



Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

**Fakulteten för veterinärmedicin
och husdjursvetenskap**
Institutionen för biomedicin och
veterinär folkhälsovetenskap

Effekten av sulforafan på genuttrycket av breast cancer resistance protein i MCF-7 celler

Karolina Sjöberg

*Uppsala
2015*

Examensarbete 30 hp inom veterinärprogrammet

*ISSN 1652-8697
Examensarbete 2015:36*

Effekten av sulforafan på genuttrycket av breast cancer resistance protein i MCF-7 celler

The effect of sulforaphane on the gene expression of breast cancer resistance protein in MCF-7 cells

Karolina Sjöberg

Handledare: Johan Lundqvist, institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

Biträdande handledare: Agneta Oskarsson och Yagmur Yagdiran, institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

Examinator: Jonas Tallkvist, institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

Examensarbete i veterinärmedicin

Omfattning: 30 hp

Nivå och fördjupning: Avancerad nivå, A2E

Kurskod: EX0751

Utgivningsort: Uppsala

Utgivningsår: 2015

Delnummer i serie: Examensarbete 2015:36

ISSN: 1652-8697

Elektronisk publicering: <http://stud.epsilon.slu.se>

Nyckelord: sulforafan, breast cancer resistance protein, BCRP, nuclear factor E2-related factor-2, Nrf2, MCF-7, bröstcancer celler, mjölk

Key words: sulforaphane, breast cancer resistance protein, BCRP, nuclear factor E2-related factor-2, Nrf2, MCF-7, breast cancer cells, milk

Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

SAMMANFATTNING

Sulforafan är en isothiocyant-förening som finns i stora mängder i olika kålväxter. Sulforafan har setts ha en kemopreventiv inverkan bland annat genom att inducera fas II-enzymerna styrda av transkriptionsfaktorn nuclear factor E2-related factor-2 (Nrf2). Nrf2 är mycket viktig i cellers skydd mot oxidativ- och elektrofil stress och inducerar uttrycket av många olika gener, bland annat olika transportproteiner. Breast cancer resistance protein (BCRP) är en av transportörerna som tros induceras av Nrf2. BCRP finns i stora mängder i lakterande juvurvävnad men också i många andra vävnader där den transporterar läkemedel ut ur cellerna. Om sulforafan kan inducera genuttrycket av BCRP skulle det kunna innebära att halten av läkemedelsrester ökar i mjölken hos kor och människor som äter en kost rik på sulforafan. Det är därför viktigt att veta om så är fallet eftersom det kan påverka livsmedelssäkerheten för konsumenter och spädbarn. Med anledning av detta har jag tittat på om sulforafan kan uppreglera genuttrycket av BCRP och om det kan aktivera Nrf2 i bröstcancer cellinjen MCF-7. Ingen uppreglering av genuttrycket av BCRP kunde ses med realtids-PCR och vid 20 µM sulforafan kunde till och med en sänkning av uttrycket ses. Med en Nrf2-luciferasreporter-assay sågs däremot en ökning av Nrf2 aktiviteten med ökande sulforafan koncentration. Dock har studien haft problem med toxicitet av sulforafan som inte detekterades i MTS-assay och inga säkra slutsatser kan därför dras om påverkan av sulforafan på Nrf2 och BCRP. Sammanfattningsvis har jag inte kunnat bevisa att sulforafan inducerar BCRP eller aktiverar Nrf2 men har inte heller bevisat motsatsen.

SUMMARY

Sulforaphane is an isothiocyante compound that is abundant in cruciferous vegetables. Sulforaphane has been shown to have a chemo preventive effect by, among other things, inducing phase II enzymes governed by the transcription factor nuclear factor E2-related factor-2 (Nrf2). Nrf2 plays an important part in the protection of cells from oxidative and electrophilic stress and induce many different genes including various transport proteins. Breast cancer resistance protein (BCRP) is one of the transporters believed to be induced by Nrf2. BCRP is present in great quantity in lactating mammary glands but also exists in various other tissues where it transports drugs out of the cells. If sulforaphane is able to induce gene expression of BCRP that might lead to an increase of drug residues in milk from cows and humans consuming a diet rich in sulforaphane and thus be a safety hazard for consumers of milk and for infants. With that in mind I have made a study where I investigated if sulforaphane can induce gene expression of BCRP and if it can activate Nrf2 in the breast cancer cell line MCF-7. I was not able to detect any induction of BCRP expression with real-time PCR and at a concentration of 20 µM of sulforaphane a reduction in expression was seen. With a Nrf2-luciferase reporter assay I was, on the other hand, able to detect an increase in Nrf2 activity with rising sulforaphane concentrations. Alas the study had problems with toxicity of sulforaphane that was not detected by MTS-assay. Because of this no safe conclusions about the effect of sulforaphane on the Nrf2 mediated expression of BCRP can be drawn. To summarise I have not been able to show that sulforaphane induces BCRP or that it activates Nrf2 but have not proven the opposite either.

INNEHÅLL

Inledning.....	1
Syfte	1
Hypoteser	1
Litteraturoversikt.....	1
Breast cancer resistance protein	1
Nuclear factor E2-related factor-2.....	3
Sulforafan	3
Ökar sulforafan uttrycket av BCRP via Nrf2?	4
Material och metoder	4
Celler och cellkultur	4
Kemikalier.....	5
Cellviabilitets assay.....	5
Realtids-PCR.....	5
RNA-isolering och kvantifiering.....	5
Realtids-PCR med omvänd transkription.....	6
Luciferasreporter-assay	6
Agarogel-elektrofores	6
Statistisk analys	7
Resultat.....	7
Cellviabilitet.....	7
Realtids-PCR.....	8
Luciferasreporter-assay	8
Agarogel-elektrofores	10
Diskussion	10
Tack.....	13
Referenser.....	13

INLEDNING

Mjölks och mjölkprodukter är viktiga näringskällor för både unga och vuxna. Detta är sant framför allt i utvecklingsländer där mjölken utgör ett viktigt tillskott till en ensidig, växtbaserad kost, men också i utvecklade länder som en del av en balanserad diet (Muehlhoff *et al.*, 2013). Kontrollen av mjölkproduktionen är därför viktig eftersom mjölk är en potentiell källa för läkemedelsrester, kemikalier och andra kontaminanter. Läkemedelsbehandling av kor utgör en risk för oönskade läkemedelsrester i mjölken (Schrickx & Fink-Gremmels, 2008). Antibiotikarester i mjölk kan till exempel ge allergiska reaktioner hos överkänsliga och störa mag-tarmfloran hos konsumenter (Livsmedelsverket, 2013). Det kan dessutom ändra mjölkens mikroflora och på så sätt störa omvandlingen av mjölk till andra mejeriprodukter som ost och yoghurt.

Vissa läkemedel utsöndras aktivt i mjölken med hjälp av olika transportörer. En av dessa transportörer är breast cancer resistance protein (BCRP) (Jonker *et al.*, 2005). BCRP är ett transportprotein som finns i flera vävnader. Bland annat uttrycks det i det apikala membranet i juverceller och kan där koncentrera olika läkemedel till mjölken. Under laktation och sen dräktighet är BCRP kraftigt uppregelat vilket tyder på någon form av endogen transportfunktion i grunden.

Uttrycket av BCRP kan påverkas av olika ämnen. Till exempel har man nyligen sett att sulforafan, en isothiocyant förening som finns i stor mängd i bland annat broccoli (Zhang *et al.*, 1992), kan uppreglera BCRP i blodhjärnbarriären hos råttor via en nuclear factor E2-related factor-2 (Nrf2) medierad mekanism (Wang *et al.*, 2014). Om detta stämmer även för juverceller skulle det kunna få till följd att kor som äter en diet rik på sulforafan får en ökad sekretion av läkemedel till mjölken. Detta i sin tur skulle kunna leda till en ökad risk för läkemedelsrester i mjölk och utgöra en möjlig fara för konsumenter. Om samma mekanism finns i humana mammarceller skulle det också kunna ge en ökad exponering av spädbarn för olika kemikalier.

Syfte

Syftet med försöket var att se om genuttrycket av BCRP uppregleras av sulforafan *in vitro* i humana bröstcancer celler, MCF-7, och om sulforafan aktiverar transkriptionsfaktorn Nrf2 i samma celler.

Hypoteser

- Sulforafan uppreglerar genuttrycket av BCRP i MCF-7 celler.
- Sulforafan aktiverar Nrf2 i MCF-7 celler.

LITTERATURÖVERSIKT

Breast cancer resistance protein

BCRP är ett ATP-beroende transportprotein som hör till familjen ATP-bindande cassette (ABC) transportörer (Doyle *et al.*, 1998). BCRP kodas av genen ABCG2 och uttrycks i flera

vävnader i kroppen. Bland annat uttrycks det i stor mängd i placenta och i lakterande juverceller (Allikmets *et al.*, 1998; Doyle *et al.*, 1998; Jonker *et al.*, 2005; Pulido *et al.*, 2006) men finns också till exempel i epitelceller i tunn och grovtarm, i hepatocyter, i njurtubuli, endotelceller samt stamceller (van Herwaarden & Schinkel, 2006; Schrickx & Fink-Gremmels, 2008; Mealey, 2011). BCRP fungerar som en effluxpump och har på så sätt en viktig funktion för kinetiken av läkemedel och andra xenobiotika då den påverkar absorption, distribution och elimination av sina substrat samtidigt som den tros vara en del av cellers skydd mot oxidativ stress (Merino *et al.*, 2005a; Merino *et al.*, 2006; Mealey, 2011). BCRP orsakar också läkemedelsresistens hos cancerceller och skyddar känsliga vävnader från xenobiotika i till exempel blodhjärnbarriären och placenta (Doyle *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 2014). I juverceller är BCRP lokaliserat till det apikala membranet och medierar sekretion och koncentration av xenobiotika till mjölken (Jonker *et al.*, 2005). Då BCRP är kraftigt uppregelrat under laktation och sen dräktighet har den troligtvis även en funktion som transportör av endogena substanser till mjölk. Vilka dessa substanser är vet dock ännu inte.

BCRP har många substrat, däribland substanser som ingår i många veterinärmedicinska läkemedel till exempel olika fluorokinoloner och benzimidazoler (Merino *et al.*, 2005b; Merino *et al.*, 2006; Pulido *et al.*, 2006) men också kemoterapeutika som nitrofurantoin, mitoxantron, daunomycin och doxorubicin (Doyle *et al.*, 1998; Merino *et al.*, 2005a; Pérez *et al.*, 2009).

Uttrycket och funktionen av BCRP kan påverkas av flera saker bland annat kön, ålder, art och genetisk variation samt närvaro av hämmande eller stimulerande substanser (van Herwaarden & Schinkel, 2006; Schrickx & Fink-Gremmels, 2008). Bland substanser som har setts ha en hämmande inverkan på BCRP-medierad transport av läkemedel i försök finns bland annat benzimidazolen fenbendazol-sulfoxid och ivermectinen doramectin samt olika flavonoider (Merino *et al.*, 2005b; Pulido *et al.*, 2006; González-Lobato *et al.*, 2014). Miljögiftet dioxin och svampmedlet prochloraz har däremot setts inducera transkription av funktionellt BCRP (Halwachs *et al.*, 2012). I en studie nyligen har också isothiocyanat-föreningen sulforafan setts kunna uppregla uttrycket av BCRP i blodhjärnbarriären hos råttor (Wang *et al.*, 2014).

Transkriptionen av BCRP har i flera försök visats regleras av transkriptionsfaktorn nuclear factor E2-related factor-2 (Nrf2). I en studie från 2010 sågs Nrf2 öka uttrycket av human BCRP på transkriptionsnivå i lung- och prostatacancer celler via antioxidant response element (ARE)-sekvensen i ABCG2s promotor (Singh *et al.*, 2010). I en annan studie, med HepG2 celler, såg man också att Nrf2 är viktig för det inducerade uttrycket av BCRP (Adachi *et al.*, 2007). I en studie av Wang *et al.* (2014) såg man att sulforafan utövar sin effekt på BCRP via Nrf2. Halwachs *et al.* (2012) visade däremot i sin studie att dioxin och prochloraz inducerar bovin BCRP via transkriptionsfaktorn aryl hydrocarbon receptor (AhR) i primära bovina juverepitelceller. AhR har i sin tur visats kunna inducera transkription av Nrf2 (Lo & Matthews, 2013) men resultaten från Halwachs *et al.*, visar att AhR även kan fungera direkt i bovin ABCG2s promotor-region. Också Ebert *et al.* (2007) såg i sin studie att BCRP induceras av AhR och la även fram bevis för att Nrf2 inte kan inducera BCRP.

Nuclear factor E2-related factor-2

Nrf2 är en basic leucine zipper transkriptionsfaktor som uttrycks i alla vävnader i kroppen (Moi *et al.*, 1994). Nrf2 är en viktig del i cellernas skydd mot oxidativ och elektrofil stress (Magesh *et al.*, 2012). I normalfallet är Nrf2 inaktiverat i cytoplasman genom sin bindning till Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1) (Dhakshinamoorthy & Jaiswal, 2001). Keap 1 hindrar Nrf2 att ta sig in i cellkärnan och medierar ubiquitinerings av Nrf2 med påföljande nedbrytning i proteasomer (McMahon *et al.*, 2003; Kobayashi *et al.*, 2006). Även inne i cellkärnan hämmas Nrf2 av proteiner som bland annat hindrar den att binda till sitt mål i DNA (Magesh *et al.*, 2012). När cellen utsätts för stress undkommer Nrf2 ubiquitinerings medierad av Keap1 och nivåerna av fritt Nrf2 i cellkärnan ökar (Dhakshinamoorthy & Jaiswal, 2001; McMahon *et al.*, 2003; Kobayashi *et al.*, 2006). Exakt hur detta går till är oklart och många teorier finns. En del forskare anser att Nrf2 lossar från Keap1 och förflyttas till cellkärnan (Dhakshinamoorthy & Jaiswal, 2001) medan andra menar att den Keap1-medierade ubiquitinerings av Nrf2 hämmas utan dissociation och att de ökade nivåerna av Nrf2 i cellkärnan utgörs av nyproducerat Nrf2 (Kobayashi *et al.*, 2006; Baird *et al.*, 2013). Flera teorier om hur Nrf2 och Keap1 medierar oxidativ stress finns också. Ett antal studier har visat att specifika cystinrester hos Keap1 är avgörande för dess funktion och man tror att kovalent modifiering av thiol-grupper av olika Nrf2-inducerare fungerar som sensor för oxidativ stress (Kobayashi *et al.*, 2006; Baird *et al.*, 2013).

När Nrf2 väl är i cellkärnan bildar den heterodimerer med andra proteiner och initierar transkription av olika gener genom att binda till antioxidant response element (ARE)-sekvensen i genernas promotor (Magesh *et al.*, 2012). Detta leder till ökad transkription av generna och därmed ökad produktion av proteiner som skyddar cellen mot oxidativ stress till exempel enzymer som NAD(P)H:quinone oxidoreductase (NQO-1) och heme oxygenase 1 (HMOX1) och transportproteiner som multidrug resistance protein och BCRP (Thimmulappa *et al.* 2002; Adachi *et al.*, 2007; Singh *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2014).

Transkriptionen av Nrf2 påverkas av olika transkriptionsfaktorer till exempel AhR som har en stimulerande effekt och estrogen receptor α (ER α) som har en hämmande effekt på transkriptionen av Nrf2 (Lo & Matthews, 2013). I närvaro av Keap1 ökar AhR transkriptionen av Nrf2 men inte av Nrf2 styrda gener eftersom Nrf2 är blockerad. Hämmning av Keap1 gav däremot en ökning av Nrf2 styrt genuttryck i närvaro av AhR.

Sulforafan

Isothiocyanat-föreningen 1-isothiocyanato-4-(methylsulfinyl)-butan eller sulforafan är en mycket potent inducerare av fas II enzymer och kan isoleras i stor mängd från bland annat broccoli (Zhang *et al.*, 1992). Isothiocyanat-föreningar är ämnen som innehåller den funktionella gruppen $-N=C=S$ och återfinns naturligt i flera växter i sin prekursorform, glucosinolater (Clarke *et al.*, 2008; Cheung & Kong, 2010). Glucosinolater omvandlas till isothiocyanat-föreningar med hjälp av enzymet myrosinas som finns i växten och i magtarmkanalen hos människor och djur. När växten skadas, till exempel när den tuggas, frigörs myrosinas och glucosinolatet omvandlas till isothiocyanat. Prekursorn till sulforafan är

glucosinolaten glucoraphanin som finns i stor mängd i broccoli, blomkål, vitkål och grönkål (Clarke *et al.*, 2008).

Sulforafan har setts ha en kemopreventiv verkan *in vivo* och *in vitro* genom att hämma både initiering och progression av cancer (Zhang *et al.*, 1994; Clarke *et al.*, 2008; Cheung & Kong, 2010). Sulforafan utövar sin kemopreventiva effekt på flera sätt. I initieringsfasen av tumörutvecklingen hämmar sulforafan fas I enzymer genom att antingen interagera direkt med dem eller genom att påverka deras transkription (Clarke *et al.*, 2008; Cheung & Kong, 2010). Sulforafan inducerar också fas II enzymer så som NQO-1 och glutation s-transferas (GST) (Zhang *et al.*, 1992) genom att interagera med Keap1 och på så sätt störa dess hämning av Nrf2 (Dinkova-Kostova *et al.*, 2002; McMahon *et al.*, 2003). Dinkova-Kostova *et al.* (2002) kunde i sitt försök med murin Keap1 visa att sulforafan interagerar med thiol-grupper i cystinresterna (C) i Keap1 och på så sätt åstadkommer dissociation av Nrf2 från Keap1. Även Hu *et al.* (2011) såg i sitt försök med human Keap1 att sulforafan kan interagera med 22 av de 27 cystinresterna i human Keap1 *in vitro* dock såg man inte att det påverkade Keap1s förmåga att binda till Nrf2. Sulforafan interagerade lättast med C38, C151, C368 samt C489 (Hu *et al.*, 2011) och C151 tros vara viktigast för sulforafans inverkan på keap1 (Baird *et al.*, 2013).

Senare i cancerutvecklingen kan sulforafan hindra utvecklingen av tumörer genom att stoppa cellcykeln och på så sätt hindra proliferation av cancerceller samt inducera apoptos (Clarke *et al.*, 2008; Cheung & Kong, 2010).

Ökar sulforafan uttrycket av BCRP via Nrf2?

Sulforafan har i flera studier setts öka uttrycket av Nrf2 medierade gener som NQO1 och GST genom att öka rekryteringen av Nrf2 till generna (Zhang *et al.*, 1992; Thimmulappa *et al.*, 2002; Lo & Matthews, 2013). Sulforafan interagerar med cystinrester i Keap1 och bidrar på så sätt till ökad Nrf2-aktivitet (Kobayashi *et al.*, 2006; Hu *et al.* 2011; Lo & Matthews, 2013). Man har även sett att Nrf2 i sin tur ökar uttrycket av BCRP (Adachi *et al.*, 2007; Singh *et al.*, 2010). Frågan man då kan ställa sig är: kan sulforafan uppregelera BCRP via Nrf2? I en studie av Ebert *et al.*, från 2007 såg man att sulforafan inte påverkade uttrycket av human BCRP i Caco-2-celler, varken på mRNA eller proteinnivå. Deras resultat visade till och med att BCRP inte tycks induceras av Nrf2 utan av AhR. I en nyare studie från 2014 kunde man däremot se att sulforafan uppreglerade BCRP i blodhjärnbarriären råttor (Wang *et al.*, 2014). Om detta stämmer även för juverceller skulle det kunna påverka utsöndringen av läkemedel och andra xenobiotika i mjölken hos kor och människor som äter en diet rik på kålväxter.

MATERIAL OCH METODER

Celler och cellkultur

Cellerna som användes i försöken var humana bröstcancerceller av linjen MCF-7 (Dr. Anne E Lykkesfeldt, Danish Cancer Society Research Center, Köpenhamn). Cellerna odlades i T75-flaskor och förvarades i inkubator i 37°C och CO₂ 5% med reglerad luftfuktighet. Cellmediet utgjordes av Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient mixture F12 med 10 % fetalt bovint serum, 2 mM L-glutamin, 100 U/ml penicillin/100 µg/ml streptomycin (alla från Gibco

Life Technologies) och 6 ng/ml insulin (BD Biosciences). Cellerna användes i försök i passage 435 till 448.

Kemikalier

Sulforafan, DL-Sulforaphane, löstes i dimethylsulfoxid (DMSO) (båda från Sigma-Aldrich) till en koncentration av 10mM. Utifrån denna stamlösning gjordes spädningar i olika koncentrationer med DMSO som spädningsmedel. Stamlösningen, DMSO till kontroll samt spädningarna förvarades i -20°C när de inte användes. I försöken användes också trypsin, TrypLE™ Express, Trypan Blue Stain 0,4% (båda från Gibco Life Technologies) samt 2-mercaptoethanol (Sigma-Aldrich).

Cellviabilitets assay

För att utvärdera toxiciteten hos sulforafan på MCF-7 cellerna användes en MTS-assay, CellTiter 96 AQueos One Solution kit (Promega). MTS-assay bygger på att en tetrazol (MTS), omvandlas av metaboliskt aktiva celler till ett färgat ämne, formazan. För att avgöra mängden formazan som bildas mäts absorbansen i cellkulturen och resultatet kan ses som proportionellt mot antalet levande celler. Cellerna såddes i 96-hålsplattor med 10 000 celler/brunn. Efter ett dygns inkubation behandlades cellerna med sulforafan i olika koncentrationer eller med 1 alternativt 2 % DMSO som kontroll. Undantaget är den MTS som kördes parallellt med realtids-PCR. Dessa celler inkuberades i 5 dygn innan behandling men är i övrigt hanterade på samma sätt som vid övriga MTS-försök. De behandlade cellerna inkuberades i 24 h och efter det utfördes MTS-assay enligt tillverkarens instruktioner. Absorbansen mättes i en Wallac Victor2 1420 microplate reader (PerkinElmer).

Realtids-PCR

RNA-isolering och kvantifiering

Effekten av sulforafan på genuttrycket av BCRP analyserades med hjälp av realtids-PCR. Celler såddes ut i 6-hålsplattor med 250 000 celler/brunn och inkuberades i fem dygn med 2-2,5 ml medium. Medium byttes efter tre och fem dagar. Efter fem dygns inkubation behandlades cellerna med sulforafanlösning eller DMSO samtidigt som medium byttes. Efter 24h inkubation med behandling togs mediet bort och cellerna sköljdes med medium en gång innan de skördades för RNA-isolering.

För RNA-isolering användes NucleoSpin® RNA II kit med DNase I (BD Biosciences) enligt tillverkarens protokoll. Isolerat RNA kvantifierades med Quant-iT™ RiboGreen® RNA Assay Kit med DNase I (Invitrogen) enligt tillverkarens protokoll. RiboGreen® är ett färgämne som fluorescerar när det binder till nukleinsyror och kan därför användas för att avgöra mängden RNA eller DNA i ett prov. Fluorescensen mättes i en Wallac Victor2 1420 microplate reader (PerkinElmer).

Skördade och lyserade celler förvarades i -80°C fram till RNA-isolering såvida detta inte skedde i samband med att cellerna skördades. Isolerat RNA förvarades i -80°C när det inte användes och på is under försök.

Realtids-PCR med omvänd transkription

Genuttrycket av BCRP i cellerna mättes med realtids-PCR (qPCR) med omvänd transkription. För detta användes QuantiTect One-Tube RT-PCR kit med SYBR-Green (Qiagen) enligt tillverkarens instruktioner men med en reaktionsvolym på 12,5 µl istället för 25 µl. Analysen gjordes i en Rotorgene, RG3000 (Corbett Research). Med hjälp av resultaten från RiboGreen assay normaliserades RNA-mängden i varje prov till 25, 50 eller 75 ng. Antalet reaktioner för varje prov varierade mellan en och tre men var samma för alla prover i en försöksomgång. För programmering av Rotorgene, RG3000 se tabell 1.

Tabell 1. *Programmering av Rotorgene, RG3000*

Steg	Temperatur	Duration
Hold	50°C	30 min
Hold 2	95°C	15 min
Cykler, 40 upprepningar		
Steg 1	94°C	60 sek
Steg 2	55°C	60 sek
Steg 3	68°C	45 sek
Hold 3	68°C	7 min
Melt	50-99°C	30 sek på första steget, 5 sek på resterande steg

Luciferasreporter-assay

För att mäta mängden fritt, aktivt Nrf2 i cellerna transfekterades de med en pGL4 baserad luciferas-plasmid, pGL4.37[luc2P/ARE/Hygro] Vector, E3641 (Promega). Luciferas-plasmiden innehåller en luciferas-gen (reporter) och en Nrf2-styrd promotorsekvens, ARE, vilket gör att luciferas enbart produceras i celler med aktivt Nrf2. MCF-7 celler såddes ut i 96-hålsplattor med 12 000 celler/brunn. Efter cirka två dagar tillsattes 0,1 µg luciferas-plasmid och 0,01µg Renilla-plasmid tillsammans med Opti-MEM Reduced Serum Medium och 0,3 µg Lipofectamine (Gibco Life Technologies) till varje brunn enligt tillverkarens instruktioner för Lipofectamine. Renilla-plasmiden uttrycks i cellerna utan induktion och fungerar som en indikator på hur effektivt cellerna i varje brunn har tagit upp plasmiderna. Man kan på så sätt normalisera värdet mellan brunnarna. Slutvolym i brunnarna var 112 µl. Efter transfektion inkuberades cellerna över natten. Dagen efter behandlades cellerna med sulforafan i olika koncentrationer eller DMSO. Cellerna inkuberades med behandlingen i 24h. Därefter avlägsnades medium och aktiviteten av reporter generna mättes med Dual-Luciferase® Reporter Assay (Promega) enligt tillverkarens instruktioner. Fluorescensen mättes i en Wallac Victor2 1420 microplate reader (PerkinElmer).

Agarosgjel-elektrofores

För att kontrollera integriteten av det RNA som användes i qPCR:en kördes en agarosgjel-elektrofores på samtliga RNA-prover. 0,42 g agaros, Agarose DNA Pure Grade (VWR Chemicals) löstes i 30,8 ml milliQ vatten och upphettades under omrörning. När lösningen kokade tillsattes 2,0 ml 20X MOPS-EDTA-Sodium Acetat (MESA) buffert (Sigma-Aldrich)

och lösningen fick därefter svalna. När lösningen svalnat tillsattes 7,2 ml formaldehydlösning (Sigma-Aldrich) och blandningen hölls i en gelform för att stelna. RNA-proverna blandades med RNA-loading buffer (Sigma-Aldrich), 2 µl RNA och 4 µl loading buffer, och inkuberades i 60°C i 10 min för att denatureras. Efter denatureringen inkuberades proverna i 2 min på is innan de laddades i gelen (6 µl/brunn). Elektroforesen kördes med 60 V i 1 h och 45 min. Som buffert för elektroforesen användes 1X MESA buffert. Gelen lästes i en Chemidoc (Bio-Rad).

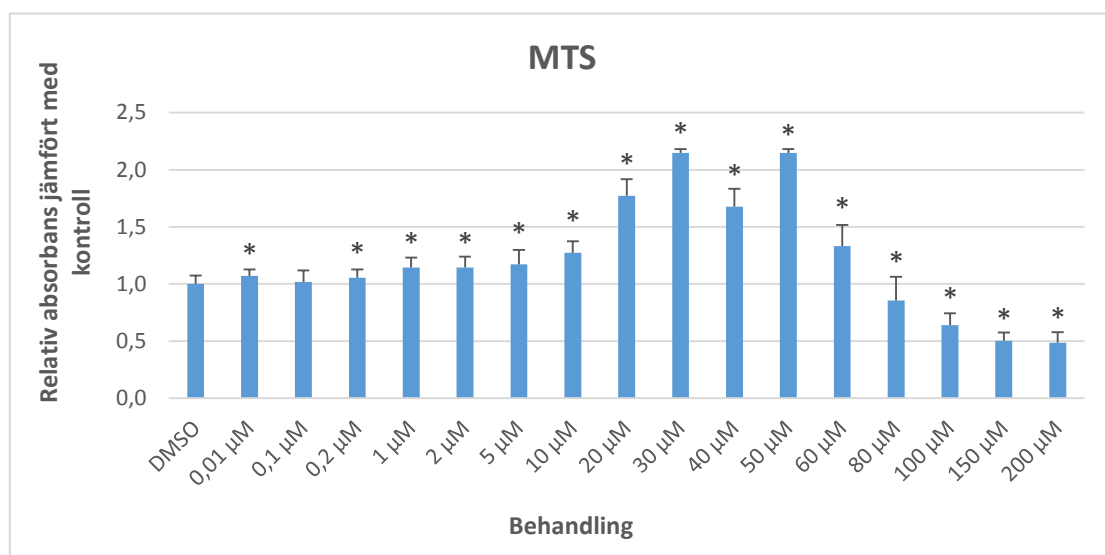
Statistisk analys

För att räkna ut den statistiska signifikansen för resultaten beräknades först det relativa värdet för varje resultat jämfört med kontrollen. Detta gjordes separat för varje försök. De relativa värdena för försök där samma metod och tillvägagångssätt använts lades sedan ihop för den statistiska analysen och medelvärde samt standardavvikelse räknades ut för varje behandlingsalternativ. Resultaten presenteras i stapeldiagram som det relativa medelvärdet jämfört med kontrollen och med standardavvikelsen angiven för varje behandling. För den statistiska analysen användes Students t-test. Analysen gjordes i programmet Minitab och som signifikant räknades p-värden $\leq 0,05$ (indikeras med * i samtliga diagram).

RESULTAT

Cellviabilitet

När toxiciteten av sulforafan på MCF-7 celler utvärderades för att avgöra den optimala behandlingskoncentrationen gjorde jag en intressant upptäckt. Efter att ha läst annan litteratur hade jag förväntat mig att sulforafan skulle ha en hämmande inverkan på viabiliteten hos MCF-7 cellerna redan i koncentrationer så låga som 10 µM (Pawlik *et al.*, 2013). Jag satte därför upp en första MTS-assay (ett dygns inkubation innan behandling) med



koncentrationerna 0,01, 0,1, 1, 5, 10, 20, 30, 40 och 50 µM. När resultatet kom visade det sig dock att sulforafan hade en signifikant stimulerande effekt på cellviabilitet i alla koncentrationer utom 0,1 µM jämfört med kontrollen och att den stimulerande effekten ökade med ökande koncentration (figur 1). Jag satte därför upp ytterligare en MTS-assay med högre

Figur 1. Effekten av sulforafan i olika koncentrationer på cellviabiliteten hos MCF-7 celler bedömt med MTS-test. Absorbansen anges som det relativa medelvärdet jämfört med kontroll.

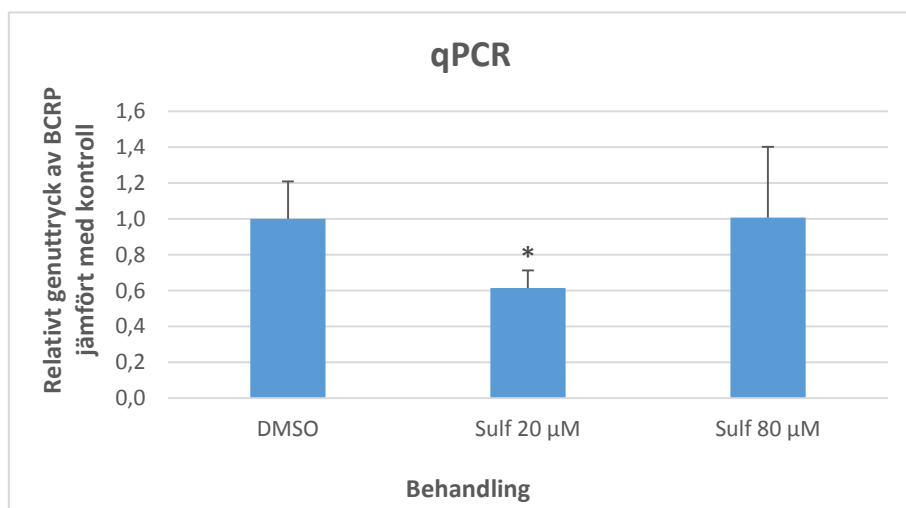
koncentrationer (0,2, 2, 10, 20, 40, 60, 100, 150 och 200 μM) och kunde då se att sulforafan hade en bifasisk effekt på cellviabiliteten där viabiliteten först ökade signifikant över nivån för kontrollen för att sedan sjunka igen (figur 1). För att konfirmera resultatet gjordes försöket en gång till med de höga koncentrationerna. Samma resultat erhöles.

Realtids-PCR

För den första qPCR:en valde jag att behandla cellerna med 80 μM sulforafan. Efter ett dygns inkubation med behandlingen kunde man se en visuell skillnad mellan behandlade och kontroll celler. De behandlade cellerna hade märkbart dragit ihop sig, ett tecken på att de inte mår bra, och kvantifiering av RNA med RiboGreen visade att de behandlade brunnarna hade betydligt lägre innehåll av RNA än kontrollbrunnarna. Resultatet från den följande qPCR:en visade dock ingen signifikant skillnad i BCRP-uttryck mellan behandlade och kontrollceller (figur 2). Liknande resultat sågs när försöket upprepades med samma koncentration. För att kontrollera att toxiciteten fortfarande var den samma när cellerna inkuberades längre tid efter utsåning kördes en MTS-assay parallellt med den andra qPCR:en (5 dagars inkubation i platta innan behandling) med resultat som överensstämde med tidigare MTS-test.

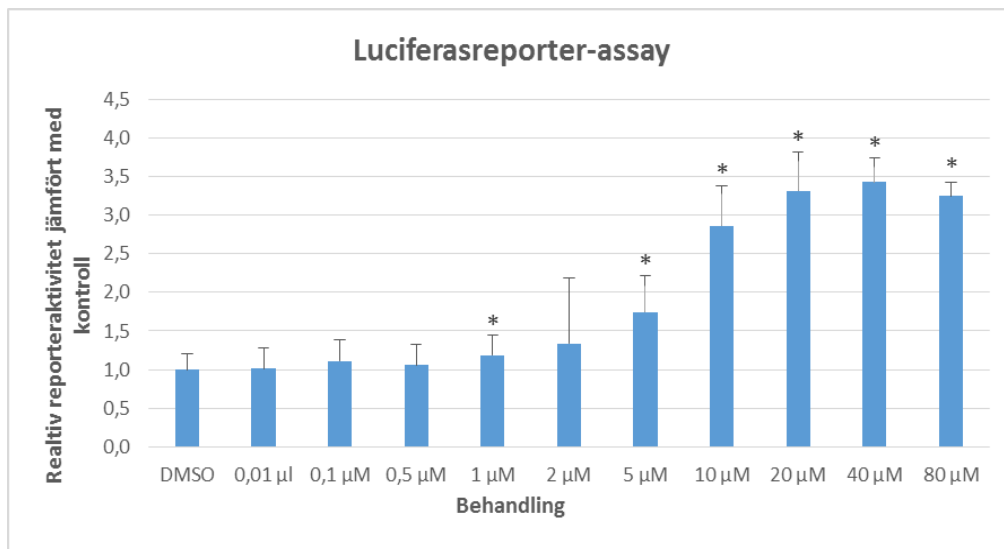
Då cellerna märkbart påverkades negativt av behandling med 80 μM sulforafan sattes ett nytt försök upp med 20 μM istället eftersom det enligt MTS-testet var en av de koncentrationer som gav högst metabolism. Även nu kunde man se en viss visuell skillnad mellan behandlade och kontrollceller men den var inte lika markant och RNA-koncentrationen var betydligt högre i de behandlade brunnarna än tidigare. qPCR visade dock något förvånande på ett signifikant sänkt BCRP-uttryck i de med sulforafan behandlade cellerna jämfört med kontrollerna (figur 2). Försöket upprepades en gång med liknande resultat.

Luciferasreporter-assay



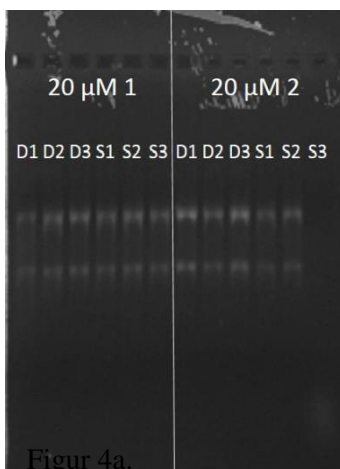
Figur 2. Effekten av sulforafan i olika koncentrationer på genuttrycket av BCRP i MCF-7 celler. Uttrycket visas som det relativa medelvärdet jämfört med kontrollen.

Luciferasreporter-assayn kördes två gånger med 0,01, 0,1, 0,5, 1, 2, 5, 10, 20 och 40 μM som slutkoncentration av sulforafan. I den första körningen togs även koncentrationen 80 μM med. Liknande resultat sågs vid båda körningarna och visade på en jämn aktivitet från Nrf2-luciferas-plasmiden medan uttrycket av renilla-plasmiden varierade mellan koncentrationerna med en minskande aktivitet med ökande koncentration. Detta gav intrycket av en Nrf2-aktivitet som ökade signifikant med ökande sulforafankoncentration (figur 3). Renilla-plasmiden bör uttryckas jämnt över plattan och om några skillnader i upptag av plasmiderna finns brukar det ses diffust utspritt över plattan. En koncentrationsberoende skillnad i Renilla-aktivitet tyder på någon form av celltoxicitet och den skenbart ökade Nrf2-aktiviteten kan



Figur 3. Effekten av sulforafan i olika koncentrationer på aktiviteten av Nrf2 i MCF-7 celler. Reporteraktiviteten anges som det relativa medelvärde jämfört med kontrollen.

därför inte med

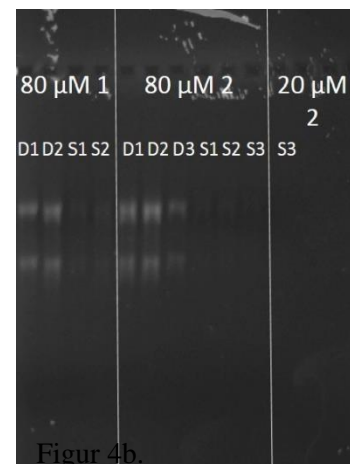


Figur 4. Gelelektrofores med RNA-prover från MCF-7 celler behandlade med sulforafan (S) eller DMSO (D) i 24h.

4a. RNA-prover från MCF-7 celler behandlade med 20 μM sulforafan eller DMSO.

4b. RNA-prover från MCF-7 celler behandlade med 80 μM sulforafan eller DMSO samt prov S3 från det högra fältet i figur 4a

säkerhet härledas till en



direkt effekt av sulforafan på Nrf2-Keap1.

Agarosgel-elektrofores

Gelektroforesen visade två tydliga band för samtliga prover behandlade med DMSO och samtliga prover utom ett från celler behandlade med 20 μ M sulforafan vilket betyder att de innehöll intakt rRNA (figur 4a). Det prov som inte uppvisade två tydliga band visade istället ett diffust, utdraget mönster vilket tyder på nedbrytning av RNA i provet. Detta prov gav även ett avvikande resultat i qPCR:en och uteslöts därför från resultaten. Proverna från cellerna behandlade med 80 μ M sulforafan visade två mycket svaga band i jämförelse med DMSO-behandlade celler från samma försök (figur 4b). Detta beror troligtvis på låg RNA-koncentration i provet jämfört med kontrollen, vilket stämmer med resultaten från RNA-kvantifieringen. Samma volym från varje prov användes till gelen vilket gör att prover med låg koncentration RNA visar band med lägre intensitet. I den andra gelen (figur 4b) togs det degraderad 20 μ M provet med ytterligare en gång för att konfirmera resultatet.

DISKUSSION

Frågeställningen för det här projektet var ifall sulforafan kan uppreglera genuttrycket av BCRP och om det kan aktivera Nrf2. Jag utgick ifrån hypotesen att sulforafan kan uppreglera BCRP och aktivera Nrf2 men har inte kunnat visa att så är fallet i de försök jag har gjort.

Flera tidigare studier har visat att sulforafan kan uppreglera Nrf2-styrda gener (Zhang et al., 1992; Thimmulappa et al. 2002; Lo & Matthews, 2013; Wang *et al.*, 2014) och sulforafan används ofta som en inducerare av Nrf2 i försök där man vill studera effekterna av oxidativ stress på celler. Man har även sett att sulforafan kan interagera med cystinrester hos Keap1 (Dinkova-Kostova *et al.*, 2002; Hu *et al.*, 2011) och det verkar vara så som sulforafan och många andra antioxidanter och xenobiotika sätter igång cellens försvar mot oxidativ och elektrofil stress. BCRP i sin tur har också i ett antal försök setts kunna induceras av Nrf2 (Adachi *et al.*, 2007; Singh *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2014) men det finns också exempel på andra studier där man har kommit fram till att BCRP induceras genom andra signalvägar (Ebert *et al.*, 2007; Halwachs *et al.*, 2012). Dock verkar den allmänna konsensusen vara att Nrf2 inducerar BCRP även om kan ske via andra signalvägar också. Med detta sagt har jag bara kunnat hitta två studier där man tittar på sulforafans effekt på BCRP. Den ena studien av Wang, et al. (2014) använde sig av både *in vivo* och *in vitro* metoder för att studera effekten av sulforafan på blodbarriären hos råttor. I denna studie kom man fram till att sulforafan uppreglerar uttrycket av BCRP via Nrf2. Ebert *et al.*, (2007) kom däremot fram till att sulforafan inte kan uppreglera BCRP varken på mRNA eller proteinnivå.

Jag har i mina försök inte kunnat se att sulforafan uppreglar BCRP i MCF-7 celler. När cellerna behandlades med 20 μ M sulforafan i 24h kunde till och med en statistiskt signifikant sänkning av BCRP uttrycket ses. Med luciferasreporter assay såg jag dock en ökad Nrf2-aktivitet med stigande koncentrationer av sulforafan. Det problematiska var bara att aktiviteten av renilla-plasmiden som användes för att normalisera Nrf2-aktiviteten sjönk med

stigande sulforafankoncentration. Renilla-plasmiden innehåller ingen specifik promotor och uttrycks därför jämnt i alla celler oavsett behandling medan luciferas-plasmiden är beroende av fritt Nrf2 för att uttryckas. Att aktiviteten av renilla-plasmiden sjunker med ökande sulforafan koncentration beror troligen på att sulforafan har en koncentrationsberoende toxisk inverkan på MCF-7 cellerna, något som stöds av en avsevärt lägre RNA koncentration hos celler behandlade med 80 μ M sulforafan, jämfört med 20 μ M, samt visuellt synlig påverkan på dessa celler. Det faktum att Nrf2-nivåerna låg på en stadig nivå och inte sjönk, som renilla-aktiviteten, med stigande sulforafankoncentration kan i och för sig betyda att sulforafan inducerar Nrf2-aktivitet. I det scenariot ökar aktiva celler sin Nrf2-aktivitet för att skydda sig mot stress inducerad av sulforafan. Nrf2-aktiviteten för individuella celler ökar men den totala Nrf2-aktiviteten för varje brunn förblir den samma eftersom resterande celler antingen dör eller stängs av. Detta är en tilltalande tanke men med de resultat vi har kan vi inte med säkerhet säga att det är detta som händer eftersom vi inte vet om det är sulforafan eller en biprodukt av celldöd eller cellskada som inducerar Nrf2-aktiviteten.

Sulforafan tycks alltså ha en toxisk inverkan på MCF-7 celler i de högre koncentrationer jag har använt baserat på den visuella skillnaden mellan celler behandlade med sulforafan och DMSO, lägre RNA-koncentration i sulforafan-behandlad celler och sjunkande renilla-aktivitet med stigande sulforafankoncentration. Det intressanta är att upprepade MTS-försök inte visade på någon anmärkningsvärd toxicitet ens vid mycket höga koncentrationer. MTS:en ledde däremot till en annan intressant upptäckt nämligen att sulforafan har en bifasisk effekt på metabolismen i MCF-7 celler. MTS-testet visar som tidigare nämnts på cellens metaboliska aktivitet och säger egentligen ingenting om hur cellerna mår. Sulforafan måste alltså ha en toxisk inverkan som inte påverkar metabolismen hos celler utan som till och med stimulerar den i vissa koncentrationer. Sulforafan metaboliseras i kroppen främst genom konjugering till glutathion (GSH) men också till en mindre del genom oxidation (Kassahun *et al.*, 1997). Detta skulle kunna vara en möjlig förklaring till den observerade toxiciteten antingen genom att sulforafan förbrukar GSH, som är en viktig del i cellens detoxifikationssystem, eller genom bildandet av reaktiva metaboliter. Den bifasiska effekten av sulforafan på metabolismen i cellerna skulle kunna bero på att sulforafan initialt stimulerar till ökad syntes av olika protektiva proteiner till exempel fas II enzymer. När koncentrationen av sulforafan och dess toxicitet ökar kämpar cellerna för att skydda sig mot den oxidativa stressen orsakad antingen av brist på GSH eller av toxiska metaboliter. Cellernas metabolism går på högvarv samtidigt som ett antal av dem börjar dö.

I en review av Negrette-Guzmán *et al.* (2013) diskuterar man de olika effekterna av sulforafan på mitokondrier. Enligt denna review kan sulforafan dels inducera apoptos i vissa celler, företrädesvis cancer celler, och vissa koncentrationer samtidigt som den har en cytoprotektiv inverkan och stimulerar mitokondriegenes i samma koncentrationer i andra, normala, celler.

Pawlik *et al.*, (2013) tittade på hur sulforafan påverkade fenotypiskt olika bröstcancer celler, bland annat MCF-7 celler. Med en MTT-assay kom de fram till att sulforafan påverkade cellviabiliteten negativt och koncentrationsberoende i alla cellinjer de tittade på. I MCF-7 cellerna minskade viabiliteten till ca 80% av kontrollen redan vid en koncentration av 10 μ M

efter 24 timmars inkubation och vid 40 μM hade den sjunkit under 25%. Man såg också att sulforafan inducerade autofagocytos och hämmade proteinsyntes i cellerna genom att påverka PI3K/Akt/mTOR/S6K1-signalvägen, en intracellulär signalväg viktig för reglering av cellens överlevnad. IC_{50} för proliferation i MCF-7 cellerna (den koncentration av sulforafan det krävs för att minska proliferationen med 50%) bestämdes till 19 μM för 24 timmars behandling i det här försöket vilket, om det stämmer, gör att båda de koncentrationer jag använde för qPCR:en var för höga.

Toxiciteten av sulforafan har varit ett stort problem i det här arbetet och kan vara en viktig orsak till att ingen effekt av sulforafan på BCRP har setts. En signifikant sänkning av BCRP aktiviteten kunde i och för sig ses vid 20 μM men frågan är hur stor vikt man kan lägga på det resultatet med tanke på att försöket enbart upprepades två gånger och med få brunnar för både behandling och kontroll. Dessutom går det inte att säga vilken effekt toxiciteten av sulforafan hade vid 20 μM eftersom MTS-assayen inte fungerade som cellviabilitets markör. Intressant är att uttrycket av BCRP ökade vid 80 μM jämfört med 20 μM . Det är frestande att dra slutsatsen att detta visar på en relativ induktion av BCRP via sulforafan men på grund av den höga toxiciteten vid den här koncentrationen kan man inte veta om det beror på sulforafan eller att BCRP induceras via andra signalvägar. Är det dock så att aktiviteten av BCRP faktiskt sjunker vid behandling med 20 μM sulforafan är det en mycket intressant upptäckt som skulle kunna utnyttjas till exempel vid kemoterapi av läkemedelsresistenta cancerformer där resistensen orsakas av en uppregelring av BCRP. Det skulle också vara intressant med tanke på en eventuell endogen funktion av BCRP som transportör av potentiellt viktiga ämnen till mjölken. För vidare studier av sulforafans effekt på BCRP bör en annan metod för att bedöma toxicitet användas.

Toxicitet behöver dock inte vara den enda orsaken till att en inducerande effekt på BCRP uteblev. Andra möjliga orsaker kan vara att MCF-7 inte är en lämplig cellinje att studera uttrycket av BCRP i. Är grunduttrycket av BCRP redan högt i MCF-7 cellerna kanske inte effekten av sulforafan är tillräcklig för att öka uttrycket ytterligare. Detta är möjligt eftersom BCRP har setts bidra till läkemedelsresistens hos cancerceller (Doyle *et al.*, 1998). Eller så kan det vara så att grunduttrycket av Nrf2 är så högt i cellerna att Keap1 är mättad. I så fall skulle en hämning av den Keap1-medierade nedbrytningen av Nrf2 inte ha någon effekt. Alternativt att cellerna blivit stressade under odling vilket gjort att de redan hade ett Nrf2 påslag vid behandling. Dessa faktorer skulle dock inte förklara sänkningen av BCRP-genuttrycket som sågs vid 20 μM . För övrigt är MCF-7 en cancercellinje och skiljer sig därför från normala mammarceller. Detta skulle kunna göra att sulforafan verkar toxiskt på MCF-7 men inte normala mammarceller (Pawlik *et al.*, 2013). Sulforafan är ju som tidigare nämnts känt för sina kemopreventiva egenskaper. Detta stöds av Pawlik *et al.*, (2013) som såg att sulforafan påverkar PI3K/Akt/mTOR/S6K1-signalvägen vilken i sin tur är uppregelrad hos cancerceller. Den toxiska effekten av sulforafan skulle alltså dels kunna vara rent dosberoende eller så ger sulforafan olika effekter i olika cellinjer.

En annan möjlig orsak till att sulforafan inte lyckades inducera BCRP i mitt försök kan helt enkelt vara att sulforafan inte inducerar BCRP. I två av de studier jag har tittat på har man kommit fram till att det är troligare att BCRP induceras via AhR-receptorn istället och i de

artiklar jag har läst har jag inte hittat någon information om att sulforafan skulle interagera med AhR. Ebert *et al.*, (2007) visade ett försök med Caco-2 celler att BCRP inducerades av kända AhR- och Nrf2-agonister (tBHQ och quercetin) men däremot inte av rena Nrf2-agonister. I ett annat försök med muterade MCF-7 celler som saknade AhR såg de dels att basalnivån av BCRP var mycket låg i dessa celler och att det inte gick att inducera BCRP. Transfektion av cellerna med en AhR-plasmid ökade nivåerna av BCRP mRNA och hämning av nedbrytningen av AhR ledde till en superinduktion av BCRP. Även Halwachs *et al.*, (2012) så i sin studie med primära bovina juverceller att BCRP inducerades via AhR. Lo och Matthews (2013) såg i sin studie med MCF-7 celler att 6 timmars behandling med enbart 10 µM sulforafan inte ökade mängden Nrf2-mRNA i cellerna. Däremot såg man en ökning av mängden Nrf2 protein efter 24 timmars behandling och diskuterar därför möjligheten att sulforafan kanske stabiliserar Nrf2 men att den inte inducerar nyproduktion av Nrf2. Man såg också att sulforafan både gav en signifikant ökning av NQO1 mRNA och ökade rekryteringen av Nrf2 till NQO1-genen. Detta bevisar att sulforafan kan inducera Nrf2-styrda gener bara genom att stabilisera Nrf2. Frågan man då kan ställa sig är om enbart stabilisering av Nrf2 är tillräckligt för att inducera genuttryck av BCRP eller om ökad transkription av Nrf2 via till exempel AhR också behövs.

Sammanfattningsvis kan man säga att jag i den här studien inte har sett några bevis för att sulforafan ökar uttrycket av BCRP i MCF-7 celler men jag har inte heller sett några bevis för att det inte kan göra det. Vid 20 µM sågs till och med en signifikant minskning av BCRP-uttrycket, något som skulle kunna vara intressant vid kemoterapi av resistenta tumörformer. Jag har också sett en synbar koncentrationsberoende ökning av Nrf2-aktiviteten efter behandling med sulforafan men på grund av toxicitet är det svårt att dra säkra slutsatser kring detta. Toxicitet av sulforafan var ett stort problem i studien och i framtida försök bör en annan analysmetod för toxicitet alternativt en annan cellinje användas.

TACK

Stort tack till min handledare Johan Lundqvist för allt stöd och för all hjälp med arbetet. Tack till min biträdande handledare Yagmur Yagdiran för all hjälp med laboratoriearbetet och min biträdande handledare Agneta Oskarsson och examinator Jonas Tallkvist för värdefull kritik på den skriftliga delen. Tack också till Erik Helmersson för hjälp på labbet.

REFERENSER

- Adachi, T., Nakagawa, H., Chung, I., Hagiya, Y., Hoshijima, K., Noguchi, N., Kuo, M. T. & Ishikawa, T. (2007). Nrf2-dependent and -independent induction of ABC transporters ABCC1, ABCC2, and ABCG2 in HepG2 cells under oxidative stress. *Journal of Experimental Therapeutics and Oncology*, vol. 6, ss. 335-348.
- Allikmets, R., Schriml, L. M., Hutchinson, A., Romano-Spica, V. & Dean, M. (1998). A human placenta-specific ATP-binding cassette gene (ABCP) on chromosome 4q22 that is involved in multidrug resistance. *Cancer Research*, vol. 58, ss. 5337-5339.
- Baird, L., Llères, D., Swift, S. & Dinkova-Kostova, A. T. (2013). Regulatory flexibility in the Nrf2-mediated stress response is conferred by conformational cycling of the Keap1-Nrf2 protein

- complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 110 (38), ss. 15259-15264.
- Cheung, K. L. & Kong, A.-N. (2010). Molecular targets of dietary phenethyl isothiocyanate and sulforaphane for cancer chemoprevention. *The AAPS Journal*, vol. 12 (1), ss. 87-97.
- Clarke, J. D., Dashwood, R. H. & Ho, E. (2008). Multi-targeted prevention of cancer by sulforaphane. *Cancer Letters*, vol. 269, ss. 291-304.
- Dhakshinamoorthy, S. & Jaiswal, A. K. (2001). Functional characterization and role of INrf2 in antioxidant response element-mediated expression and antioxidant induction of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 gene. *Oncogene*, vol. 20, ss. 3906-3917.
- Dinkova-Kostova, A. T., Holtzclaw, W. D., Cole, R. N., Itoh, K., Wakabayashi, N., Katoh, Y., Yamamoto, M. & Talalay, P. (2002). Direct evidence that sulfhydryl of Keap1 are the sensors regulating induction of phase 2 enzymes that protect against carcinogens and oxidants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 99 (18), ss. 11908-11913.
- Doyle, L. A., Yang, W., Abruzzo, I. V., Krogmann, T., Gao, Y., Rishi, A. K. & Ross, D. D. (1998). A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Medical Sciences*, vol. 95, ss. 15665-15670.
- Ebert, B., Seidel, A. & Lampen, A. (2007). Phytochemicals induce breast cancer resistance protein in Caco-2 cells and enhance the transport of benzo[a]pyrene-3-sulfate. *Toxicological Sciences*, vol. 96 (2), ss. 227-236.
- González-Lobato, L., Real, R., Herrero, D., de la Fuente, A., Prieto, J. G., Marqués, M. M., Álvarez, A. I. & Merino, G. (2014). Novel *in vitro* system for prediction of veterinary drug residues in ovine milk and dairy products. *Food Additives & Contaminants: Part A*, vol. 31 (6), ss. 1026-1037.
- Halwachs, S., Wassermann, L., Lindner, S., Zizzadoro, C. & Honscha, W. (2012). Fungicide prochloraz and environmental pollutant dioxin induce the ABCG2 transporter in bovine mammary epithelial cells by the arylhydrocarbon receptor signaling pathway. *Toxicological Sciences*, vol. 131 (2), ss. 491-501.
- Hu, C., Egger, A. L., Mesecar, A. D. & van Breemen, R. B. (2011). Modification of Keap1 cysteine residues by sulforaphane. *Chemical Research in Toxicology*, vol. 24 (4), ss. 515-521.
- Jonker, J. W., Merino, m., Musters, S., van Herwaarden, A. E., Bolscher, E., Wagenaar, E., Mesman, E., Dale, T. C. & Schinkel, A. H. (2005). The breast cancer resistance protein BCRP (ABCG2) concentrates drugs and carcinogenic xenotoxins into milk. *Nature Medicine*, vol. 11 (2), ss. 127-129.
- Kassahun, K., Davis, M., Hu, P., Martin, B. & Baillie, T. (1997). Biotransformation of the naturally occurring isothiocyanate sulforaphane in the rat: identification of phase I metabolites and glutathione conjugates. *Chemical Research in Toxicology*, vol. 10, ss. 1228-1233.
- Kobayashi, A., Kang, M.-I., Watai, Y., Tong, K. I., Shibata, T., Uchida, K. & Yamamoto, M. (2006). Oxidative and electrophilic stresses activate Nrf2 through inhibition of ubiquitination activity of Keap1. *Molecular and Cellular Biology*, vol. 26 (1), ss. 221-229.
- Livsmedelverket (2013-08-23). *Läkemedelsrester - fördjupning*. <http://www.slv.se/sv/grupp1/Risker-med-mat/Kemiska-amnen/Lakemedelsrester/Lakemedelsrester---fordjupning/> [2014-09-29]

- Lo, R. & Matthews, J. (2013). The aryl hydrocarbon receptor and estrogen receptor alpha differentially modulate nuclear factor erythroid-2-related factor 2 transactivation in MCF-7 breast cancer cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 270, ss. 139-148.
- Magesh, S., Chen, Y. & Hu, L. 2012. Small molecule modulators of Keap1-Nrf2-ARE pathway as potential preventive and therapeutic agents. *Medical research reviews*, vol. 32 (4), ss. 687-726.
- McMahon, M., Itoh, K., Yamamoto, M. & Hayes, J. D. (2003). Keap1-dependent proteasomal degradation of transcription factor Nrf2 contributes to the negative regulation of antioxidant response element-driven gene expression. *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 278 (24), ss. 21592-21600.
- Mealey, K., L. (2011). ABCG2 transporter: therapeutic and physiologic implications in veterinary species. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, vol. 35, ss. 105-112.
- Merino, G., Álvarez, A. I., Pulido, M. M., Molina, A. J., Schinkel, A. H. & Prieto, J. G. (2006). Breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) transports fluoroquinolone antibiotics and affects their oral availability, pharmacokinetics, and milk secretion. *Drug Metabolism and Disposition*, vol. 34 (4), ss. 690-695.
- Merino, G., Jonker, J. W., Wagenaar, E., van Herwaarden, A. E. & Schinkel, A. H. (2005a). The breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) affects pharmacokinetics, hepatobiliary excretion, and milk secretion of the antibiotic nitrofurantoin. *Molecular Pharmacology*, vol. 67, ss. 1758-1764.
- Merino, G., Jonker, J. W., Wagenaar, E., Pulido, M. M., Molian, A. J., Alvarez, A. I. & Schinkel, A. H. (2005b). Transport of anthelmintic benzimidazole drugs by breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2). *Drug Metabolism and Disposition*, vol. 33 (5), ss. 614-618.
- Moi, P., Chan, K., Asunis, I., Cao, A. & Kan, Y. W. (1994). Isolation of NF-E2-related factor 2 (Nrf2), a NF-E2-like basic leucine zipper transcriptional activator that binds to the tandem NF-E2/AP1 repeat of the β -globin locus control region. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 91 (21) ss. 9926-9930.
- Muehlhoff, E., Bennett, A. & McMahon, D. (2013). Introduction I: Muehlhoff, E., Bennett, A. & McMahon, D. (red), *Milk and dairy products in human nutrition*. Rom: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 1-10. Tillgänglig: <http://www.fao.org/docrep/018/i3396e/i3396e.pdf> [2014-11-25]
- Pawlik, A., Wiczak, A., Kaczyńska, A., Antosiewicz, J. & Herman-Antosiewicz, A. (2013). Sulphoraphane inhibits growth of phenotypically different breast cancer cells. *European Journal of Nutrition*, vol. 52, ss. 1949-1958.
- Pérez, M., Real, R., Mendoza, G., Merino, G., Prieto, J. G. & Alvarez, A. I. (2009). Milk secretion of nitrofurantoin, as a specific BCRP/ABCG2 substrate, in assaf sheep: modulation by isoflavones. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, vol. 32, ss. 498-502.
- Pulido, M. M., Molina, A. J., Merino, G., Mendoza, G., Prieto, J. G. & Alvarez, A. I. (2006). Interaction of enrofloxacin with breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2): influence of flavonoids and role in milk secretion in sheep. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, vol. 29, ss. 279-287.
- Schricks, J. A. & Fink-Gremmels, J. (2008). Implications of ABC transporters on the disposition of typical veterinary medicinal products. *European Journal of Pharmacology*, vol. 585, ss. 5010-519.

- Singh, A., Wu, H., Zhang, P., Happel, C., Ma, J. & Biswal, S. (2010). Expression of ABCG2 (BCRP) is regulated by Nrf2 in cancer cells that confers side population and chemoresistance phenotype. *Molecular Cancer Therapeutics*, vol. 9, ss. 2365-2376.
- Thimmulappa, R. K., Mai, K. H., Kensler, T. W., Yamamoto, M. & Biswal, S. (2002). Identification of Nrf2-regulated genes induced by the chemopreventive agent sulforaphane by oligonucleotide microarray. *Cancer Research*, vol. 62, ss. 5196-5203.
- van Herwaarden, A. E. & Schinkel, A. H. (2006). The function of breast cancer resistance protein in epithelial barriers, stem cells and milk secretion of drugs and xenotoxins. *TRENDS in Pharmacological Sciences*, vol. 27 (1), ss. 10-16.
- Wang, X., Campos, C. R., Peart, J. C., Smith, L. S., Boni, J. L., Cannon, R. E. & Miller, D. S. (2014). Nrf2 upregulates ATP binding cassette transporter expression and activity at the blood-brain and blood-spinal cord barriers. *The Journal of Neuroscience*, vol. 34 (25), ss. 8585-8593.
- Zhang, Y., Kensler, T. W., Cho, C-G., Posner, G. H. & Talalay, P. (1994). Anticarcinogenic activities of sulforaphane and structurally related synthetic norboryl isothiocyanates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 91, ss. 3147-3150.
- Zhang, Y., Talalay, P., Cho, C.-G. & Posner, G. H. (1992). A major inducer of anticarcinogenic protective enzymes from broccoli: isolation and elucidation of structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 89 (6), ss. 2399-2403.