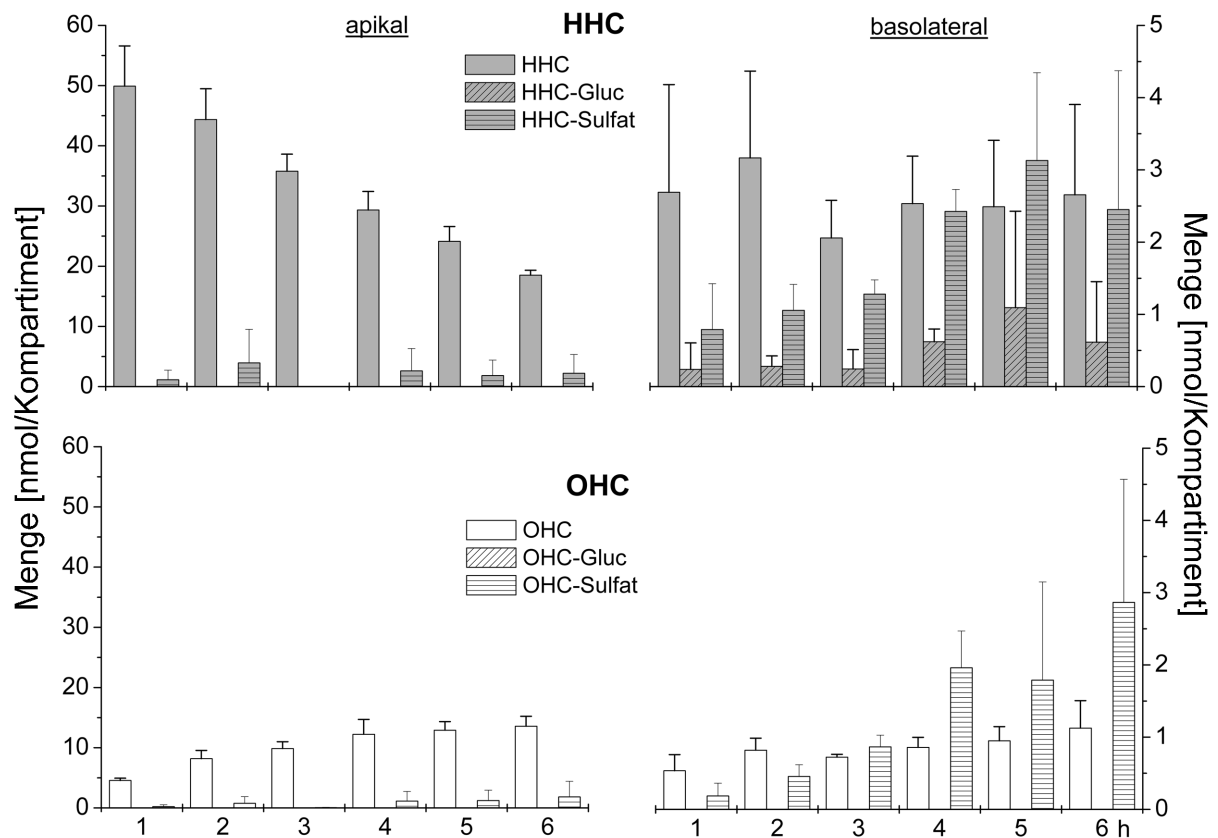


Abbildung 27: Zeitverlauf der Metabolisierung und Abgabe der Metaboliten an das jeweilige Kompartiment nach Inkubation der Caco-2 Zellen mit  $50 \mu\text{M}$  HHC in HBSS von der apikalen Seite bis zu 6 h. Dargestellt sind die MW  $\pm$  SD aus drei unabhängigen Versuchen.

apikale Seite abgegeben. Der Gehalt an OHC auf der apikalen Seite stieg von 6 % nach 1 h Inkubation auf 18 % nach 6 h Inkubation an, ins basolaterale Kompartiment gelangte jedoch nur 1 % OHC. OHC wurde nicht glucuronidiert gefunden, die gebildete Sulfatmenge stieg in beiden Kompartimenten von 0,1 auf 4 % an.

Um den Gehalt an HHC in den Monolayern abzuschätzen, wurden hier ebenfalls die Inserts ausgeschnitten und gemäß Kap. 5.13.6 aufgearbeitet. Die detektierten Substanzgehalte von HHC und OHC sind in Abbildung 28 dargestellt.

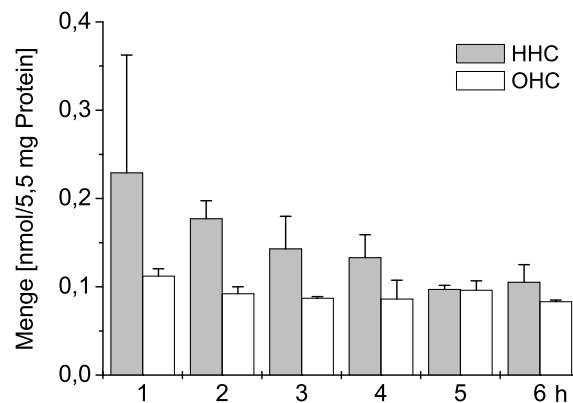


Abbildung 28: HHC-Stoffmenge in den Caco-2 Zellen nach Inkubation mit 50  $\mu\text{M}$  HHC. Dargestellt sind die MW  $\pm$  SW von zwei unabhängigen Bestimmungen.

Im Gegensatz zu CUR wurden deutlich geringere Mengen an HHC und OHC in den Zellen angereichert. Nur etwa 0,5 % an HHC und OHC konnte in den Zellen gefunden werden.

#### **Inkubation mit HHC von der basolateralen Seite:**

Wurde mit HHC von der basolateralen Seite inkubiert, blieb dessen Menge im Donorkompartiment über den gesamten Inkubationszeitraum unverändert (Ergebnisse in Abbildung 49 im Anhang). Zwischen 80 und 90 % des HHC konnten auf der basolateralen Seite wiedergefunden werden. Weniger als 1 % HHC wurde in das apikale Kompartiment transportiert. In beiden Kompartimenten war wenig OHC zu finden, etwas größere Mengen wurden auf der Donorseite gefunden. Auf der basolateralen Seite konnten nur zu einigen Zeitpunkten geringe Mengen an HHC-Glucuronid gefunden werden.

Zusammenfassend zeigte sich, dass HHC ebenso wie CUR, schlecht aus dem apikalen Kompartiment aufgenommen werden konnte. Bei einer Inkubation von der basolateralen Seite gelangte so gut wie kein HHC in die Zellen. Die konjugierten Metabolite wurden auch hierbei vorwiegend ins basolaterale Kompartiment abgegeben, wobei das reduzierte OHC in größerer Menge an die Donorseite entlassen wurde.

### 3.4.7 Resorption von Bisdemethoxycurcumin

#### Inkubation von BDMC von der apikalen Seite:

Mit BDMC wurde nur ein Versuch durchgeführt, um dessen Resorption im Millicell<sup>®</sup> System zu untersuchen. Dabei wurden die Sulfate nicht erfasst, da keine Sulfatspaltung durchgeführt wurde. Die Inkubation erfolgte analog zu den Inkubationen mit CUR und HHC (50  $\mu$ M, 0 - 6 h). In Abbildung 29 sind die Ergebnisse der Inkubation gezeigt.

Nach apikaler Applikation konnten nur 0,1 % unmetabolisiertes BDMC auf der basolateralen Seite der Membran gefunden werden. BDMC wurde zu den Metaboliten Hexahydro-BDMC (HHBDMC) und Octahydro-BDMC (OHBDMC) reduziert, die in größeren Mengen zur Donor- als zur Akzeptorseite abgegeben wurden. Auf der apikalen Seite waren rund 10 % und auf der basolateralen Seite ca. 2 % reduzierte Metabolite vorhanden. Die Glucuronide von BDMC und in geringerem Ausmaß auch von HHBDMC wurden hauptsächlich zur basolateralen Seite abgegeben.

BDMC wurde von den Caco-2 Zellen nicht besser resorbiert als CUR oder HHC. Die reduzierten Metaboliten wurden ebenso wie bei der Inkubation mit CUR in verstärktem Maße an die apikale Seite zurück transportiert, während die konjugierten Metabolite auf die basolaterale Seite abgegeben wurden.

### 3.4.8 Die Permeabilitätskoeffizienten der Curcuminoide

Der  $P_{app}$ -Wert liefert eine Aussage über die Resorptionseigenschaften einer Substanz. Je niedriger dieser Wert ist, desto schlechter wird eine Substanz nach oraler Aufnahme im Darm resorbiert (s. Einleitung Kap. 1.2.2). Yee et al. [1997] beschreiben einen sigmoiden Zusammenhang zwischen dem  $P_{app}$ -Wert und der Resorption nach oraler Gabe einer Substanz. Zur Charakterisierung der Resorptionseigenschaften der Curcuminoide wurden deren  $P_{app}$ -Werte zu verschiedenen Inkubationszeiten mit der Formel aus Kap. 5.13.7 berechnet. In der Tabelle 12 sind die berechneten  $P_{app}$ -Werte für CUR zusammengefasst. Da mit CUR von der apikalen und der basolateralen Seite inkubiert wurde, konnte der  $P_{app}$ -Wert in beide Richtungen bestimmt werden.

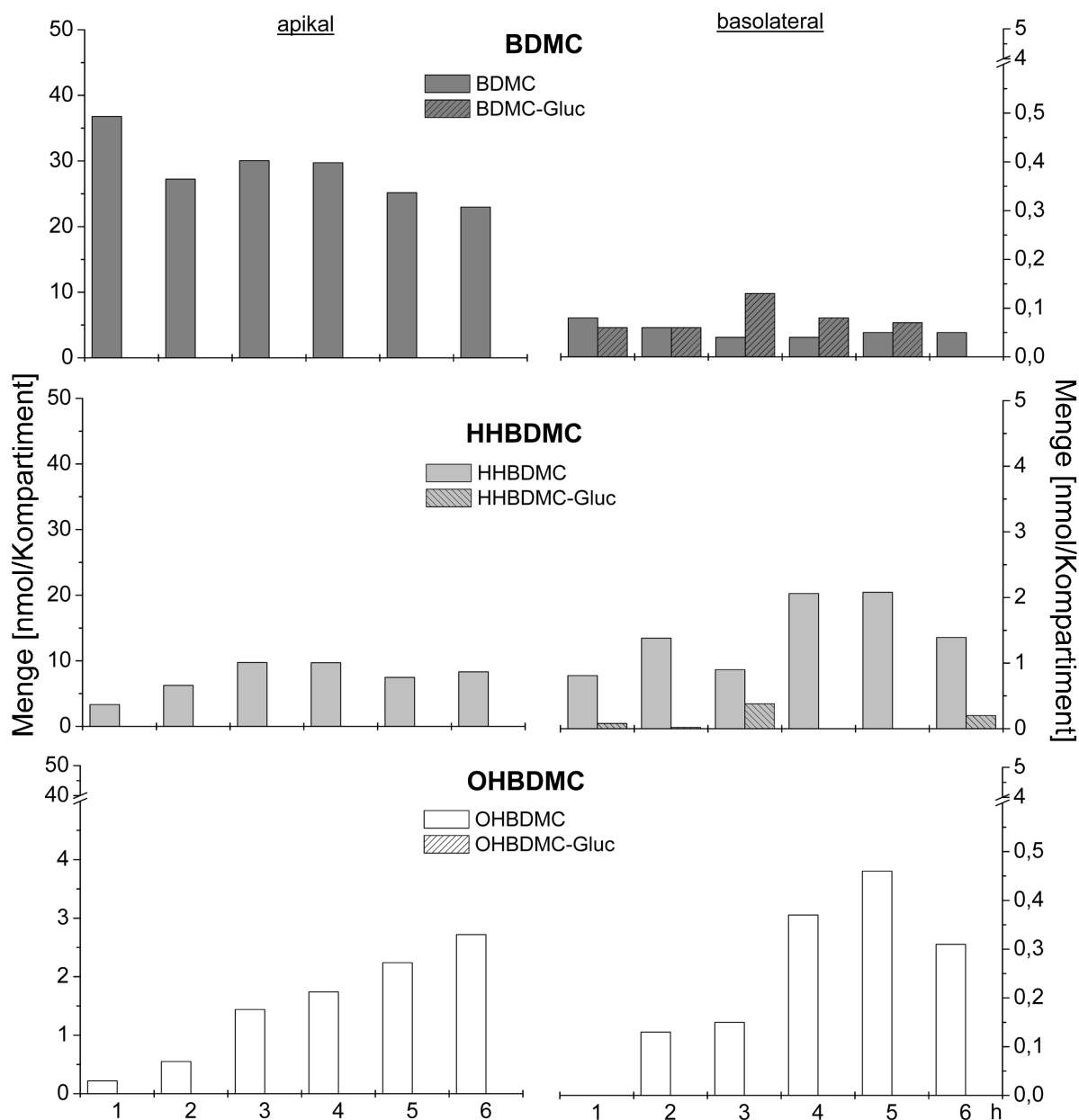


Abbildung 29: Stoffmenge an BDMC und seinen Metaboliten im jeweiligen Kompartiment nach Inkubation der Caco-2 Zellen mit 50  $\mu$ M BDMC bis zu 6 h von der apikalen Seite. Dargestellt sind die Werte aus einer Einfachbestimmung ohne Sulfatspaltung.

Tabelle 12:  $P_{app}$ -Werte für CUR und CUR mit Metaboliten. Die MW  $\pm$  SD wurden zu verschiedenen Zeitpunkten berechnet und stammen aus drei (apikal  $\rightarrow$  basolateral) bzw. aus einem (basolateral  $\rightarrow$  apikal) Versuch.

Zeitpunkt [h]	$P_{app} [\times 10^{-6} \text{ cm/s}]$			
	apikal $\rightarrow$ basolateral		basolateral $\rightarrow$ apikal	
	CUR	CUR + Metabolite	CUR	CUR + Metabolite
1	0,05 $\pm$ 0,05	0,50 $\pm$ 0,24	0,03	0,7
2	0,07 $\pm$ 0,07	1,01 $\pm$ 0,17	0,01	0,35
3	0,04 $\pm$ 0,06	1,21 $\pm$ 0,49	0,01	0,36
4	0,03 $\pm$ 0,03	1,12 $\pm$ 0,49	0	0,17
5	0,03 $\pm$ 0,02	1,05 $\pm$ 0,30	0	0,16
6	0,03 $\pm$ 0,03	1,33 $\pm$ 0,55	0	0,2

CUR zeigt dabei über den gesamten Inkubationszeitraum bis zu 6 h sehr niedrige  $P_{app}$ -Werte. Werden die Metaboliten in die Berechnung mit einbezogen, liegen die  $P_{app}$ -Werte bei 1 h um  $1,33 \pm 0,55 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$ . Insgesamt sind die Werte verglichen mit der Positivkontrolle Coffein aber sehr niedrig (s. Kap. 3.4.2).

Der  $P_{app}$ -Wert für HHC kann ebenfalls für die Applikation von beiden Kompartimenten ermittelt werden. Tabelle 13 fasst die ermittelten  $P_{app}$ -Werte für HHC zusammen.

Bei der Inkubation mit HHC und BDMC (Tabelle 27 im Anhang) wird deutlich, dass der  $P_{app}$ -Wert in der ersten Stunde nach Inkubationsbeginn am höchsten ist. Im Zeitverlauf fällt der Wert und bleibt dann konstant auf niedrigem Niveau. Der Wert sollte daher trotz Zeitunabhängigkeit (s. Formel in Kap. 5.13.7) nur zu frühen Inkubationszeitpunkten bestimmt werden. Auch bei HHC und BDMC wurde der  $P_{app}$ -Wert mit deren Metaboliten bestimmt. Dieser war im Gegensatz zur Inkubation mit CUR deutlich höher. Die Größenordnung bleibt aber gleich und somit auch das Ausmaß der Resorption. Von der apikalen Seite ins basolaterale Kompartiment sind die bestimmten  $P_{app}$ -Werte jeweils größer als bei der umgekehrten Inkubation.

Tabelle 13:  $P_{app}$ -Werte für HHC und HHC mit Metaboliten. Die MW  $\pm$  SD wurden zu verschiedenen Zeitpunkten berechnet und stammen aus drei (apikal  $\rightarrow$  basolateral) bzw. aus zwei (basolateral  $\rightarrow$  apikal) Versuchen.

Zeitpunkt [h]	$P_{app} [\times 10^{-6} \text{ cm/s}]$			
	apikal $\rightarrow$ basolateral		basolateral $\rightarrow$ apikal	
	HHC	HHC + Metabolite	HHC	HHC + Metabolite
1	3,30 $\pm$ 1,80	5,50 $\pm$ 4,00	0,76 $\pm$ 0,05	0,93 $\pm$ 0,12
2	1,90 $\pm$ 0,73	4,11 $\pm$ 1,49	0,41 $\pm$ 0,02	0,56 $\pm$ 0,01
3	0,84 $\pm$ 0,21	2,20 $\pm$ 0,42	0,18 $\pm$ 0,01	0,22 $\pm$ 0,02
4	0,78 $\pm$ 0,20	2,72 $\pm$ 0,64	0,23 $\pm$ 0,14	0,23 $\pm$ 0,17
5	0,61 $\pm$ 0,23	2,17 $\pm$ 0,13	0,12 $\pm$ 0,04	0,13 $\pm$ 0,19
6	0,54 $\pm$ 0,26	2,19 $\pm$ 0,63	0,13 $\pm$ 0,07	0,18 $\pm$ 0,06

Die  $P_{app}$ -Werte sind für alle drei Substanzen sehr niedrig, was auf eine niedrige Resorption nach oraler Gabe schließen lässt. Für HHC konnte nach 1 h ein  $P_{app}$ -Wert von  $3,3 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$  berechnet werden, der auf eine mittlere Resorption zwischen 20 und 70 % schließen lässt (s. Kap. 1.2.2). Unter der Berücksichtigung der Hauptsubstanz HHC und seiner Metabolite bleibt der  $P_{app}$ -Wert über den gesamten Inkubationszeitraum von 6 h größer als  $1 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$ . Damit wird HHC etwas besser resorbiert als CUR und BDMC.

### 3.4.9 Zusammenfassung der Aufnahme der Curcuminoide

Die Caco-2 Zellen verhielten sich im Vergleich zu den anderen verwendeten Zelllinien (HepG2, HT29, Ishikawa und V79) analog im Hinblick auf die Aufnahme von CUR aus dem Inkubationsmedium. Zu Beginn der Inkubationszeit konnten bis zu 5 % der inkubierten Substanzmenge im Zelllysate gefunden werden. Die Caco-2 Zellen sind etwas größer als die übrigen Zelllinien (Zelldurchmesser:  $16,9 \pm 0,61 \mu\text{m}$ , s. Kap. 5.6). Sie besitzen aufgrund ihrer Größe und da sie 21 Tage ausdifferenzieren mehr Lipide und Proteine. Möglicherweise erfolgte deshalb diese ausgeprägte Akkumulation in den Zellen. Die aufgenommene CUR-Menge sank aber schnell im Verlauf der Inkubationszeit von 6 h, was bedeutet, dass CUR von den Zellen zügig metabolisiert wurde und entweder konjugiert ans basolaterale oder reduziert ans apikale Medium abgegeben wurde. Der polarisierte Monolayer war nur



in der Lage von der apikalen Seite der Membran die Curcuminoide aufzunehmen. Bei einer Inkubation von der basolateralen Seite wurden nur geringe Mengen an CUR und HHC resorbiert, das heißt übertragen auf die *in vivo*-Situation, dass einmal ins Blut gelangtes CUR nicht wieder in das Darmlumen zurückgegeben wird.

Usta et al. [2007] beschreiben, nach einer Inkubation mit 160 nmol CUR von beiden Seiten des Monolayers, eine bevorzugte Abgabe von GSH-Addukten des CUR an das apikale Kompartiment. Dabei wird ein Adduktgehalt von bis zu 36 nmol erreicht und es werden aktive Transportprozesse durch die Caco-2 Zellen vermutet.

Im verwendeten Millicell<sup>®</sup> System der vorliegenden Arbeit konnten auch nach Optimierung der LC/MS-Methode in keinem Inkubationsmedium Spuren von GSH-Addukten gefunden werden. Da aber eventuell die Bedingungen nach wie vor nicht optimal waren, kann nicht ausgeschlossen werden, dass die hier verwendeten Caco-2 Zellen ebenfalls GSH-Addukte bildeten. Diese fehlen daher in der Bilanzierung und bei den Resorptionsversuchen.

In keinem Versuch konnte eine Beeinflussung der Intaktheit des Monolayers durch Inkubation mit CUR beobachtet werden. Die Bestimmungen der LY-Passage nach Abschluss der Inkubationen (bis zu 18 h) ergaben keine Erhöhung der Farbstoffmenge im basolateralen Kompartiment, obwohl der antiproliferative Effekt von CUR auf die Caco-2 Zellen bereits beschrieben wurde. Lev-Ari et al. [2005] inkubierten die Caco-2 Zellen nach einer 24-stündigen Anwachsphase mit CUR (bis zu 30  $\mu$ M) und konnten eine Verringerung der Viabilität der Zellen beobachten. Eigene Versuche mit den Caco-2 Zellen zeigten weder nach einer Anwachsphase von 24 h noch nach der vollständigen Ausdifferenzierung von 21 Tagen mit CUR-Konzentrationen von bis zu 100  $\mu$ M eine Verringerung der Viabilität im MTT-Test.

CUR wurde von den Caco-2 Zellen in geringem Maß resorbiert und die konjugierten Metaboliten wurden vorwiegend an die Blutseite abgegeben. Diese Tatsache könnte die geringe Detektion von unkonjugiertem CUR bei *in vivo*-Untersuchungen erklären [Sharma et al., 2007]. Die reduzierten Metaboliten HHC und OHC wurden im Gegensatz dazu, vor allem an die Darmseite abgegeben, könnten dann wieder aufgenommen und an die Blutseite abgegeben werden. HHC selbst wurde deutlich besser aufgenommen als CUR.

Diese Beobachtung bestätigte ein Vergleich der  $P_{app}$ -Werte von CUR und HHC. HHC wurde auf der Blutseite sowohl konjugiert als auch unkonjugiert detektiert. Da nur geringe CUR-Stoffmengen im basolateralen Kompartiment detektiert werden konnten, besteht die Möglichkeit, dass CUR die Zellen in oder an durch die Caco-2 Zellen produzierte Lipoproteine gebunden verlässt. Die Extrahierbarkeit von CUR aus diesen Partikeln könnte noch geringer sein als aus proteinreichen Lösungen. Da die Lipophilie von HHC aber deutlich geringer als die von CUR ist, wurde mehr davon im basolateralen Medium gefunden und es könnte eventuell schlechter an Lipidpartikel gebunden über das Blut transportiert werden als CUR.

Da die Caco-2 Zellen in der Lage sind unter geeigneten Inkubationsbedingungen die humanähnlichen Lipoproteine CM, VLDL, IDL und HDL zu produzieren und an das basolaterale Kompartiment abzugeben, sollte die Detektion im basolateralen Medium nicht nur durch eine reine Extraktion erfolgen, sondern zudem eine vorangehende UZ mit Hilfe eines Dichtegradienten durchgeführt werden. Das Extraktionsmittel Ethylacetat wird durch Folch-Reagenz ersetzt, da dieses als geeignetes Extraktionsmittel für Lipide gilt [Folch et al., 1957]. Im folgenden Kapitel sind die Ergebnisse zusammengefasst.

#### 3.4.10 Untersuchungen zur Sekretion von Lipoproteinen durch Caco-2 Zellen

Caco-2 Zellen besitzen die Fähigkeit nach der Ausdifferenzierung basolateral die Lipoproteine (CM, VLDL, LDL, IDL und HDL) abzugeben. Die Auftrennung dieser ist mit Hilfe von UZ im Dichtegradienten möglich (s. Kap. 5.13.9).

Mit verschiedenen Substanzen wurde untersucht, wie die Bildung und Sekretion dieser Lipoproteine durch unterschiedliche Zusätze zu den Inkubationsmedien beeinflusst werden können (s. Einleitung 1.2.3). Als Positivkontrolle für die Verteilung einer Substanz in den Lipoproteinen sollte das gut beschriebene Vitamin E verwendet werden [Anwar et al., 2006; Tsuzuki et al., 2007]. Nach Inkubation in Kombination von OA und TC wurde Vitamin E mit steigender Menge in den proteinreicheren Fraktionen gefunden. Wurde der Caco-2 Monolayer allerdings mit Vitamin E vorinkubiert und anschließend mit OA und TC in selben Mischungsverhältnis wie zuvor zur Sekretion von Lipoproteinen angeregt, wurde vermehrt Vitamin E in den Fraktionen der CM und VLDL gefunden [Anwar et al., 2006]. Eine Verwen-

dung von Vitamin E als Positivkontrolle erwies sich als sehr ungeeignet, da eine Detektion per HPLC/Fluoreszenzdetektor nicht eindeutig war. Daher sollten im Folgenden die Lipoproteine mit Hilfe der Fettsäuren Palmitinsäure (C16:0), Stearinsäure (C18:0), Ölsäure (OA, C18:1) und Cholesterol (Chol) über GC/FID-Analysen charakterisiert werden. Die Fettsäureverteilung bzw. deren Stoffmenge und der Proteingehalt sollten die einzelnen UZ-Proben charakterisieren.

### **Stabilität der Curcuminoide im UZ-Versuch:**

Die Aufarbeitungszeit während der UZ beträgt mindestens 21 h, und es bestand die Befürchtung, dass die CUR-Konzentration in dieser Zeit stark abnimmt. Die Stabilität von 30  $\mu$ M CUR (1 % DMSO) wurde daher in reinem HBSS bzw. in nach 18 h Inkubation basolateral entnommenem HBSS, welche die von Caco-2 Zellen produzierten Lipoproteine enthielt. Die Aufarbeitung erfolgte wie in Kap. 5.13.9 beschrieben. Durch die enthaltenen Lipoproteine konnten 16,9 % CUR im Bezug auf den 0 h-Wert wiedergefunden werden, im Gegensatz dazu konnten im reinen HBSS weniger als 1 % detektiert werden. Die zusätzlich untersuchten Curcuminoide iso-CUR und HHC zeigten ebenfalls eine Substanzstabilisierung durch die vorhandenen Lipoproteine.

### **Charakterisierung der einzelnen Lipidfraktionen:**

Die Charakterisierung der zehn Fraktionen, die mit Hilfe der UZ erhalten wurden, erfolgte zunächst über die Ermittlung des Proteingehalts. Dabei war die Ermittlung mit Hilfe des Bradford-Reagenz schwierig, da die Kaliumbromid (KBr)-Lösungen unterschiedlicher Dichte verschiedene Blindwerte hatten. Um diesen Effekt zu vermindern, wurde jeweils eine Leerprobe nur mit HBSS zentrifugiert. Durch Subtraktion der jeweiligen Blindwerte waren die Proteingehalte in den Fraktionen 5, 6 und 10 bestimmbar. Diese entsprechen den Fraktionen von IDL und HDL und besitzen die höchsten Proteingehalte (s. Einleitung 1.2.3).

Die Verteilung der Fettsäuren wurde mit Hilfe von GC/FID-Messungen ermittelt. Nach einer Inkubation mit DMEM/F12-Medium bzw. mit Medium und FKS waren die untersuchten Fettsäuren in den einzelnen Fraktionen sehr homogen verteilt. Erhöhte Gehalte

konnten in keiner Fraktion gefunden werden. Die Inkubation mit gemischten Micellen (mit postprandialer Zusammensetzung, s. 5.13.9) hatte auf die Sekretion von C16:0, C18:0 sowie Chol eine steigernde Wirkung. Die Zusammensetzung dieser gemischten Micellen enthält allerdings bereits Chol und die beiden Fettsäuren, diese sind dabei im PC enthalten.

Die Inkubation mit OA sollte laut Literatur [Luchoomun und Hussain, 1999; van Greevenbroek et al., 2000] die Abgabe von CM und VLDL anregen. Mit Hilfe der GC/FID-Analysen konnte aber nur gezeigt werden, dass nach Inkubation mit 1 mM OA die Bildung von LDL-Partikeln gesteigert wurde.

Damit sind noch keine eindeutigen Ergebnisse für die Lipoproteine, die durch Caco-2 Zellen gebildet und sezerniert werden, bekannt. Ein Transport der Curcuminoide mit Hilfe dieser Lipoproteine kann noch nicht abgeschätzt werden. Die Instabilität von CUR wird während der langen Aufarbeitungszeit den Nachweis für einen Einbau in die Lipoproteine erschweren, zudem müssen gebildete und ans Medium abgegebene Metaboliten von denjenigen unterschieden werden, die ebenfalls über die Lipoproteine transportiert werden.

#### 3.4.11 Metabolismus durch intestinale Bakterien

Der humane Darm spielt eine wichtige Rolle in der Aufnahme von Nahrungsbestandteilen und Xenobiotica. Die Schleimhaut des Dickdarms beheimatet  $10^{14}$  -  $10^{15}$  bakterielle Keime. Es wurden bisher zwischen 400 und 500 verschiedene Gattungen charakterisiert, die in anaerobe und aerobe Bakterien unterteilt werden können [Beckmann und Ruffer, 2000]. Zu den anaeroben Bakterien gehören z. B. Bifidobakterien, Clostridien sowie die Keime der Bacteroides-Prevotella-Porphyromonas-Gruppe, z. B. *Bacteroides fragiles* und *uniformis*. Die aeroben Bakterien bestehen aus Enterobakterien wie Escherichia coli, Klebsiellen, Enterobacter, Citrobacter und Enterococcus, Bacillus sowie Staphylococcus und Streptococcus [Beckmann und Ruffer, 2000; Hill, 1995; Hoffmann, 1966]. Das Verhältnis zwischen anaeroben und aeroben Bakterien liegt bei etwa 1:10 [Hill, 1995].  $10^9$  -  $10^{12}$  koloniebildende Einheiten pro Gramm Fäzes (KBE/g) machen 50 % der Gesamtmasse des Stuhls aus und zeigen die dichte mikrobielle Besiedelung des Darms [Beckmann und Ruffer, 2000].

Als Metabolisierungsreaktionen dieser Mikroflora werden Deglycosylierung, Ringspaltung, Reduktion, Decarboxylierung, Demethylierung und Dehydroxylierung beschrieben, z. B. bei den Isoflavonen Daidzin und Genistin [Coldham et al., 2002; Hur et al., 2000] oder dem Flavanol (-)-Epicatechin 3-*O*-gallat [Meselhy et al., 1997]. Als Enzyme wurden neben Cellulasen, Lipasen, Decarboxylasen und anderen Proteinasen weiterhin fremdstoffmetabolisierende Enzyme wie UGT, SULT, Reduktasen, Oxidasen und Dehydrogenasen nachgewiesen [Beckmann und Ruffer, 2000].

Über den Metabolismus von CUR mit humanen intestinalen Bakterien ist bisher wenig bekannt. Für die Aufnahme und Verteilung in diverse Organe spielt es eine entscheidende Rolle, ob CUR als Muttersubstanz aufgenommen wird, oder ob nur dessen Metaboliten resorbiert werden. In bisherigen Studien wurde vor allem nach CUR, dessen Glucuronid und Sulfat gesucht. Andere Metaboliten wurden vernachlässigt. Möglicherweise wird CUR aber nicht direkt aufgenommen, sondern zunächst durch humane Darmbakterien verstoffwechselt. Zur Überprüfung, ob die verwendete Suspension humaner Fäzesbakterien (Herstellung s. Kap. 5.15.6) geeignet war für Metabolismusuntersuchungen, sollte das System mit Hilfe des Säugerlignans Matairesinol (MAT) etabliert werden. Die Metabolisierung von MAT ist bereits ausreichend charakterisiert [Clavel et al., 2005; Heinonen et al., 2001; Wang et al., 2000]. Erst nach der Etablierung des Systems sollten Inkubationsversuche mit CUR folgen.

Zu Beginn der Experimente wurde eine Suspension aus der Fäzes einer schlachtfrischen Ratte gewonnen (Gewinnung s. Kap. 5.15.5). Die Inkubationsversuche mit diesen Proben ergaben aber einen geringen Substanzumsatz, selbst nach Erhöhung der Bakterienmenge durch zusätzliche Fäzessuspension. Zur Identifizierung und Charakterisierung der Metaboliten müssen aber ausreichende Mengen gebildet werden. Daher wurde auf eine Suspension aus humanen Fäzesbakterien gewechselt (s. Kap. 5.15.6).

#### **3.4.12 Metabolismus des Säugerlignans Matairesinol**

Für die Lignane MAT und Secolariciresinol wird ein charakteristischer intestinaler Metabolismus beschrieben, dabei erfolgt zunächst eine zweifache Demethylierung und anschließend eine zweifache Dehydroxylierung am aromatischen Ring [Heinonen et al., 2001; Wang et al.,

2000]. Diese Metabolisierung erfolgt vor allem im humanen Darm durch dort vorkommende Bakterien [Bowey et al., 2003; Eeckhaut et al., 2008]. Aus MAT wird dadurch das Enterolakton gebildet, dem eine schwach estrogene [Kulling et al., 1998] und eine antikanzerogene Wirkung zugeschrieben wird [Bergman Jungstrom et al., 2007; Kulling et al., 1998; Wang, 2002; Welshons et al., 1987]. Hierbei handelt es sich um eine Aktivitätssteigerung des Metaboliten gegenüber der Muttersubstanz. Da der Metabolismusweg von MAT gut beschrieben ist, wurde MAT als Positivkontrolle für die Fähigkeit der Fäzessuspension zur Demethylierung und Dehydroxylierung verwendet. Abbildung 30 gibt einen Überblick über die ablaufenden Demethylierungen und Dehydroxylierungen im Metabolismus des MAT.

Die ablaufenden Reaktionsschritte sind für verschiedene Bakterienstämme wie z.B. *Peptostreptococcus* sp. SDG-1 und *Eubacterium* sp. SDG-2 gut bekannt [Wang et al., 2000]. Dabei entstehen im Zeitverlauf alle gezeigten Metaboliten, wobei die Demethylierung bevorzugt abläuft [Wang et al., 2000; Wang, 2002]. Mit Hilfe dieser Metabolisierungsschritte sollte überprüft werden, ob in den Suspensionen eine geeignete Anzahl an Bakterien vorlag und ob ebenfalls alle Zwischenstufen der Metabolisierung des MAT gefunden werden können. Es wurde davon ausgegangen, dass MAT analog zur Literatur umgesetzt wird.

Die Inkubationen erfolgten wie in Kap. 5.15.7 beschrieben. Nach Ablauf der Inkubationszeit unter anaeroben Bedingungen wurden die Suspensionen mit der dreifachen Menge Ethylacetat extrahiert, nach dem Einengen zur Trockene in MeOH aufgenommen und ein Aliquot mit Hilfe der LC/MS analysiert. Als Inkubationszeit eignete sich ausschließlich eine Dauer von 72 h, da bei kürzeren Inkubationszeiten keine ausreichende Menge an Metaboliten zur Analyse gebildet wurde. Als Negativkontrollen wurden jeweils Inkubationen mit autoklavierter Fäzessuspension durchgeführt. Durch den Prozess des Autoklavieren (121 °C, 1 bar) sollen alle vorhandenen Bakterien und Sporen abgetötet werden, so dass kein Umsatz der Testsubstanzen erfolgen kann.

Mit Hilfe von LC/MS-Analysen und dem Enterolakton als Referenzsubstanz konnten alle Metaboliten des MAT gefunden werden. Zusätzliche MS/MS-Analysen auf das Mutterion sind jedoch nötig, um die Identität der Substanzen eindeutig zu klären, da in den auto-

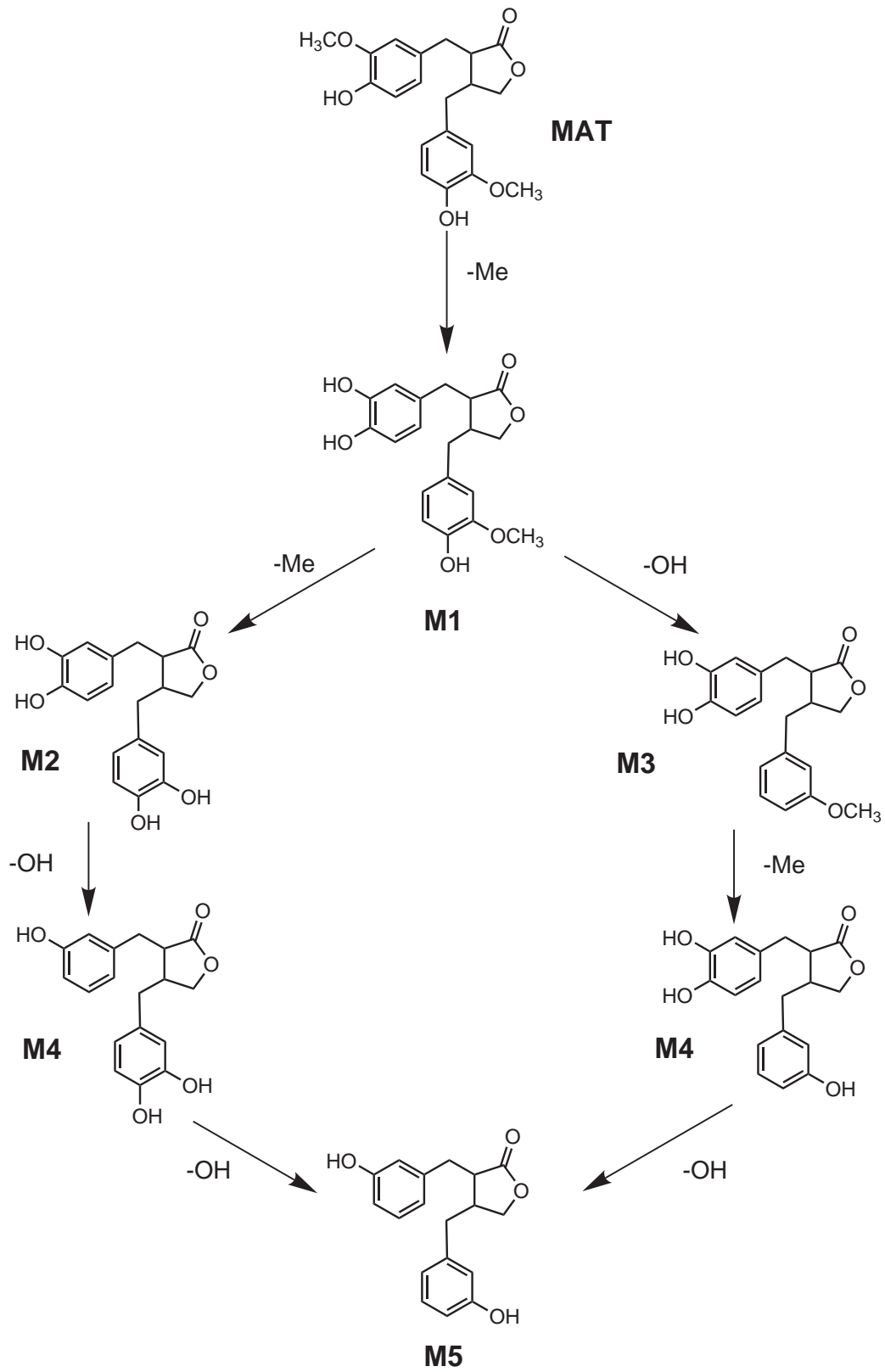


Abbildung 30: Schematischer Verlauf der Metabolisierung von MAT durch humane Fäzesbakterien zu Enterolaktone (M5). OH: Hydroxygruppe, Me: Methoxygruppe.

klavierten Proben für die Masse und Retentionszeit von Enterolakton ebenfalls ein Peak vorhanden war. Somit erwies sich die Fäzessuspension als geeignet für die Untersuchung des humanen intestinalen Metabolismus und wurde im Folgenden zur Inkubation mit CUR und HHC verwendet.

#### 3.4.13 Metabolismus von CUR und HHC

Nachdem eine Metabolisierung von MAT mit der Fäzessuspension erfolgte, sollte anschließend eine Inkubation mit CUR durchgeführt werden. Da CUR eine strukturelle Ähnlichkeit mit MAT besitzt, lag die Überlegung nahe, dass CUR analog MAT metabolisiert wird. Abbildung 31 zeigt die Strukturformeln von MAT und CUR, erkennbar sind die beiden aromatischen Ringe mit den beiden Hydroxy- und Methoxygruppen, die über eine Kohlenstoff-Kette miteinander verbunden sind.

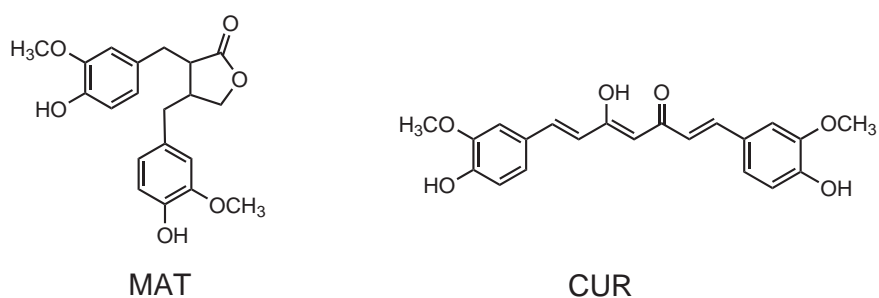


Abbildung 31: Chemische Strukturen von MAT und CUR.

Falls diese strukturelle Ähnlichkeit genügt, sollte CUR analog zum Metabolismusweg von MAT umgesetzt werden. Der Metabolismusweg für CUR durch anaerobe Darmbakterien wird wie in Abbildung 32 angenommen.



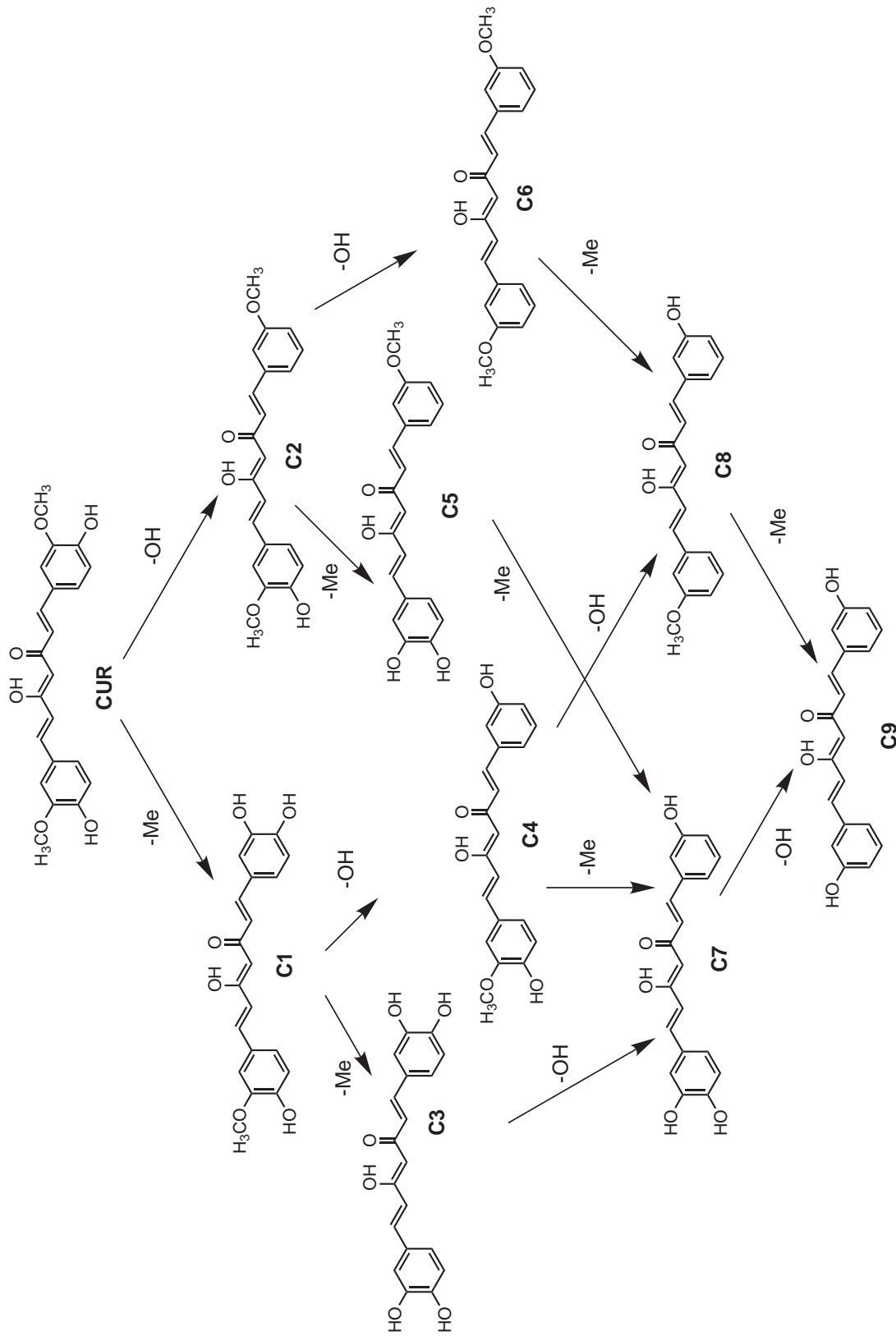


Abbildung 32: Angenommener Metabolismus von CUR durch humane Fäzesbakterien. OH: Hydroxygruppe, Me: Methoxygruppe.

In diesem Testsystem wurde ebenfalls die Instabilität von CUR überprüft. Die Inkubationen erfolgten anaerob in autoklavierter Fäzessuspension und in Kalium-Phosphat-Puffer über einen Zeitraum von 0 bis 72 h. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Proben extrahiert, an der Evaporatorzentrifuge eingengt und der Rückstand in MeOH aufgenommen. Die Analyse erfolgte mit Hilfe der LC/MS (s. Kap. 5.15.7). Bei der Überprüfung der Stabilität unter anaeroben Bedingungen konnte gezeigt werden, dass CUR durch Inkubation im Puffer wenig und durch Bestandteile der Fäzessuspension gut stabilisiert wird (Abbildung 33).

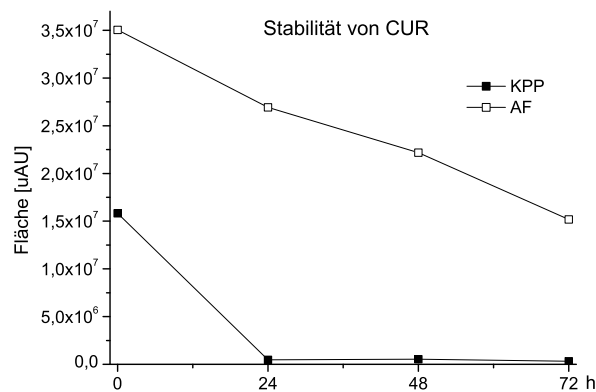


Abbildung 33: Zeitverlauf der CUR-Abnahme in autoklavierter Fäzessuspension (AF) und Kalium-Phosphat-Puffer (KPP). Dargestellt ist die UV-Fläche (bei 420 nm) in ultra Absorption Units [uAU] der LC/MS-Messung im Zeitverlauf aus einem Versuch.

Die nachgewiesene CUR-Menge nimmt im Puffer innerhalb von 24 h bereits um über 90 % ab, in der autoklavierten Fäzessuspension dagegen fällt sie innerhalb der gesamten Inkubationszeit von 72 h auf 43 % ab. Diese Beobachtungen bestätigen die Stabilitätsuntersuchungen von CUR in HBSS (s. Kap. 3.4.3), da auch hier innerhalb von nur 1 h über 75 % des CUR zerfallen waren. Die Trübstoffe der Fäzessuspension oder andere (proteinreiche) Fäzesbestandteile stabilisierten das CUR deutlich. Eine Inkubation mit CUR über den langen Inkubationszeitraum von 72 h erscheint möglich, ohne dass dabei das gesamte CUR zerfallen sein sollte.

Aufgrund der Instabilität von CUR sollte der angenommene Metabolismusweg zuerst mit dem reduzierten Metaboliten HHC abgeklärt werden. Abbildung 34 zeigt den erwarteten Metabolismusweg nach Inkubation von intestinalen Bakterien mit HHC.

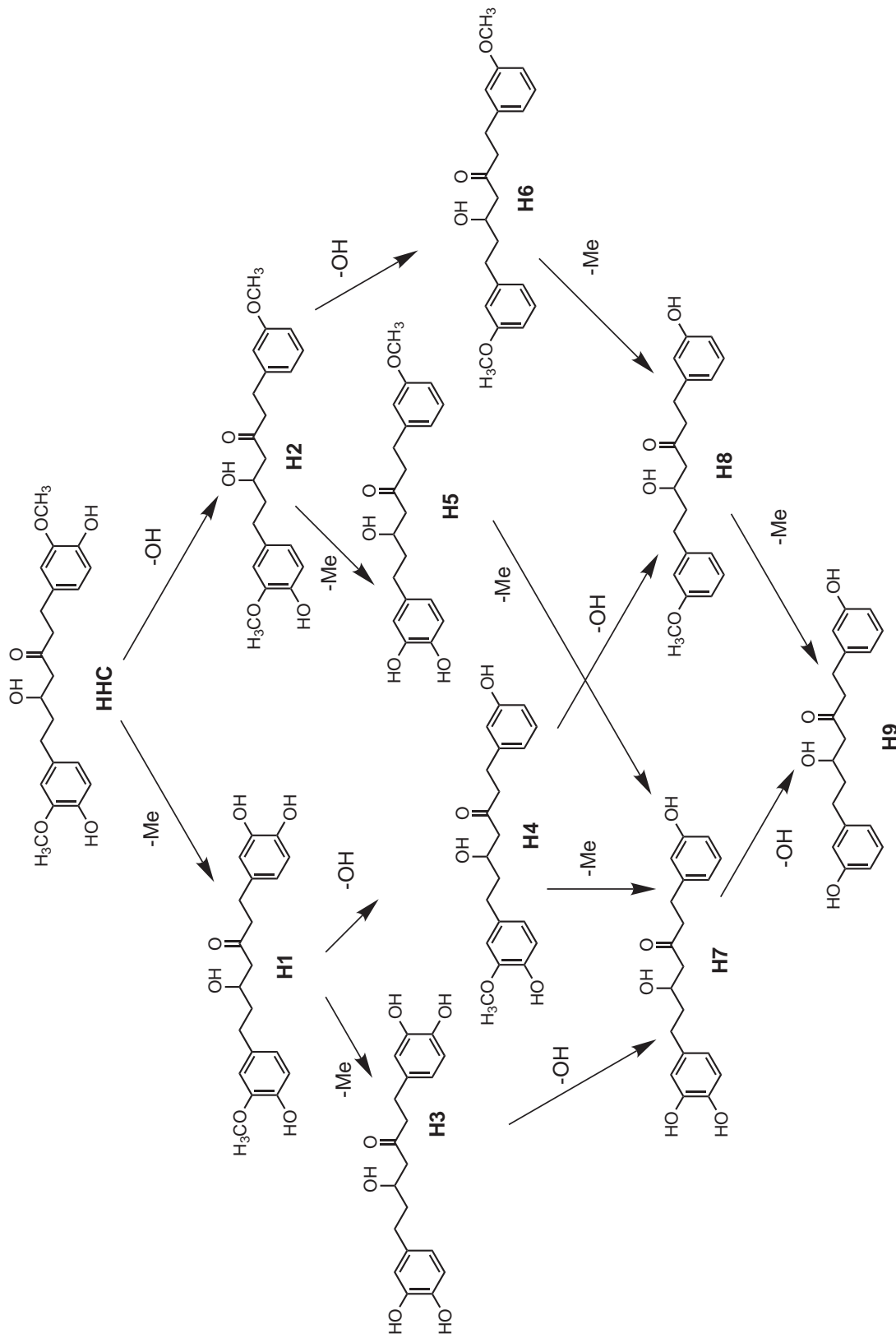


Abbildung 34: Angenommener Metabolismus von HHC durch humane Fäzesbakterien. OH: Hydroxygruppe, Me: Methoxygruppe.

Zur Bestimmung des Metabolismuswegs von HHC wurden die CUR-Derivate gemäß Pabon et al. [1964] hergestellt, soweit möglich säulenchromatographisch getrennt und mit Hilfe katalytischer Hydrierung (s. Kap. 5.15.1) dadurch die gewünschten HHC-Derivate erhalten. Nach Optimierung der LC/MS-Messmethode wurden die erwarteten Metaboliten anhand ihrer Retentionszeit und ihrer charakteristischen Fragmentierung bestimmt. Als Reinsubstanzen wurden HHC, H2, H3, H8 und H9 erhalten. Die chromatographischen Eigenschaften sind in Tabelle 14 dargestellt.

Tabelle 14: Chromatographische Daten für die HHC-Fäzesmetaboliten. HPLC- und MS-Bedingungen siehe Kap. 5.3.3.  $t_R$ : Retentionszeiten in der LC/MS.

Metabolit	Masse [g/mol]	$t_R$ [min]	LC/MS [M-H] <sup>-</sup>	LC/MS/MS-Fragmentierung m/z (rel. Intensität)
HHC	374	13,3	373	121 (5), 165 (23), 179 (100), 193 (28)
H2	358	14,8	357	163 (9), 179 (43), 193 (100)
H3	346	8,8	345	121 (13), 165 (100), 179 (68)
H8	328	18,2	327	131 (1), 149 (100), 163 (5)
H9	314	13,7	313	131 (8), 149 (100), 163 (64)

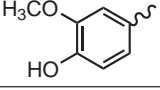
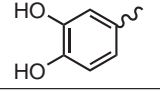
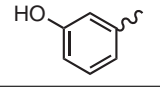
Um die Wiederfindung zu überprüfen, wurde ein Gemisch der vorhandenen HHC-Derivate zu einer Fäzesprobe gegeben und ohne Inkubation direkt mit Ethylacetat extrahiert. Per LC/MS-Analyse konnten alle eingesetzten Derivate identifiziert werden. Damit konnte eine Identifizierung aus den inkubierten Fäzesproben sichergestellt werden.

Bei den Inkubationen mit der humanen Fäzessuspension konnten insgesamt deutlich bessere Umsätze als mit der Rattenfäzessuspension erreicht werden. Aber auch diese Inkubationen waren großen Schwankungen unterworfen, so dass keine reproduzierbaren Ergebnisse erhalten werden konnten.

Mit Hilfe der synthetisierten Reinsubstanzen konnte den aromatischen Ringen ein charakteristisches Fragmentierungsmuster zugeordnet werden (Tabelle 15).

Bei allen Inkubationen für 72 h mit 50  $\mu$ M HHC konnten nur zwei Metaboliten eindeutig identifiziert werden und diese einfache und doppelte Demethylierung mit Hilfe der Fragmentierung bestätigt werden (Metaboliten H1 und H3). Für die nachfolgenden Schritte der

Tabelle 15: Daten für die charakteristische Fragmentierung der verschiedenen aromatischen Ringe der erwarteten Metaboliten.

Struktur	Fragmentierung und rel. Intensität
	121 (5), 165 (23), 179 (100), 193 (28)
	121 (13), 165 (100), 179 (68)
	131 (8), 149 (100), 163 (64)

Dehydroxylierung konnten zwar Hinweise (analoge Retentionszeit) gefunden werden, jedoch war das Fragmentierungsmuster nicht analog zur Referenzsubstanz und somit eine genaue Zuordnung nicht möglich.

Zur Überprüfung, ob die Fäzesbakterien die *meta*-Position der Methoxygruppe zur Kette bevorzugt demethylieren, wurden anschließend 72-stündige Inkubationen mit iso-HHC durchgeführt. Dieses wurde durch katalytische Hydrierung aus iso-CUR (s. Kap. 5.15.4) hergestellt. In diesem Molekül sind die Positionen der Methoxy- und der Hydroxygruppe im Gegensatz zum CUR und MAT vertauscht (Methoxygruppe *para*-ständig). Bei diesen Inkubationen war nur ein sehr geringer Umsatz des iso-HHC zu beobachten. Daher konnte nur eine geringe Menge an Metaboliten gefunden werden. Vermutlich bevorzugen die humanen Fäzesbakterien tatsächlich die *meta*-Position der Methoxygruppe.

Mit CUR wurden bisher nur zwei Vorversuche gemacht. Diese bestätigten die Bildung des Mono- und des Dicatechols. Eine eindeutige Identifizierung über Referenzsubstanzen, deren Retentionszeiten und Fragmentierungsmuster war bisher nicht möglich, da die Entfernung der benzyliischen Schutzgruppen (s. Kap. 5.15.2) nicht gelang.

### 3.4.14 Zusammenfassung der intestinalen Metabolisierung

Durch die Inkubation von CUR und HHC mit den humanen Fäzesbakterien kommt es zur Bildung von Metaboliten mit catecholischer Struktur. Substanzen mit Catecholstruktur gelten als bedenklich, da bekannt ist, dass sie zu Redoxcycling mit Chinonbildung neigen. Chinone besitzen eine hohe Reaktivität, sind elektrophil und als Michael-Akzeptoren in der Lage Peptide, Proteine und/oder Nukleinsäuren zu alkylieren und kovalente Addukte mit Makromolekülen zu bilden [Marquardt und Schäfer, 2004]. Zudem können durch Redoxcycling vermehrt reaktive Sauerstoffspezies gebildet werden. Ein Beispiel für das Redoxcycling mit Chinonbildung sind die Catecholestrogene [Liehr, 1990]. Eine Entgiftung kann über die Methylierung der Hydroxylgruppen durch die Catechol-*O*-methyltransferase (COMT) erfolgen [Eisenbrand und Metzler, 2002; Marquardt und Schäfer, 2004]. Abbildung 35 zeigt die Reaktionen, die beim Redoxcycling der CUR- bzw. HHC-Metaboliten ablaufen könnten.

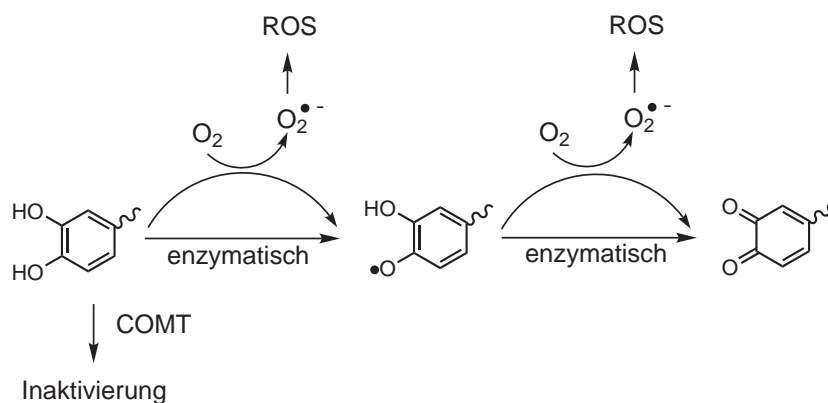


Abbildung 35: Angenommener Redoxcycling Mechanismus des CUR- bzw. HHC-Catechols, modifiziert nach [Eisenbrand und Metzler, 2002; Marquardt und Schäfer, 2004]. ROS: reaktive Sauerstoffspezies, COMT: Catechol-*O*-methyltransferase.

Die Aufnahme und die Eigenschaften der gebildeten Catecholmetaboliten von CUR und HHC waren bisher selten Ziel der Forschung. In wenigen Veröffentlichungen wurde versucht, diese beiden Metaboliten als CUR-Analoga zu synthetisieren [Anand et al., 2008b; Chen et al., 2006b; Portes et al., 2007]. Das Dicatechol verhinderte die Hämolyse von roten Blutkörperchen [Deng et al., 2006] und besitzt antiinflammatorische Eigenschaften, indem es die Cyclooxygenase und die 5-Lipoxygenase inhibiert [Portes et al., 2007]. Beide Catechole wurden hinsichtlich ihrer antioxidativen Wirkung untersucht. Mit steigender Anzahl an

Hydroxygruppen wurde eine Verbesserung der Radikalfängereigenschaften beschrieben [Venkateswarlu et al., 2005].

Die Reaktivität bestimmter Gruppen besitzt sowohl den Vorteil, dass ein Abfangen von Radikalen möglich ist, als auch den Nachteil, dass eine Interaktion mit reaktiven Gruppen aus Proteinen oder anderen Makromolekülen stattfinden kann. Die cytotoxische Wirkung wurde mit Hilfe von Lymphozyten bestimmt. Diese lag bei 50  $\mu\text{g}$  Catechol bzw. Dicatechol bereits bei über 90 % [Venkateswarlu et al., 2005]. In den genannten Veröffentlichungen wurden beide Substanzen als CUR-Analoga und nicht als natürlich vorkommende oder entstehende Metaboliten beschrieben.

Weitere Studien sind erforderlich, um das genauere Ausmaß der Catechol- bzw. Dicatecholdurchbildung durch humane Fäzesbakterien, die Charakterisierung dieser Metaboliten im Hinblick auf deren Toxizität sowie die Aufnahme und besondere Wirkungen zu untersuchen.

Neben der direkten Metabolisierung des CUR durch die humanen Fäzesbakterien ist eine Reduktion der Kette zu erwarten. Die Fähigkeit der Bakterien zur Reduktion wird verschiedentlich beschrieben [Beckmann und Rüffer, 2000]. Damit wäre es möglich, dass vier Metaboliten mit catecholischer Struktur aus CUR entstehen: die beiden Catechole des CUR und die beiden des HHC. Für die HHC-Catechole ist ebenfalls wenig über eine mögliche Toxizität bekannt und das Ausmaß deren Bildung ist noch unklar.

Ist die Metabolisierung durch die humanen Fäzesbakterien ausgeprägt, kann von einer deutlich geringeren Resorption von CUR im Darm ausgegangen werden. Mit Hilfe des Caco-2 Millicell<sup>®</sup> Systems konnte eine sehr geringe Resorption für CUR nachgewiesen werden. Wird diese durch Metabolisierung von den Darmbakterien weiter eingeschränkt, wäre dies eine Erklärung für die geringe Bioverfügbarkeit von CUR und die geringe systemische CUR-Menge in Tier- und Humanstudien selbst nach sehr hoher oral verabreichter Dosis von bis zu 12 g/Tag [Vareed et al., 2008]. Ob die gebildeten Catecholmetaboliten aufgenommen und konjugiert werden, bleibt fraglich.

Inwieweit die Metabolisierung durch Darmbakterien zur verringerten CUR-Bioverfügbarkeit beitragen kann, ist ungeklärt. Bei den teilweise doch recht Dosen, die verabreicht wurden, kann selbst bei geringem Ausmaß der Catecholbildung eine toxikologisch relevante Menge davon gebildet werden.



---

## 4 Zusammenfassung

Im asiatischen Raum wird Curcumin (CUR) aus den Rhizomen des Ingwergewächses *Curcuma longa* seit Jahrhunderten als Gewürz und Heilmittel vor allem bei Erkrankungen des Magen-Darm-Traktes verwendet. Dabei werden CUR-Dosen von bis zu 1,5 g/Tag pro Person über die Nahrung aufgenommen. Vor allem in Indien wird die niedrige Inzidenz von Kolonkarzinomen mit einer hohen CUR-Einnahme in Zusammenhang gebracht.

Da mittlerweile viele Substanzen auf ihre chemoprotektive und antikanzerogene Wirkung untersucht wurden und zur Wirkungsentfaltung hohe Dosen am Wirkort, bei meist niedriger Bioverfügbarkeit der einzelnen Substanzen, erreicht werden müssen, kommen immer mehr Nahrungsergänzungsmittel mit angereicherten Frucht- und Wurzelextrakten aus diversen Pflanzen auf den Markt. CUR ist weltweit unter verschiedenen Handelsnamen mit teilweise sehr hohen Dosierungen von bis zu 1100 mg reines CUR pro Kapsel erhältlich, wobei als tägliche Einnahme bis zu 2,7 g empfohlen werden. Die amerikanische Food and Drug Administration (FDA) hat CUR als "generally regarded as safe" eingestuft, was so viel bedeutet, dass es als sicher gilt. In Humanstudien konnten selbst nach hohen Dosisgaben von bis zu 12 g/Tag keine adversen Effekte festgestellt werden, weshalb in allen Studien eine Einstufung des CUR als nichttoxische Substanz erfolgte. Dabei bleibt zu bedenken, dass die Probanden diese Mengen nur über einen kurzen Zeitraum von mehreren Wochen bis Monaten erhielten. Als Nahrungsergänzungsmittel wäre eine Einnahme jedoch auch über mehrere Jahre denkbar.

In den Untersuchungen dieser Arbeit zeigte eine CUR-Behandlung von kultivierten Zelllinien eine cytotoxische Wirkung ab 30  $\mu$ M CUR, einen Arrest in der G2-Phase des Zellzyklus sowie eine veränderte Morphologie der Zellen. Es kam zum verzögerten Wachstum bzw. Absterben der Zellen durch die mitotische Katastrophe, erkennbar durch starke Mikrotubulischäden, was eine defekte Ausbildung der Mitosespindel zur Folge hatte. Daraus folgte während der mitotischen Teilung eine Fehlverteilung der Chromosomen und anschließendes Absterben der Zellen. Eine CUR-Bindung an die Mikrotubuliproteine führte zu einer gestörten Tubulinpolymerisation und -depolymerisation, was die defekte Ausbildung des

Spindelapparates zur Folge hatte. Im Anschluss an die defekte mitotische Zellteilung gehen die Zellen in den programmierten Zelltod über.

Mit Hilfe von Zellfraktionierung nach CUR-Inkubation konnte gezeigt werden, dass CUR in hohen Konzentrationen in den Membranen des Endoplasmatischen Retikulums von drei humanen Krebszelllinien akkumuliert und somit in der Lage ist innere Kompartimente der Zellen zu erreichen. Geringere Mengen wurden im Cytosol gefunden, in dem vorrangig die Reduktion zu Hexahydro-CUR (HHC) erfolgte. Mit diesem Nachweis konnte bewiesen werden, dass CUR in die Zellen aufgenommen wird, an das vor allem im Cytosol lokalisierte Tubulin binden und somit die obengenannten Wirkungen auslösen kann.

Die Resorption von CUR im etablierten Caco-2 Millicell<sup>®</sup> System kann als gering eingestuft werden. Die erreichten  $P_{app}$ -Werte liegen im Bereich von  $0,05 \times 10^{-6}$  cm/s, was einer schlechten Bioverfügbarkeit im Menschen nach oraler Gabe entspricht. Die ermittelten Werte für HHC lagen mit  $3,3 \times 10^{-6}$  cm/s im Bereich für eine mittlere Resorption. Nur eine geringe Verbesserung konnte durch Inkubation mit gemischten Micellen mit postprandialer Zusammensetzung erreicht werden. Da es sich bei CUR um eine lipophile Substanz handelt, wurde seine Verteilung in Lipoproteinen, die von den Caco-2 Zellen gebildet und an das Medium abgegeben werden, untersucht. Es konnte aber noch nicht eindeutig geklärt werden, ob CUR tatsächlich über die Lipoproteine transportiert wird.

Im anaeroben Inkubationssystem mit humanen Fäzesbakterien wurden für CUR und HHC mehrere Metaboliten mit catecholischer Struktur identifiziert. In welchem Ausmaß diese gebildet werden und inwieweit sie von Darmzellen aufgenommen werden können sowie deren Einfluss auf die Resorption von CUR und dessen Toxizität sollte Ziel weiterer Untersuchungen sein.

Durch die metabolischen Prozesse, welche in dieser Arbeit untersucht wurden, konnten zwei kritische Metabolitengruppen identifiziert werden: die Glucuronide und die Catechole. Bei beiden ist bisher nicht ausreichend geklärt, in welchem Maß diese Metaboliten Reaktionen mit Proteinen oder anderen Makromolekülen eingehen und diese dadurch

---

strukturell verändern können. Das CUR-Glucuronid beeinflusst durch kovalente Bindung die Polymerisationseigenschaften der Mikrotubuli und könnte damit pharmakologische und toxikologische Relevanz besitzen. Catechole sind ebenfalls zur Reaktion mit Proteinen und anderen Makromolekülen fähig und könnten vor allem am Entstehungsort im Darm mit Zellen der Darmschleimhaut interagieren oder dort vermehrt reaktive Sauerstoffspezies bilden, welche die Zellen z.B. durch oxidativen Stress schädigen.

CUR findet in der Nahrung als geeigneter Naturstoff mit krebspräventiven Eigenschaften Verwendung. Entscheidend hierfür ist jedoch, dass seine Wirkung selektiv ist und vor allem im Darm atypisch proliferierende Zellen in ihrem Wachstum eingeschränkt werden. Hinweise für eine selektive Wirkung von CUR auf entartete Zellen im Gegensatz zu gesunden Zellen wurden beobachtet. Durch Nahrungsergänzungsmittel werden allerdings hohe Dosen im Darm erreicht, durch die im Darm eine vermehrte Catecholbildung möglich sein könnte. Ebenso könnten durch die hohe CUR-Dosierung auch höhere Gehalte im Darm aufgenommen und nach dessen Verteilung über das Plasma systemisch in sämtlichen Organen erreicht werden. Ein eindeutiger Nachweis der Aufnahme durch die Zellen wurde durch die Akkumulation von CUR im Endoplasmatischen Retikulum gezeigt. Aufgrund der geringfügigen Resorption über die Darmzellen bleibt es allerdings fraglich, ob CUR nach der Aufnahme aus dem Darm wirklich über das Blut alle Gewebe, in denen CUR eine protektive Wirkung zugeschrieben wird, wie z.B. die Brust oder das Hirn erreichen kann.



---

## 5 Material und Methoden

### 5.1 Geräte und Hilfsmittel

<b>Biofreezer</b>	GFL, Burgwedel
<b>Durchflusscytometer</b>	Partec PA II, Anregung mit Quecksilberdampflampe
<b>Evaporatorzentrifuge</b>	RC 10.10 mit Kühlfalle RCT 90 (Jouan GmbH, Unterhaching)
<b>Fluoreszenzmikroskop</b>	Eclipse E400 (Nikon, Düsseldorf); Objektiv: Plan Apo 60xA/1.40, 100x/1.4 (Öl); Okular: 10x/22; Fluoreszenz-Filtereinsätze: UV-2A (DAPI, Ex <sup>1</sup> : 330-380, DM <sup>2</sup> : 200, BA <sup>3</sup> : 420), G-2A (Rhodamin, Ex <sup>1</sup> : 510-560, DM <sup>2</sup> : 575, BA <sup>3</sup> : 590), FITC (Ex <sup>1</sup> : 465-495, DM <sup>2</sup> : 505, BA <sup>3</sup> : 515-555), Tripelfilter Mikroskopkamera SPOT-RT monochrome CCD-Digitalkamera (Visitron Diagnostic Systems); Software: MetaView (Universal Imaging Corp.)
<b>Kühlschrank</b>	Premium (Liebherr, Bulle, Schweiz)
<b>Mikrotiterplattenlesegeräte</b>	GENios (Tecan, Crailsheim) mit Auswertesoftware: XFluor4 Wallac Victor2 <sup>TM</sup> (PerkinElmer, Boston, USA)
<b>pH-Meter</b>	CG 817 mit Elektrode BlueLine 12 (Schott AG, Mainz)
<b>Photometrie</b>	UV/Vis Photometer V-550 (Jasco); Software SpectraManager 1.53 M (Jasco, Groß-Umstadt); mit Thermostat julabo 5 (Julabo Labortechnik, Seelbach)

---

<sup>1</sup>Anregung, Wellenlänge in nm

<sup>2</sup>Dichroistischer Spiegel, Wellenlänge in nm

<sup>3</sup>Emissionsfilter, Wellenlänge in nm

<b>Pipetten</b>	Präzisionsküvetten aus Quarzglas Suprasil <sup>®</sup> ; Typ QS 1.000; Schichttiefe 10,00 mm (Hellma, Müllheim) Eppendorf Reference 0,5 - 10 $\mu$ l; 10 - 100 $\mu$ l; 50 - 200 $\mu$ l; 100 - 1000 $\mu$ l (Eppendorf, Hamburg) Multipette plus (Eppendorf, Hamburg) Abimed Discovery 1000 - 5000 $\mu$ l (Abimed, Langenfeld)
<b>Schüttelinkubator</b>	Unitron, Infors AG (Bottmingen, Schweiz)
<b>Synthese</b>	Exsikator Magnetrührer IKAMAG RET-G (IKA Labortechnik, Staufen) Rotationsverdampfer Rotavapor Re 111 mit Wasserbad (Büchi, Essen) und Membran-Vakuumpumpe mit Druckregler CVC24 (Vacuubrand, Wertheim)
<b>Thermomixer</b>	Eppendorf 5436 (Eppendorf, Hamburg)
<b>Tubulinpräparation</b>	Ultrazentrifuge Centrikon T-1080 (Kontron Instruments, (fixed angle) Rotor TFT 55.38)
<b>Ultrazentrifuge</b>	Ultrazentrifuge Centrikon T-1080 (Kontron Instruments, Schwing-Rotor TST 41.14)
<b>Vakuumpumpen</b>	ABM Greiffenberger Antriebstechnik GmbH, Marktredwitz
<b>Voltohmmeter</b>	EVOM-X, World Precision Instruments, Inc., Sarasota, FL USA, freundliche Leihgabe der BASF SE
<b>Vortex</b>	Genie 2 (Scientific Industries, Bohemia, New York, USA)
<b>Waagen</b>	Analysenwaage Sartorius handy; Typ H51 (Sartorius AG, Göttingen) Präzisionswaage Sartorius excellence; Typ E2000D (Sartorius AG, Göttingen)
<b>Zellfraktionierung</b>	Centrifuge 5417R (Eppendorf, Hamburg) Ultrazentrifuge (Beckman TL-100; Rotor TLA-45)

	Ultraschallspitze (Branson, Hannover)
	Zentrifuge Mikroliter (Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen)
	Megafuge 1.0R (Heraeus, Hanau)
<b>Zellkultur</b>	Autoklav (RS Laborgeräte, Heidelberg)
	Brutschrank Hera Cell (Heraeus, Hanau)
	Gasbrenner gasprofi 2 SCS (WLD-Tec, Göttingen)
	Handzählgeräte
	Neubauerzählkammer
	Phasenkontrastmikroskop Axiovert 40 C; Objektive 5x/0.12 Ph0, 10x/0.25 Ph1 (Zeiss, Oberkochen)
	Pipetus (Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt)
	Sterilbank Hera Safe (Heraeus, Hanau)
	Stickstofftank GT40 (Air Liquide, Düsseldorf)
	Wasserbad (Memmert, Schwabach)
<b>Zellzählgerät</b>	CASY <sup>®</sup> 1 Schärfe Systeme (Reutlingen)

## 5.2 Verbrauchsmaterial

<b>Anaerocult</b>	Anaerocult A mini (Merck KGaA, Darmstadt)
	Anaerotest Stäbchen (Merck KGaA, Darmstadt)
<b>Deckgläser</b>	24 × 60 mm (Marienfeld, Lauda-Königshofen)
<b>Einmal-Kanülen</b>	Roth, Karlsruhe
<b>Faltenfilter</b>	Schleicher & Schuell GmbH, Dassel
<b>Halb-Mikro-Küvetten</b>	10 × 4 × 45 mm, Plastik (Sarstedt, Nürnberg)
<b>Kryoröhrchen</b>	2 ml (Sarstedt, Nürnberg)
<b>Mikrotiterplatten</b>	Nunclon 6-Well, 24-Well und 96-Well Platten (Nalge Nunc International, Rochester, New York, USA)
<b>Millicell-Inserts</b>	24-Well Komplettsystem, 6-(hanging)-Well Inserts (Millipore, Schwalbach)
<b>Objektträger</b>	superfrost (Menzel, Braunschweig)

<b>Pasteurpipetten</b>	Roth, Karlsruhe
<b>Pipettenspitzen</b>	10, 100 und 1000 $\mu\text{l}$ (Sarstedt, Nürnberg), 5000 $\mu\text{l}$ (Eppendorf, Hamburg)
<b>Polyallomerröhrchen</b>	12 ml, UZ-beständig (Beckman, Krefeld)
<b>Quadripermschalen</b>	Multischalen $132 \times 82 \text{ mm}^2$ , 4 Vertiefungen (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen)
<b>Reaktionsgefäße</b>	1,5 ml; 2 ml (Sarstedt, Nürnberg)
<b>Reaktionsgefäße für UZ</b>	1,5 ml (Beckman, Krefeld)
<b>Sterilfilter</b>	0,22 und 0,45 $\mu\text{m}$ (Roth, Karlsruhe), Bottle Top Filters; 0,2 $\mu\text{m}$ , 500 ml (Nalge Nunc International, Rochester, New York, USA)
<b>Zellkulturschalen</b>	$\emptyset$ 150 mm (Biochrom AG, Berlin) $\emptyset$ 100 mm (Biochrom AG, Berlin) $\emptyset$ 60 mm (Biochrom AG, Berlin) $\emptyset$ 40 mm (Biochrom AG, Berlin)
<b>Zentrifugenröhrchen</b>	15 ml (Sarstedt, Nürnberg); 50 ml (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen)

### 5.3 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden soweit nicht anders vermerkt von Sigma/Aldrich/Fluka (Taufkirchen), VWR/Merck (Darmstadt), Serva (Heidelberg) oder Carl Roth (Karlsruhe) in der Reinheit mindestens "zur Analyse" bezogen.

Für alle verwendeten Puffer und Lösungen wurde soweit nicht anders angegeben Reinstwasser aus der Reinstwasseranlage (Serie Ultra Clear, SG Wasseraufbereitung und Regenerierstation GmbH, Barsbüttel) verwendet.



**Curcuminoide:**

Alle Curcuminoide wurden am Institut synthetisiert und gegebenenfalls hydriert:

<b>CUR</b>	chemische Synthese
<b>BDMC</b>	chemische Synthese
<b>iso-CUR</b>	chemische Synthese
<b>HHC</b>	katalytische Hydrierung von CUR
<b>HHBDMC</b>	katalytische Hydrierung von BDMC
<b>iso-HHC</b>	katalytische Hydrierung von iso-CUR
<b>CUR- und HHC-Derivate für Metabolismus</b>	chemische Synthese und katalytische Hydrierung

**Enzyme:**

<b><math>\beta</math>-Glucuronidase Typ B-1</b>	aus Rinderleber, 1 240 000 U/g (Sigma/Aldrich/Fluka, Taufkirchen)
<b>Sulfatase Typ VI</b>	aus <i>Acetobacter aerogenes</i> (12,25 U/ml); gelöst in Glycerin (Sigma/Aldrich/Fluka, Taufkirchen)

**Gase:**

<b>Helium</b>	4.6 (Air Liquide, Düsseldorf)
<b>Kohlendioxid</b>	Air Liquide, Düsseldorf
<b>Stickstoff</b>	5.0 (Air Liquide, Düsseldorf)
<b>Wasserstoff</b>	5.0 (Air Liquide, Düsseldorf)

**Zellkulturmedien und Zusätze:**

<b>DMEM</b>	mit Phenolrot, L-Glutamin, 4,5 g/l Glucose und 0,11 g/l Natriumpyruvat; ohne Natriumbicarbonat (MP Biomedicals, Heidelberg)
<b>DMEM/F12</b>	mit Phenolrot, L-Glutamin, 3,15 g/l Glucose und 15 mM HEPES; ohne Natriumbicarbonat (Sigma/Aldrich/Fluka, Taufkirchen)
<b>FKS</b>	Invitrogen, Karlsruhe
<b>Penicillin/Streptomycin</b>	5 000 U/ml Penicillin, 5 mg/ml Streptomycin (Sigma/Aldrich/Fluka, Taufkirchen)
<b>Trypsinlösung, 10×</b>	25 g Trypsin/l (Sigma/Aldrich/Fluka, Taufkirchen)
<b>EDTA</b>	Alfa Aesar GmbH & Co KG, Karlsruhe

**5.3.1 HPLC/DAD**

In allen HPLC-Systemen der folgenden Kapitel wurden die Vorsäulen SecurityGuard C18 (ODS), 4,0 × 3,0 mm i.d. (Phenomenex) und die Reversed Phase-Säulen Luna 5u C18 (2), 250 × 4,6 mm i.d., 5 µm Partikelgröße (Phenomenex) verwendet.

Analytisches Hochdruckgradientensystem der Serie HP 1100 mit Degasser, binärer Pumpe und Dioden-Array-Detektor (DAD); die Aufnahme und Analyse der Daten erfolgte mit der Software HP ChemStation, Version Rev.A.07.01 (Agilent Technologies, Waldbronn)

<b>Autosampler</b>	717plus (Waters)
<b>Manueller Injektor</b>	Injektionsventil Modell 7725i (Rheodyne)
<b>Flussrate</b>	1 ml/min
<b>Eluent A</b>	entionisiertes H <sub>2</sub> O; pH 3,0 mit konz. Ameisensäure eingestellt
<b>Eluent B</b>	Acetonitril (Acros Organics BVBA, Geel, Belgien)

**Gradient 1:** Zur Detektion von Curcuminoiden und deren reduktiven Metaboliten HHC, HHBDMC, iso-HHC, OHC

Zeit (min)	0	35
Eluent A (%)	70	30
Eluent B (%)	30	70

Detektion: 280, 370 und 420 nm

**Gradient 2:** Zur Detektion von Coffein

Zeit (min)	0	16	23
Eluent A (%)	90	55	0
Eluent B (%)	10	45	100

Detektion: 275 und 280 nm

**Gradient 3:** Zur Detektion von synthetischen CUR-Derivaten (aus Fäzesinkubationen)

Zeit (min)	0	40	42	45
Eluent A (%)	50	0	0	50
Eluent B (%)	50	100	100	50

Detektion: 280, 400 und 420 nm

**Gradient 4:** Zur Detektion von synthetischen CUR-Derivaten (aus Fäzesinkubationen)

Zeit (min)	0	15	45	47
Eluent A (%)	70	30	0	70
Eluent B (%)	30	70	100	30

Detektion: 280, 400 und 420 nm

### 5.3.2 HPLC/UV

Analytisches Hochdruckgradientensystem der Serie Beckman System Gold mit binärer Pumpe (125 Solvent Module) und UV/Vis-Detektor (166); die Erfassung und Analyse der Daten erfolgte mit der Software Beckman 32 Karat, Version 7.0

- Manueller Injektor** Injektionsventil Modell 7725i (Rheodyne)
- Flussrate** 1 ml/min
- Eluent A** entionisiertes H<sub>2</sub>O; mit 5 mM Tetrabutylammoniumdihydrogenphosphat als Ionenpaar-Reagenz.
- Eluent B** Acetonitril

Gradient 5: Zur Detektion von HHC-, HHBDMC- und iso-HHC-Sulfaten

Zeit (min)	0	2	22
Eluent A (%)	5	50	100
Eluent B (%)	95	50	0

Detektion: 280 nm

### 5.3.3 HPLC-UV/MS

#### HPLC-System

LC/MS-Komplettsystem Finnigan Surveyor, Thermo Electron Cooperation mit Autosampler; die Aufnahme und Analyse der Daten erfolgte mit der Software XKalibur (Thermo Fischer, Schwerte)

- Flussrate** 500 µl/min
- Eluent A** entionisiertes H<sub>2</sub>O; pH 3,0 mit konz. Ameisensäure eingestellt
- Eluent B** Acetonitril

**Gradient 1:** Zur Detektion von Curcuminoiden und deren reduktiven Metaboliten und Sulfaten von HHC

Zeit (min)	0	30	35	38	40
Eluent A (%)	70	30	0	0	70
Eluent B (%)	30	70	100	100	30

Detektion: 280, 370 und 420 nm

**Gradient 2:** Zur Detektion von HHC und HHC-Metaboliten aus Fäzesinkubationen

Eluent A: dest. H<sub>2</sub>O

Eluent B: Acetonitril

Zeit (min)	0	20	21	25	27
Eluent A (%)	70	20	0	0	70
Eluent B (%)	30	80	100	100	30

Detektion: 280, 370 und 420 nm

## Massenspektrometer

Lineare Ionenfalle als Massenanalysator

Ionisation: Electrospray-Ionisation (ESI) im negativen Modus

Kollisionsenergie: CID 35

Massenbereich: m/z 200 - 600

Nach der Trennung der HHC-Derivate auf der HPLC-Säule wurde ein Teil des Eluenten nach Ionisierung mittels MS und MS/MS analysiert. Die Aufnahme erfolgte im Full MS Scan-Modus und anschließend auf die Mutterionen [M-H]<sup>-</sup> der HHC-Derivate (374, 360, 358, 346, 344, 342, 328, 330, 314).

### 5.3.4 GC/FID

Verwendet wurde ein Gaschromatograph der Marke Fisons GC 8130 mit Flammenionisationsdetektor. Die Aufzeichnung der Daten erfolgte mit der Software Maestro Version 2.3 und ausgewertet wurde mit Hilfe der Software Beckman Karat32 (Version 7.0).

<b>Injektor</b>	ATLAS Optic2, programmierbar, (ATASGL International B.V., Eindhoven, Niederlande)
<b>Kapillarsäule</b>	Alltech Econo-Cap EC5, 5 % Diphenylsiloxan, 30 m × 0,32 mm, 0,25 µm Filmdicke
<b>Trägergas</b>	Helium, 1 bar
<b>Injektionsvolumen</b>	1 µl

Temperaturprogramm:

Injektor: 300 °C bei 1 bar, Modus: Splitless

Detektor: 250 °C

Initialtemperatur:	80 °C	
Isotherme 1:	1 min	
Aufheizrate 1:	30 °C/min	Temperatur 1: 180 °C
Aufheizrate 2:	5 °C/min	Temperatur 2: 225 °C
Aufheizrate 3:	40 °C/min	Temperatur 3: 300 °C
Isotherme 2 :	10 min	

## 5.4 Methoden in der Zellkultur

Alle verwendeten humanen Zellen stammen von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, haben etwa eine Verdopplungszeit von 24 h und werden ca. 30 bis 40 Passagen lang kultiviert (Ausnahmen siehe in der folgenden Aufzählung).

- **Zelllinien:**

<b>Caco-2 Zellen</b>	Zelllinie aus einem Adenokarzinom des humanen Kolons; kultiviert in DMEM/F12-Medium; Passagenzahl: bis 80
<b>HepG2 Zellen</b>	Zelllinie aus humanem Hepatom; kultiviert in DMEM/F12-Medium
<b>HT29 Zellen</b>	Zelllinie aus einem Adenokarzinom des humanen Kolons; kultiviert in DMEM-Medium
<b>Ishikawa Zellen</b>	Zelllinie aus einem Adenokarzinom des humanen Endometriums; kultiviert in DMEM/F12-Medium
<b>V79 Zellen</b>	Lungenfibroblasten des männlichen Chinesischen Hamsters; kultiviert in DMEM-Medium; Verdopplungszeit: 12 h

- **Lösungen:**

PBS: 0,1 M NaCl, 4,5 mM KCl, 7 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 3 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> in dest. H<sub>2</sub>O lösen, pH auf 7,4 einstellen, auf 1 l auffüllen und sterilfiltrieren.  
Für PBS-EDTA wurden zusätzlich 200 mg EDTA/l benötigt.

Trypsin: 20 ml 10× Trypsinlösung wurden auf 200 ml mit PBS-EDTA aufgefüllt (0,25 % Trypsin), für die Caco-2 Zellen wurde 0,625 % Trypsin benötigt (50 ml auf 200 ml verdünnen).

- **Kulturmedien:**

DMEM/F12-Kulturmedium:		DMEM-Kulturmedium:	
Reagenzien	Endkonz.	Reagenzien	Endkonz.
DMEM/F12	15,6 g/l	DMEM	15,6 g/l
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1,2 g/l	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	2,25 g/l

Lösen in bidest. H<sub>2</sub>O; pH-Einstellung auf 6,8 - 6,9; Sterilfiltrieren und Zugabe von 10 % FKS, Penicillin (100 U/ml) und Streptomycin (0,1 mg/ml).

- **Kultivierung und Passagieren:**

Die Zellen wurden bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> in einer mit Wasser gesättigten Atmosphäre kultiviert. Vor dem Benutzen wurden alle Lösungen und Medien auf 37 °C erwärmt.

Zum Passagieren wurde das Medium von der Kulturschale abgesaugt und der Zellmonolayer mit PBS gewaschen. Anschließend wurden 3 ml Trypsin für 30 sec auf die Zellen gegeben und nach dem Aspirieren die Schale so lange in den Brutschrank gestellt, bis sich die Zellen abkugelten (ca. 5 bis 10 min, bei HepG2 Zellen blieb das Trypsin zur Inkubation im Brutschrank auf dem Monolayer). Durch Klopfen wurden die Zellen vollständig abgelöst und mit 10 ml Medium abgespült. Die Zellen wurden mit der Neubauerkammer gezählt und etwa  $5 \times 10^5$  Zellen auf eine neue Zellkulturplatte ausgestreut.

Für die verschiedenen Inkubationen wurden unterschiedliche Zellzahlen ausgestreut (s. jeweilige Beschreibung), die Endkonzentration an Lösungsmittel betrug soweit nicht anders vermerkt 0,5 % DMSO.

- **Kryokonservierung und Auftauen der Zelllinien:**

Damit immer Zellen in niedrigen Passagen zur Verfügung stehen, wurden nach dem Abtrypsinieren  $3 \times 10^6$  Zellen pro Kryoröhrchen in 1,5 ml Einfriermedium (70 % des jeweiligen Mediums, 20 % FKS und 10 % DMSO) eingefroren und im Stickstofftank bis zur Verwendung gelagert. Diese Aliquots wurden bei Bedarf in frischem Medium aufgenommen, bei RT für 5 min bei  $1\,000 \times g$  zentrifugiert und das Medium aspiriert. Anschließend wurden die Zellen in frischem Medium in einer Ø 100 mm-Schale kultiviert und nach 24 h das Medium gewechselt, um das restliche DMSO zu entfernen.

- **Test auf Mycoplasmen:**

Um auszuschließen, dass die Zellen mit Mycoplasmen kontaminiert waren, wurden regelmäßig  $1 \times 10^5$  Zellen auf einem OT 24 h kultiviert und mit DAPI die DNA angefärbt. Unter dem Fluoreszenzmikroskop waren nur die Zellkerne der Zelllinien erkennbar. Damit wurde kontrolliert, dass keine Mycoplasmen vorhanden waren.



## 5.5 Zellfraktionierung

Um die Einlagerungsfähigkeit der Curcuminoide in die verschiedenen Zelllinien zu überprüfen, wurden aus dem Zellysat der jeweiligen Zellen mittels Zellfraktionierung die Mikrosomen (Membranen des ER) und das Cytosol gewonnen. Die Zellfraktionen wurden mit Folch-Reagenz [Folch et al., 1957] und das Medium mit Ethylacetat extrahiert.

### Lösungen:

Natrium-Acetat-Puffer: 0,15 M Natrium-Acetat lösen, mit Essigsäure auf pH 5,0 bringen und auf 100 ml auffüllen

Folch-Reagenz: Chloroform/Methanol: 2:1 (v/v)

### Durchführung:

Inkubation der Zellen:

- Ausstreuen von  $3 \times 10^6$  Zellen in  $\varnothing$  100 mm Kulturschalen und Kultivierung für 24 h
- Inkubation pro Zeitpunkt in einer Schale mit 30  $\mu$ M CUR oder HHC
- Entfernen des Mediums nach Ablauf der Inkubationszeit und Lagerung des Inkubationsmediums bis zur Aufarbeitung bei -20 °C
- Abtrypsinieren der Zellen mit 0,25 % Trypsin und Aufnahme in 7 ml PBS, Zentrifugation bei  $1\,500 \times g$ , Aspiration des PBS, Aufnahme des Zellpellets in 200  $\mu$ l PBS und Lagerung des Pellets bei -80 °C (Zellyse) im Biofreezer bis zur Aufarbeitung

Aufarbeitung:

- KULTURMEDIUM: 4 ml des Mediums wurden mit 24 mM internem Standard (IS) 3,5,3',5'-Tetramethylbisphenol A (TMBPA) (Endkonz. 48  $\mu$ M) versetzt und geteilt. Ein 2 ml-Aliquot wurde mit 2 ml Natrium-Acetat-Puffer (Na-Ac-Puffer) und 100 U Glucuronidase versetzt und beide Proben wurden im Wasserbad für 3 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die Extraktion mit  $2 \times 4$  ml Ethylacetat. Nach dem Abrotieren des Lösungsmittels wurde der Überstand in 50  $\mu$ l MeOH aufgenommen und ein Aliquot mittels HPLC/DAD analysiert.

- **ZELLYSAT:** Das Zellysat eines jeden Inkubationszeitpunktes wurde mit 5 mM TMBPA (Endkonz. 55,5  $\mu$ M) in PBS versetzt und mit Hilfe einer Ultraschallspitze 15 sec mit 40 Watt unter Eiskühlung vollständig lysiert und homogenisiert. Die erste Zentrifugation erfolgte bei  $9\,000 \times g$  und  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  für 15 min. Der Überstand wurde anschließend in UZ-stabile Reaktionsgefäße überführt. Die zweite Zentrifugation erfolgte bei  $100\,000 \times g$  und  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  für 1 h. Der Rückstand aus der ersten Zentrifugation enthielt vor allem Membranbestandteile, dieser sowie der Rückstand der zweiten Zentrifugation, welcher die Membranen des ER enthielt, wurden mit 250  $\mu$ l PBS überschichtet und nochmals mit Hilfe der Ultraschallspitze homogenisiert. Die beiden Rückstände sowie der Überstand der zweiten Zentrifugation (cytosolische Fraktion) wurden  $2\times$  mit 500  $\mu$ l Folch-Reagenz extrahiert. Nach der Evaporation zur Trockene wurden die Rückstände ebenfalls in MeOH aufgenommen und ein Aliquot per HPLC/DAD analysiert.

### **Auswertung:**

Der interne Standard wurde nur als Extraktionskontrolle verwendet und fand in der Berechnung keinerlei Verwendung. Mit Hilfe von Kalibriergeraden (s. Anhang Tabelle 21) wurde der absolute Gehalt an Substanz und Metaboliten in den drei Fraktionen des Zellysates und im Kulturmedium ermittelt.

## **5.6 Zelldurchmesser- und Zellvolumenbestimmung**

Mit Hilfe des Zellzählgerätes CASY<sup>®</sup> kann der Durchmesser und das Volumen von kultivierten Zellen bestimmt werden. Dabei handelt es sich um ein Partikelmessgerät, welches die Größe der Partikel einer Probe ermittelt. Zur Messung werden die Zellen in der schwachen Elektrolytlösung CASYton Counter Puffer suspendiert und mit konstanter Geschwindigkeit durch eine Kapillare definierter Geometrie gesaugt. Über zwei Platinelektroden wird während der Messung eine Spannung an die Kapillarstrecke angelegt. Die elektrolytgefüllte Kapillare stellt somit einen definierten elektrischen Widerstand dar. Bei der Messung verdrängen die Zellen eine ihrem Volumen entsprechende Menge der Elektrolytlösung und es kommt zu einer Widerstandserhöhung (intakte Zellen werden als Isolator betrachtet). Diese Änderung des Widerstands wird als Maß für das Volumen der Zellen betrachtet. Es wurde der Bereich von

3,2 bis 80  $\mu\text{m}$  vermessen. Im Abstand von 1  $\mu\text{m}$  wurde die Anzahl von Zellen bestimmt, die sich in diesem Bereich befanden. Die Messverteilung der Zellen pro  $\mu\text{m}$  kann als Gaußverteilung aufgetragen und daraus die durchschnittliche Zellgröße errechnet werden.

**Lösungen:**

CASYton Counter Puffer: 0,14 M NaCl; 1,1 mM EDTA- $\text{Na}_2$ ; 5,4 mM KCl; 7,1 mM NaF;  
1,6 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ; 14 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  in  $\text{H}_2\text{O}$

**Durchführung:**

100  $\mu\text{l}$  Zellsuspension, die zwischen  $1 \times 10^5$  und  $1 \times 10^6$  Zellen enthielt, wurden in 10 ml CASYton Puffer gut gemischt und an die Kapillare gehalten. Um einen Größenvergleich zu den toten Zellen der jeweiligen Zelllinie zu erhalten, wurden 50  $\mu\text{l}$  Zellsuspension mit 50  $\mu\text{l}$  reinem Ethanol lysiert und ebenfalls vermessen.

**Auswertung:**

Durch Auftragung der Gaußverteilung der lebenden und der toten Zellen konnte die durchschnittliche Zellgröße einer toten und einer lebenden Zelle bestimmt werden. Das Maximum der Gaußkurve war der durchschnittliche Durchmesser der überprüften Zelllinie.

Mit Hilfe des ermittelten Durchmessers einer Zelllinie konnte das durchschnittliche Volumen berechnet werden. Dazu wurde angenommen, dass sich die abtrypsinisierten Zellen wie Kugeln verhalten:

$$V = \frac{4}{3} \times \pi \times r^3$$

V = Volumen einer Kugel

r = Radius =  $1/2 \times d$

d = Durchmesser einer Zelle (bestimmt mit Hilfe des CASYCell Counters)

Tabelle 18 fasst die Ergebnisse der Zelldurchmesserbestimmung zusammen. Die humanen Zelllinien sind dabei etwa gleich groß. Die V79 Zellen sind die kleinsten Zellen (10,9  $\mu\text{m}$ ) und die Caco-2 Zellen sind besonders groß (16,9  $\mu\text{m}$ ).

Für die Berechnung der Konzentration an CUR bzw. HHC pro Zeitpunkt wurden  $2,5 \times 10^6$  Zellen als Zellzahl pro Inkubationsplatte angenommen, da  $3 \times 10^6$  Zellen ausgestreut wurden, und es bei der Aufarbeitung zu Verlusten kam.

Tabelle 18: Ergebnisse der CASYCounter Messung. Dargestellt ist der mittlere Durchmesser  $\pm$  SD von drei unabhängigen Messungen.

Zelllinie	Durchmesser [ $\mu\text{m}$ ]
Caco-2	16,9 $\pm$ 0,61
HepG2	15,0 $\pm$ 0,36
HT29	14,4 $\pm$ 0,65
Ishikawa	14,4 $\pm$ 0,30
V79	10,9 $\pm$ 0,20

## 5.7 Kolorimetrische *in vitro*-Cytotoxizitätstests

### 5.7.1 MTT-Test

Beim MTT-Test wird durch eine zelluläre Reduktion das MTT zum MTT-Formazan umgewandelt. Dieses besitzt sein Absorptionsmaximum bei 570 nm. Die ionische gelbe Ausgangssubstanz wird über Endozytose von den Zellen aufgenommen. Je nach Zelltyp erfolgt die Reduktion zu dem blauen Formazan in den Mitochondrien, Lysosomen oder im Cytosol (Reduktion s. Abbildung 36). Diese Reduktion des MTT korreliert mit dem Redox-Status einer Zellpopulation und wird als Lebensfähigkeit oder Viabilität angegeben [Berridge und Tan, 1993; Liu et al., 1997; Vistica et al., 1991].

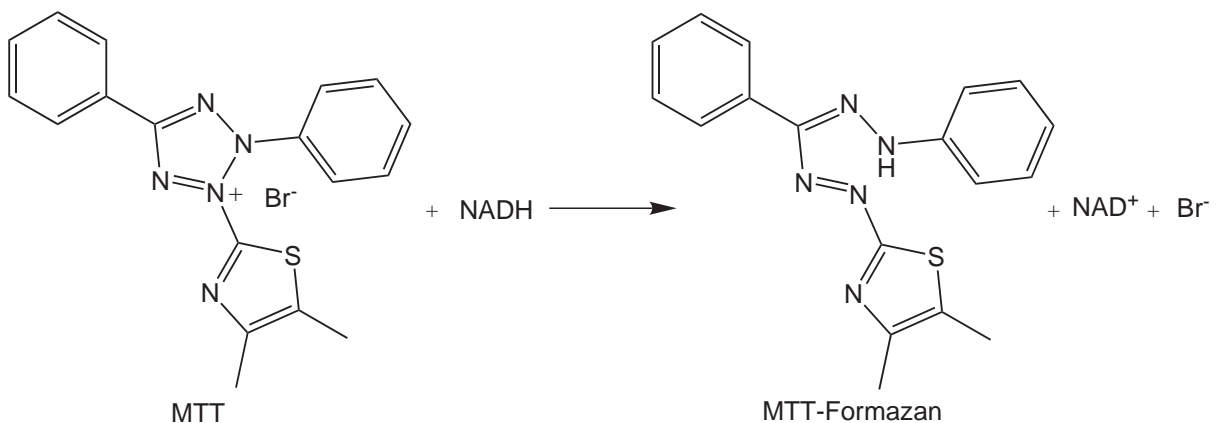


Abbildung 36: Zelluläre Reduktion von MTT (gelb) zu MTT-Formazan (blau)

**Lösungen:**

MTT-Farblösung: 50 mg MTT-Bromid (Sigma, Taufkirchen) werden in 10 ml sterilem PBS gelöst (Erwärmen und Ultraschallbad), mit 0,22  $\mu\text{m}$  Filter sterilfiltriert und in 2 ml-Portionen im Kühlschrank aufbewahrt.

MTT-Lyse-Puffer: 10 g SDS werden in DMSO gelöst, danach werden 0,6 ml Eisessig zugegeben und mit DMSO auf 100 ml aufgefüllt.

**Durchführung:**

- Ausstreuen von 20 000 Zellen/Well (V79 Zellen: 10 000 Zellen/Well) in 200  $\mu\text{l}$  Medium in eine 96-Well Platte und Kultivierung für 24 h
- Inkubation für 6 bis 24 h in Kulturmedium mit und ohne FKS mit steigenden Substanzkonzentrationen in DMSO
- Zugabe von 20  $\mu\text{l}$  MTT-Farblösung/Well 2 h vor Ablauf der Inkubationszeit und Inkubation der Platte für weitere 2 h im Brutschrank
- Aspiration des Mediums nach Ablauf der Inkubationszeit und Zelllyse mit 100  $\mu\text{l}$  Lyse-Puffer pro Well
- Schütteln der Platte für 5 min bei RT im Plattenlesegerät und anschließende Messung der Absorption bei 570 nm

**Auswertung:**

Die Extinktionen wurden auf die Lösungsmittelkontrolle bezogen und als prozentualer Anteil dieser angegeben. Pro Konzentration wurden acht Wells verwendet, diese Versuche dreimal wiederholt und die MW und die SD berechnet.

Mit Hilfe des Computerprogramms OriginPro 8G erfolgte eine Berechnung der Dosis-Wirkungs-Kurven. Dabei wird mit dem Levenberg-Marquardt-Algorithmus eine nichtlineare Ausgleichsgerade nach dem Prinzip der kleinsten Abweichungsquadrate durch die Messpunkte berechnet. Der sigmoidale Kurvenverlauf wird mit der Logistik-Funktion beschrieben:

$$y = \frac{A_1 - A_2}{1 + \left(\frac{X}{X_0}\right)^p} + A_2$$

mit  $A_1$ : Maximalwert (Kontrolle, 100 % Viabilität);  $A_2$ : Minimalwert (maximaler Viabilitätsverlust);  $X$ : Konzentration in  $\mu\text{mol/l}$ ;  $X_0$ :  $\text{IC}_{50}$ -Wert;  $p$ : Steigung.

Der  $\text{IC}_{50}$ -Wert beschreibt die Konzentration einer Substanz bei der 50 % der Zellen im Wachstum inhibiert werden.

### 5.7.2 SRB-Test

Beim SRB-Test bindet das SRB im Sauren an die Proteine der Zelle. Nach dem Auswaschen des ungebundenen Farbstoffes wird das gebundene SRB mit einem basischen Tris-Puffer wieder in Lösung gebracht. Die Absorption des SRB wird photometrisch bei 570 nm bestimmt [Skehan et al., 1990]. Die Strukturformel von SRB ist in Abbildung 37 dargestellt.

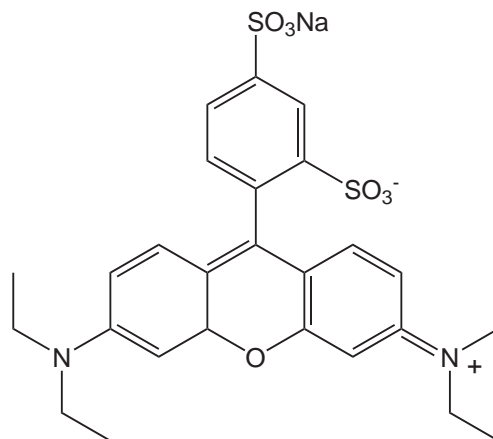


Abbildung 37: Strukturformel von Sulforhodamin B (SRB).

#### Lösungen:

Trichloressigsäure-Lösung: (10 % (w/v)) 50 g Trichloressigsäure werden in 500 ml  $\text{H}_2\text{O}$  gelöst und im Kühlschrank aufbewahrt.

Essigsäure: (1 % (v/v)) 10 ml Eisessig werden mit  $\text{H}_2\text{O}$  auf 1 l aufgefüllt.

SRB-Lösung: (0,4 % (w/v)) 0,4 g SRB-Farbstoff werden in 100 ml 1 %iger Essigsäure gelöst.

Tris-Puffer: (10 mM, ungepuffert) 0,6 g Tris Base werden in 500 ml  $\text{H}_2\text{O}$  gelöst.

#### Durchführung:

- Ausstreuen von 10 000 Zellen/Well (V79 Zellen: 5 000 Zellen/Well) in 200  $\mu\text{l}$  Medium in eine 96-Well Platte und Kultivierung für 24 h

- Inkubation der Zellen mit den gewünschten Substanzkonzentrationen für 72 h
- Zugabe von 100  $\mu\text{l}$  Trichloressigsäurelösung pro Well nach Ablauf der Inkubationszeit und weitere Inkubation für 1 h bei 4 °C
- Waschen der Platte 4 $\times$  mit dest. H<sub>2</sub>O und Trocknung der Platte über Nacht
- Zugabe von 100  $\mu\text{l}$  SRB-Lösung je Well und Inkubation von 30 min bei RT
- Waschen der Platte 4 $\times$  mit 1%iger Essigsäure und Trocknung der Platte über Nacht
- Zugabe von 200  $\mu\text{l}$  Tris-Puffer/Well, 3 min Inkubation bei RT, Schütteln für 2 min im Plattenlesegerät und Messung der Absorption bei 570 nm

**Auswertung:**

Die Extinktionen wurden auf die Lösungsmittelkontrolle bezogen und als prozentualer Anteil dieser angegeben. Pro Konzentration wurden acht Wells verwendet, diese Versuche dreimal wiederholt und die MW und die SD gebildet.

Die sigmoidale Kurvenanpassung zur Ermittlung der IC<sub>50</sub>-Werte erfolgte wie beim MTT-Test (s. Kap. 5.7.1) mit dem Computerprogramm OriginPro 8G.

## 5.8 Messung der Zellzyklusverteilung

Am Durchfluscytometer kann mittels FACS-Messung die Zellzyklusverteilung kultivierter Zellen untersucht werden. Zellen besitzen in den verschiedenen Phasen des Zellzyklus einen unterschiedlichen DNA-Gehalt. Jede Zelllinie hat dabei eine charakteristische Zellzyklusverteilung. Bei der Durchfluscytometrie wird nach der Lyse der Plasmamembranen die DNA mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI gefärbt. In der G<sub>2</sub>/M-Phase liegt die DNA tetraploid vor und weist damit die höchste Fluoreszenz auf, in der G<sub>1</sub>-Phase dagegen liegt die DNA nur diploid vor und daher zeigt sich nur eine schwache Fluoreszenz. In der S-Phase während der Replikation liegt der DNA-Gehalt zwischen dem der G<sub>1</sub>- und der G<sub>2</sub>/M-Phase. Am Durchfluscytometer wird die Fluoreszenz eines Partikels bei einer Wellenlänge von 435 - 500 nm detektiert und die Anzahl der Zellen in den verschiedenen Zellzyklusphasen bestimmt [Lehmann et al., 2005].

**Lösungen:**

CyStain<sup>®</sup> DNA 2step, High Resolution DNA staining kit (Partec):

Lyse-Puffer: 21 mg Salz (Buffer reagent) werden in 1 ml Extraktionspuffer gelöst

DAPI: direkt einsetzen

**Durchführung:**

- Ausstreuen von 50 000 Zellen/Well in 1 ml Medium in eine 24-Well Platte und Kultivierung für 24 h
- Inkubation mit den gewünschten Konzentrationen für verschiedene Zeitpunkte
- Zellyse nach Ablauf der Inkubationszeit gemäß Herstellerprotokoll mit 150  $\mu$ l Lyse-Puffer für 10 min
- Zugabe von 750  $\mu$ l DAPI-Lösung nach 10 min Inkubation
- Überführen der Zellysate in Röhrchen und sofortige Messung am Durchflusscytometer (Färbung haltbar ca. 24 h)

**Auswertung:**

Die blaue Fluoreszenz wurde detektiert und linear aufgetragen. Die G0/G1-Phase sollte etwa eine Intensität von 200 Einheiten besitzen. Die Gesamtzellzahl und die Zellzahlen in den einzelnen Zellzyklusphasen wurden pro ml angegeben. Daraus konnten die prozentualen Anteile an der jeweiligen Phase des Zellzyklus angegeben werden. Pro Konzentration wurden drei Wells inkubiert, dies wurde dreimal unabhängig wiederholt und die MW und die SD berechnet. Zudem wurde der MW und die SD der Zellzahlen bei den verwendeten Konzentrationen aufgetragen.

## 5.9 Immunologische Färbungen

Um den Einfluss von verschiedenen Chemikalien auf die Mitoserate, die Störung des Mikrotubuligerüsts und die Anzahl der Mikrokerne pro Zelle zu untersuchen, werden mit Hilfe von fluoreszenzmarkierten Antikörpern die MTP und die Centromere der Zellen angefärbt. Die DNA wird mit dem Farbstoff DAPI angefärbt [Brugger et al., 2006; Tan et al., 1980].



**Lösungen:**

10× PBS-CMF: 1,37 M NaCl, 27 mM KCl, 78 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (wasserfrei) und KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> werden in H<sub>2</sub>O gelöst und auf 1 l aufgefüllt.

PBS-CMF-Puffer: 100 ml 10× PBS-CMF-Puffer werden mit H<sub>2</sub>O verdünnt, mit NaOH auf pH 8,0 eingestellt und auf 1 l aufgefüllt.

Antifade-Lösung: 100 mg p-Phenylendiamin-dihydrochlorid werden in 10 ml PBS gelöst und mit NaHCO<sub>3</sub>-Lösung (0,5 M; pH 9 mit NaOH) auf pH 8 eingestellt, sterilfiltriert und bei -20 °C gelagert

DAPI-Lösung: 1 mg DAPI werden in 1 ml H<sub>2</sub>O gelöst

Dapi-Antifade-Lösung: in 10 ml Antifade-Lösung werden 10 µl DAPI-Lösung (Endkonzentration: 1 µg/ml) gelöst, aliquotiert (0,7 ml) und mit Alufolie umwickelt bei -20 °C gelagert

Ziegenullserum: unverdünnt verwendet (Sigma, Taufkirchen)

BSA-Lösung: 1% (m/v) BSA werden in PBS-CMF gelöst

**Primäre Antikörper:**

Centromer positive Control (CREST-Antikörper) (DPC Biermann, Bad Nauheim)  
Monoclonaler Anti-α-Tubulin Antikörper aus Maus-Ascitesflüssigkeit (Sigma, Taufkirchen)

Primärantikörper-Lösung: Die Primärantikörper werden mit BSA-Lösung verdünnt (CREST 1:200; Anti-Tubulin 1:500)

**Sekundäre Antikörper:**

Polyvalenter Anti-Human-Antikörper der Ziege (Sigma, Taufkirchen);  
FITC-konjugiert  
Anti-Maus-Antikörper der Ziege (Jackson ImmunoResearch, Newmarket, UK);  
CY3-konjugiert

Sekundärantikörper-Lösung: Die Sekundärantikörper werden mit BSA-Lösung verdünnt (Anti-Human 1:200; Anti-Maus 1:250)

**Durchführung:**

Inkubation der Zellen:

- Kultivierung von vier OT pro Quadripermschale für 24 h: Ausstreuen von  $10^5$  Zellen je Vertiefung in 5 ml Kulturmedium
- Inkubation der OT mit den gewünschten Konzentrationen an CUR bzw. Col oder NQO
- Mediumwechsel nach Ablauf der Inkubationszeit von 24 h und Kultivierung für weitere 24 h
- Entnahme der OT aus Medium und Lagerung bis zur weiteren Verwendung (mind. 30 min) in MeOH bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$

Färbung der OT:

- Waschen der OT  $3\times$  für je 5 min in PBS-CMF
- Die Inkubationsschritte erfolgten in einer feuchten Kammer bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$
- Inkubation mit  $200\text{ }\mu\text{l}$  Ziegenserum (Deckglas) pro OT für 1 h, Entfernung der Deckgläser und Schwenken der OT kurz in PBS-CMF
- Inkubation mit  $100\text{ }\mu\text{l}$  Primärantikörper-Lösung (Deckglas) für 1 h, nach Entfernung der Deckgläser erneutes Waschen der OT  $3\times$  für 5 min in PBS-CMF
- OT-Inkubation mit je  $100\text{ }\mu\text{l}$  Sekundärantikörper-Lösung (Deckglas), anschließendes Waschen mit PBS 8,0 ( $3\times$  je 5 min)
- Bedecken der OT nach dem Trocknen mit ca.  $70\text{ }\mu\text{l}$  DAPI-Antifade-Lösung (Haltbarkeit der Markierung etwa 14 Tage im Dunkeln)

**Auswertung:**

Die Auswertung erfolgte optisch unter dem Fluoreszenzmikroskop. Es wurden pro OT zweimal je 1 000 Zellen ausgewertet. Bestimmt wurde die Anzahl an Kinetochor-positiven und -negativen Mikrokernen, die Anzahl der Zellen, die sich in der Mitose befanden, sowie die Häufigkeit des Auftretens von fragmentierten Zellkernen (mehr als drei Mikrokerne pro Zelle). Die Störungen am Mikrotubuligerüst wurden nicht quantitativ erfasst, da

ein Schweregrad nicht ermittelbar war und es keinen eindeutigen Marker für Störungen gab. Für jede Zelllinie wurden diese Inkubationen mit verschiedenen Zellpassagen in drei unabhängigen Versuchen durchgeführt.

Für die Aufnahme der gefärbten Zellen wurde von jedem Fluoreszenzfilter mit einer Digitalkamera ein Graustufenbild aufgenommen. Diese Bilder wurden mit Hilfe der Software MetaView Farbkanälen zugeordnet und diese übereinander gelegt. Die Zuordnung der Farben erfolgte entsprechend den Fluoreszenzfarben.

## 5.10 MTP-Präparation aus Pferdehirn

Die Isolierung von MTP aus schlachtfischem Pferdehirn basiert auf der Methode von Shelanski et al. [1973]. Durch zwei Zyklen von Polymerisation und Depolymerisation mit jeweils anschließender UZ werden die MTP von anderen Zellbestandteilen abgetrennt. Im zellfreien System polymerisieren MTP in Gegenwart von 0,5 mM  $Mg^{2+}$ -Ionen und 1 mM GTP bei 37 °C; 4 M Glycerin in der Lösung erhöhen die Ausbeute der Polymerisation. Die gebildeten Mikrotubuli depolymerisieren unter Eiskühlung in ihre Tubulin-Dimere [Shelanski et al., 1973].

### Lösungen:

REA-Puffer 10×: 100 mM MES, 1 mM EGTA und 0,5 mM  $MgCl_2$  werden in 200 ml  $H_2O$  gelöst, der pH-Wert mit konz. NaOH auf 6,4 eingestellt und mit  $H_2O$  auf 1000 ml aufgefüllt.

REA-Puffer 1×: 500 ml REA-Puffer 10× wird mit  $H_2O$  auf 5 l aufgefüllt.

REA 4M: (pH 6,4) 100 ml REA 10× und 386 g Glycerin (4 M) werden mit  $H_2O$  auf 1000 ml aufgefüllt.

REA 8M: (pH 6,4) 25 ml REA 10× und 184 g Glycerin (8 M) werden mit  $H_2O$  auf 250 ml aufgefüllt.

GTP:  $Na_2$ -guanosin-5-triphosphat  $\times$  3  $H_2O$

### **Durchführung:**

Vor Beginn der MTP-Präparation wurden alle Lösungen und Rotoren 24 h im Kühlschrank auf 4 °C gekühlt. Für die Präparation wurden zwei schlachtfrische Pferdehirne mit einem Gesamtgewicht von 700 g verwendet. Das schlachtwarne Material wurde auf Eis ins Labor gebracht.

### **Aufarbeitung des Pferdehirns:**

Die Hirne wurden unter ständiger Eiskühlung mit einer Pinzette vorsichtig von der Hirnhaut und anhängenden Blutgefäßen befreit. Das verbleibende Gewebe wurde 2× mit eiskaltem REA-Puffer gewaschen und gewogen.

Kleinere Portionen des Hirns wurden in eiskaltem REA 4 M (70 ml Puffer pro 100 g Hirn) mit einer Schere grob zerkleinert und anschließend mit dem Pürierstab unter Eiskühlung homogenisiert. Das Homogenat wurde 30 min bei 4 °C und  $10\,000 \times g$  zentrifugiert. Der Überstand wurde abdekantiert und in einer Ultrazentrifuge 60 min bei 4 °C und  $100\,000 \times g$  zentrifugiert. Diese Lösung wurde dem ersten Polymerisations-/Depolymerisationszyklus unterworfen.

### **Erster Polymerisations-/Depolymerisationszyklus:**

Das Volumen des Überstandes wurde bestimmt, GTP bis zu einer Endkonzentration von 1 mM zugegeben und die Lösung im Wasserbad bei 37 °C für 30 min inkubiert. Die Bildung der Mikrotubuli war an der zunehmenden Trübung der Lösung zu erkennen. Zeitgleich wurden Rotor und Ultrazentrifuge auf 30 °C temperiert. Nach Beendigung der Inkubationszeit wurden die Mikrotubuli in der Ultrazentrifuge abzentrifugiert.

Der Überstand wurde verworfen, das Pellet 2× mit 30 °C warmem REA-Puffer gewaschen und in 80 ml eiskaltem REA-Puffer suspendiert. Unter sanftem Pottern löste sich das Pellet unter Eiskühlung und wurde anschließend auf Eis 30 min depolymerisiert. Der Rotor wurde währenddessen auf 4 °C gekühlt. Im Anschluss wurden die nicht depolymerisierten Bestandteile bei 30 °C 60 min und  $100\,000 \times g$  abzentrifugiert. Der Überstand wurde für den zweiten Zyklus verwendet oder gegebenenfalls über Nacht bei -20 °C gelagert.

### **Zweiter Polymerisations-/Depolymerisationszyklus:**

Nach der Bestimmung des Volumens vom Überstand wurde dieser mit dem gleichen Volumen an REA 8 M ergänzt und GTP bis zu einer Endkonzentration von 1 mM hinzugegeben. Die

Polymerisation und Depolymerisation erfolgte wie im ersten Zyklus beschrieben.

Der Überstand wurde verworfen, das Pellet  $2\times$  mit warmem REA-Puffer gewaschen und in 20 ml kaltem REA-Puffer suspendiert. Nach 30 min Depolymerisation auf Eis wurde der nichtpolymerisierte Anteil wie im ersten Zyklus beschrieben abzentrifugiert.

Der MTP-haltige Überstand wurde gemischt und in Kryoröhrchen portioniert (1 ml). Die Lagerung erfolgte in flüssigem Stickstoff.

## 5.11 Bestimmung der MTP-Konzentration

Um den Gehalt an MTP in dem aus Pferdehirn gewonnenen MTP-Präparat zu bestimmen, wurde die Extinktion von drei unterschiedlich konzentrierten MTP-Lösungen im Photometer bei  $35\text{ }^{\circ}\text{C}$  und 276 nm gegen Luft gemessen.

### Durchführung:

40, 80 und 120  $\mu\text{l}$  MTP-Lösung wurden in 450, 410 und 370  $\mu\text{l}$  REA-Puffer verdünnt und gut gemischt.

### Auswertung:

Es wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt. Mit Hilfe der Extinktionen wurde über das Lambert-Beersche Gesetz mit dem Extinktionskoeffizienten  $\varepsilon = 120\text{ l} \times \text{mmol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$  die jeweilige MTP-Konzentration berechnet und aus diesen der Mittelwert gebildet.

Tabelle 19: Messwerte der MTP-Lösungen und berechnete Konzentrationen.

MTP-Lösung [ $\mu\text{l}$ ]	Extinktion bei 276 nm	Konzentration [ $10^{-5}\text{ mol/l}$ ]
40	0,806	8,2
	0,795	8,1
80	1,342	6,9
	1,362	7,1
120	1,957	6,8
	1,999	7,0

Der Mittelwert betrug  $7,4 \times 10^{-5} \pm 0,63\text{ mol/l}$ . Bei einem Molekulargewicht des Tubulins von 100 000 kDa/mol ergab sich eine MTP-Menge von 7,4 mg/ml.

## 5.12 Mikrotubuli-Polymerisation

Um festzustellen, ob Substanzen die Polymerisation von MTP zu Mikrotubuli beeinflussen, wurde der Mikrotubuli-Polymerisationsassay durchgeführt. Die Polymerisation ist mit einer Trübungszunahme verbunden, die bei 350 nm photometrisch bestimmt werden kann. Die Extinktionszunahme ist zur Menge der gebildeten Mikrotubuli proportional. Der Polymerisationsassay wird unter zellfreien Bedingungen *in vitro* durchgeführt. Hierfür wurden frisch aufgetaute MTP aus Pferdehirn verwendet, welche zuvor präpariert worden waren (s. Kap. 5.10).

### Durchführung:

Die Messung erfolgte in REA-Puffer, der 10  $\mu$ M MTP enthielt, in Quarzküvetten (Schichtdicke,  $d = 1$  cm). Das Endvolumen betrug 0,5 ml. Mehrere Ansätze wurden parallel gemessen, daher wurde ein entsprechendes Volumen an MTP-Suspension in REA-Puffer hergestellt, wovon pro Küvette 480  $\mu$ l verwendet wurden. Vor der Zugabe der Testsubstanzen (CUR) wurde durch Messung der Absorption bei 276 nm überprüft, ob sich in den Küvetten annähernd gleich große MTP-Gehalte befanden. Die Messungen erfolgten im temperierten Photometer (35 °C) bei 350 nm. Den MTP-Suspensionen wurden je 10  $\mu$ l der Testsubstanzen bzw. DMSO für die Kontrollansätze zugegeben. Eine anschließende Inkubation über 20 min erfolgte, um die Extinktionskonstanz zu überprüfen. Die Polymerisation wurde durch Zugabe von je 10  $\mu$ l frisch hergestellter GTP-Lösung (Endkonz. 0,5 mM) pro Küvette gestartet und die Trübungszunahme über 30 min in 5 min-Intervallen verfolgt. Daran schloss sich eine 30-minütige Depolymerisation bei 4 °C an. Es erfolgte ein weiterer Polymerisationszyklus ohne erneute GTP-Zugabe. Ein regulärer Polymerisationsverlauf ist in Abbildung 38 dargestellt.

$$E_2 - E_1 = \Delta E_{Ia} \quad \text{I. Polymerisation}$$

$$E_2 - E_3 = \Delta E_{Ia} \quad \text{I. Depolymerisation}$$

$$E_4 - E_3 = \Delta E_{Ia} \quad \text{II. Polymerisation}$$

$$E_4 - E_5 = \Delta E_{Ia} \quad \text{II. Depolymerisation}$$

$$E_6 - E_5 = \Delta E_{Ia} \quad \text{III. Polymerisation}$$

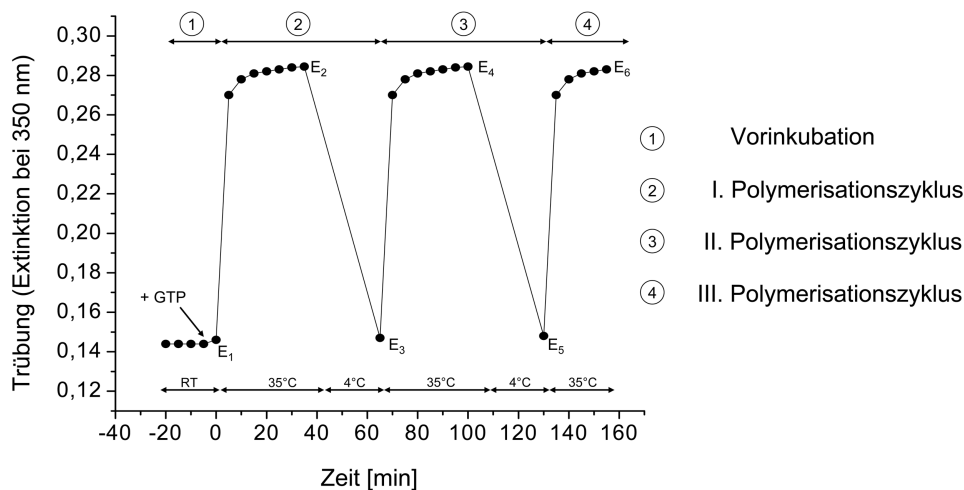


Abbildung 38: Grafische Auftragung eines regulären MTP-Polymerisationsverlaufs. Dargestellt sind drei Polymerisationszyklen (30 min, 35 °C) und zwei Depolymerisationszyklen (30 min, 4 °C). RT: Raumtemperatur.

30  $\mu\text{M}$  CUR wurde in einem Versuch vor und in einem anderen nach der Polymerisation zugegeben. Als Positivkontrolle wurde 2  $\mu\text{M}$  Col mitgeführt.

#### Stabilität von CUR in den Lösungen der Mikrotubulin-Polymerisation:

Zur Bestimmung der Stabilität von CUR im Puffer wurden die Bindungsspektren im Phosphat- und im REA-Puffer mit 30  $\mu\text{M}$  CUR über einen Zeitverlauf von 60 min verfolgt. Die Abnahme der Substanzmenge wurde anhand der Veränderung des Absorptionsmaximums beobachtet. Durch zusätzliche Zugabe von Lysozym, MTP und BSA (1 mg/ml) wurde die Bindung bzw. die Stabilisierung des CUR durch die Proteine untersucht.

### 5.13 Das Millicell<sup>®</sup> System

Für die Untersuchungen und Inkubationen im Caco-2 Millicell<sup>®</sup> System ist eine Abfolge mehrerer aufeinanderfolgender Schritte notwendig. Die Abbildung 39 gibt einen schematischen Überblick über die wichtigsten Arbeitsschritte, die in den folgenden Kapiteln ausführlicher beschrieben sind.

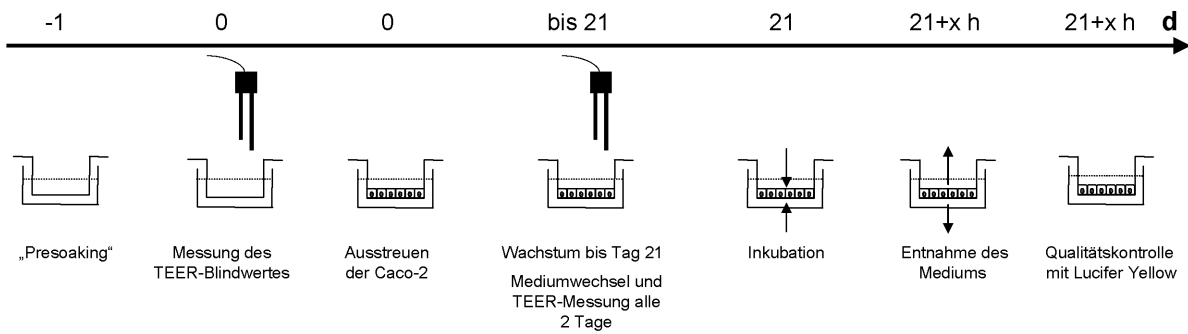


Abbildung 39: Zeitverlauf der Kultivierung und Inkubation des Caco-2 Millicell Inserts.

Die Vorgehensweise der Kultivierung erfolgte folgendermaßen:

- Presoaking: das Insert im zugehörigen Well wird vor dem Ausstreuen der Zellen oder der TEER-Wert-Messung für 24 h in DMEM/F12 eingeweicht
- Messung des TEER-Blindwertes mit einem Voltohmmessgerät
- Ausstreuen von 80 000 bis 86 000 Zellen pro  $\text{cm}^2$  auf der apikalen Seite der Membran
- Kultivierung der Caco-2 Zellen im Millicell<sup>®</sup>-System für 21 Tage, alle 2 Tage Mediumwechsel
- Inkubation am 21. Tag mit Coffein oder den Curcuminoiden
- Entnahme des Inkubationsmediums nach der gewünschten Inkubationszeit
- Qualitätskontrolle des Caco-2 Monolayers mit dem Fluoreszenzfarbstoff LY oder Ausschneiden des Inserts

### 5.13.1 Kultivierung der Caco-2 Zellen im Millicell<sup>®</sup> System

Für die Resorptionsversuche wurde das Millicell<sup>®</sup> System der Firma Millipore GmbH verwendet. Die Inserts des 6-Well Systems bestehen aus hängenden Einsätzen mit Membranen aus PET mit einem Porendurchmesser von  $0,4 \mu\text{m}$ . Die Einsätze teilen das Kulturmedium in ein apikales und ein basolaterales Kompartiment durch die Membran, auf der die Caco-2 Zellen wachsen. Das Volumen auf der apikalen Seite beträgt 2 ml und auf der basolateralen 4 ml. Nach dem Passagieren wurden die Zellen auf die vorgeweichten Membranen ausgestreut



(80 000 - 86 000 Zellen/cm<sup>2</sup>). Dies entsprach 375 000 Zellen/Well. Alle 2 Tage erfolgte ein Mediumwechsel, bei dem in beiden Kompartimenten das verbrauchte Medium ersetzt wurde. Die Resorptionsversuche fanden am Tag 21 nach dem Ausstreuen statt.

### 5.13.2 Qualitätskontrolle der Monolayer

Als Qualitätskontrolle wurden der Verlauf des TEER-Wertes und die Transportrate des Markermoleküls LY bestimmt. Die Vorgehensweise der beiden Methoden wird im folgenden Kapitel erläutert.

#### a) TEER-Wert:

Vor dem Ausstreuen der Zellen erfolgte das sogenannte Presoaking, bei dem jedes Well mit dem hängenden Insert für ca. 24 h in DMEM/F12 äquiliert wurde. Danach wurde der TEER-Blindwert gemessen und somit der Eigenwiderstand der Membran erfasst. Nach Ausstreuen der Zellen wurde der TEER-Wert in den verwendeten 6-Well Platten während der Kultivierung nicht mehr bestimmt. Kurz vor Beginn der Inkubation wurde der TEER-Wert ein letztes Mal gemessen, um zu sehen, ob die Membran dicht bewachsen war [Liang et al., 2000; Wilson et al., 1990].

Die Messung erfolgte mit einem Voltohmmessgerät, welches aus zwei versetzt angeordneten Elektroden besteht. Eine Elektrode tauchte dabei in das apikale und eine in das basolaterale Kompartiment. Der TEER-Wert wurde ermittelt, indem ein Gleichstrom bekannter Größe über die Membran floss. Die resultierende Spannung wurde gemessen und nach dem Ohmschen Gesetz der Widerstand berechnet. Der Widerstand  $R$  [ $\Omega$ ] wurde am Gerät abgelesen ( $R_{Probe}$ ) und mit dem zuvor bestimmten Blindwert ( $R_{Blind}$ ) verrechnet. Damit ergab sich der Widerstandswert für die Zellschicht ( $R_{Zellschicht}$ ):

$$R_{Zellschicht} = R_{Probe} - R_{Blind}$$

Der Widerstand ist umgekehrt proportional zur Zellfläche. Je größer die Membran, desto niedriger ist der Widerstand. Anhand dieser Beziehung wird anstatt des Widerstandes das Produkt aus Widerstand und Fläche berechnet. Dieser Wert ist von der Fläche unabhängig und wird in  $\Omega \times \text{cm}^2$  angegeben.

$$\text{TEER} [\Omega \times \text{cm}^2] = (R_{Probe} - R_{Blind}) \times \text{Wachstumsfläche Membran}$$

Die Widerstandswerte für Membrandurchmesser  $> 24$  mm sollen laut Herstellerangaben nicht in den flächenabhängigen Widerstand umgerechnet werden, da die Elektrode keine einheitliche Stromdichte über die relativ große Membran durch den Spalt zwischen Membran und dem Rand des Wells liefern kann. Die Werte wurden zu Beginn bzw. kurz vor der Inkubation an drei Stellen im Well gemessen und daraus der MW gebildet.

**b) LY-Test:**

Da der TEER-Wert in den 6-Well Platten nur eine geringe Aussagekraft besitzt, wurde zusätzlich der LY-Test verwendet [Bailey et al., 1996; Trotter und Storch, 1991]. Die Überprüfung der Caco-2 Zellschicht auf Intaktheit mit dem Dilithiumsalz LY wurde direkt nach dem Resorptionsversuch durchgeführt (Strukturformel s. Abbildung 40).

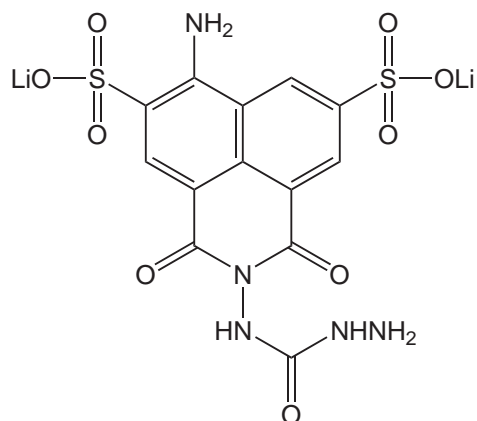


Abbildung 40: Strukturformel von Lucifer Yellow (LY).

**Lösungen:**

LY-Lösung: 10 mg LY werden in 100 ml HBSS gelöst

HBSS: 1,2 mM  $\text{CaCl}_2$ ; 0,5 mM  $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ ; 0,4 mM  $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ ; 5,3 mM KCl;  
0,4 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 4,2 mM  $\text{NaHCO}_3$ ; 0,14 M NaCl; 0,3 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; 5,6 mM  
Glucose in  $\text{H}_2\text{O}$  lösen und mit HCl auf pH 7,4 einstellen.

**Durchführung:**

Der Monolayer jedes einzelnen Inserts wurde nach der vollständigen Probenentnahme von beiden Seiten  $2 \times$  mit 2 ml HBSS gewaschen. Das apikale Kompartiment wurde mit einer Lösung von  $100 \mu\text{g}/\text{ml}$  LY in HBSS für 1 h im Brutschrank bei  $37^\circ\text{C}$  kultiviert. Basolateral

wurde frisches HBSS hinzugegeben. Nach dem Ende der Inkubationszeit wurde von der basolateralen Seite ein Aliquot entfernt und der Gehalt an LY fluoreszenzphotometrisch bestimmt. Die relative Fluoreszenz (relative fluorescence units, RFU) der Proben wurde in 96-Well Platten mittels Fluoreszenzplattenlesegerät bei einer Anregung von 485 nm und einer Emission von 535 nm gemessen.

Für die Berechnung des prozentualen Durchgangs von LY wurde ein Blindwert aus reinem HBSS gemessen sowie die Fluoreszenz einer LY-Lösung, deren Konzentration 33,3 µg/ml in HBSS betrug. Dieser sogenannte Equilibriumwert entspricht einer gleichmäßigen Verteilung von LY im gesamten Well. Der Wert 33,3 µg/ml lässt sich mit folgender Gleichung bestimmen:

$$RFU \text{ (Equilibrium)} = \frac{(LY - \text{Konz. im Donorkompartiment } t_0) \times (Volumen_{apikal})}{Volumen_{apikal} + Volumen_{basolateral}}$$

$$RFU \text{ (Equilibrium 6 - Well)} = \frac{100 \mu\text{g/ml} \times 2 \text{ ml}}{2 \text{ ml} + 4 \text{ ml}} = 33,3 \mu\text{g/ml}$$

Die LY-Passage im Testwell wird mit Hilfe folgender Gleichung bestimmt:

$$LY - \text{Passage } \% = \frac{RFU(Probe) - RFU(Blind)}{RFU(Equilibrium) - RFU(Blind)} \times 100$$

Liegt der Wert unter 1 %/h, wird der Zellmonolayer als intakt erachtet. Falls der Wert über 1%/h beträgt, kann der Monolayer vor oder während der Inkubation geschädigt worden sein und ist daher nicht intakt. Die Ergebnisse dieser Wells sollten verworfen werden.

### 5.13.3 Qualitätskontrolle der Caco-2 Zellen

Die Caco-2 Zellen exprimieren nach dem Ausdifferenzieren die Aktivität der AIP [Hillgren et al., 1995]. Um die Aktivität der Passage zu überprüfen und zu erkennen, ob die gewählte Passage schon zu hoch ist, wurde die Aktivität der AIP während der Versuche mitbestimmt. Das Enzym katalysiert die Hydrolyse von Phosphatestern. Ein Substrat für die AIP ist das 4-Nitrophenylphosphat (4-NPP). Dieses ist zuerst hellgelb und wird von der AIP zum stärker gefärbten p-Nitrophenolat-Anion und Phosphat umgesetzt (s. Abbildung 41).

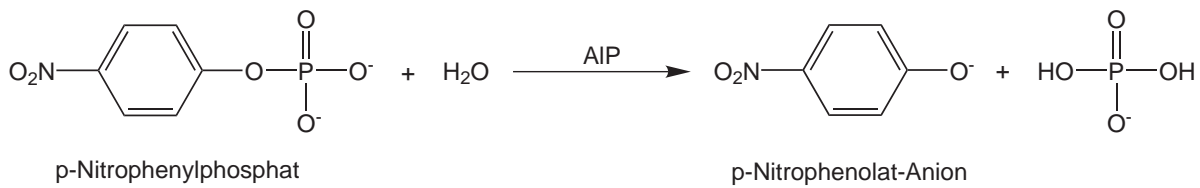


Abbildung 41: Umwandlung des 4-NPP in das Anion

**Lösungen:**

MgCl<sub>2</sub>-Stammlösung: 24 mM MgCl<sub>2</sub> × 6 H<sub>2</sub>O werden in 100 ml H<sub>2</sub>O gelöst, zu 1,2 ml aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

4-NPP-Lösung: 5 mM 4-NPP, 1 M Diethanolamin und 1 ml MgCl<sub>2</sub>-Stammlösung (24 mM) werden gelöst, der pH-Wert mit konz. HCl auf 9,8 eingestellt und auf 100 ml aufgefüllt.

4-Nitrophenolat-Stammlösung: 5 mM 4-NPP in H<sub>2</sub>O lösen, pH-Einstellung mit 1 N NaOH (pH 8), Konzentrationen für Kalibriergerade: 5 bis 25 nmol Absolutmenge

**Durchführung:**

Herstellung des Zelllysates:

- Ausstreuen von 1 × 10<sup>6</sup> Zellen/2 ml Medium in Ø 40 mm Kulturschalen und Kultivierung für 21 Tage
- Kultivierung für 24 h bis 21 Tage
- Waschen des Monolayers mit PBS, Abschaben und Überführen in Reaktionsgefäß mit ca. 1 ml PBS
- Zentrifugation für 5 min bei 1 000 × g, Aspiration des Überstandes und Zugabe von 200 µl PBS, Lagerung bis zur Aufarbeitung bei -80 °C
- Homogenisation vor Messung 10 sec bei 40 Watt mit der Ultraschallspitze
- Herstellen von Verdünnungen für Messung (1:5 bzw. 1:10)

Messung der Kalibrierpunkte und der Zellysate:

- Messung in 96-Well Platten, Zugabe von 10  $\mu\text{l}$  Kalium-Phosphat-Puffer (pH 7,4) pro Well und 10  $\mu\text{l}$  Zellysat-Verdünnung
- Zusatz von 50  $\mu\text{l}$  4-NPP-Lösung
- Inkubation 5 min bei RT im Dunkeln
- Schütteln für 30 sec im Plattenlesegerät und Messung der Absorption bei 405 nm
- Kalibrierung: Zugabe von 20  $\mu\text{l}$  Kalium-Phosphat-Puffer und 50  $\mu\text{l}$  4-Nitrophenolat-Verdünnungen pro Well
- Messung der Kalibrierpunkte parallel zu Proben, Blindwert:  $\text{H}_2\text{O}$

**Auswertung:**

Für die Auswertung der Kalibriergeraden wurde von den Messwerten der Blindwert abgezogen. Die Kalibriergerade betrug

$$E = (0,0273 \times n) - 0,0087$$

mit E: Extinktion (gemessen am Plattenlesegerät) und n: Konzentration von 4-Nitrophenolat in nmol.

Die Berechnung der gebildeten 4-Nitrophenolatmenge durch das Zellysat der Caco-2 Zellen erfolgte mit Hilfe dieser Kalibriergeraden. Für die niedrigeren Passagen (P 18) sowie für die höheren Passagen (P 42) lag der Wert bei ca. 1 438 nmol 4-Nitrophenolat pro Zellkulturplatte.

#### 5.13.4 Versuche zur Reduktion im Medium

Da bei jedem Inkubationsversuch mit CUR im Donorkompartiment dessen reduzierte Metaboliten gefunden werden konnten, wurde überprüft, ob die Caco-2 Zellen reduzierende Enzyme an das Medium abgeben und die Reduktion des CUR auch ohne Zellen stattfindet. Dazu wurde am 21. Tag direkt vor der Inkubation das Kulturmedium auf beiden Seiten abgenommen. Vom apikalen und basolateralen Medium wurden 500  $\mu\text{l}$  mit 50  $\mu\text{M}$  CUR bzw. HHC 1 und 3 h inkubiert. Anschließend wurden die Proben 2 $\times$  mit 1 ml Ethylacetat extrahiert und der Rückstand in 40  $\mu\text{l}$  MeOH aufgenommen. 25  $\mu\text{l}$  davon wurden mittels HPLC/DAD analysiert.

### 5.13.5 Sulfatierung

Um die Sulfate von HHC, HHBDMC und iso-HHC genauer charakterisieren zu können, wurden diese mit Rattenlebercytosol (männlich, Wistar) und PAPS als Cofaktor gebildet. Die Durchführung erfolgte nach Asai und Miyazawa [2000].

#### Lösungen:

4 mM PAPS in Kalium-Phosphat-Puffer, pH 8

0,1 M MgCl<sub>2</sub> in Kalium-Phosphat-Puffer, pH 7,4

#### Durchführung:

Die Inkubationen erfolgten in einem Gesamtansatz von 0,2 ml in 0,1 M Kalium-Phosphat-Puffer (pH 7,4) und enthielten das Substrat (50 µM) in DMSO (Endkonzentration 1 %), 1 mg/ml cytosolisches Protein, 0,4 mM PAPS und 10 mM MgCl<sub>2</sub>. Die Vorinkubation erfolgte 5 min bei 37 °C, die Reaktion wurde durch Zugabe von PAPS gestartet und 30 min bei 37 °C inkubiert. Durch Eiskühlung wurde die Reaktion abgestoppt und bei 1 000 × g für 3 min zentrifugiert. Der Überstand wurde direkt oder nach enzymatischer Hydrolyse der Sulfate mittels HPLC/DAD analysiert. Für die Hydrolyse wurde ein Aliquot des Überstandes mit 0,2 U Sulfatase Typ IV aus *Acetobacter aerogenes* in 0,2 ml Kalium-Phosphat-Puffer (pH 7,1) gemischt, für 2 h bei 37 °C inkubiert und anschließend ebenfalls mittels HPLC/DAD detektiert.

Die Inkubationen erfolgten als Doppelbestimmungen und die Negativkontrollen wurden in Abwesenheit von PAPS durchgeführt. Weitere Analysen erfolgten per HPLC-UV/MS, um die Sulfate anhand der Massen zu identifizieren.

### 5.13.6 Inkubationsversuche

Die Resorption von Coffein oder den Curcuminoiden durch die Caco-2 Zellen wurde im Caco-2 Millicell<sup>®</sup> System untersucht. Dabei wurden die Zellen entweder apikal oder basolateral mit Substanz inkubiert.

**Lösungen:**

Kalium-Phosphat-Puffer: 0,1 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> und 0,1 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: Vorlegen der sauren Komponente, mit der basischen auf pH 7,1 bringen

**Durchführung:**

Inkubation der Zellen:

- Kultivierung der Zellen bis zum 21. Tag, Überprüfung des TEER-Wertes
- Entfernung des Mediums und Waschen des apikalen und basolateralen Kompartiments mit HBSS (2 × 2 ml)
- Inkubation des jeweiligen Kompartiments mit den Curcuminoiden oder Coffein in HBSS und HBSS-Zugabe zum anderen Kompartiment
- Inkubation bis zu 6 h mit Substanz
- Probennahme: entweder gesamtes Volumen aus beiden Kompartimenten oder nur definiertes Volumen aus einem Well für Zeitverlauf
- Waschen des apikalen und basolateralen Kompartiments mit HBSS (2 × 2 ml)
- Qualitätskontrolle mit LY oder Ausschneiden der Membran zur Aufarbeitung der Zellen (Lagerung bis zur Aufarbeitung bei -80 °C)

**Aufarbeitung:**

- KULTURMEDIUM:

**Extraktion ohne Aufarbeitung:** Nach Zugabe des IS Bisphenol A wurde das Medium in drei Teile geteilt zur Extraktion ohne Aufarbeitung und zur Extraktion nach Glucuronid- bzw. Sulfatspaltung. Die Extraktion ohne Aufarbeitung erfolgte nach 3 h bei 37 °C, um Verluste bei der Glucuronid- und Sulfatspaltung zu erkennen. Dazu wurde 2× mit dem doppelten Volumen an Ethylacetat extrahiert und nach dem Evaporieren zur Trockene der Rückstand in wenig MeOH aufgenommen und ein Aliquot mittels HPLC/DAD analysiert.

**Glucuronidspaltung:** Die Probe wurde mit gleichem Volumen an Na-Ac-Puffer versetzt und mit einem Aliquot an Glucuronidase, in Na-Ac-Puffer gelöst (100 U/Ansatz),

gemischt. Der Ansatz wurde 3 h bei 37 °C inkubiert und wie bei der sofortigen Extraktion aufgearbeitet. Aus der Differenz der Substanzmenge aus den beiden Ansätzen kann indirekt die Menge an gebildetem Glucuronid bestimmt werden. Da aber CUR und sein Glucuronid sehr instabil sind, ist eine Bilanzierung nicht ausreichend möglich.

**Sulfatspaltung:** Das dritte Aliquot der Probe wurde mit 0,1 U Sulfatase aus *Acetobacter aerogenes* in Kalium-Phosphat-Puffer (pH 7,1) gemischt und für 2 h bei 37 °C inkubiert. Die weitere Aufarbeitung wurde wie bei den Proben der sofortigen Extraktion durchgeführt, und die Auswertung erfolgte wiederum aus der Differenz zwischen Proben der sofortigen Extraktion und der Sulfatspaltung.

- ZELLYSAT:

Die ausgeschnittenen Monolayer des 6-Well Systems wurden in 200  $\mu$ l PBS bei -80 °C gelagert und zur vollständigen Zellyse für 15 sec mit Ultraschall behandelt. Mit einem kleinen Aliquot wurde eine Proteinbestimmung nach Bradford (s. Kap. 5.14) durchgeführt und der Rest wurde 2 $\times$  mit der doppelten Menge Folch-Reagenz (s. Kap. 5.5) extrahiert. Der Rückstand wurde in MeOH aufgenommen und mittels HPLC/DAD untersucht. Bei dieser Extraktion werden Sulfate und Glucuronide nicht erfasst.

- COFFEIN:

Die Coffeinproben müssen aufgrund der niedrigen Substanzkonzentration im Akzeptorkompartiment extrahiert und damit aufkonzentriert werden. Die Extraktion erfolgte 2 $\times$  mit der doppelten Menge Ethylacetat. Nach der Evaporation zur Trockene wurde der Rückstand in 40  $\mu$ l MeOH aufgenommen und davon wurden 25  $\mu$ l per HPLC/DAD analysiert.

- BILANZIERUNG:

Für die Bilanzierungsversuche wurden 6-Well Platten ohne Insert verwendet. Nach der Inkubation mit 50  $\mu$ M Testsubstanz wurde das Medium abgenommen, in drei Teile geteilt und ebenfalls extrahiert ohne Aufarbeitung, bzw. einer enzymatischen Hydrolyse der Glucuronide oder der Sulfate unterzogen. Die Monolayer wurden in diesem Fall abgeschabt, in 200  $\mu$ l PBS im Biofreezer bei -80 °C gelagert und danach für 15 sec mit einer Ultraschallspitze lysiert. Nach der Extraktion mit Folch-Reagenz und der



Evaporation zur Trockene wurde der Rückstand in MeOH aufgenommen und mittels HPLC/DAD analysiert.

- STABILITÄT IN HBSS:

Um die Stabilität der Curcuminoide (CUR, iso-CUR, BDMC) im Puffer zu untersuchen, wurden die Substanzen in HBSS inkubiert. Dazu wurde eine Lösung aus der zu untersuchenden Substanz (50  $\mu\text{M}$ ) und dem IS Bisphenol A (40  $\mu\text{M}$ ) in Puffer inkubiert, analog den Bedingungen in der Zellkultur (37 °C, 0 bis 6 h). Die Endkonzentration an Lösungsmittel betrug 1 % DMSO. Jedes Aliquot (500  $\mu\text{l}$ ) wurde mit 2  $\times$  1 ml Ethylacetat extrahiert und bis zur Trockene eingengt. Der Rückstand wurde in 40  $\mu\text{l}$  MeOH aufgenommen und davon 25  $\mu\text{l}$  mittels HPLC/DAD analysiert.

### 5.13.7 Berechnung des Permeabilitätskoeffizienten

Der Zusammenhang zwischen Resorption nach oraler Applikation und dem  $P_{app}$ -Wert wurde in Kap. 1.2.2 beschrieben. Durch Auswertung der Daten aus den Caco-2 Transportstudien kann der  $P_{app}$ -Wert mittels folgender Gleichung berechnet werden [Le Ferrec et al., 2001; Yee, 1997]:

$$P_{app} = \frac{dQ}{dt \times A \times c_0}$$

$dQ/dt$ : Substanzfluss über die Zellschicht bzw. Produktmenge im basolateralen (A  $\rightarrow$  B) oder apikalen (B  $\rightarrow$  A) Kompartiment als Funktion der Zeit in nmol/sec

A: Oberfläche des Monolayers in  $\text{cm}^2$

$c_0$ : Ausgangskonzentration im Donorkompartiment in nmol/ml

Je nachdem von welcher Seite inkubiert wird, kann der  $P_{app}$ -Wert von der apikalen zur basolateralen Seite oder von der basolateralen Seite in die apikale Richtung berechnet werden. Der  $P_{app}$ -Wert wurde für die Curcuminoide mit und ohne den jeweiligen Metaboliten bestimmt.

### 5.13.8 Inkubationsversuche mit gemischten Micellen

Um die Resorption im Darm durch Caco-2 Zellen möglichst genau zu imitieren, wurden Versuche mit verschiedenen Substanzen durchgeführt, welche die Aufnahme von CUR erhöhen sollten. Es wurden gemischte Micellen oder unterschiedliche Gehalte an OA verwendet. Die gemischten Micellen wurden aus verschiedenen physiologischen Bestandteilen hergestellt. Dazu wurden als Gallensäure TC, als Fettsäure OA, Chol, sowie ein Monoacylglycerid und PC verwendet.

#### Lösungen:

25 mM Chol, 100 mM OA, 100 mM PC, 100 mM 2-Monoolein (MO) und 100 mM

Lysophosphatidylcholin (LPC) werden in Folch-Reagenz gelöst.

24 mM TC wird in serumfreiem DMEM/F12-Medium gelöst.

#### Durchführung:

15  $\mu$ l OA (Endkonzentration im Insert: 0,6 mM) und jeweils 5  $\mu$ l PC (0,2 mM), LPC (0,2 mM), MO (0,2 mM), Chol (0,05 mM) wurden in ein großes GC-Gläschen pipettiert. Die zu untersuchende Substanz wurde entweder in Folch-Reagenz oder MeOH zupipettiert und unter dem N<sub>2</sub>-Strom abgeblasen. 208  $\mu$ l TC (Endkonzentration 2 mM) in Medium wurden dazugegeben und anschließend wurde auf 2,5 ml mit serumfreiem Medium (mit P/S) aufgefüllt. Von den gemischten Micellen wurden sofort 2 ml zur Inkubation verwendet. Die Lösungen sollten dabei klar sein.

#### Inkubation der Zellen:

- Kultivierung der Zellen bis zum 21. Tag, Überprüfung des TEER-Wertes
- Entfernung des Mediums und Waschen des apikalen und basolateralen Kompartiments mit HBSS (2× 2 ml)
- Inkubation des apikalen Kompartiments mit der gemischten Micellen-Suspension und HBSS-Zugabe zum basolateralen Kompartiment für 18 h
- Probennahme des gesamten Volumens aus beiden Kompartimenten und Lagerung bei -80 °C im Biofreezer

- Waschen des apikalen und basolateralen Kompartiments mit HBSS (2 × 2 ml)
- Qualitätskontrolle mit LY oder Ausschneiden der Membran zur Aufarbeitung der Zellen (Lagerung bis zur Aufarbeitung bei -80 °C)

Der basolateral abgenommene Puffer wurde entweder wie in Kap. 5.13.6 aufgearbeitet oder der UZ wie im folgenden Kapitel unterzogen.

### 5.13.9 Auftrennung der Lipoproteine durch Ultrazentrifugation

Um das basolateral entnommene Medium in die verschiedenen Lipidfraktionen aufzutrennen, wurde eine Dichtezentrifugation mit KBr durchgeführt. Damit können die unterschiedlichen Fraktionen in die Dichten zwischen 1,006 und 1,1 g/ml aufgetrennt werden [Anwar et al., 2007; Luchoomun und Hussain, 1999].

Formel zur Berechnung der benötigten KBr-Menge:

$$\text{KBr [g]} = \frac{\text{Plasma [ml]} \times (\text{neue Dichte} - \text{alte Dichte})}{1 - [0.312 \times \text{neue Dichte}]}$$

Die Dichte des Plasmas wird mit 1,006 g/ml, die von Wasser mit 1,000 g/ml angenommen.

#### Lösungen:

KBr-Lösung (1,006 g/ml): 0,4372 g KBr in 50 ml H<sub>2</sub>O lösen

KBr-Lösung (1,019 g/ml): 1,3928 g KBr in 50 ml H<sub>2</sub>O lösen

KBr-Lösung (1,063 g/ml): 4,7130 g KBr in 50 ml H<sub>2</sub>O lösen

#### Durchführung:

Ultrazentrifugation:

- Befüllen des UZ beständigen Polyallomerröhrchens mit 3,5 ml des basolateral entnommenen Inkubationsmediums, Zugabe von 0,57 g KBr zur Einstellung der Dichte auf 1,1 g/ml
- Vorsichtige Überschichtung mit 3 ml 1,063 g/ml-Lösung, 3 ml 1,019 g/ml-Lösung und 2 ml 1,006 g/ml-Lösung

- 1. UZ: für 33 min bei 15 °C und  $270\,000 \times g$
- Abnehmen des obersten ml und Ersetzen durch 1 ml 1,006 g/ml-Lösung. Hierin waren die großen CM (Svedberg-Konstante ( $S_f$ ) > 400) enthalten.
- 2. UZ: für 3 h 28 min bei 15 °C und  $270\,000 \times g$
- Entfernen des obersten ml und Ausgleich durch 1 ml 1,006 g/ml-Lösung. Dieser ml enthielt die kleinen CM ( $S_f$ : 60 - 400).
- 3. UZ: für 17 h bei 15 °C und  $270\,000 \times g$
- Entnahme des obersten ml; Inhalt: die VLDL
- Trennung des restlichen Gradienten in weitere sieben Fraktionen: Entnahme von 1,5 ml-Proben mit Hilfe einer Kanüle von unten aus dem Polyallomerröhrchen
- Die Fraktionen 3 bis 5 enthielten die IDL und LDL (1,02 - 1,063 g/ml), 6 bis 8 enthielten HDL und die unterste Fraktion (1,063 - 1,1 g/ml).
- Lagerung aller Fraktionen bis zur Aufarbeitung bei -20 °C

### Extraktion:

Die Proben (1 bzw. 1,5 ml) wurden jeweils mit  $1 \times 4$  ml Folch-Reagenz extrahiert. Die Fraktionen wurden einzeln aufgearbeitet. Das Lösungsmittel wurde am Evaporator abgezogen und der Rückstand der Curcuminoide in MeOH aufgenommen. Jedes Aliquot wurde mittels HPLC/DAD analysiert und der Gehalt pro Fraktion mit Hilfe von Kalibriergeraden bestimmt.

Für die GC/FID-Analyse wurden nur  $600 \mu\text{l}$  der Probe mit  $2 \times 2$  ml Folch-Reagenz extrahiert, der Rückstand wurde nach dem Einengen zur Trockene in  $10 \mu\text{l}$  Folch-Reagenz aufgenommen und mit  $5 \mu\text{l}$  TMSH derivatisiert (Die vollständige Methylierung findet im Injektor der GC unter Temperatureinwirkung statt).  $1 \mu\text{l}$  wurden mittels GC/FID analysiert und mittels Kalibrierung quantifiziert.

**Stabilitätsuntersuchungen:**

Für die Überprüfung der Stabilität der Curcuminoide wurde die Zentrifugation mit HBSS und nach 18 h basolateral abgenommenem Medium durchgeführt, welches bereits die Lipoproteine enthielt. Dazu wurden in jeweils 3,5 ml Medium 50  $\mu\text{M}$  CUR, HHC und iso-CUR in 2 % DMSO gelöst. Damit wurden die oben aufgeführten Zentrifugations- und Extraktionsschritte durchgeführt. Die Aufarbeitung erfolgte wie in diesem Kapitel beschrieben und die Konzentrationen wurden mittels HPLC/DAD bestimmt. Die prozentuale Abnahme wurde auf den 0 h-Wert vor der UZ bezogen.

## 5.14 Proteinbestimmung nach Bradford

Der Coomassie-Farbstoff Brilliant Blau G250 bindet in saurer Lösung an Proteine. Die dadurch verursachte Verschiebung des Absorptionsmaximums von 465 nm auf 595 nm ermöglicht die Bestimmung von Proteingehalten [Bradford, 1976].

**Lösungen:**

Farbreagenz: 10 mg Coomassie Brilliant Blau G250 in 5 ml Ethanol lösen, 10 ml ortho-Phosphorsäure (85 %) zugeben und mit  $\text{H}_2\text{O}$  auf 100 ml auffüllen.

BSA-Stammlösung: 10 mg BSA einwiegen und in 10 ml  $\text{H}_2\text{O}$  lösen (1 mg/ml)

**Durchführung:**

- Kalibriergerade zwischen 20 und 160  $\mu\text{g}/\text{ml}$ : Zelllysatproben

Von verschiedenen Verdünnungen der BSA-Lösung bzw. der Zelllysate wurden 100  $\mu\text{l}$  in einem Reaktionsgefäß mit 1 ml Farbreagenz gemischt. Nach 5 min in der Dunkelheit erfolgte die photometrische Bestimmung in Kunststoffküvetten bei 595 nm. Die Kalibriergerade wurde von 20 - 160  $\mu\text{g}/\text{ml}$  erstellt. Jede Messung wurde 3 $\times$  wiederholt. Der Blindwert wurde mit  $\text{H}_2\text{O}$  ermittelt.

- Kalibriergerade zwischen 1 und 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ : Proben aus der UZ

Hierbei wurden 800  $\mu\text{l}$  Probelösung bzw. BSA-Lösung mit 200  $\mu\text{l}$  Farbreagenz gemischt. Nach 5 min Reaktion in der Dunkelheit wurde wieder am Photometer die Absorption bei 595 nm in Kunststoffküvetten bestimmt. Hierbei wurde die Kalibriergerade zwischen 1 - 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  erstellt und jeder Messpunkt 3 $\times$  wiederholt. Für den Blindwert wurden die jeweiligen KBr-Lösungen mit der vergleichbaren Dichte verwendet.

## 5.15 Metabolismus durch intestinale Bakterien

### 5.15.1 Chemische Synthese von CUR-Metaboliten

Die zu erwartenden CUR-Metaboliten wurden gemäß Parbon et. al. [1964] synthetisiert. Folgende Aldehyde wurden dafür verwendet:

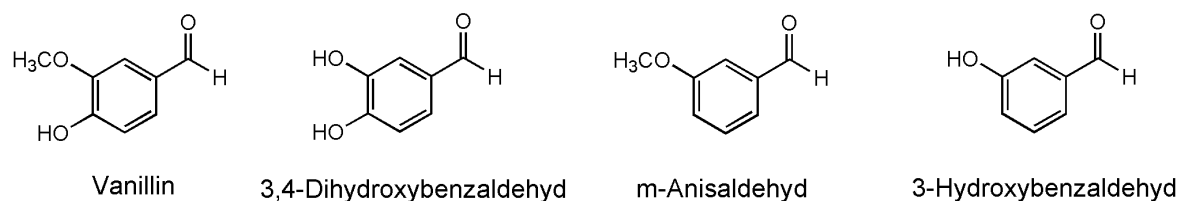


Abbildung 42: Verwendete Aldehyde für die CUR-Derivat-Synthese

Um die Syntheseschritte zu verringern wurde jeweils aus zwei Aldehyden eine Mischung aus CUR-Derivaten synthetisiert. Die folgende Tabelle fasst die Synthesen und die gebildeten Derivate zusammen:

Tabelle 20: Schema für die Synthese gemischter CUR-Derivate

eingesetzte Aldehyde	Derivat
Vanillin + 3,4-Dihydroxybenzaldehyd	CUR, C1, C3
Vanillin + m-Anisaldehyd	CUR, C2, C6
m-Anisaldehyd + 3,4-Dihydroxybenzaldehyd	C5, C3, C6
Vanillin + 3-Hydroxybenzaldehyd	CUR, C4, C9
3-Hydroxy-Benzaldehyd + 3,4-Dihydroxybenzaldehyd	C3, C7, C6
m-Anisaldehyd + 3-Hydroxybenzaldehyd	C3, C8, C9

**Durchführung:**

- 25 mmol Acetylaceton und 17 mmol Borsäureanhydrid wurden eine halbe h gerührt, bis eine zähflüssige Paste entstand.
- Zugabe von 10 ml über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknetes Ethylacetat
- Dieses Gemisch wurde zu einer Lösung aus jeweils 25 mmol der beiden benötigten Aldehyde und 100 mmol Tributylborat in 15 ml trockenem Ethylacetat gegeben und 10 min rühren gelassen
- innerhalb von 10 min wurden 5 mmol n-Butylamin zugetropft und 4 h gerührt, Lagerung über Nacht bei 4 °C
- Zugabe von 37,5 ml 0,6 N wässriger, 60 °C heißer HCl und 1 h Rühren
- Abtrennung der organischen Phase und dreimalige Extraktion mit trockenem Ethylacetat
- anschließendes säurefrei Waschen der organischen Phase (bessere Phasentrennung: NaCl hinzugeben)
- Trocknung über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  und Abdestillation des Lösungsmittels
- Auskristallisation und Waschen mit wenig kaltem MeOH und  $\text{H}_2\text{O}$ , Abfiltrieren und Trocknung über Nacht im Exsikator
- Überprüfung der Reinheit mittels HPLC/DAD und HPLC-UV/MS

Der catecholische 3,4-Dihydroxybenzaldehyd konnte nicht direkt für die Synthese eingesetzt werden, da dieser sich im Syntheseansatz nicht vollständig löste. Um den Aldehyd für die Synthese zu stabilisieren, wurde dieser mit Schutzgruppen versehen, die Durchführung erfolgte wie im folgenden Kapitel erläutert.

### 5.15.2 Benzylierung des 3,4-Dihydroxy-Benzaldehyds

Die Reaktion zum Versetzen des Aldehyds mit Schutzgruppen erfolgte direkt vor der Synthese des CUR-Derivates (Reaktionsgleichung s. Abbildung 43). 13 mmol 3,4-Dihydroxybenzaldehyd wurden in 260 ml MeOH gelöst, mit 65 mmol Benzylbromid und 52 mmol  $K_2CO_3$  versetzt und unter Rühren für 3 h am Rückfluss erhitzt. Die Überprüfung auf Reinheit erfolgte mittels Dünnschichtchromatographie (DC) (Kieselgel-DC-Platte, Fließmittelgemisch Benzol/Ethylacetat (8:2)) und UV-Auswertung. Nach Abkühlen auf Eis wurde am Rotationsverdampfer aufkonzentriert. Der Rückstand wurde zwischen 260 ml  $H_2O$  und 400 ml Ethylacetat verteilt. Die organische Phase wurde mit wenig  $H_2O$  gewaschen und über  $MgSO_4$  getrocknet. Anschließend wurde diese auf das gewünschte Volumen am Rotavapor eingeeengt, welches direkt zur Synthese der CUR-Derivate (s. Kap. 5.15.1) verwendet wurde.

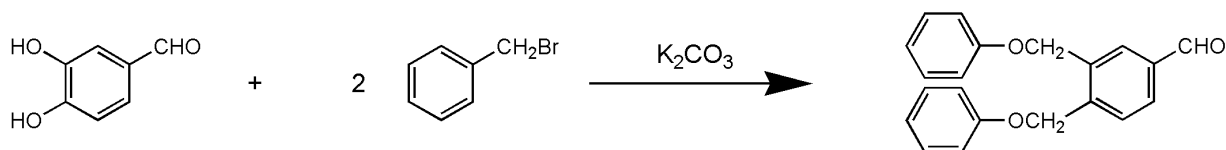


Abbildung 43: Benzylierung von 3,4-Dihydroxybenzaldehyd

### 5.15.3 Säulenchromatographische Trennung der CUR-Derivate

Um die CUR-Derivat-Gemische aufzutrennen und die einzelnen Derivate zu erhalten, wurden die Fraktionen säulenchromatographisch getrennt. In eine Glassäule wurden 15 g Kieselgel (zur Trennung von 1 g des Gemisches werden 50 g Kieselgel benötigt) eingefüllt und mit Heptan/Ethylacetat (3:1) quellen gelassen. Nach der Probenaufgabe von  $300 \mu l$  wurde konstant eine Mischung aus Heptan/Ethylacetat (3:1) aufgetropft. Durch ihre unterschiedliche Polarität wurden die CUR-Derivate aufgetrennt. Das Lösungsmittel wurde abrotiert und der Rückstand in MeOH aufgenommen. Diese Einzelfraktionen konnten der katalytischen Hydrierung unterzogen werden, um aus den CUR-Derivaten die jeweiligen HHC-Derivate zu erhalten.



#### 5.15.4 Katalytische Hydrierung

Zur Gewinnung der HHC-Derivate für die Charakterisierung der Fäzesmetaboliten wurden die CUR-Derivate katalytisch hydriert [Uehara et al., 1987]. Eine Lösung von 5 bis 10 mg des jeweiligen CUR-Derivates in 2 ml MeOH wurde mit etwa 5 mg eines Pd-Katalysators (5% Pd auf Aktivkohle) versetzt und unter H<sub>2</sub>-Atmosphäre bei RT für ca. 18 h gerührt. Durch Zentrifugation wurde der Katalysator abgetrennt und per HPLC/DAD bei 280 nm die Reinheit der Produkte überprüft. Für die genauere Analyse wurden MS/MS-Analysen mit der HPLC-UV/MS auf die Molekülmasse durchgeführt. Charakteristische Massenfragmente wurden zur Identifizierung bestimmt.

#### 5.15.5 Bakteriengewinnung aus Rattenfäzes

Die Präparationen der Fäzessuspensionen fand in Anlehnung an die Arbeiten von Meselhy et al. [1997] und Wang et al. [2000] statt. Der schlachtfrische Darm einer Ratte wurde schnellstmöglich auf Trockeneis entleert und das Gewicht der Fäzes bestimmt. Danach wurde die Fäzes mit Kalium-Phosphat-Puffer (pH 7,3; mit N<sub>2</sub> begast) in einem Potter homogenisiert und pro 5 g mit 50 ml Puffer aufgefüllt. Nach der Filtration durch eine Mullbinde wurde das Filtrat auf 100 ml aufgefüllt und zu je 2 ml aliquotiert. Diese Aliquote wurden bis zur Inkubation bei -80 °C gelagert. Der Fäzesanteil der Suspension betrug 5% (m/v), was etwa physiologischen Bedingungen im Dünndarm entspricht. Alle Arbeiten erfolgten auf Trockeneis, um während der gesamten Aufarbeitung eine anaerobe Atmosphäre zu garantieren.

#### 5.15.6 Bakteriengewinnung aus humanem Fäzes

Die humanen Fäzesproben wurden analog Kap. 5.15.5 aufgearbeitet.

#### 5.15.7 Inkubationsbedingungen

Die anaerobe Inkubation der Fäzesproben erfolgte in 6-Well Platten bei 37 °C in anaerober Atmosphäre eines Schwenkinkubators bei 100 rpm. Die Inkubationszeit betrug 24, 48 und 72 h [Karppinen et al., 2000].

**Lösungen:**

Kalium-Phosphat-Puffer: 0,1 M  $K_2HPO_4$  und 0,1 M  $KH_2PO_4$ : Vorlegen der sauren Komponente mit der basischen auf pH 7,3 bringen

Spurenelementsuspension: 12 mM  $CaCl_2$ , 50 mM  $MnCl_2 \times 4 H_2O$ , 4 mM  $CoCl_2 \times 6 H_2O$ , 30 mM  $FeCl_3 \times 6 H_2O$  in 250 ml  $H_2O$  lösen

Reduzierendes Medium: 25 mM  $Na_2S \times 9 H_2O$  und 170  $\mu l$  1 M NaOH in 4 ml  $H_2O$  lösen

**Inkubationsansatz:**

Reagenzien:	Volumen [ $\mu l$ ]:
Kalium-Phosphat-Puffer	328
Testsubstanz in DMSO	10
Spurenelementlösung	2
Reduzierendes Medium	60
Fäzessuspension	600
Gesamtansatz	1000

Die Reaktion wurde durch Zugabe der Fäzessuspension gestartet. Das anaerobe Millieu wurde mit Hilfe des Anaerocult A-Kits und den dazugehörigen Anaerotest-Stäbchen (Merck KGaA, Darmstadt) kontrolliert. Die Fermentation wurde nach Inkubationsende durch Zugabe von 10  $\mu l$  ortho-Phosphorsäure abgestoppt, die Probe in 2 ml Reaktionsgefäße überführt und mit 1 ml Aceton versetzt, um lipophile Metabolite von den Feststoffen zu lösen. Anschließend wurden die festen Bestandteile der Suspension abzentrifugiert und abgetrennt. Das Aceton wurde im Evaporator aus dem Überstand entfernt. Die wässrige Phase wurde mit  $3 \times 1$  ml Ethylacetat extrahiert. Nach dem Einengen zur Trockene am Evaporator wurde der Rückstand in 200  $\mu l$  MeOH aufgenommen und mittels HPLC-UV/MS analysiert. Die Proben wurden bis zur Analyse bei  $-20$  °C gelagert.

Parallel durchgeführte Kontrollinkubationen wurden mit autoklavierter Fäzessuspension (30 min bei 121 °C) oder Kalium-Phosphat-Puffer durchgeführt.

### **5.15.8 Stabilität von CUR bei anaerober Inkubation**

Bei den Fäzesinkubationen wurden Proben mit 50  $\mu\text{M}$  CUR im Puffer und mit autoklavierter Fäzes für bis zu 72 h mitinkubiert. Die Aufarbeitung erfolgte wie in Kap. 5.15.7, über den Flächenvergleich der CUR-Peaks wurde der Substanzverlust abgeschätzt.



---

## 6 Literatur

- Abid, A., Bouchon, I., Siest, G. und Sabolovic, N., 1995. Glucuronidation in the Caco-2 human intestinal cell line: induction of UDP-glucuronosyltransferase 1\*6. *Biochem Pharmacol*, 50(4), 557–61.
- Aggarwal, B. B., Sundaram, C., Malani, N. und Ichikawa, H., 2007. Curcumin: the Indian solid gold. *Adv Exp Med Biol*, 595, 1–75.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. und Walter, P., 2004. *Molekularbiologie der Zelle*. WILEY-VCH Verlag GmbH, Weinheim, 4. Auflage.
- Anand, P., Kunnumakkara, A. B., Newman, R. A. und Aggarwal, B. B., 2007. Bioavailability of curcumin: problems and promises. *Mol Pharm*, 4(6), 807–18.
- Anand, P., Sundaram, C., Jhurani, S., Kunnumakkara, A. B. und Aggarwal, B. B., 2008a. Curcumin and cancer: an "old-age" disease with an "age-old" solution. *Cancer Lett*, 267(1), 133–64.
- Anand, P., Thomas, S. G., Kunnumakkara, A. B., Sundaram, C., Harikumar, K. B., Sung, B., Tharakan, S. T., Misra, K., Priyadarsini, I. K., Rajasekharan, K. N. und Aggarwal, B. B., 2008b. Biological activities of curcumin and its analogues (Congeners) made by man and Mother Nature. *Biochem Pharmacol*, 76(11), 1590–1611.
- Anto, R. J., Mukhopadhyay, A., Denning, K. und Aggarwal, B. B., 2002. Curcumin (diferuloylmethane) induces apoptosis through activation of caspase-8, BID cleavage and cytochrome c release: its suppression by ectopic expression of Bcl-2 and Bcl-xl. *Carcinogenesis*, 23(1), 143–50.
- Anwar, K., Iqbal, J. und Hussain, M. M., 2007. Mechanisms involved in vitamin E transport by primary enterocytes and in vivo absorption. *J Lipid Res*, 48(9), 2028–38.
- Anwar, K., Kayden, H. J. und Hussain, M. M., 2006. Transport of vitamin E by differentiated Caco-2 cells. *J Lipid Res*, 47(6), 1261–73.
- Artursson, P. und Karlsson, J., 1991. Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial (Caco-2) cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 175(3), 880–5.
- Asai, A. und Miyazawa, T., 2000. Occurrence of orally administered curcuminoid as glucuronide and glucuronide/sulfate conjugates in rat plasma. *Life Sci*, 67(23), 2785–93.
- Bailey, C. A., Bryla, P. und Malick, A. W., 1996. The use of the intestinal epithelial cell culture model, Caco-2, in pharmaceutical development. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 22(1,2), 85–103.
- Balasubramanian, K., 2006. Molecular orbital basis for yellow curry spice curcumin's prevention of Alzheimer's disease. *J Agric Food Chem*, 54(10), 3512–20.
- Baranczyk-Kuzma, A., Garren, J. A., Hidalgo, I. J. und Borchardt, R. T., 1991. Substrate specificity and some properties of phenol sulfotransferase from human intestinal Caco-2 cells. *Life Sci*, 49(16), 1197–206.

- Barclay, L. R., Vinqvist, M. R., Mukai, K., Goto, H., Hashimoto, Y., Tokunaga, A. und Uno, H., 2000. On the antioxidant mechanism of curcumin: classical methods are needed to determine antioxidant mechanism and activity. *Org Lett*, 2(18), 2841–3.
- Barik, A., Priyadarsini, K. I. und Mohan, H., 2003. Photophysical studies on binding of curcumin to bovine serum albumins. *Photochem Photobiol*, 77(6), 597–603.
- Barta, I., Smerak, P., Polivkova, Z., Sestakova, H., Langova, M., Turek, B. und Bartova, J., 2006. Current trends and perspectives in nutrition and cancer prevention. *Neoplasma*, 53(1), 19–25.
- Bateman, P. A., Jackson, K. G., Maitin, V., Yaqoob, P. und Williams, C. M., 2007. Differences in cell morphology, lipid and apo B secretory capacity in caco-2 cells following long term treatment with saturated and monounsaturated fatty acids. *Biochim Biophys Acta*, 1771(4), 475–85.
- Beckmann, G. und Rüffer, A., 2000. *Mikroökologie des Darmes*. Schlütersche GmbH & Co. KG, Hannover, 1. Auflage.
- Belakavadi, M. und Salimath, B. P., 2005. Mechanism of inhibition of ascites tumor growth in mice by curcumin is mediated by NF-kB and caspase activated DNase. *Mol Cell Biochem*, 273(1-2), 57–67.
- Bergman Jungstrom, M., Thompson, L. U. und Dabrosin, C., 2007. Flaxseed and its lignans inhibit estradiol-induced growth, angiogenesis, and secretion of vascular endothelial growth factor in human breast cancer xenografts in vivo. *Clin Cancer Res*, 13(3), 1061–7.
- Berridge, M. V. und Tan, A. S., 1993. Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Arch Biochem Biophys*, 303(2), 474–82.
- Bhandarkar, S. S. und Arbiser, J. L., 2007. Curcumin as an inhibitor of angiogenesis. *Adv Exp Med Biol*, 595, 185–95.
- Bharti, A. C., Donato, N., Singh, S. und Aggarwal, B. B., 2003. Curcumin (diferuloylmethane) down-regulates the constitutive activation of nuclear factor-kappa B and IkappaBalpha kinase in human multiple myeloma cells, leading to suppression of proliferation and induction of apoptosis. *Blood*, 101(3), 1053–62.
- Bisht, S., Feldmann, G., Soni, S., Ravi, R., Karikar, C., Maitra, A. und Maitra, A., 2007. Polymeric nanoparticle-encapsulated curcumin ("nanocurcumin"): a novel strategy for human cancer therapy. *J Nanobiotechnology*, 5, 3.
- Bock-Hennig, B. S., Kohle, C., Nill, K. und Bock, K. W., 2002. Influence of t-butylhydroquinone and beta-naphthoflavone on formation and transport of 4-methylumbelliferone glucuronide in Caco-2/TC-7 cell monolayers. *Biochem Pharmacol*, 63(2), 123–8.
- Bowey, E., Adlercreutz, H. und Rowland, I., 2003. Metabolism of isoflavones and lignans by the gut microflora: a study in germ-free and human flora associated rats. *Food Chem Toxicol*, 41(5), 631–6.
- Bradford, M. M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72, 248–54.

- Breithofer, A., Graumann, K., Scicchitano, M. S., Karathanasis, S. K., Butt, T. R. und Jungbauer, A., 1998. Regulation of human estrogen receptor by phytoestrogens in yeast and human cells. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 67(5-6), 421–9.
- Brugger, E. M., Wagner, J., Schumacher, D. M., Koch, K., Podlech, J., Metzler, M. und Lehmann, L., 2006. Mutagenicity of the mycotoxin alternariol in cultured mammalian cells. *Toxicol Lett*, 164(3), 221–30.
- Castedo, M., Perfettini, J. L., Roumier, T., Andreau, K., Medema, R. und Kroemer, G., 2004. Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition. *Oncogene*, 23(16), 2825–37.
- Chateau, D., Pauquai, T., Delers, F., Rousset, M., Chambaz, J. und Demignot, S., 2005. Lipid micelles stimulate the secretion of triglyceride-enriched apolipoprotein B48-containing lipoproteins by Caco-2 cells. *Journal of cellular physiology*, 202(3), 767–776.
- Chen, A., Xu, J. und Johnson, A. C., 2006a. Curcumin inhibits human colon cancer cell growth by suppressing gene expression of epidermal growth factor receptor through reducing the activity of the transcription factor Egr-1. *Oncogene*, 25(2), 278–87.
- Chen, H., Zhang, Z. S., Zhang, Y. L. und Zhou, D. Y., 1999. Curcumin inhibits cell proliferation by interfering with the cell cycle and inducing apoptosis in colon carcinoma cells. *Anticancer Res*, 19(5A), 3675–80.
- Chen, H. W. und Huang, H. C., 1998. Effect of curcumin on cell cycle progression and apoptosis in vascular smooth muscle cells. *Br J Pharmacol*, 124(6), 1029–40.
- Chen, J., Wanming, D., Zhang, D., Liu, Q. und Kang, J., 2005. Water-soluble antioxidants improve the antioxidant and anticancer activity of low concentrations of curcumin in human leukemia cells. *Pharmazie*, 60(1), 57–61.
- Chen, W. F., Deng, S. L., Zhou, B., Yang, L. und Liu, Z. L., 2006b. Curcumin and its analogues as potent inhibitors of low density lipoprotein oxidation: H-atom abstraction from the phenolic groups and possible involvement of the 4-hydroxy-3-methoxyphenyl groups. *Free Radic Biol Med*, 40(3), 526–35.
- Cheng, A. L., Hsu, C. H., Lin, J. K., Hsu, M. M., Ho, Y. F., Shen, T. S., Ko, J. Y., Lin, J. T., Lin, B. R., Ming-Shiang, W., Yu, H. S., Jee, S. H., Chen, G. S., Chen, T. M., Chen, C. A., Lai, M. K., Pu, Y. S., Pan, M. H., Wang, Y. J., Tsai, C. C. und Hsieh, C. Y., 2001. Phase I clinical trial of curcumin, a chemopreventive agent, in patients with high-risk or pre-malignant lesions. *Anticancer Res*, 21(4B), 2895–900.
- Choudhuri, T., Pal, S., Agwarwal, M. L., Das, T. und Sa, G., 2002. Curcumin induces apoptosis in human breast cancer cells through p53-dependent Bax induction. *FEBS Lett*, 512(1-3), 334–40.
- Choudhuri, T., Pal, S., Das, T. und Sa, G., 2005. Curcumin selectively induces apoptosis in deregulated cyclin D1-expressed cells at G2 phase of cell cycle in a p53-dependent manner. *J Biol Chem*, 280(20), 20 059–68.
- Clavel, T., Henderson, G., Alpert, C. A., Philippe, C., Rigottier-Gois, L., Dore, J. und Blaut, M., 2005. Intestinal bacterial communities that produce active estrogen-like compounds enterodiol and enterolactone in humans. *Appl Environ Microbiol*, 71(10), 6077–85.

- Coldham, N. G., Darby, C., Hows, M., King, L. J., Zhang, A. Q. und Sauer, M. J., 2002. Comparative metabolism of genistin by human and rat gut microflora: detection and identification of the end-products of metabolism. *Xenobiotica*, 32(1), 45–62.
- Conney, A. H., Lou, Y. R., Xie, J. G., Osawa, T., Newmark, H. L., Liu, Y., Chang, R. L. und Huang, M. T., 1997. Some perspectives on dietary inhibition of carcinogenesis: studies with curcumin and tea. *Proc Soc Exp Biol Med*, 216(2), 234–45.
- Cooper, T. H., Clark, J. G. und Guzinski, J. A., 1994. Analysis of Curcuminoids by High-Performance Liquid Chromatography. *ACS Symposium Series*, 547, 231–236.
- Delie, F. und Rubas, W., 1997. A human colonic cell line sharing similarities with enterocytes as a model to examine oral absorption: advantages and limitations of the Caco-2 model. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*, 14(3), 221–86.
- Deng, S., Chen, W., Zhou, B., Yang, L. und Liu, Z., 2006. Protective effects of curcumin and its analogues against free radical-induced oxidative haemolysis of human red blood cells. *Food Chemistry*, 98(1), 112–119.
- Deodhar, S. D., Sethi, R. und Srimal, R. C., 1980. Preliminary study on antirheumatic activity of curcumin (diferuloyl methane). *Indian J Med Res*, 71, 632–4.
- Dietze, F., Arrieta, A. F. und Zimmer, U., 1997. pKa stability constants and UV/VIS spectral behaviour of selected curcumin analogues. *Pharmazie*, 52, 302–06.
- Eeckhaut, E., Struijs, K., Possemiers, S., Vincken, J. P., Keukeleire, D. D. und Verstraete, W., 2008. Metabolism of the lignan macromolecule into enterolignans in the gastrointestinal lumen as determined in the simulator of the human intestinal microbial ecosystem. *J Agric Food Chem*, 56(12), 4806–12.
- Eisenbrand, G. und Metzler, M., 2002. *Toxikologie für Naturwissenschaftler und Mediziner*. WILEY-VCH Verlag GmbH, Weinheim, 2. Auflage.
- Fisher, J. M., Wrighton, S. A., Watkins, P. B., Schmiedlin-Ren, P., Calamia, J. C., Shen, D. D., Kunze, K. L. und Thummel, K. E., 1999. First-pass midazolam metabolism catalyzed by 1 $\alpha$ ,25-dihydroxy vitamin D<sub>3</sub>-modified Caco-2 cell monolayers. *J Pharmacol Exp Ther*, 289(2), 1134–42.
- Folch, J., Lees, M. und Sloane Stanley, G. H., 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem*, 226(1), 497–509.
- Frackowiak, S., Labidi, B., Hernandez-Verdun, D. und Bouteille, M., 1986. Preservation of chromosome integrity during micronucleation induced by colchicine in PtK1 cells. *Chromosoma*, 94(6), 468–74.
- Galijatovic, A., Otake, Y., Walle, U. K. und Walle, T., 2001. Induction of UDP-glucuronosyltransferase UGT1A1 by the flavonoid chrysin in Caco-2 cells—potential role in carcinogen bioinactivation. *Pharm Res*, 18(3), 374–9.
- Galijatovic, A., Walle, U. K. und Walle, T., 2000. Induction of UDP-glucuronosyltransferase by the flavonoids chrysin and quercetin in Caco-2 cells. *Pharm Res*, 17(1), 21–6.
- Gan, Liang-Shang L.; Thakker, D. R., 1997. Applications of the Caco-2 model in the design and development of orally active drugs: elucidation of biochemical and physical barriers posed by the intestinal epithelium. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 23, 77–98.



- Ganten, D., 2008. *Grundlagen der Molekularen Medizin*. Springer-Verlag Heidelberg, 3. Auflage.
- Garcea, G., Jones, D. J., Singh, R., Dennison, A. R., Farmer, P. B., Sharma, R. A., Steward, W. P., Gescher, A. J. und Berry, D. P., 2004. Detection of curcumin and its metabolites in hepatic tissue and portal blood of patients following oral administration. *Br J Cancer*, 90(5), 1011–5.
- Garcia-Alloza, M., Borrelli, L. A., Rozkalne, A., Hyman, B. T. und Bacskai, B. J., 2007. Curcumin labels amyloid pathology in vivo, disrupts existing plaques, and partially restores distorted neurites in an Alzheimer mouse model. *J Neurochem*, 102(4), 1095–104.
- Govindarajan, V., 1980. Turmeric - chemistry, technology, and quality. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 12(3), 199–301.
- van Greevenbroek, M. M., Erkelens, D. W. und de Bruin, T. W., 2000. Caco-2 cells secrete two independent classes of lipoproteins with distinct density: effect of the ratio of unsaturated to saturated fatty acid. *Atherosclerosis*, 149(1), 25–31.
- van Greevenbroek, M. M., van Meer, G., Erkelens, D. W. und de Bruin, T. W., 1996. Effects of saturated, mono-, and polyunsaturated fatty acids on the secretion of apo B containing lipoproteins by Caco-2 cells. *Atherosclerosis*, 121(1), 139–50.
- van Greevenbroek, M. M., Voorhout, W. F., Erkelens, D. W., van Meer, G. und de Bruin, T. W., 1995. Palmitic acid and linoleic acid metabolism in Caco-2 cells: different triglyceride synthesis and lipoprotein secretion. *J Lipid Res*, 36(1), 13–24.
- Gres, M. C., Julian, B., Bourrie, M., Meunier, V., Roques, C., Berger, M., Boulenc, X., Berger, Y. und Fabre, G., 1998. Correlation between oral drug absorption in humans, and apparent drug permeability in TC-7 cells, a human epithelial intestinal cell line: comparison with the parental Caco-2 cell line. *Pharm Res*, 15(5), 726–33.
- Guha, S. und Bhattacharyya, B., 1997. The colchicine-tubulin interaction: a review. *Current Science*, 73(4), 351–8.
- Gupta, K. K., Bharne, S. S., Rathinasamy, K., Naik, N. R. und Panda, D., 2006. Dietary antioxidant curcumin inhibits microtubule assembly through tubulin binding. *Febs J*, 273(23), 5320–32.
- Hanif, R., Qiao, L., Shiff, S. J. und Rigas, B., 1997. Curcumin, a natural plant phenolic food additive, inhibits cell proliferation and induces cell cycle changes in colon adenocarcinoma cell lines by a prostaglandin-independent pathway. *J Lab Clin Med*, 130(6), 576–84.
- Heinonen, S., Nurmi, T., Liukkonen, K., Poutanen, K., Wahala, K., Deyama, T., Nishibe, S. und Adlercreutz, H., 2001. In vitro metabolism of plant lignans: new precursors of mammalian lignans enterolactone and enterodiol. *J Agric Food Chem*, 49(7), 3178–86.
- Hidalgo, I. J. und Li, J., 1996. Carrier-mediated transport and efflux mechanisms in Caco-2 cells. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 22(1,2), 53–66.
- Hill, M. J., 1995. *Role of gut bacteria in human toxicology and pharmacology*. Taylor & Francis Ltd., London, 1. Auflage.
- Hillgren, K. M., Kato, A. und Borchardt, R. T., 1995. In vitro systems for studying intestinal drug absorption. *Med Res Rev*, 15(2), 83–109.

- Hochman, J. H., Chiba, M., Nishime, J., Yamazaki, M. und Lin, J. H., 2000. Influence of P-glycoprotein on the transport and metabolism of indinavir in Caco-2 cells expressing cytochrome P-450 3A4. *J Pharmacol Exp Ther*, 292(1), 310–8.
- Hoehle, S. I., Pfeiffer, E. und Metzler, M., 2007. Glucuronidation of curcuminoids by human microsomal and recombinant UDP-glucuronosyltransferases. *Mol Nutr Food Res*, 51(8), 932–8.
- Hoehle, S. I., Pfeiffer, E., Solyom, A. M. und Metzler, M., 2006. Metabolism of curcuminoids in tissue slices and subcellular fractions from rat liver. *J Agric Food Chem*, 54(3), 756–64.
- Hoffmann, K., 1966. Bakterielle Besiedlung des menschlichen Darmes. Dr. Alfred Hüthig Verlag Heidelberg, 1. Auflage.
- Holder, G. M., Plummer, J. L. und Ryan, A. J., 1978. The metabolism and excretion of curcumin (1,7-bis-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione) in the rat. *Xenobiotica*, 8(12), 761–8.
- Holy, J. M., 2002. Curcumin disrupts mitotic spindle structure and induces micronucleation in MCF-7 breast cancer cells. *Mutat Res*, 518(1), 71–84.
- Hour, T. C., Chen, J., Huang, C. Y., Guan, J. Y., Lu, S. H. und Pu, Y. S., 2002. Curcumin enhances cytotoxicity of chemotherapeutic agents in prostate cancer cells by inducing p21(WAF1/CIP1) and C/EBPbeta expressions and suppressing NF-kappaB activation. *Prostate*, 51(3), 211–8.
- Huang, M. T., Ma, W., Lu, Y. P., Chang, R. L., Fisher, C., Manchand, P. S., Newmark, H. L. und Conney, A. H., 1995. Effects of curcumin, demethoxycurcumin, bisdemethoxycurcumin and tetrahydrocurcumin on 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced tumor promotion. *Carcinogenesis*, 16(10), 2493–7.
- Huang, M. T., Ma, W., Yen, P., Xie, J. G., Han, J., Frenkel, K., Grunberger, D. und Conney, A. H., 1997. Inhibitory effects of topical application of low doses of curcumin on 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced tumor promotion and oxidized DNA bases in mouse epidermis. *Carcinogenesis*, 18(1), 83–8.
- Hughes, T. E., Sasak, W. V., Ordovas, J. M., Forte, T. M., Lamon-Fava, S. und Schaefer, E. J., 1987. A novel cell line (Caco-2) for the study of intestinal lipoprotein synthesis. *J Biol Chem*, 262(8), 3762–7.
- Hur, H. G., Lay, J. O., J., Beger, R. D., Freeman, J. P. und Rafii, F., 2000. Isolation of human intestinal bacteria metabolizing the natural isoflavone glycosides daidzin and genistin. *Arch Microbiol*, 174(6), 422–8.
- van Iersel, M. L., Ploemen, J. P., Lo Bello, M., Federici, G. und van Bladeren, P. J., 1997. Interactions of alpha, beta-unsaturated aldehydes and ketones with human glutathione S-transferase P1-1. *Chem Biol Interact*, 108(1-2), 67–78.
- Iersel, M. L., Ploemen, J. P., Struik, I., van Amersfoort, C., Keyzer, A. E., Schefferlie, J. G. und van Bladeren, P. J., 1996. Inhibition of glutathione S-transferase activity in human melanoma cells by alpha,beta-unsaturated carbonyl derivatives. Effects of acrolein, cinnamaldehyde, citral, crotonaldehyde, curcumin, ethacrynic acid, and trans-2-hexenal. *Chem Biol Interact*, 102(2), 117–32.

- Inano, H., Onoda, M., Inafuku, N., Kubota, M., Kamada, Y., Osawa, T., Kobayashi, H. und Wakabayashi, K., 1999. Chemoprevention by curcumin during the promotion stage of tumorigenesis of mammary gland in rats irradiated with gamma-rays. *Carcinogenesis*, 20(6), 1011–8.
- Inano, H., Onoda, M., Inafuku, N., Kubota, M., Kamada, Y., Osawa, T., Kobayashi, H. und Wakabayashi, K., 2000. Potent preventive action of curcumin on radiation-induced initiation of mammary tumorigenesis in rats. *Carcinogenesis*, 21(10), 1835–41.
- Ireson, C., Orr, S., Jones, D. J., Verschoyle, R., Lim, C. K., Luo, J. L., Howells, L., Plummer, S., Jukes, R., Williams, M., Steward, W. P. und Gescher, A., 2001. Characterization of metabolites of the chemopreventive agent curcumin in human and rat hepatocytes and in the rat in vivo, and evaluation of their ability to inhibit phorbol ester-induced prostaglandin E2 production. *Cancer Res*, 61(3), 1058–64.
- Ireson, C. R., Jones, D. J., Orr, S., Coughtrie, M. W., Boocock, D. J., Williams, M. L., Farmer, P. B., Steward, W. P. und Gescher, A. J., 2002. Metabolism of the cancer chemopreventive agent curcumin in human and rat intestine. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 11(1), 105–11.
- Jaiswal, A. S., Marlow, B. P., Gupta, N. und Narayan, S., 2002. Beta-catenin-mediated transactivation and cell-cell adhesion pathways are important in curcumin (diferuylmethane)-induced growth arrest and apoptosis in colon cancer cells. *Oncogene*, 21(55), 8414–27.
- Jaruga, E., Sokal, A., Chrul, S. und Bartosz, G., 1998. Apoptosis-independent alterations in membrane dynamics induced by curcumin. *Exp Cell Res*, 245(2), 303–12.
- Joshi, H. C., 1998. Microtubule dynamics in living cells. *Curr Opin Cell Biol*, 10(1), 35–44.
- Kakar, S. S. und Roy, D., 1994. Curcumin inhibits TPA induced expression of c-fos, c-jun and c-myc proto-oncogenes messenger RNAs in mouse skin. *Cancer Lett*, 87(1), 85–9.
- Karppinen, S., Liukkonen, K., Aura, A., Forssell, P. und Poutanen, K., 2000. In vitro fermentation of polysaccharides of rye, wheat and oat brans and inulin by human faecal bacteria. *J Sci Food Agric*, 80, 1469–76.
- Kawamori, T., Lubet, R., Steele, V. E., Kelloff, G. J., Kaskey, R. B., Rao, C. V. und Reddy, B. S., 1999. Chemopreventive effect of curcumin, a naturally occurring anti-inflammatory agent, during the promotion/progression stages of colon cancer. *Cancer Res*, 59(3), 597–601.
- Kelloff, G. J., Hawk, E. T., Karp, J. E., Crowell, J. A., Boone, C. W., Steele, V. E., Lubet, R. A. und Sigman, C. C., 1997. Progress in clinical chemoprevention. *Semin Oncol*, 24(2), 241–52.
- King, A. A., Shaughnessy, D. T., Mure, K., Leszczynska, J., Ward, W. O., Umbach, D. M., Xu, Z., Ducharme, D., Taylor, J. A., Demarini, D. M. und Klein, C. B., 2007. Antimutagenicity of cinnamaldehyde and vanillin in human cells: Global gene expression and possible role of DNA damage and repair. *Mutat Res*, 616(1-2), 60–9.
- Koo, J. Y., Kim, H. J., Jung, K. O. und Park, K. Y., 2004. Curcumin inhibits the growth of AGS human gastric carcinoma cells in vitro and shows synergism with 5-fluorouracil. *J Med Food*, 7(2), 117–21.
- Kruhl, B., 2005. Bestimmung der UDP-Glucosyltransferaseaktivität in Caco-2 Zellen. Wissenschaftliche Abschlussarbeit, Universität Karlsruhe (TH).

- Kulling, S. E., Jacobs, E., Pfeiffer, E. und Metzler, M., 1998. Studies on the genotoxicity of the mammalian lignans enterolactone and enterodiol and their metabolic precursors at various endpoints in vitro. *Mutat Res*, 416(1-2), 115–24.
- Kumar, S., Narain, U., Tripathi, S. und Misra, K., 2001. Syntheses of Curcumin Bioconjugates and Study of Their Antibacterial Activities against beta-Lactamase-Producing Microorganisms. *Bioconjug Chem*, 12(4), 464–9.
- Kunwar, A., Barik, A., Mishra, B., Rathinasamy, K., Pandey, R. und Priyadarsini, K. I., 2008. Quantitative cellular uptake, localization and cytotoxicity of curcumin in normal and tumor cells. *Biochim Biophys Acta*, 1780(4), 673–9.
- Kunwar, A., Barik, A., Pandey, R. und Priyadarsini, K. I., 2006. Transport of liposomal and albumin loaded curcumin to living cells: an absorption and fluorescence spectroscopic study. *Biochim Biophys Acta*, 1760(10), 1513–20.
- Kuo, M. L., Huang, T. S. und Lin, J. K., 1996. Curcumin, an antioxidant and anti-tumor promoter, induces apoptosis in human leukemia cells. *Biochim Biophys Acta*, 1317(2), 95–100.
- Kuwayama, K., Inoue, H., Kanamori, T., Tsujikawa, K., Miyaguchi, H., Iwata, Y., Miyauchi, S., Kamoto, N. und Kishi, T., 2007. Interactions between 3,4-methylenedioxymethamphetamine, methamphetamine, ketamine, and caffeine in human intestinal Caco-2 cells and in oral administration to rats. *Forensic Sci Int*, 170(2-3), 183–8.
- Lao, C. D., Ruffin, M. T. t., Normolle, D., Heath, D. D., Murray, S. I., Bailey, J. M., Boggs, M. E., Crowell, J., Rock, C. L. und Brenner, D. E., 2006. Dose escalation of a curcuminoid formulation. *BMC Complement Altern Med*, 6, 10.
- Le Ferrec, E., Chesne, C., Artusson, P., Brayden, D., Fabre, G., Gires, P., Guillou, F., Rousset, M., Rubas, W. und Scarino, M. L., 2001. In vitro models of the intestinal barrier. The report and recommendations of ECVAM Workshop 46. European Centre for the Validation of Alternative methods. *Altern Lab Anim*, 29(6), 649–68.
- Lehmann, L., Esch, H. L., Wagner, J., Rohnstock, L. und Metzler, M., 2005. Estrogenic and genotoxic potential of equol and two hydroxylated metabolites of Daidzein in cultured human Ishikawa cells. *Toxicol Lett*, 158(1), 72–86.
- Leu, T. H. und Maa, M. C., 2002. The molecular mechanisms for the antitumorigenic effect of curcumin. *Curr Med Chem Anti-Canc Agents*, 2(3), 357–70.
- Lev-Ari, S., Strier, L., Kazanov, D., Madar-Shapiro, L., Dvory-Sobol, H., Pinchuk, I., Marian, B., Lichtenberg, D. und Arber, N., 2005. Celecoxib and curcumin synergistically inhibit the growth of colorectal cancer cells. *Clin Cancer Res*, 11(18), 6738–44.
- Levy, E. und Bendayan, M., 2000. Use of immunoelectron microscopy and intestinal models to explore the elaboration of apolipoproteins required for intraenterocyte lipid transport. *Microsc Res Tech*, 49(4), 374–82.
- Levy, E., Mehran, M. und Seidman, E., 1995. Caco-2 cells as a model for intestinal lipoprotein synthesis and secretion. *Faseb J*, 9(8), 626–35.

- Levy, E., Yotov, W., Seidman, E. G., Garofalo, C., Delvin, E. und Menard, D., 1999. Caco-2 cells and human fetal colon: a comparative analysis of their lipid transport. *Biochim Biophys Acta*, 1439(3), 353–62.
- Li, L., Ahmed, B., Mehta, K. und Kurzrock, R., 2007. Liposomal curcumin with and without oxaliplatin: effects on cell growth, apoptosis, and angiogenesis in colorectal cancer. *Mol Cancer Ther*, 6(4), 1276–82.
- Li, L., Braitheh, F. S. und Kurzrock, R., 2005. Liposome-encapsulated curcumin: in vitro and in vivo effects on proliferation, apoptosis, signaling, and angiogenesis. *Cancer*, 104(6), 1322–31.
- Liang, E., Chessic, K. und Yazdanian, M., 2000. Evaluation of an accelerated Caco-2 cell permeability model. *J Pharm Sci*, 89(3), 336–45.
- Liehr, J. G., 1990. Genotoxic effects of estrogens. *Mutat Res*, 238(3), 269–76.
- Lim, G. P., Chu, T., Yang, F., Beech, W., Frautschy, S. A. und Cole, G. M., 2001. The curry spice curcumin reduces oxidative damage and amyloid pathology in an Alzheimer transgenic mouse. *J Neurosci*, 21(21), 8370–7.
- Lin, J. K. und Lin-Shia, S. Y., 2001. Mechanisms of cancer chemoprevention by curcumin. *Proc Natl Sci Counc Repub China B*, 25(2), 59–66.
- Lin, J. K., Pan, M. H. und Lin-Shiau, S. Y., 2000. Recent studies on the biofunctions and biotransformations of curcumin. *Biofactors*, 13(1-4), 153–8.
- Liu, A., Lou, H., Zhao, L. und Fan, P., 2006. Validated LC/MS/MS assay for curcumin and tetrahydrocurcumin in rat plasma and application to pharmacokinetic study of phospholipid complex of curcumin. *J Pharm Biomed Anal*, 40(3), 720–7.
- Liu, Y., Peterson, D. A., Kimura, H. und Schubert, D., 1997. Mechanism of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. *J Neurochem*, 69(2), 581–93.
- Luchoomun, J. und Hussain, M. M., 1999. Assembly and secretion of chylomicrons by differentiated Caco-2 cells. Nascent triglycerides and preformed phospholipids are preferentially used for lipoprotein assembly. *J Biol Chem*, 274(28), 19 565–72.
- Ma, Z., Shayeganpour, A., Brocks, D. R., Lavasanifar, A. und Samuel, J., 2007. High-performance liquid chromatography analysis of curcumin in rat plasma: application to pharmacokinetics of polymeric micellar formulation of curcumin. *Biomed Chromatogr*, 21(5), 546–52.
- Magalska, A., Sliwinska, M., Szczepanowska, J., Salvioli, S., Franceschi, C. und Sikora, E., 2006. Resistance to apoptosis of HCW-2 cells can be overcome by curcumin- or vincristine-induced mitotic catastrophe. *Int J Cancer*.
- Mahakunakorn, P., Tohda, M., Murakami, Y., Matsumoto, K., Watanabe, H. und Vajaragupta, O., 2003. Cytoprotective and cytotoxic effects of curcumin: dual action on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative cell damage in NG108-15 cells. *Biol Pharm Bull*, 26(5), 725–8.
- Maiti, K., Mukherjee, K., Gantait, A., Saha, B. P. und Mukherjee, P. K., 2007. Curcumin-phospholipid complex: Preparation, therapeutic evaluation and pharmacokinetic study in rats. *Int J Pharm*, 330(1-2), 155–63.

- Majone, F., Tonetto, S., Soligo, C. und Panozzo, M., 1992. Identification of kinetochores and DNA synthesis in micronuclei induced by mitomycin C and colchicine in Chinese hamster ovary cells. *Teratog Carcinog Mutagen*, 12(4), 155–66.
- Manson, M. M., Gescher, A., Hudson, E. A., Plummer, S. M., Squires, M. S. und Prigent, S. A., 2000. Blocking and suppressing mechanisms of chemoprevention by dietary constituents. *Toxicol Lett*, 112-113, 499–505.
- Marczylo, T. H., Verschoyle, R. D., Cooke, D. N., Morazzoni, P., Steward, W. P. und Gescher, A. J., 2007. Comparison of systemic availability of curcumin with that of curcumin formulated with phosphatidylcholine. *Cancer Chemother Pharmacol*, 60(2), 171–7.
- Marquardt, H. und Schäfer, S., 2004. *Lehrbuch der Toxikologie*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, 2. Auflage.
- Masuda, T., Hidaka, K., Shinohara, A., Maekawa, T., Takeda, Y. und Yamaguchi, H., 1999. Chemical studies on antioxidant mechanism of curcuminoid: analysis of radical reaction products from curcumin. *J Agric Food Chem*, 47(1), 71–7.
- Masuda, T., Maekawa, T., Hidaka, K., Bando, H., Takeda, Y. und Yamaguchi, H., 2001. Chemical studies on antioxidant mechanism of curcumin: analysis of oxidative coupling products from curcumin and linoleate. *J Agric Food Chem*, 49(5), 2539–47.
- Mathews, S. und Rao, M., 1991. Interactions of curcumin with glutathione. *International Journal of Pharmaceutics*, 76, 257–59.
- Matthes, H. W. D., Luu, B. und Ourisson, G., 1980. Cytotoxic components of *Zingiber zerumbet*, *Curcuma zedoaria* and *C. domestica*. *Phytochemistry*, 19, 2643–2650.
- Maurya, D. K., Adhikari, S., Nair, C. K. und Devasagayam, T. P., 2007. DNA protective properties of vanillin against gamma-radiation under different conditions: possible mechanisms. *Mutat Res*, 634(1-2), 69–80.
- Mehta, K., Pantazis, P., McQueen, T. und Aggarwal, B. B., 1997. Antiproliferative effect of curcumin (diferuloylmethane) against human breast tumor cell lines. *Anticancer Drugs*, 8(5), 470–81.
- Menon, V. P. und Sudheer, A. R., 2007. Antioxidant and anti-inflammatory properties of curcumin. *Adv Exp Med Biol*, 595, 105–25.
- Meselhy, M. R., Nakamura, N. und Hattori, M., 1997. Biotransformation of (-)-epicatechin 3-O-gallate by human intestinal bacteria. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 45(5), 888–93.
- Mishra, S., Kapoor, N., Mubarak Ali, A., Pardhasaradhi, B. V., Kumari, A. L., Khar, A. und Misra, K., 2005. Differential apoptotic and redox regulatory activities of curcumin and its derivatives. *Free Radic Biol Med*, 38(10), 1353–60.
- Munzel, P. A., Schmohl, S., Heel, H., Kalberer, K., Bock-Hennig, B. S. und Bock, K. W., 1999. Induction of human UDP glucuronosyltransferases (UGT1A6, UGT1A9, and UGT2B7) by t-butylhydroquinone and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in Caco-2 cells. *Drug Metab Dispos*, 27(5), 569–73.
- Naidu, K. A. und Thippeswamy, N. B., 2002. Inhibition of human low density lipoprotein oxidation by active principles from spices. *Mol Cell Biochem*, 229(1-2), 19–23.

- Okada, H. und Mak, T. W., 2004. Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells. *Nat Rev Cancer*, 4(8), 592–603.
- Okada, K., Wangpoengtrakul, C., Tanaka, T., Toyokuni, S., Uchida, K. und Osawa, T., 2001. Curcumin and especially tetrahydrocurcumin ameliorate oxidative stress-induced renal injury in mice. *J Nutr*, 131(8), 2090–5.
- Ou, S. und Kwok, K., 2004. Ferulic acid: Pharmaceutical functions, preparation and applications in foods. *J Sci Food Agric*, 84(11), 1261–1269.
- Paine, M. F. und Fisher, M. B., 2000. Immunochemical identification of UGT isoforms in human small bowel and in caco-2 cell monolayers. *Biochem Biophys Res Commun*, 273(3), 1053–7.
- Pan, M. H., Huang, T. M. und Lin, J. K., 1999. Biotransformation of curcumin through reduction and glucuronidation in mice. *Drug Metab Dispos*, 27(4), 486–94.
- Pfeiffer, E., Hoehle, S., Solyom, A. M. und Metzler, M., 2003. Studies on the stability of turmeric constituents. *J Food Eng*, 56, 257–59.
- Pfeiffer, E., Hoehle, S. I., Walch, S. G., Riess, A., Solyom, A. M. und Metzler, M., 2007. Curcuminoids form reactive glucuronides in vitro. *J Agric Food Chem*, 55(2), 538–44.
- Pinto, M., Robine-Leon, S., Appay, M., Kedinger, M., Triadou, N., Dussaulx, E., Lacroix, B., Simon-Assmann, P., Haffen, K., Fogh, J. und Zweibaum, A., 1983. Enterocyte-like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture. *Biol Cell*, 47, 323–330.
- Piper, J. T., Singhal, S. S., Salameh, M. S., Torman, R. T., Awasthi, Y. C. und Awasthi, S., 1998. Mechanisms of anticarcinogenic properties of curcumin: the effect of curcumin on glutathione linked detoxification enzymes in rat liver. *Int J Biochem Cell Biol*, 30(4), 445–56.
- Piwocka, K., Jaruga, E., Skierski, J., Gradzka, I. und Sikora, E., 2001. Effect of glutathione depletion on caspase-3 independent apoptosis pathway induced by curcumin in Jurkat cells. *Free Radic Biol Med*, 31(5), 670–8.
- Portes, E., Gardrat, C. und Castellan, A., 2007. A comparative study on the antioxidant properties of tetrahydrocurcuminoids and curcuminoids. *Tetrahedron*, 63, 9092–99.
- Price, L. C. und Buescher, R. W., 1997. Kinetics of alkaline degradation of the food pigments curcumin and curcuminoids. *Journal of Food Science*, 62(2), 267–69.
- Pulla Reddy, A. C., Sudharshan, E., Appu Rao, A. G. und Lokesh, B. R., 1999. Interaction of curcumin with human serum albumin—a spectroscopic study. *Lipids*, 34(10), 1025–9.
- Ramachandran, C., Fonseca, H. B., Jhabvala, P., Escalon, E. A. und Melnick, S. J., 2002. Curcumin inhibits telomerase activity through human telomerase reverse transcriptase in MCF-7 breast cancer cell line. *Cancer Lett*, 184, 1–6.
- Ramachandran, C. und You, W., 1999. Differential sensitivity of human mammary epithelial and breast carcinoma cell lines to curcumin. *Breast Cancer Res Treat*, 54(3), 269–78.
- Rao, C. V., Kawamori, T., Hamid, R. und Reddy, B. S., 1999. Chemoprevention of colonic aberrant crypt foci by an inducible nitric oxide synthase-selective inhibitor. *Carcinogenesis*, 20(4), 641–4.

- Rao, C. V., Rivenson, A., Simi, B. und Reddy, B. S., 1995. Chemoprevention of colon carcinogenesis by dietary curcumin, a naturally occurring plant phenolic compound. *Cancer Res*, 55(2), 259–66.
- Ravindranath, V. und Chandrasekhara, N., 1980. Absorption and tissue distribution of curcumin in rats. *Toxicology*, 16(3), 259–65.
- Ravindranath, V. und Chandrasekhara, N., 1981. In vitro studies on the intestinal absorption of curcumin in rats. *Toxicology*, 20(2-3), 251–7.
- Ravindranath, V. und Chandrasekhara, N., 1982. Metabolism of curcumin—studies with [<sup>3</sup>H]curcumin. *Toxicology*, 22(4), 337–44.
- Romero, M. R., Efferth, T., Serrano, M. A., Castano, B., Macias, R. I., Briz, O. und Marin, J. J., 2005. Effect of artemisinin/artesunate as inhibitors of hepatitis B virus production in an in vitro replicative system. *Antiviral Res*, 68(2), 75–83.
- Roninson, I. B., Broude, E. V. und Chang, B. D., 2001. If not apoptosis, then what? Treatment-induced senescence and mitotic catastrophe in tumor cells. *Drug Resist Updat*, 4(5), 303–13.
- Roughley, P. und Whiting, D., 1973. Experiments in the Biosynthesis of Curcumin. *Journal of the Chemical Society*, 20, 2379–88.
- Scartezzini, P. und Speroni, E., 2000. Review on some plants of Indian traditional medicine with antioxidant activity. *J Ethnopharmacol*, 71(1-2), 23–43.
- Schmiedlin-Ren, P., Thummel, K. E., Fisher, J. M., Paine, M. F., Lown, K. S. und Watkins, P. B., 1997. Expression of enzymatically active CYP3A4 by Caco-2 cells grown on extracellular matrix-coated permeable supports in the presence of 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>. *Mol Pharmacol*, 51(5), 741–54.
- Schuler, M., Rupa, D. S. und Eastmond, D. A., 1997. A critical evaluation of centromeric labeling to distinguish micronuclei induced by chromosomal loss and breakage in vitro. *Mutat Res*, 392(1-2), 81–95.
- Seithel, A., Karlsson, J., Hilgendorf, C., Bjorquist, A. und Ungell, A. L., 2006. Variability in mRNA expression of ABC- and SLC-transporters in human intestinal cells: comparison between human segments and Caco-2 cells. *Eur J Pharm Sci*, 28(4), 291–9.
- Shah, P., Jogani, V., Bagchi, T. und Misra, A., 2006. Role of Caco-2 cell monolayers in prediction of intestinal drug absorption. *Biotechnol Prog*, 22(1), 186–98.
- Shao, Z. M., Shen, Z. Z., Liu, C. H., Sartippour, M. R., Go, V. L., Heber, D. und Nguyen, M., 2002. Curcumin exerts multiple suppressive effects on human breast carcinoma cells. *Int J Cancer*, 98(2), 234–40.
- Sharma, O. P., 1976. Antioxidant activity of curcumin and related compounds. *Biochem Pharmacol*, 25(15), 1811–2.
- Sharma, R. A., Euden, S. A., Platton, S. L., Cooke, D. N., Shafayat, A., Hewitt, H. R., Marczylo, T. H., Morgan, B., Hemingway, D., Plummer, S. M., Pirmohamed, M., Gescher, A. J. und Steward, W. P., 2004. Phase I clinical trial of oral curcumin: biomarkers of systemic activity and compliance. *Clin Cancer Res*, 10(20), 6847–54.



- Sharma, R. A., Gescher, A. J. und Steward, W. P., 2005. Curcumin: the story so far. *Eur J Cancer*, 41(13), 1955–68.
- Sharma, R. A., Ireson, C. R., Verschoyle, R. D., Hill, K. A., Williams, M. L., Leuratti, C., Manson, M. M., Marnett, L. J., Steward, W. P. und Gescher, A., 2001a. Effects of dietary curcumin on glutathione S-transferase and malondialdehyde-DNA adducts in rat liver and colon mucosa: relationship with drug levels. *Clin Cancer Res*, 7(5), 1452–8.
- Sharma, R. A., McLelland, H. R., Hill, K. A., Ireson, C. R., Euden, S. A., Manson, M. M., Pirmohamed, M., Marnett, L. J., Gescher, A. J. und Steward, W. P., 2001b. Pharmacodynamic and pharmacokinetic study of oral curcuma extract in patients with colorectal cancer. *Clin Cancer Res*, 7(7), 1894–900.
- Sharma, R. A., Steward, W. P. und Gescher, A. J., 2007. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of curcumin. *Adv Exp Med Biol*, 595, 453–70.
- Shelanski, M. L., Gaskin, F. und Cantor, C. R., 1973. Microtubule assembly in the absence of added nucleotides. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 70(3), 765–8.
- Shin, J. W., Son, J. Y., Kang, J. K., Han, S. H., Cho, C. K. und Son, C. G., 2008. *Trichosanthes kirilowii* tuber extract induces G2/M phase arrest via inhibition of tubulin polymerization in HepG2 cells. *J Ethnopharmacol*, 115(2), 209–16.
- Shishodia, S., Amin, H. M., Lai, R. und Aggarwal, B. B., 2005. Curcumin (diferuloylmethane) inhibits constitutive NF-kappaB activation, induces G1/S arrest, suppresses proliferation, and induces apoptosis in mantle cell lymphoma. *Biochem Pharmacol*, 70(5), 700–13.
- Shoba, G., Joy, D., Joseph, T., Majeed, M., Rajendran, R. und Srinivas, P. S., 1998. Influence of piperine on the pharmacokinetics of curcumin in animals and human volunteers. *Planta Med*, 64(4), 353–6.
- Simon, A., Allais, D. P., Duroux, J. L., Basly, J. P., Durand-Fontanier, S. und Delage, C., 1998. Inhibitory effect of curcuminoids on MCF-7 cell proliferation and structure-activity relationships. *Cancer Lett*, 129(1), 111–6.
- Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D., Monks, A., McMahon, J., Vistica, D., Warren, J. T., Bokesch, H., Kenney, S. und Boyd, M. R., 1990. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J Natl Cancer Inst*, 82(13), 1107–12.
- Snyder, R. D. und Arnone, M. R., 2002. Putative identification of functional interactions between DNA intercalating agents and topoisomerase II using the V79 in vitro micronucleus assay. *Mutat Res*, 503(1-2), 21–35.
- Sumanont, Y., Murakami, Y., Tohda, M., Vajragupta, O., Matsumoto, K. und Watanabe, H., 2004. Evaluation of the nitric oxide radical scavenging activity of manganese complexes of curcumin and its derivative. *Biol Pharm Bull*, 27(2), 170–3.
- Sun, Y. M., Wang, R. X., Yuan, S. L., Lin, X. J. und Liu, C. B., 2004. Theoretical study on the antioxidant activity of curcumin. *Chinese Journal of Chemistry*, 22, 827–30.
- Suresh, D. und Srinivasan, K., 2007. Studies on the in vitro absorption of spice principles—curcumin, capsaicin and piperine in rat intestines. *Food Chem Toxicol*, 45(8), 1437–42.

- Surh, Y. J. und Chun, K. S., 2007. Cancer chemopreventive effects of curcumin. *Adv Exp Med Biol*, 595, 149–72.
- Tan, E. M., Rodnan, G. P., Garcia, I., Moroi, Y., Fritzler, M. J. und Peebles, C., 1980. Diversity of antinuclear antibodies in progressive systemic sclerosis. Anti-centromere antibody and its relationship to CREST syndrome. *Arthritis Rheum*, 23(6), 617–25.
- Tiyaboonchai, W., Tungpradit, W. und Plianbangchang, P., 2007. Formulation and characterization of curcuminoids loaded solid lipid nanoparticles. *Int J Pharm*, 337(1-2), 299–306.
- Tønnesen, H., 1992. Chemistry of curcumin and curcuminoids. ACS Symposium Series (Phenolic Compd. Food Their Eff. Health I), 506, 143–53.
- Tønnesen, H. H. und Karlsen, J., 1985a. Studies on curcumin and curcuminoids. V. Alkaline degradation of curcumin. *Z Lebensm Unters Forsch*, 180, 132–34.
- Tønnesen, H. H. und Karlsen, J., 1985b. Studies on curcumin and curcuminoids. VI. Kinetics of curcumin degradation in aqueous solution. *Z Lebensm Unters Forsch*, 180(5), 402–4.
- Tønnesen, H. H., Karlsen, J. und van Henegouwen, G. B., 1986. Studies on curcumin and curcuminoids. VIII. Photochemical stability of curcumin. *Z Lebensm Unters Forsch*, 183(2), 116–22.
- Tønnesen, H. H., Karlsen, J. und Mostad, A., 1982. Structural Studies of Curcuminoids. I. The Crystal Structure of Curcumin. *Acta Chemica Scandinavica*, B 36, 475–79.
- Traber, M. G., Kayden, H. J. und Rindler, M. J., 1987. Polarized secretion of newly synthesized lipoproteins by the Caco-2 human intestinal cell line. *J Lipid Res*, 28(11), 1350–63.
- Trotter, P. J. und Storch, J., 1991. Fatty acid uptake and metabolism in a human intestinal cell line (Caco-2): comparison of apical and basolateral incubation. *J Lipid Res*, 32(2), 293–304.
- Tsuzuki, W., 2007. Absorption properties of micellar lipid metabolites into Caco2 cells. *Lipids*, 42(7), 613–9.
- Tsuzuki, W., Yunoki, R. und Yoshimura, H., 2007. Intestinal epithelial cells absorb gamma-tocotrienol faster than alpha-tocopherol. *Lipids*, 42(2), 163–70.
- Uehara, S., Yasuda, I., Akiyama, K., Morita, H., Takeya, K. und Itokawa, H., 1987. Diarylheptanoids from the rhizomes of *Curcuma xanthorrhiza* and *Alpinia officinarum*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 35(8), 3298–304.
- Unterhalt, B., 1980. Turmeric and its application in mustard. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*, 170(6), 425–8.
- Usta, M., Wortelboer, H. M., Vervoort, J., Boersma, M. G., Rietjens, I. M., van Bladeren, P. J. und Cnubben, N. H., 2007. Human Glutathione S-Transferase-Mediated Glutathione Conjugation of Curcumin and Efflux of These Conjugates in Caco-2 Cells. *Chem Res Toxicol*, 20(12), 1895–1902.
- Valentin-Severin, I., Le Hegarat, L., Lhuguenot, J. C., Le Bon, A. M. und Chagnon, M. C., 2003. Use of HepG2 cell line for direct or indirect mutagens screening: comparative investigation between comet and micronucleus assays. *Mutat Res*, 536(1-2), 79–90.

- Van Erk, M. J., Teuling, E., Staal, Y. C., Huybers, S., Van Bladeren, P. J., Aarts, J. M. und Van Ommen, B., 2004. Time- and dose-dependent effects of curcumin on gene expression in human colon cancer cells. *J Carcinog*, 3(1), 8.
- Vareed, S. K., Kakarala, M., Ruffin, M. T., Crowell, J. A., Normolle, D. P., Djuric, Z. und Brenner, D. E., 2008. Pharmacokinetics of curcumin conjugate metabolites in healthy human subjects. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 17(6), 1411–7.
- Venkateswarlu, S., Ramachandra, M. S. und Subbaraju, G. V., 2005. Synthesis and biological evaluation of polyhydroxycurcuminoids. *Bioorg Med Chem*, 13(23), 6374–80.
- Verma, S. P., Goldin, B. R. und Lin, P. S., 1998. The inhibition of the estrogenic effects of pesticides and environmental chemicals by curcumin and isoflavonoids. *Environ Health Perspect*, 106(12), 807–12.
- Verma, S. P., Salamone, E. und Goldin, B., 1997. Curcumin and genistein, plant natural products, show synergistic inhibitory effects on the growth of human breast cancer MCF-7 cells induced by estrogenic pesticides. *Biochem Biophys Res Commun*, 233(3), 692–6.
- Vistica, D. T., Skehan, P., Scudiero, D., Monks, A., Pittman, A. und Boyd, M. R., 1991. Tetrazolium-based assays for cellular viability: a critical examination of selected parameters affecting formazan production. *Cancer Res*, 51(10), 2515–20.
- Voet, D., Voet, J. G. und Pratt, C. W., 2002. *Lehrbuch der Biochemie*. WILEY-VCH Verlag GmbH, Weinheim, 1. Auflage.
- Wahlstrom, B. und Blennow, G., 1978. A study on the fate of curcumin in the rat. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)*, 43(2), 86–92.
- Wang, L. Q., 2002. Mammalian phytoestrogens: enterodiol and enterolactone. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 777(1-2), 289–309.
- Wang, L. Q., Meselhy, M. R., Li, Y., Qin, G. W. und Hattori, M., 2000. Human intestinal bacteria capable of transforming secoisolariciresinol diglucoside to mammalian lignans, enterodiol and enterolactone. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 48(11), 1606–10.
- Wang, Y. J., Pan, M. H., Cheng, A. L., Lin, L. I., Ho, Y. S., Hsieh, C. Y. und Lin, J. K., 1997. Stability of curcumin in buffer solutions and characterization of its degradation products. *J Pharm Biomed Anal*, 15(12), 1867–76.
- Welshons, W. V., Murphy, C. S., Koch, R., Calaf, G. und Jordan, V. C., 1987. Stimulation of breast cancer cells in vitro by the environmental estrogen enterolactone and the phytoestrogen equol. *Breast Cancer Res Treat*, 10(2), 169–75.
- Wilson, G., Hassan, I. F., Dix, C. J., Williamson, I., Shah, R., Mackay, M. und Artursson, P., 1990. Transport and permeability properties of human Caco-2 cells: an in vitro model of the intestinal epithelial cell barrier. *Journal of Controlled Release*, 11(1-3), 25–40.
- Wolanin, K., Magalska, A., Mosieniak, G., Klinger, R., McKenna, S., Vejda, S., Sikora, E. und Piwocka, K., 2006. Curcumin affects components of the chromosomal passenger complex and induces mitotic catastrophe in apoptosis-resistant bcr-abl-expressing cells. *Mol Cancer Res*, 4(7), 457–69.

- Woo, J. H., Kim, Y. H., Choi, Y. J., Kim, D. G., Lee, K. S., Bae, J. H., Min do, S., Chang, J. S., Jeong, Y. J., Lee, Y. H., Park, J. W. und Kwon, T. K., 2003. Molecular mechanisms of curcumin-induced cytotoxicity: induction of apoptosis through generation of reactive oxygen species, down-regulation of Bcl-XL and IAP, the release of cytochrome c and inhibition of Akt. *Carcinogenesis*, 24(7), 1199–208.
- Wortelboer, H. M., Usta, M., van der Velde, A. E., Boersma, M. G., Spenkelink, B., van Zanden, J. J., Rietjens, I. M., van Bladeren, P. J. und Cnubben, N. H., 2003. Interplay between MRP inhibition and metabolism of MRP inhibitors: the case of curcumin. *Chem Res Toxicol*, 16(12), 1642–51.
- Yamada, H., Miyahara, T., Kozuka, H., Matsushashi, T. und Sasaki, Y. F., 1993. Potentiating effects of organomercuries on clastogen-induced chromosome aberrations in cultured Chinese hamster cells. *Mutat Res*, 290(2), 281–91.
- Yang, F., Lim, G. P., Begum, A. N., Ubeda, O. J., Simmons, M. R., Ambegaokar, S. S., Chen, P. P., Kaye, R., Glabe, C. G., Frautschy, S. A. und Cole, G. M., 2005. Curcumin inhibits formation of amyloid beta oligomers and fibrils, binds plaques, and reduces amyloid in vivo. *J Biol Chem*, 280(7), 5892–901.
- Yee, S., 1997. In vitro permeability across Caco-2 cells (colonic) can predict in vivo (small intestinal) absorption in man—fact or myth. *Pharm Res*, 14(6), 763–6.
- Young, A. M., Audus, K. L., Proudfoot, J. und Yazdanian, M., 2006. Tetrazole compounds: the effect of structure and pH on Caco-2 cell permeability. *J Pharm Sci*, 95(4), 717–25.
- Zhao, Z. und Moghadasian, M., 2008. Chemistry, natural sources, dietary intake and pharmacokinetic properties of ferulic acid: A review. *Food Chemistry*, 109(4), 691–702.
- Zsila, F., Bikadi, Z. und Simonyi, M., 2003a. Molecular basis of the Cotton effects induced by the binding of curcumin to human serum albumin. *Tetrahydron: Asymmetry*, 14, 2433–44.
- Zsila, F., Bikadi, Z. und Simonyi, M., 2003b. Unique, pH-dependent biphasic band shape of the visible circular dichroism of curcumin-serum albumin complex. *Biochem Biophys Res Commun*, 301(3), 776–82.

---

## A Anhang

### A.1 Externe Kalibrierungen

Tabelle 21: Parameter zu den externen Kalibrierungen für verschiedene Curcuminoid-Derivate bei HPLC-UV/Vis-Detektion mittels DAD. Die Kurvenanpassung und Berechnung erfolgte mit Hilfe des Computerprogramms OriginPro 8G durch lineare Regressionsanalyse. A: integrierte Peakfläche; n: injizierte Stoffmenge

Substanz	Wellenlänge in nm	Kalibrierbereich in nmol	Geradengleichung	R <sup>2</sup>
CUR	420	0,0025 - 2,0	$A = 2544 n + 31,985$	0,9991
HHC	280	0,1 - 4,0	$A = 304,04 n - 1,8745$	0,9995
BDMC	420	0,01 - 0,4	$A = 2473,3 n - 7,7956$	0,9987
iso-CUR	420	0,025 - 0,75	$A = 2860,6 n + 1,5635$	0,9999

Tabelle 22: Parameter zu den externen Kalibrierungen für verschiedene Fettsäuren und Cholesterol per GC-Analyse mittels FID-Detektion. A: integrierte Peakfläche; n: injizierte Stoffmenge

Substanz	Kalibrierbereich in mg/ml	Geradengleichung	R <sup>2</sup>
C 16:0	0,0067 - 0,1	$A = 5 \times 10^6 n - 22303$	0,9791
C 18:0	0,0067 - 0,1	$A = 5 \times 10^6 n - 20593$	0,9802
C 18:1	0,0067 - 0,1	$A = 5 \times 10^6 n - 24305$	0,9857
Chol	0,0067 - 0,1	$A = 3 \times 10^6 n - 11410$	0,9893

## A.2 IC<sub>50</sub>-Werte für die Curcuminoide

Tabelle 23: Ergebnisse des MTT-Test nach der Inkubation von Ishikawa und V79 Zellen mit Curcuminoiden: Dargestellt sind die MW  $\pm$  SD von drei unabhängigen Messungen. <sup>a)</sup>: Substanzinkubation in Medium ohne FKS, > 100 (250)  $\mu$ M: kein Rückgang der Viabilität unter 50 %.

Zelllinie	Curcuminoid	Inkubationszeit	IC <sub>50</sub> -Wert
V79	BDMC	24 h	33,2 $\pm$ 3,88 $\mu$ M
	iso-CUR	6 h <sup>a)</sup>	10,8 $\pm$ 3,43 $\mu$ M
	iso-CUR	24 h	9,2 $\pm$ 3,24 $\mu$ M
	HHC	24 h	$\geq$ 250 $\mu$ M
Ishikawa	BDMC	24 h	> 100 $\mu$ M
	iso-CUR	24 h	> 100 $\mu$ M
	HHC	24 h	> 250 $\mu$ M

## A.3 Bindungsspektren von CUR und in Puffer

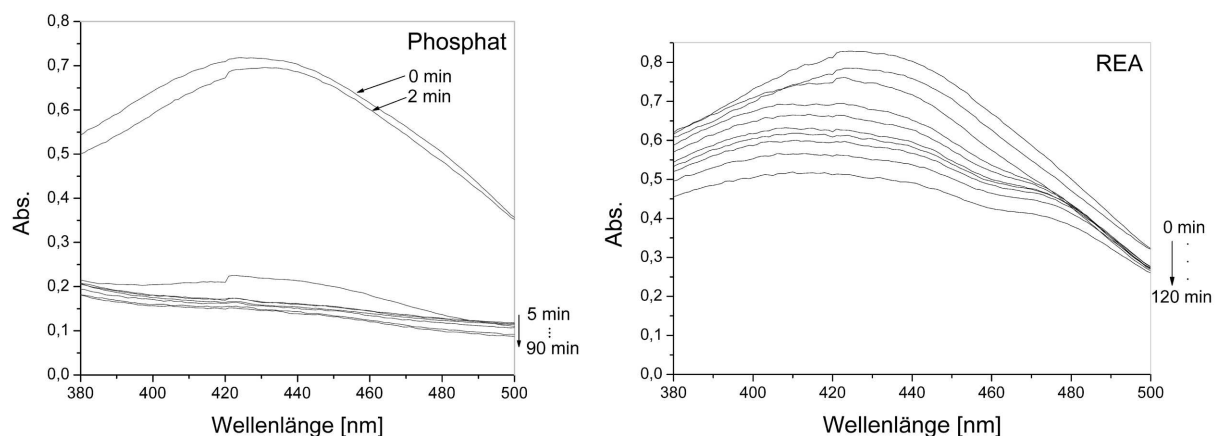


Abbildung 44: UV/Vis-Spektren von 30  $\mu$ M CUR (0 bis 120 min) in Kalium-Phosphat-Puffer (links) und REA-Puffer (rechts) zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach CUR-Zugabe.

## A.4 Bindungsspektren von CUR mit verschiedenen Proteinen

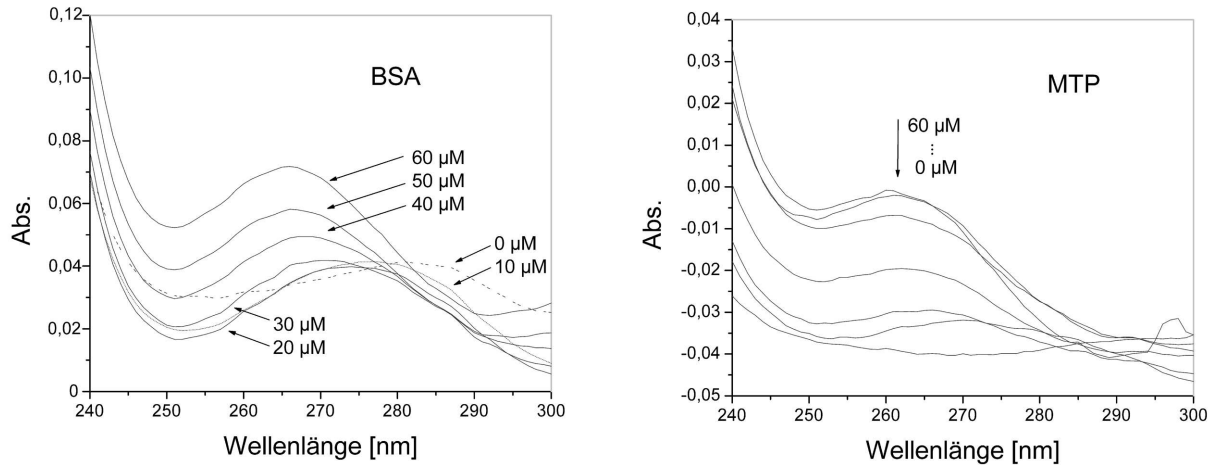


Abbildung 45: Bindungsspektren von CUR (0 bis 60  $\mu\text{M}$ ) an BSA (links) und MTP (rechts) (1 mg/ml).

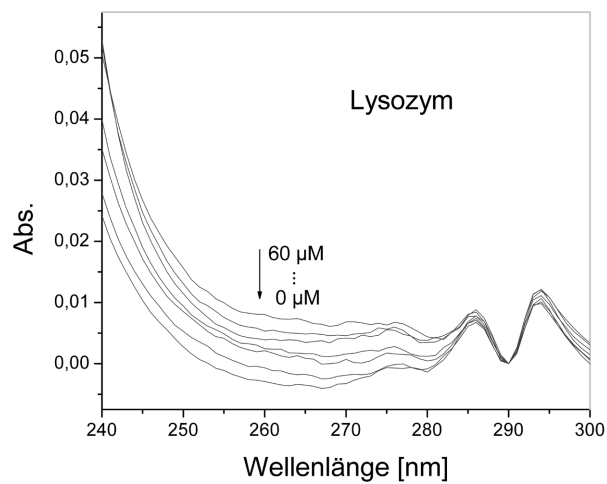


Abbildung 46: Bindungsspektum von CUR (0 bis 60  $\mu\text{M}$ ) an Lysozym (1 mg/ml).

## A.5 Bilanzierungsversuche

Tabelle 24: Bilanzierung der Inkubation mit 50  $\mu\text{M}$  CUR oder HHC in DMEM/F12 in einer 6-Well Platte ohne Inserts für 3 h. Die MW  $\pm$  SW stammen aus zwei unabhängigen Versuchen. Die Absolutmenge ist im Medium auf nmol/4 ml und bei den Zellen auf nmol/Insert bezogen.

Substanz	Absolutmenge		Menge in %	
	bei Inkubation mit CUR	HHC	bei Inkubation mit CUR	HHC
CUR	6,61	-	6,63	-
HHC	1,03	7,08	1,03	8,85
OHC	2,03	7,42	2,04	9,28
CUR-Gluc	n.d.	-	-	-
HHC-Gluc	1,13	0,8	1,13	1,00
OHC-Gluc	0	0	0	0
CUR-Sulfat	0,29	-	0,29	-
HHC-Sulfat	6,29	9,84	6,31	12,30
OHC-Sulfat	5,81	16,75	5,83	20,94
CUR im Zellysat	0,15	-	0,15	-
HHC im Zellysat	0,05	0,06	0,05	0,08
OHC im Zellysat	0,22	0,47	0,22	0,59
$\Sigma = 23,68$			$\Sigma = 53,04$	



Tabelle 25: Bilanzierung der Inkubation mit 50  $\mu\text{M}$  iso-CUR in HBSS in einer 6-Well Platte ohne Inserts für 3 h. Dargestellt sind die Ergebnisse aus einem Versuch. Der prozentuale Anteil bezieht sich auf den 0 h-Wert.

Substanz	Absolutmenge	Menge in %
iso-CUR	13,79	13,19
iso-HHC	1,48	1,42
iso-OHC	0,73	0,70
iso-CUR-Gluc	1,07	1,02
iso-HHC-Gluc	0,36	0,34
iso-OHC-Gluc	0,04	0,04
iso-CUR-Sulfat	0	0
iso-HHC-Sulfat	0	0
iso-OHC-Sulfat	0	0
iso-CUR im Zellysat	2,42	2,31
iso-HHC im Zellysat	0,29	0,28
iso-OHC im Zellysat	0,17	0,16
		$\Sigma = 19,46$

Tabelle 26: Bilanzierung der Inkubation mit 50  $\mu\text{M}$  BDMC in HBSS in einer 6-Well Platte ohne Inserts für 3 h. Dargestellt sind die MW  $\pm$  SW aus zwei unabhängigen Versuchen. Der prozentuale Anteil bezieht sich auf den 0 h-Wert.

Substanz	Absolutmenge	Menge in %
BDMC	3,49 $\pm$ 2,87	3,61 $\pm$ 2,91
HHBDMC	8,44 $\pm$ 0,23	8,81 $\pm$ 0,02
OHBDMC	5,04 $\pm$ 0,15	5,26 $\pm$ 0,29
BDMC-Gluc	0,21 $\pm$ 0,06	0,22 $\pm$ 0,06
HHBDMC-Gluc	1,05 $\pm$ 0,13	1,09 $\pm$ 0,17
OHBDMC-Gluc	0	0
BDMC-Sulfat	0,09 $\pm$ 0,12	0,09 $\pm$ 0,12
HHBDMC-Sulfat	9,84 $\pm$ 5,23	10,35 $\pm$ 5,72
OHBDMC-Sulfat	3,39 $\pm$ 0,48	3,55 $\pm$ 0,59
BDMC im Zellysat	0,11 $\pm$ 0,08	0,11 $\pm$ 0,08
HHBDMC im Zellysat	0,09 $\pm$ 0,11	0,09 $\pm$ 0,11
OHBDMC im Zellysat	0,20 $\pm$ 0,03	0,21 $\pm$ 0,03
		$\Sigma = 33,39$

## A.6 Versuche zur Reduktion im Kulturmedium

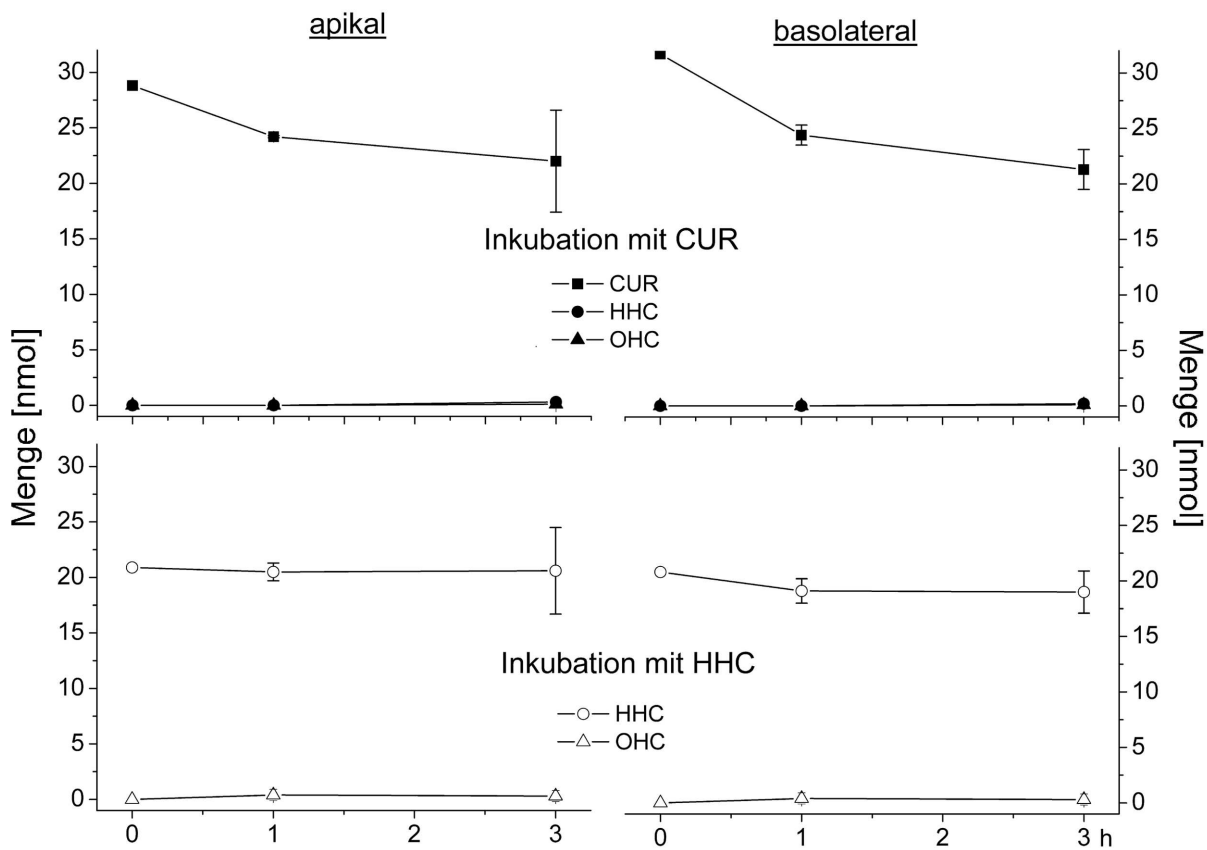


Abbildung 47: Überprüfung der Reduktion von 50  $\mu\text{M}$  CUR oder HHC in nach 24 h Kultivierung im Millicell<sup>®</sup> System abgenommenem DMEM/F12 im zellfreien System. Dargestellt sind die MW  $\pm$  SD aus vier unabhängigen Versuchen.

### A.7 Basolaterale Inkubation von CUR und HHC

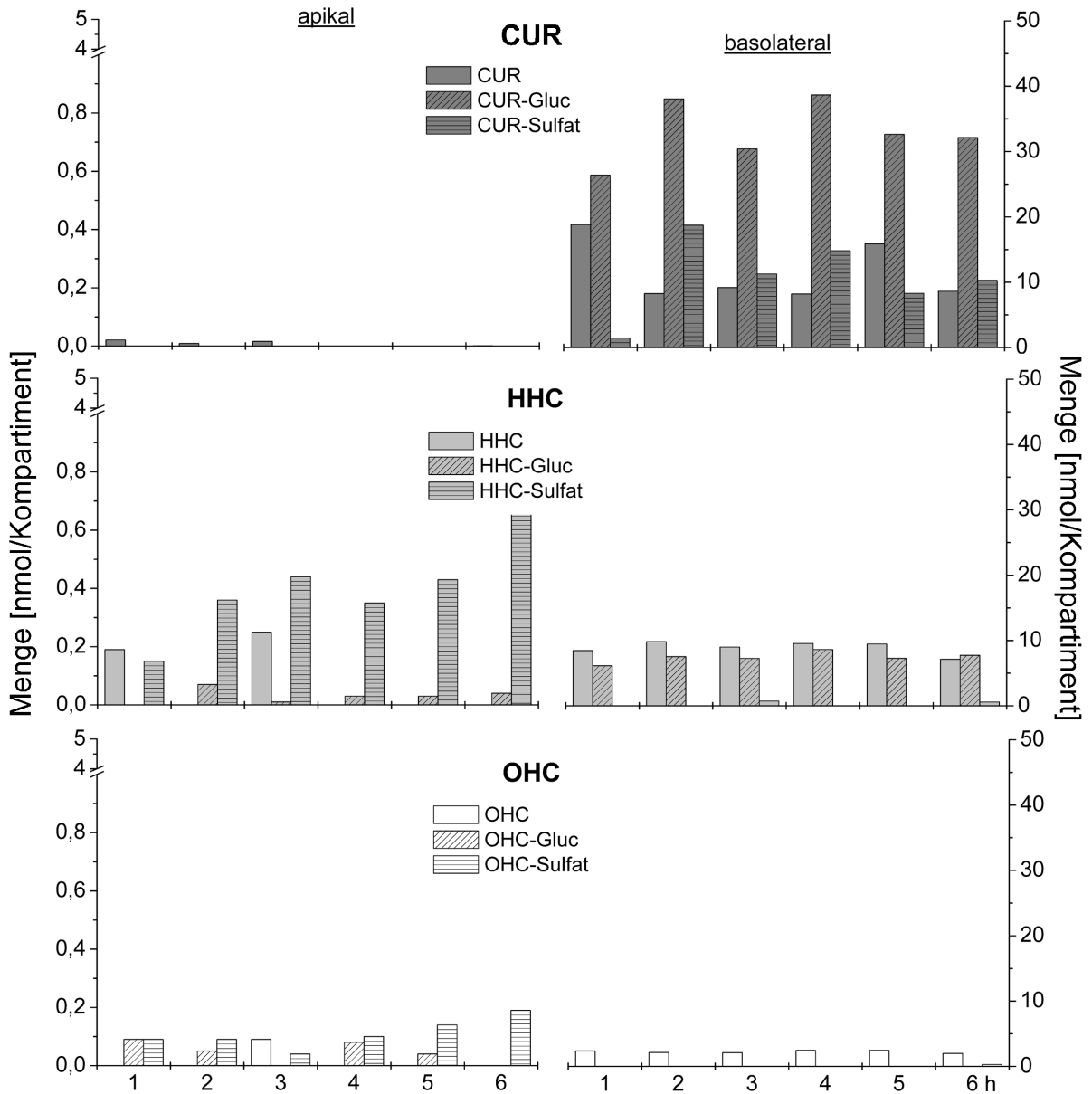


Abbildung 48: Zeitverlauf der Metabolisierung nach Inkubation mit 50  $\mu\text{M}$  CUR in HBSS vom basolateralen Kompartiment bis zu 6 h. Dargestellt sind die Werte aus einer Einfachbestimmung.

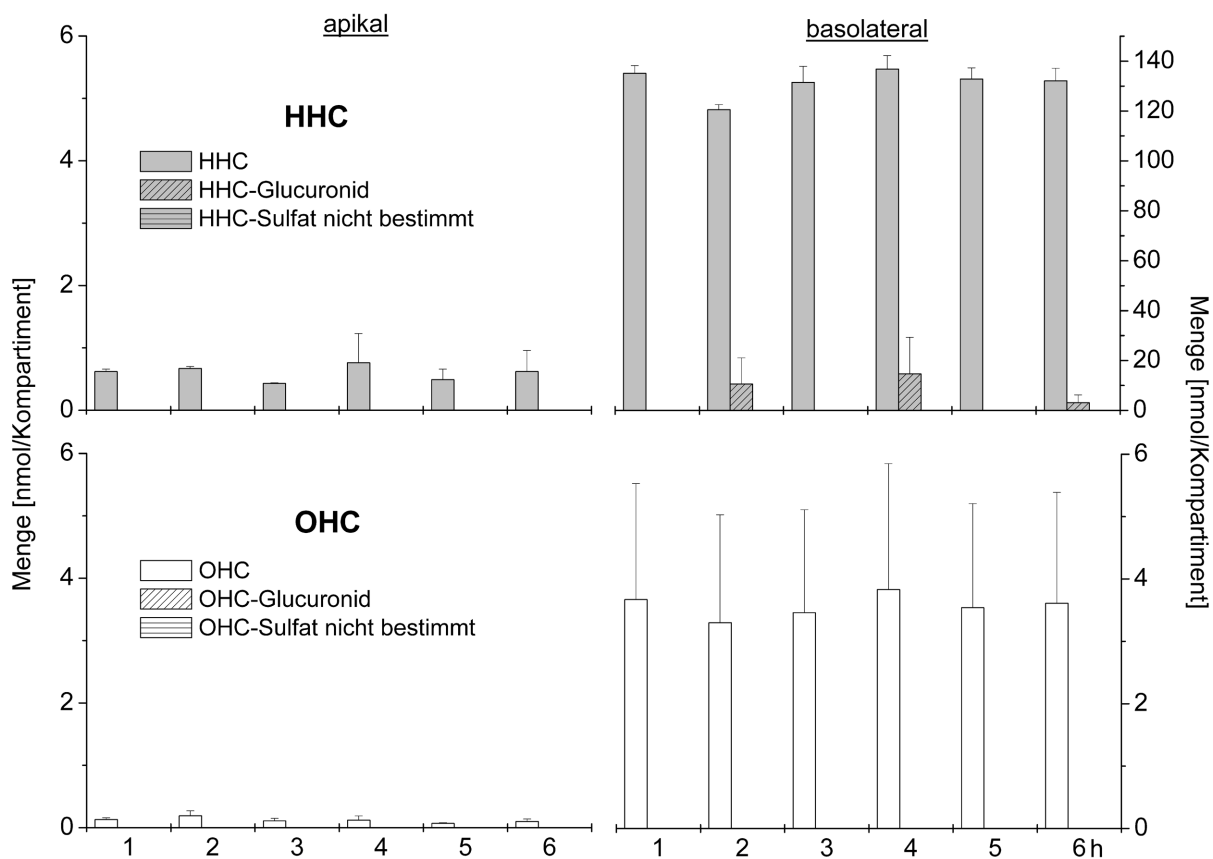


Abbildung 49: Zeitverlauf der Metabolisierung und Abgabe der Metaboliten an das jeweilige Kompartiment im Caco-2 Millicell<sup>®</sup> System nach Inkubation mit 50  $\mu$ M HHC in HBSS vom basolateralen Kompartiment bis zu 6 h. Dargestellt sind die Werte aus einer Doppelbestimmung mit MW  $\pm$  SW, die Sulfate wurden nicht bestimmt.

**A.8  $P_{app}$ -Werte von BDMC**

Tabelle 27:  $P_{app}$ -Werte von BDMC und BDMC mit Metaboliten. Die Werte beziehen sich auf die Resorption von apikal nach basolateral und stammen aus einem Versuch.

Zeitpunkt [h]	$P_{app}$ [ $\cdot 10^{-6}$ cm/s]	
	BDMC	BDMC + Metabolite
1	0,10	1,27
2	0,04	1,01
3	0,02	0,66
4	0,01	0,78
5	0,01	0,65
6	0,01	0,40

## **B Publikationen und Poster**

### **Publikationen in Fachzeitschriften**

Dempe, J. S., Scheerle, R. K., Pfeiffer, E., Metzler, M. Metabolismus und Resorption von Curcumin im Caco-2 Millicell<sup>®</sup> System. Erscheint in Lebensmittelchemie.

Dempe, J. S., Scheerle, R. K., Pfeiffer, E., Metzler, M. Metabolism and absorption of curcumin in the Caco-2 Millicell<sup>®</sup> system. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 379 (Suppl. 1), 71.

Dempe, J. S., Pfeiffer, E., Grimm, A. S., Metzler, M., 2008. Metabolism of curcumin and induction of mitotic catastrophe in human cancer cells. Mol Nutr Food Res 52(9), 1074-81.

Dempe, J. S., Pfeiffer, E., Metzler, M., 2008. Curcumin induces mitotic breakdown in various human cancer cells. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 377 (Suppl. 1), 77.

Dempe, J. S., Pfeiffer, E., Metzler, M., 2008. Metabolismus von Curcumin in humanen HepG2- und HT29-Zellen. Lebensmittelchemie, 62(4), 98.

Dempe, J. S., Pfeiffer, E., Metzler, M., 2007. Accumulation of curcumin in membranous structures of human Ishikawa endometrial cancer cells. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 375 (Suppl. 1), 80.

Kratschmann, J. S., Pfeiffer, E., Metzler, M., 2007. Der Einfluss von Curcumin auf die Zellmembranen von humanen Ishikawa-Endometriumskarzinom-Zellen. Lebensmittelchemie, 61(2), 41.

Kratschmann, J. S., Pfeiffer, E., Metzler, M., 2006. Effects of curcuminoids on the cell cycle in human ishikawa endometrial cancer cells. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 372 (Suppl. 1), 109.

---

## Beiträge auf Kongressen und Fachtagungen

Dempe, J. S., Scheerle, R. K., Pfeiffer, E., Metzler, M. Metabolism and absorption of curcumin in the Caco-2 Millicell<sup>®</sup> system. 50. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie, Mainz, 10. - 12. März 2009.

Dempe, J. S., Pfeiffer, E., Metzler, M. Cellular distribution and effects of curcumin in human cancer cell lines. 45. Congress of the European Societies of Toxicology, Rhodos, Griechenland, 5. - 8. Oktober 2008.

Dempe, J. S., Scheerle, R. K., Pfeiffer, E., Metzler, M. Metabolismus und Resorption von Curcumin im Caco-2 Millicell<sup>®</sup> System. Deutscher Lebensmittelchemikertag der Lebensmittelchemischen Gesellschaft, Kaiserslautern, 8. - 10. September 2008. Abstract-Band, S. 242.

Dempe, J. S., Pfeiffer, E., Metzler, M. Cellular distribution and effects of curcumin in human cancer cell lines. BW ToxNet Meeting, Tübingen, 23. Juli 2008. Abstract-Band S. 8.

Dempe, J. S., Pfeiffer, E., Metzler, M. Curcumin induces mitotic breakdown in various human cancer cells. 49. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie, Mainz, 11. - 13. März 2008. Programmheft S. 103.

Dempe, J. S., Pfeiffer, E., Metzler, M. Accumulation of curcumin in membranous structures of human Ishikawa endometrial and HT29 colonadenom cancer cells. 6. Annual International Conference on Frontiers in Cancer Prevention, Philadelphia, USA, 5. - 8. Dezember 2007.

Dempe, J. S., Pfeiffer, E., Metzler, M. Metabolismus von Curcumin in humanen HepG2- und HT29-Zellen. Deutscher Lebensmittelchemikertag der Lebensmittelchemischen Gesellschaft, Nürnberg-Erlangen, 10. - 12. September 2007. Abstract-Band, S. 186.

Dempe, J. S., Pfeiffer, E., Metzler, M. Accumulation of curcumin in membranous structures of human Ishikawa endometrial cancer cells. BW ToxNet Meeting, Karlsruhe, 10. Juli 2007. Abstract-Band S. 31.

Dempe, J. S., Pfeiffer, E., Metzler, M. Accumulation of curcumin in membranous structures of human Ishikawa endometrial cancer cells. 48. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie, Mainz, 13. - 15. März 2007. Programmheft S. 114.

Kratschmann, J. S., Pfeiffer, E., Metzler, M. Der Einfluss von Curcumin auf die Zellmembranen von humanen Ishikawa-Endometriumskarzinom-Zellen. Deutscher Lebensmittelchemikertag der Lebensmittelchemischen Gesellschaft, Dresden, 18. - 20. September 2006. Abstract-Band, S. 274.

Kratschmann, J. S., Pfeiffer, E., Metzler, M. Effects of curcuminoids on the cell cycle in human ishikawa endometrial cancer cells. 47. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie, Mainz, 4. - 6. April 2006. Programmheft, S. 111.

Kratschmann, J. S., Pfeiffer, E., Metzler, M. Der Einfluss auf den Zellzyklus von humanen Ishikawa-Endometriumskarzinom-Zellen. Regionaltagung der Lebensmittelchemischen Gesellschaft Südwest, Karlsruhe, 6. - 7. März 2006.



---

## C Danksagung

Ich möchte mich bei allen bedanken, die auf verschiedenste Art und Weise zum Entstehen dieser Arbeit beigetragen haben:

- Herrn Prof. Dr. Dr. M. Metzler für die Bereitstellung des interessanten Themas, die freundliche Aufnahme in seinen Arbeitskreis und die hilfreiche Unterstützung während der gesamten Arbeit.
- Erika Pfeiffer für ihre Geduld, Anregungen, Unterstützung, ihr Vertrauen in mich und meine Arbeit, sowie die Zeit, die sie sich in allen Phasen dieser Arbeit für mich nahm.
- Silke Gerstner für die tolle Zeit bei den Toxkursen, die beste Bürokommunikation und die Hilfe durch das Korrekturlesen dieser Arbeit.
- Britta Burkhardt und Andreas Hildebrand für den Spaß im Büro und im Labor und die vielen Ü-Ei-Wetten.
- Anne Grimm, Romy Scheerle, Benita Schmidt und Anne-Grit Adam für die zuverlässigen Experimente im Rahmen ihrer Diplomarbeiten.
- Iris Mackiw für ihre Hilfe in der Zellkultur.
- Doris Honig für ihren unermüdlichen Einsatz bei allen Fragestellungen im Zusammenhang mit der GC.
- allen Mitarbeitern des Instituts, besonders Silke Gerstner, Simon Göckler, Georg Damm, Jörg Wagner, Simone Höhle, Markus Zettner, Britta Burkhardt und Andreas Hildebrand, für das gute Arbeitsklima und ihre Hilfsbereitschaft während der gesamten Dauer meiner Arbeit.

Besonderer Dank gilt:

- meinem Mann Sebastian für seine Hilfe, Aufmunterungen, Geduld und Verständnis in jeder Phase dieser Arbeit.
- meinen Eltern für die Motivation, den Zuspruch und jegliche Unterstützung während meines gesamten Studiums und dieser Arbeit in allen Lebenslagen und für das Korrekturlesen dieser Arbeit.
- meinen Schwiegereltern für die Unterstützung und die Beantwortung medizinischer Fragen aller Art.



## Lebenslauf

Name	Julia Simone Dempe geb. Kratschmann
Geburtsdatum	21. April 1981
Geburtsort	Berlin
Staatsangehörigkeit	deutsch

## Schulbildung

08/1987 - 03/1989	Berken-Grundschule Holzgerlingen
04/1989 - 07/1991	GHS Heumaden, Calw
09/1991 - 06/2000	Maria von Linden-Gymnasium, Calw-Stammheim Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

## Hochschulbildung

10/2000 - 08/2005	Studium der Lebensmittelchemie an der Universität Karlsruhe (TH)
10/2002	Erster Abschnitt der Staatsprüfung für Lebensmittelchemiker
12/2004 - 08/2005	Diplomarbeit im Arbeitskreis von Prof. Dr. Dr. M. Metzler am Institut für Angewandte Biowissenschaften, Abteilungen für Lebensmittelchemie und Toxikologie, der Universität Karlsruhe (TH) in Zusammenarbeit mit der Firma Merck KGaA Darmstadt Thema: Estrogene Wirkung und Stabilität von Curcuminoiden in humanen Endometrium-Zellen (Ishikawa-Zellen) Abschluss: Diplom-Lebensmittelchemikerin / Zweiter Abschnitt der Staatsprüfung für Lebensmittelchemiker

## Promotion

seit 10/2005

Wissenschaftliche Angestellte an der Universität Karlsruhe (TH), Fakultät für Chemie und Biowissenschaften, Institut für Angewandte Biowissenschaften, Abteilungen für Lebensmittelchemie und Toxikologie, Arbeitskreis Prof. Dr. Dr. M. Metzler