

Elke Heiß

Dr. sc. hum.

## **Molekulare Grundlagen der anti-inflammatorischen Wirkung von Sulforaphan und Etablierung eines Brustdrüsen-Organkulturmodells**

Geboren am 08. 05. 1973 in Regensburg

Reifeprüfung am 8. Juli 1992 in Regensburg

Studiengang der Fachrichtung Biochemie vom WS 1992 bis WS 1998 an der Universität Regensburg und an der University of Kent at Canterbury

Vordiplom: 23. September 1994 an der Universität Regensburg

Diplom: 12. Februar 1998 an der Universität Regensburg

Promotionsfach: Onkologie (DKFZ)

Doktorvater: Prof. Dr. rer. nat. H. Bartsch

Im Rahmen dieser Arbeit wurden sowohl die molekularen Grundlagen der anti-inflammatorischen Wirkung von Sulforaphan analysiert, als auch das *mouse mammary gland organ culture* (MMOC) Modell als neues Screening-System für potentiell brustkrebspräventive Substanzen in unserem Labor etabliert.

Die Resultate der Arbeiten, die sich mit dem entzündungshemmenden Mechanismus von Sulforaphan beschäftigten, lassen sich folgendermaßen skizzieren:

1. Sulforaphan wurde bisher vor allem wegen der Modulation des Fremdstoffmetabolismus als chemopräventiv eingestuft. Unser Interesse galt nun seinen anti-inflammatorischen Eigenschaften. Es konnte zum ersten Mal gezeigt werden, daß Sulforaphan in LPS-stimulierten Raw 264.7 Makrophagen die Expression der proinflammatorischen Proteine iNOS, Cox-2 und die Sekretion von TNF- $\alpha$  unterdrückt.
2. Sulforaphan übt seinen Einfluß bereits vor der Transkription aus. Es inhibiert selektiv den Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B. Dabei konnten der Abbau des Inhibitors von NF- $\kappa$ B, der nukleäre Transport und post-translationale Phosphorylierungen von NF- $\kappa$ B Untereinheiten als Angriffspunkt von Sulforaphan ausgeschlossen werden.
3. Vielmehr verhindert Sulforaphan, daß NF- $\kappa$ B im Kern an seine DNA-Konsensussequenz bindet. Dieser Vorgang ist stark redoxabhängig, und Sulforaphan scheint mit eben dieser

Redoxsensitivität von NF- $\kappa$ B zu interferieren. Als Isothiocyanat kann es mit frei zugänglichen SH-Gruppen ein Dithiocarbamat ausbilden. Es konnten Hinweise auf eine direkte Modifikation von Cysteinresten in NF- $\kappa$ B Untereinheiten gefunden werden.

4. Sulforaphan sorgt zudem in den ersten Stunden nach LPS-Stimulus für eine Depletion von freiem GSH, die zu einem oxidativen *shift* im zellulären Redoxpotential führt, was bekanntermaßen die DNA-Bindung hemmt. Die Reduktion der freien GSH-Menge ist aber nicht der alleinige molekulare Mechanismus, der der Hemmung der NF- $\kappa$ B Aktivität durch Sulforaphan zugrunde liegt. Vermutlich interagiert Sulforaphan zusätzlich mit einem weiteren Redoxfaktor, der für die NF- $\kappa$ B-Funktion wichtig ist, wie zum Beispiel Thioredoxin oder Ref-1.

Das zweite Hauptziel der Arbeit bestand darin, das *mouse mammary gland organ culture* (MMOC) Modell in unserem Labor zu etablieren. Während der vorliegenden Arbeit wurden

1. aus über 1000 Verbindungen insgesamt 27 ausgewählt, die in vorgeschalteten *in vitro* Versuchen gute chemopräventive Eigenschaften bewiesen, darunter Vertreter der Lunularsäurederivate, Curcumin- und Distyrylketonderivate, Chalone und Phloroglucinole. Diese wurden dann im Hinblick auf eine potentielle Prävention von Brustkrebs im MMOC auf ihre Fähigkeit getestet, DMBA-induzierte Präneoplasien in der murinen Brustdrüse zu unterdrücken. 11 von ihnen, vor allem Mitglieder der Chalcon- und Lunularsäuregruppe, erwiesen sich als potente Hemmer der NLAL-Bildung. Besonders gut schnitten im Vergleich Verbindungen ab, die in der Lage sind, die Expression von Phase 2 Enzymen zu steigern, Phase 1 Enzyme und Cyclooxygenasen zu hemmen oder Differenzierung einzuleiten.
2. Als aktivste unserer Verbindungen in der Hemmung präneoplastischer Läsionen konnte Xanthohumol identifiziert werden, ein prenyliertes Chalcon aus Hopfen, mit einer halbmaximalen inhibitorischen Konzentration von 12 nM.
3. Eine detailliertere Untersuchung ergab, daß Grundlage dafür hauptsächlich die anti-östrogenen und anti-proliferativen Effekte von Xanthohumol sind. Xanthohumol ist ein potenter Hemmer der  $\beta$ -Estradiol-induzierten Induktion von alkalischer Phosphatase in der Ishikawa-Endometriumkrebszelllinie. Xanthohumol inhibiert die DNA-Synthese im zellfreien und zellulären System und kann einen Zellzyklusarrest in der S-Phase bewirken. Es konnte ferner gezeigt werden, daß Xanthohumol in höheren Konzentrationen Apoptose in der MDA-MB 435 Brustkrebszelllinie induziert.