

**“THE ISOFLAVONES BIOCHANIN A AND PRUNETIN ARE POTENT MODULATORS OF
INTESTINAL EPITHELIAL BARRIER FUNCTION VIA DISTINCT SIGNAL TRANSDUCTION PATHWAYS
STUDIES IN CULTURED CACO-2 CELLS”**

Dipl. troph. Stefanie Piegholdt

1. Berichterstatter: Prof. Dr. G. Rimbach

Mit der täglichen Ernährung wird eine Vielzahl sekundärer Pflanzenstoffen aufgenommen, die mit dem Epithel des Darms in Kontakt treten und in seiner Funktion beeinflussen können. Dennoch gibt es bisher kaum systematische Studien zum Einfluss sekundärer Pflanzenstoffe auf die Integrität des Darmepithels. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, bioaktive Pflanzenstoffe zu identifizieren, die sowohl unter normalen als auch unter Entzündungsbedingungen, wie sie bei entzündlichen Darmerkrankungen auftreten, die intestinale Barriere stärken.

Der Darm ist permanent einer Vielzahl exogener und endogener Stressfaktoren ausgesetzt, z.B. bakteriellen und viralen Toxinen, reaktiven Sauerstoff- und Stickoxidspezies und Xenobiotica. Die Enterozytenschicht des Darms stellt dabei die erste Verteidigungslinie gegen diese Einflussfaktoren dar, wobei ihre Durchlässigkeit durch unterschiedliche Strukturen wie sogenannte Tight Junctions und Adherence Junctions zwischen benachbarten Zellen bestimmt wird. Zur Untersuchung der intestinalen Barrierenfunktionen wurde die humane Darmzelllinie CaCo-2 genutzt, da diese Zellen in Kultur rasch differenzieren und einen sehr dichten Zellrasen ausbilden. Durch die elektrodenbasierte Messung des transepithelialen elektrischen Widerstands war es möglich, den Einfluss potentiell aktiver Pflanzenmetabolite auf die Barrierfunktion standardisiert zu quantifizieren. Darüber hinaus wurden mechanistische Untersuchungen im CaCo-2-Zellkulturmodell durchgeführt, um die zugrundeliegenden Signalwege der Regulation der Barrierefunktion zu ermitteln.

Insgesamt wurden 29 verschiedene sekundäre Pflanzenstoffe auf ihre barriemodulierende Eigenschaft untersucht, von denen die drei Isoflavonoide Genistein, Biochanin A und Prunetin am potentesten waren. Biochanin A und Prunetin, die im Vergleich zu Genistein eine zusätzliche Methylierung an einer Hydroxylgruppe aufweisen, wurden dabei erstmals als potentielle Modulatoren der intestinalen Barriere identifiziert. Alle drei Substanzen vermindern die Tyrosin-Phosphorylierung des Tight-Junction-Proteins ZO-1 deutlich, wodurch die Bindungsintensität von ZO-1 zu anderen Tight- und Adherence-Junction-Proteinen erhöht und die Barriere dichte verbessert wird. Biochanin A, Prunetin und Genistein sind gleichsam wirksame kompetitive Inhibitoren zellulärer Tyrosinkinase, was mittels bioinformatischer Berechnungen und Docking-Studien am Modell der EGF-Rezeptor-Tyrosinkinase bestätigt werden konnte. Die Hemmung der Tyrosinkinaseaktivitäten scheint dabei von zentraler Bedeutung für den Einfluss von Biochanin A, Prunetin und Genistein auf die ZO-1-Phosphorylierung.

Zur Klärung weiterer beteiligter Signalwege wurden die Threoninphosphorylierung, mRNA- und Proteinspiegel ausgewählter Tight- und Adherence-Junction-Proteine sowie die Konzentration der pro-inflammatorischen microRNA-212 bestimmt, wobei weder Genistein noch Biochanin A oder Prunetin signifikante Effekte ausübten. Dagegen wurden die Aktivierung von ERK, die Metalloproteinase-Aktivität und die TNF α -abhängige NF κ B-Transaktivierung signifikant durch Biochanin A und Prunetin reduziert. Die Hemmung des ERK-Signalweges könnte möglicherweise entscheidend in der barriesteigernden Wirkung von Biochanin A und Prunetin sein, da der synthetische ERK-Inhibitor PD98059 eine vergleichbare Verbesserung der Barriere dichte zeigte.

Insgesamt konnten durch die vorliegende Arbeit Biochanin A und Prunetin als neue Substanzen zur Förderung der Darmbarriere identifiziert werden, wobei eine Verbesserung der Bindungsintensitäten zwischen den Tight- und Adherence-Junction-Proteinen durch die verminderte Phosphorylierung des Brückenproteins ZO-1 hauptverantwortlich scheint. Darüber hinaus verhindern Biochanin A und Prunetin einen TNF α -abhängigen Verlust der Barrierefunktion, begründet in der konstitutionellen Hemmung der ERK-Aktivität und daraus folgend einer Deaktivierung von NF κ B. Die Aufnahme von Biochanin A und Prunetin über Lebensmittel wie Soja, Mangofrucht, Kudzu und Yambohnen könnte die intestinale Barrierefunktion *in vivo* verbessern. Ein damit verbundener verbesserter Schutz gegen Pathogene und Fremdstoffe würde möglicherweise Risiko und Ausmaß akuter Darmentzündungen verringern.