

Projektskizze

1. Projektbezeichnung

Zum Einfluß von pflanzlichen Polyphenolen und Phytopharmaka auf die CYP1A1-abhängige Aktivierung von Präkanzerogenen

2. Kurztitel

CYP1A1-Inhibierung

3. Zusammenfassung

Da Cytochrom P450 1A1 (CYP1A1) eine Schlüsselrolle bei der Bioaktivierung von Präkanzerogenen wie Benzo[a]pyren (B[a]P) und anderen Umweltgiften spielt, besteht eine Strategie der Prävention von Krebserkrankungen in der Inhibierung von CYP1A1. Epidemiologischen Studien belegen eine inverse Korrelation zwischen einer verstärkten Einnahme von Nahrungsmitteln pflanzlichen Ursprungs und Krebsrisiko. Das Projekt sieht Untersuchungen zum Einfluß von natürlich vorkommenden Polyphenolen und Phytopharmaka auf den B[a]P-Metabolismus durch CYP1A1 in einem rekonstituierten In-vitro-System bestehend aus gereinigtem humanem CYP1A1, gereinigter humaner P450-Reductase und Dilaurylphosphatidylcholin vor. Schwerpunkt ist die Untersuchung des terminalen Schrittes der Aktivierung, der Epoxidation von 7,8-Dihydrodiol-B[a]P zu den Dirolepoxiden, den ultimativ kanzerogenen Metaboliten.

4. Stand der Forschung und eigene Vorarbeiten

Aufgrund von epidemiologischen Studien korreliert eine verstärkte Einnahme von Nahrungsmitteln pflanzlichen Ursprungs (Früchten, Gemüse, Tee, Wein u.ä.) mit einem verringerten Krebsrisiko was international zu einer verstärkten Suche nach spezifischen Stoffen in Pflanzen mit dem Ziel einer Krebsvorsorge geführt hat (Chemoprävention). Besonders Vertreter einer Familie ubiquitär in Pflanzen vorkommender Substanzen, der Flavonoide u.a. Polyphenole, werden in diesem Zusammenhang diskutiert und gegenwärtig international zunehmend untersucht. Einen guten Überblick über den Stand der Forschung bezüglich der antikanzerogenen, aber auch antioxidativen, antiviralen, entzündungshemmenden und antithrombotischen Wirkungen von Flavonoiden gibt ein kürzlich erschienener Review (Middleton et al., 2000). Für bestimmte Krebserkrankungen ist eine inverse Korrelation zwischen der Einnahme bestimmter Flavonoide bzw. flavonoid-haltiger Nahrung und dem Risiko an Krebs zu erkranken nahezu gesichert (z.B.: Marchand et al., 2000; Lu et al., 2001; Deschner et al., 1991). Ein möglicher Mechanismus dieses Schutzeffektes besteht in der bekannten Eigenschaft einiger Flavonoide Enzyme zu inhibieren, die in die chemische Kanzerogenese involviert sind.

Eine Schlüsselrolle bei der Bioaktivierung von chemischen Präkanzerogenen wie Benzo[a]pyren (B[a]P) und anderer Umweltgifte spielt bekanntlich Cytochrom P450 1A1 (CYP1A1). Der erste Schritt der Aktivierung besteht in der Bildung von 7,8-epoxy-B[a]P, gefolgt von seiner Hydrolyse zu B[a]P-*trans*-7,8-dihydrodiol (7,8-dihydrodiol-B[a]P). In einer weiteren durch CYP1A1 katalysierten Reaktion wird aus 7,8-diol-B[a]P das ultimativ genotoxische, kanzerogene Diolepoxid, (\pm)-B[a]P-*r*-7,*t*-8-dihydrodiol-*t*-9,10-epoxid, gebildet. Eine verringerte Bioaktivierung von Präkanzerogenen durch Inhibierung von CYP1A1 könnte den beobachteten Schutzeffekt der Flavonoide erklären.

Bisher konnte der Einfluß von Flavonoiden auf die Aktivierung präkanzerogener Substanzen durch humanes CYP1A1 nur unvollständig charakterisiert werden. Hinweise auf eine inhibitorische Wirkung bestimmter Flavonoide auf P450-Aktivitäten wurden entweder unter Verwendung von Lebermikrosomen oder auf der Basis von Reaktionen mit Modellsubstraten (wie z.B. Ethoxyresorufin (EROD)) durchgeführt. So konnte gezeigt werden, daß bestimmte Flavonoide die EROD in Lebermikrosomen stark inhibieren (mit IC₅₀-Werten im unteren µM-Bereich) (Siess et al., 1995; Obermeier et al., 1995) und daß der B[a]P-Metabolismus in menschlichen Lebermikrosomen beeinflusst wird (Buening et al., 1981).

Untersuchungen zur Rolle des Polymorphismus bei der Inhibierung von CYP1A1-Aktivitäten sind uns nicht bekannt. Ein Grund dafür ist sicher die bisher geringe Verfügbarkeit der humanen CYP1A1-Varianten. Menschliches CYP1A1 existiert, soweit bisher bekannt, neben dem am häufigsten vorkommenden Wildtyp (CYP1A1*1), in sieben allelen Varianten (vgl. Web URL: <http://www.imm.ki.se/CYPalleles>). Zwei der Varianten sind durch SNPs charakterisiert, die mit einem Austausch von Aminosäuren verbunden sind (CYP1A1*2: CYP1A1-Ile462Val und CYP1A1*4: CYP1A1-Thr461Asn. Letztere wurde von uns kürzlich entdeckt (Cascorbi et al., 1996). In der Folge konnten wir nachweisen, daß beide Mutationen veränderte Enzymaktivitäten zur Folge haben (Schwarz et al., 2000 und 2001). In diesem Zusammenhang ist es interessant, daß eine neuere epidemiologische Studie über einen besonders großen Schutzeffekt bestimmter Flavonoide bei Krebstypen, die im Zusammenhang mit dem Auftreten der Variante CYP1A1*2 steht, berichtet, und damit auf einen Einfluß des CYP1A1-Genotyps hindeutet (Marchand et al., 2000).

Das geplante Projekt soll dazu dienen für mehrere typische Flavonoide ihre inhibitorische Wirkung auf den B[a]P- und 7,8-dihydrodiol-B[a]P- Metabolismus durch humanes CYP1A1 zu charakterisieren. Darüber hinaus soll für ausgewählte Flavonoide mit großer inhibitorischer Potenz die Rolle des Polymorphismus des CYP1A1-Gens untersucht werden. Die Untersuchungen sollen erstmalig mit gereinigtem menschlichem CYP1A1 in einem rekonstituierten System und durch Analyse der physiologisch relevanten Epoxidation von 7,8-diol-B[a]P zu den ultimativ kanzerogenen Produkten, den Diolepoxiden, durchgeführt werden.

Eigene Vorarbeiten während der letzten 5 Jahre innerhalb des DFG-Projektes Ro1287/1-3 führten zur erfolgreichen Etablierung eines effektiven Expressions- und Reinigungssystems für humanes CYP1A1 und seine allelen Varianten (und P450-Reductase) auf der Grundlage des Baculovirus/ Insektenzellen-Systems, das eine gute Basis für die geplanten enzymatischen Analysen darstellt. Folgende Veröffentlichungen mit Bezug zum geplanten Vorhaben belegen die Expertise des Antragstellers:

- D. Schwarz, P. Kisselev, I. Cascorbi, W.-H. Schunck, I. Roots
Differential metabolism of benzo[a]pyrene and benzo[a]pyrene-7,8-dihydrodiol by human CYP1A1 variants. Carcinogenesis 22, 453-459 (2001).
- P. Kisselev, D. Schwarz, K.-L. Platt, W.-H. Schunck, I. Roots
Epoxidation of benzo[a]pyrene-7,8-dihydrodiol by human CYP1A1 in reconstituted membranes: Effects of charge and nonbilayer phase propensity of the membrane. Eur. J. Biochem. 269, 1799-1805 (2002).
- A. Chernogolov, J. Behlke, W.-H. Schunck, I. Roots, D. Schwarz
Human CYP1A1 allelic variants: Baculovirus expression and purification, hydrodynamic, spectral and catalytical properties and their potency in the formation of all-trans-retinoic acid Prot. Expr. Purif. (2002), accepted, in press.

Folgende weitere für das beantragte Projekt relevante Vorarbeiten wurden abgeschlossen:

- Optimierung der Probenvorbereitung und HPLC-Methodik zur Untersuchung der CYP1A1-abhängigen Epoxidation von 7,8-Diol-B[a]P
- Optimierung der Probenvorbereitung und Fluoreszenznachweis zu AHH-Tests (Untersuchung der B[a]P-Hydroxylierung)

5.1 Bisherige bzw. beantragte Förderung des Projektes bzw. von themenverwandten Teilprojekten im Rahmen der haushaltsfinanzierten Forschungsförderung

<i>Projektkurztitel</i>	<i>Projektleiter</i>	<i>Gesamtfördersumme</i>	<i>Förderzeitraum</i>
CYP1A1-Hydroxylierungen	Dr. Schwarz, Dieter	28.000,- DM	1999-2000
Cerivastatin-Metabolismus	Dr. Schwarz, Dieter	23.000,- DM	2001
CYP2C8- <i>In vitro</i> -System	Dr. Schwarz, Dieter	22.500,- DM	2002
CYP1A1-Inhibierung	Dr. Schwarz, Dieter	11.000,- €	2003

5.2 Drittmittelperspektive

Angestrebte Drittmittelförderung: DFG
Vorgesehener Termin Drittmittelantragstellung: 10/2003

6. Ziele

Erstes Ziel des Vorhabens ist die Etablierung eines In-vitro-Systems zur Beurteilung der inhibitorischen Kapazität von chemischen Substanzen bei der metabolischen Aktivierung von Präkanzerogenen durch menschliches CYP1A1, dem Schlüsselenzym bei der Kanzerogenese. Bisherige Untersuchungen unter Verwendung von Lebermikrosomen und/oder Modellreaktionen

mit (unphysiologischen) Substraten wie Alkoxyresorufinen (Methoxy- (MROD), Ethoxyresorufin (EROD) u.ä.) ließen nur eine indirekte und eingeschränkte Beurteilung zu. Im vorliegenden Projekt sollen erstmalig in einem rekonstituierten System, bestehend aus den gereinigten humanen Enzymen (CYP1A1, P450-Reductase) und Lipid (DLPC), Analysen der physiologisch relevanten Entgiftungs- und Giftungsreaktionen durchgeführt werden. Als Substrate werden typische Vertreter der polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe wie B[a]P und 7,8-diol-B[a]P eingesetzt und deren Hydroxylierung zu 3-OH-B[a]P (Entgiftungsweg) und Epoxidation zu den B[a]P-Diol-epoxiden (Aktivierung), den ultimativ kanzerogenen Produkten, analysiert.

Das geplante Projekt soll dazu dienen für mehrere typische Flavonoide und andere Polyphenole ihre inhibitorische Wirkung auf den B[a]P- und 7,8-dihydrodiol-B[a]P- Metabolismus durch humanes CYP1A1 zu charakterisieren. Um die inhibitorische Kapazität quantitativ beurteilen zu können, werden für alle Substanzen IC_{50} -Werte bestimmt. Für diejenigen Substanzen mit der höchsten Hemmwirkung werden darüberhinaus Inhibitorikinetik-Studien zur Bestimmung des Mechanismus der Inhibierung durchgeführt (Typ der Hemmung, K_i -Werte).

Schließlich soll für ausgewählte Substanzen mit großer inhibitorischer Potenz die Rolle des Polymorphismus des CYP1A1-Gens analysiert werden, da es Hinweise aufgrund epidemiologischer Studien gibt, die eine inverse Korrelation zwischen der Einnahme von Flavonoiden und Lungenkrebsrisiko gefunden haben.

7. Arbeitsprogramm

Ständig: (Permanente) Insektenzellkultur zur Expression und Reinigung der CYP1A1-Varianten und humaner P450-Reductase.

Auf der Basis eines rekonstituierten Systems bestehend aus den gereinigten Enzymen (CYP1A1 und NADPH Cytochrom P450-Reductase) und Lipid soll der Einfluß von mehreren strukturell unterschiedlichen Flavonoiden (Flavanole, Flavone, Catechine, Stilbene, Caretonoide) auf den Umsatz von B[a]P und 7,8-dihydrodiol- B[a]P durch die allelen Varianten des humanen CYP1A1 analysiert werden. Dazu wird ein bereits etablierter in vitro-Assay (AHH-Test) mit Fluoreszenznachweis (für B[a]P - Hydroxylierung) bzw. UV-VIS-Detektion (für 7,8-dihydrodiol-B[a]P - Epoxidation) eingesetzt (Schwarz et al. 2001). Neben der generellen quantitativen Charakterisierung der inhibitorischen Wirkung durch IC_{50} -Werte sollen für ausgewählte Flavonoide mit großer Inhibitor-Potenz der Mechanismus der Inhibierung durch enzymkinetische Untersuchungen, Untersuchung des Einflusses der Inhibitoren auf die P450-Reductase-Aktivität und Präinkubationsexperimente charakterisiert werden.

1. Bestimmung der katalytischen Aktivitäten von humanem CYP1A1 in Abhängigkeit von der Flavonoid-Konzentration für typische Flavonoide:

- A. Hydroxylierung von B[a]P (AHH-Test) durch Wildtyp-CYP1A1 (Bestimmung der IC₅₀-Werten)
 -Flavonole: Kaempferol, Myricetin (Quercetin und Rutin: siehe unter Anstrich 4)
 -Flavanone: Naringenin, Naringin
 -Resveratrol, (+)-Epigallocatechin-Gallat, (+)-Catechin, Lycopin, β -Carotin
 -St. John's Wort und seine Hauptbestandteile (Hypericin, Hyperforin, Pseudohypericin, Quercetin, Rutin)
- B. Epoxidation von 7,8-dihydrodiol-B[a]P durch Wildtyp-CYP1A1 (Bestimmung von IC₅₀-Werten)
 -Flavonole: Kaempferol, Myricetin (Quercetin und Rutin: siehe unter Anstrich 4)
 -Flavanone: Naringenin, Naringin
 -Resveratrol, (+)-Epigallocatechin-Gallat, (+)-Catechin, Lycopin, β -Carotin
 -St. John's Wort und seine Hauptbestandteile (Hypericin, Hyperforin, Pseudohypericin, Quercetin, Rutin)

2. Für ausgewählte Flavonoide (mit der größten inhibitorischen Wirkung):

- A. Bestimmung des Mechanismus der Inhibierung (kompetitiv, nicht-kompetitiv, unkompetitiv, oder Misch-Typ) durch Messung der Inhibierungskinetik (Messung der Enzymkinetik bei vier verschiedenen Inhibitorkonzentrationen) für die Epoxidation von 7,8-Diol-B[a]P
- B. Bestimmung der kinetischen Konstanten durch Analyse der Lineweaver-Burk-Plots

3. Rolle des Polymorphismus des CYP1A1-Gens:

Einfluß von Flavonoiden auf die katalytische Aktivität der Varianten m2 und m4 von humanem CYP1A1:

In Abhängigkeit von den unter 1. und 2. erhaltenen Ergebnissen für ausgewählte Inhibitoren:

- A. Epoxidation von 7,8-dihydrodiol-B[a]P durch CYP1A1.2 (CYP1A1-Ile462Val)
 B. Epoxidation von 7,8-dihydrodiol-B[a]P durch CYP1A1.4 (CYP1A1-Thr461Asn)

8. Voraussetzungen für die Durchführung des Vorhabens

Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern

- Dr. W.-H. Schunck / Prof. Welfle (Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin, Berlin-Buch (MDC)): In Zusammenarbeit mit diesen Gruppen erfolgen enzymatische Untersuchungen mit radioaktiv-markierten Substraten, HPLC- und Fluoreszenzmessungen (bereits Mitnutzer in den letzten Jahren)
- Prof. Dr. P. Kisselev (Institut für Bioorganische Chemie, Akademie der Wissenschaften, Minsk, Weißrußland): Mitarbeit bei Proteinreinigung und enzymatischen Analysen.

Apparative Voraussetzungen und investive Mittel

Am Institut für Klinische Pharmakologie (Charité) und am MDC (AG Dr. Schunck) sind alle Geräte für Insektenzellzucht, zur Proteinreinigung, für die Durchführung der enzymatischen Assays einschließlich der Analytik zur Auswertung vorhanden. Investive Mittel fallen lediglich für HPLC-Säulen und neue verbesserte Spinnerflächen zur Insektenzellkultur an.

9. Förderdauer Regelförderzeit: 2003 (ein Jahr)

10. Beantragte Mittel und Begründung

Gesamt: 11.000,- € (davon: 9.000,- für konsumtive und 2.000,- € für investive Mittel).

Die Begründung für die einzelnen Positionen Verbrauchsmaterial, Reisekosten und sonstige Kosten geht aus der Spezifikation im Abschnitt III.7 des Deckblattes hervor.

HPLC-Trennsäulen: Spezielle HPLC-Trennsäulen, sind zu beschaffen, da eine Mehrfachnutzung zur Trennung verschiedenartiger Produkte bei dem von uns geplanten Einsatz sehr verschiedenartiger Inhibitoren nicht möglich ist (vgl. investive Mittel).

Spinnerkultur-Flaschen: Mit dem Einsatz der neuen Corning ProCulture Spinner Flasks ist eine wesentliche Steigerung der Arbeitseffektivität verbunden (höhere Zelldichten, größere Kulturvolumina und Expressionsraten) (vgl. investive Mittel).

Literatur:

Buening, M.K., Chang, R.L., Huang, M.-T., Fortner, J.G., Wood, A.W., and Conney, A.H. (1981) Activation and inhibition of benzo[a]pyrene and aflatoxin B1 metabolism in human liver microsomes by naturally occurring flavonoids. *Cancer Res.* 41, 67-72.

Cascorbi, I., Brockmöller, J., and Roots, I. (1996) A C4887A polymorphism in exon 7 of human CYP1A1: Population frequency, mutation linkages, and impact on lung cancer susceptibility. *Cancer Res.* 56, 4965-4969.

Deschner, E.E., Ruperto, J., Wong, G., and Newmark, H.L. (1991) Quercetin and rutin as inhibitors of azoxymethanol-induced colonic neoplasia. *Carcinogenesis* 7, 1193-1196.

Lu, J., Ho, C., Ghai, G., and Chen, K.Y. (2001) Resveratrol analog, 3,4,5,4'-terahydrostilbene, differentially induces pro-apoptotic p53/Bax gene expression and inhibits the growth of transformed cells but not their normal counterparts. *Carcinogenesis* 22 (2), 321-328.

Marchand, L.L., Murphy, S.P., Hankin, J.H., Wilkens, L.R., Kolonel, L.N. (2000) Intake of flavonoids and lung cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 92, 154-160.

Middleton, E., Kandaswami, C., Theoharides, T.C. (2000) The effects of plant flavonoids on mammalian cells: Implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol. Reviews* 52, 673-751.

Obermeier, M.T., White, R.E., Yang, C.S. (1995) Effects of bioflavonoids on hepatic P450 activities. *Xenobiotica* 25, 575-584.

Schwarz, D., Kisselev, P., Schunck, W.-H., Chernogolov, A., Boidol, W., Cascorbi, I., Roots, I. (2000) Allelic variants of human cytochrome P4501A1 (CYP1A1): Effect of T461N and I462V substitutions on steroid hydroxylase specificities. *Pharmacogenetics* 10, 519-530.

Schwarz, D., Kisselev, P., Cascorbi, I., Schunck, W.-H., und Roots, I. (2001) Differential metabolism of benzo[a]pyrene and benzo[a]pyrene-7,8-dihydrodiol by human CYP1A1 variants. *Carcinogenesis* 22 (3), 453-459.

Siess, M.H., Leclerc, J., Canivenc-Lavier, M.C., Rat, P., and Suschetet, M. (1995) Heterogeneous effects of natural flavonoids on monooxygenase activities in human and rat liver microsomes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 130, 73-78.

Anlagen

-Gentechnische Sicherheit:

Die Genehmigung für die Durchführung gentechnischer Arbeiten (S1) liegt vor:

Zustimmungsbescheid: V C 121 - 728/95.

-Kopie einer eigenen Publikation

CHERNOGOLOV, J. BEHLKE, W.-H. SCHUNCK, I. ROOTS, D. SCHWARZ
Human CYP1A1 allelic variants: Baculovirus expression and purification, hydrodynamic, spectral and catalytical properties and their potency in the formation of all-trans-retinoic acid
Prot. Expr. Purif. (2002), accepted, in press.