



universität  
wien

# DISSERTATION

Titel der Dissertation

„Einfluss ausgewählter Isoflavone und eines  
stilbenreichen Extraktes auf Topoisomerasen und die  
DNA-Integrität“

Verfasserin

Diplom-Lebensmittelchemikerin Simone Bächler

angestrebter akademischer Grad

Doktorin der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

Wien, 2013

Studienkennzahl lt. Studienblatt: A 091 419

Dissertationsgebiet lt. Studienblatt: Chemie

Betreuerin / Betreuer: Prof. Dr. rer. nat. Doris Marko



Ich danke Frau Prof. Dr. D. Marko für die Überlassung des interessanten Themas sowie die wertvollen Hilfestellungen für das Gelingen dieser Arbeit.

Des Weiteren danke ich den Gutachtern Frau Prof. Dr. L. Lehmann sowie Frau Prof. Dr. M. Cichna-Markl für die Übernahme der Beurteilung meiner Arbeit.



## I. Inhaltsverzeichnis

|            |                                                      |          |
|------------|------------------------------------------------------|----------|
| <b>I.</b>  | <b>Inhaltsverzeichnis .....</b>                      | <b>i</b> |
| <b>II.</b> | <b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>                    | <b>v</b> |
| <b>1.</b>  | <b>Einleitung .....</b>                              | <b>1</b> |
| <b>2.</b>  | <b>Theoretischer Hintergrund .....</b>               | <b>3</b> |
| 2.1.       | Humane Topoisomerasen .....                          | 3        |
| 2.1.1.     | Klassifizierung.....                                 | 3        |
| 2.1.2.     | Topoisomerase II.....                                | 4        |
| 2.1.3.     | Hemmung humaner Topoisomerase II .....               | 6        |
| 2.1.4.     | Topoisomerase-Gifte in der Chemotherapie .....       | 10       |
| 2.1.5.     | Topoisomerase II und Leukämie .....                  | 11       |
| 2.2.       | DNA-Integrität.....                                  | 13       |
| 2.3.       | Oxidativer Stress.....                               | 15       |
| 2.3.1.     | Reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies .....     | 15       |
| 2.3.2.     | Nrf2-Signalweg .....                                 | 16       |
| 2.4.       | Isoflavone .....                                     | 19       |
| 2.4.1.     | Vorkommen und Gehalte .....                          | 19       |
| 2.4.2.     | Exposition.....                                      | 20       |
| 2.4.3.     | Bioverfügbarkeit und Metabolismus .....              | 21       |
| 2.4.4.     | Biologische Wirkungen .....                          | 27       |
| 2.4.5.     | Molekulare Wirkmechanismen .....                     | 30       |
| 2.4.6.     | Toxikologische Betrachtung.....                      | 33       |
| 2.5.       | Vineatrol®30 und darin enthaltene Inhaltsstoffe..... | 36       |
| 2.5.1.     | Resveratrol.....                                     | 36       |
| 2.5.2.     | Vineatrol®30 .....                                   | 38       |
| 2.5.3.     | Resveratrol-Oligomere .....                          | 40       |

|                                                                                                                                  |           |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>3. Ziele der Arbeit .....</b>                                                                                                 | <b>42</b> |
| <b>4. Ergebnisse und Diskussion.....</b>                                                                                         | <b>44</b> |
| 4.1. Untersuchungen zur biologischen Wirkung von Genistein.....                                                                  | 44        |
| 4.1.1. Einfluss auf humane Topoisomerasen in HT1080-Zellen .....                                                                 | 44        |
| 4.1.2. Einfluss auf die DNA-Integrität humaner Kolonkarzinomzellen .....                                                         | 47        |
| 4.1.3. Wirkung von Genistein auf Topoisomerase II im Gastrointestinaltrakt<br>männlicher Wistar Ratten.....                      | 50        |
| 4.1.4. Tabellarischer Überblick über die Ergebnisse .....                                                                        | 58        |
| 4.1.5. Diskussion der biologischen Wirkungen von Genistein .....                                                                 | 59        |
| 4.2. Einfluss des oxidativen Metabolismus auf die biologische Aktivität von Daidzein ..                                          | 69        |
| 4.2.1. Einfluss der oxidativen Daidzein-Metabolite auf die katalytische Aktivität<br>humaner Topoisomerase II.....               | 69        |
| 4.2.2. Bildung von Wasserstoffperoxid durch Daidzein und seine oxidativen<br>Metabolite unter Zellkulturbedingungen.....         | 71        |
| 4.2.3. Einfluss von Daidzein, 6-HO-DAI und 8-HO-DAI auf die Proliferation von<br>HT29-Zellen.....                                | 72        |
| 4.2.4. Einfluss auf humane Topoisomerasen in HT29-Zellen .....                                                                   | 75        |
| 4.2.5. Einfluss auf die DNA-Integrität .....                                                                                     | 79        |
| 4.2.6. Einfluss auf die Zellzyklusverteilung.....                                                                                | 83        |
| 4.2.7. Bestimmung der Apoptose-Induktion durch oxidative Daidzein-Metabolite .....                                               | 85        |
| 4.2.8. Modulation des zellulären Redoxstatus durch oxidative Daidzein-Metabolite ..                                              | 86        |
| 4.2.9. Tabellarischer Überblick über die Ergebnisse .....                                                                        | 93        |
| 4.2.10. Diskussion der Ergebnisse zur biologischen Aktivität der oxidativen<br>Daidzein-Metabolite.....                          | 94        |
| 4.3. Untersuchungen zur biologischen Aktivität von Vineatrol® <sup>30</sup> und darin<br>enthaltenen Resveratrol-Oligomeren..... | 104       |
| 4.3.1. Einfluss auf humane Topoisomerase II.....                                                                                 | 104       |
| 4.3.2. Einfluss auf die DNA-Integrität .....                                                                                     | 110       |
| 4.3.3. Tabellarischer Überblick über die Ergebnisse .....                                                                        | 114       |

|                                                                                                         |            |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 4.3.4. Diskussion der Ergebnisse zu Vineatrol®30 und den darin enthaltenen Resveratrol-Oligomeren ..... | 114        |
| <b>5. Zusammenfassung .....</b>                                                                         | <b>122</b> |
| <b>6. Material und Methoden .....</b>                                                                   | <b>126</b> |
| 6.1. Konzeption der Tierstudie .....                                                                    | 126        |
| 6.1.1. Tierhaltung .....                                                                                | 126        |
| 6.1.2. Behandlung der Tiere .....                                                                       | 126        |
| 6.1.3. Futterzusammensetzung .....                                                                      | 126        |
| 6.2. Zellkultur .....                                                                                   | 127        |
| 6.2.1. Verwendete Zelllinien .....                                                                      | 127        |
| 6.2.2. Kultivierung von Monolayerkulturen.....                                                          | 128        |
| 6.2.3. Inkubation der Zellen .....                                                                      | 130        |
| 6.2.4. Mykoplasmen-Test.....                                                                            | 130        |
| 6.3. Amplex® Red Hydrogen Peroxide Assay .....                                                          | 131        |
| 6.4. Bestimmung der Zytotoxizität .....                                                                 | 132        |
| 6.4.1. Zellvitalität mit Trypanblau.....                                                                | 132        |
| 6.4.2. Membranintegrität im LDH-Assay.....                                                              | 133        |
| 6.4.3. Mitochondriale Aktivität im WST-1-Assay .....                                                    | 135        |
| 6.5. Einfluss auf Topoisomerasen.....                                                                   | 136        |
| 6.5.1. Dekatenierungsassay .....                                                                        | 136        |
| 6.5.2. ‘Isolating <i>in vivo</i> complexes of enzyme to DNA’ (ICE)-Bioassay .....                       | 137        |
| 6.6. Einfluss auf die DNA-Integrität.....                                                               | 140        |
| 6.6.1. Alkalischer Comet Assay .....                                                                    | 140        |
| 6.6.2. Immunohistochemische Bestimmung von $\gamma$ H2AX-Foci.....                                      | 142        |
| 6.7. Untersuchungen zur Zellzyklus-Verteilung.....                                                      | 144        |
| 6.8. Apoptose-Induktion (Cell Death Detection ELISA <sup>PLUS</sup> ).....                              | 145        |
| 6.9. Modulation des zellulären Redoxstatus .....                                                        | 146        |
| 6.9.1. Dichlorofluorescein (DCF)-Assay .....                                                            | 146        |

|                                                              |            |
|--------------------------------------------------------------|------------|
| 6.9.2. Nrf2-Translokation mittels Western Blot Analyse ..... | 148        |
| 6.9.3. Nrf2-Reportergen-Assay .....                          | 152        |
| 6.10. Verzeichnis der Materialien .....                      | 154        |
| <b>III. Literaturverzeichnis.....</b>                        | <b>161</b> |
| <b>IV. Abstract Deutsch.....</b>                             | <b>177</b> |
| <b>V. Abstract English.....</b>                              | <b>179</b> |
| <b>VI. Formelverzeichnis .....</b>                           | <b>180</b> |
| <b>VII. Lebenslauf.....</b>                                  | <b>182</b> |
| <b>VIII. Publikationsliste.....</b>                          | <b>183</b> |
| <b>IX. Dank .....</b>                                        | <b>187</b> |

## II. Abkürzungsverzeichnis

|                  |                                                       |               |                                              |
|------------------|-------------------------------------------------------|---------------|----------------------------------------------|
| <b>3'-HO-DAI</b> | 3'-Hydroxydaidzein                                    | <b>DCF</b>    | Dichlorofluorescein                          |
| <b>6-HO-DAI</b>  | 6-Hydroxydaidzein                                     | <b>DMEM</b>   | Dulbecco's Modified Eagle's Medium           |
| <b>8-HO-DAI</b>  | 8-Hydroxydaidzein                                     | <b>DMSO</b>   | Dimethylsulfoxid                             |
| <b>A431</b>      | humane epidermoide Karzinomzelllinie                  | <b>DNA-PK</b> | DNA-abhängige Proteinkinase                  |
| <b>ALL</b>       | akute lymphoblastische Leukämie                       | <b>DOX</b>    | Doxorubicin                                  |
| <b>AML</b>       | akute myeloische Leukämie                             | <b>DTT</b>    | Dithiothreitol                               |
| <b>APS</b>       | Ammoniumperoxodisulfat                                | <b>EGFR</b>   | Epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor          |
| <b>ARE</b>       | antioxidativ responsive Element                       | <b>ELISA</b>  | <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>     |
| <b>ATM</b>       | <i>ataxia telangiectasia mutated</i>                  | <b>ER</b>     | Estrogenrezeptor                             |
| <b>ATR</b>       | <i>ataxia telangiectasia and Rad3-related protein</i> | <b>ERK</b>    | <i>extracellular-signal regulated kinase</i> |
| <b>AU</b>        | <i>arbitrary units</i>                                | <b>ETO</b>    | Etoposid                                     |
| <b>BRCA1</b>     | <i>breast cancer 1, early onset</i>                   | <b>FKS</b>    | fetales Kälberserum                          |
| <b>BSA</b>       | <i>bovine serum albumin, (Rinderserumalbumin)</i>     | <b>FPG</b>    | Formamidopyrimidin-DNA-Glykosylase           |
| <b>Chk2</b>      | Checkpoint Kinase 2                                   | <b>GEN</b>    | Genistein                                    |
| <b>CHO</b>       | <i>Chinese Hamster Ovary Cells</i>                    | <b>GFP</b>    | grün fluoreszierendes Protein                |
| <b>CTRL</b>      | <i>control</i> (Kontrolle)                            | <b>HOP</b>    | Hopeaphenol                                  |
| <b>DAI</b>       | Daidzein                                              | <b>HRP</b>    | <i>horseradish peroxidase</i>                |
| <b>DAPI</b>      | 4',6-Diamin-2-phenyl-indol                            | <b>HPRT</b>   | Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase |
|                  |                                                       | <b>HT1080</b> | humane Fibrosarkomzelllinie                  |

|                |                                                     |               |                                                                         |
|----------------|-----------------------------------------------------|---------------|-------------------------------------------------------------------------|
| <b>HT29</b>    | humane Kolonkarzinom-zelllinie                      | <b>NFκB</b>   | <i>nuclear factor ,kappa-light-chain-enhancer‘ of activated B-cells</i> |
| <b>ICE</b>     | Isolating <i>in vivo</i> complexes of enzyme to DNA | <b>NMA</b>    | <i>normal melting agarose</i>                                           |
| <b>IDD</b>     | isoflavone - depleted diet (isoflavonarme Diät)     | <b>Nrf2</b>   | <i>nuclear factor erythroid 2-related factor 2</i>                      |
| <b>IRD</b>     | isoflavone - rich diet (isoflavonreiche Diät)       | <b>PBS</b>    | <i>phosphate buffered saline</i>                                        |
| <b>kDNA</b>    | Kinetoplasten-DNA                                   | <b>r2-Vin</b> | r2-Viniferin                                                            |
| <b>Keap1</b>   | <i>Kelch-like ECH associ-ating protein 1</i>        | <b>ROS</b>    | reaktive Sauerstoff-spezies                                             |
| <b>LDH</b>     | Laktat-Dehydrogenase                                | <b>RNS</b>    | reaktive Stickstoffspezies                                              |
| <b>LMA</b>     | <i>low melting agarose</i>                          | <b>RT</b>     | Raumtemperatur                                                          |
| <b>LumiGlo</b> | Luminol-Lösung                                      | <b>RTK</b>    | Rezeptortyrosinkinasen                                                  |
| <b>MAPK</b>    | Mitogen-aktivierte Proteinkinase                    | <b>SDS</b>    | <i>sodium dodecyl sulfate</i> (Natriumdodecylsulfat)                    |
| <b>MLL</b>     | <i>mixed-lineage leukemia</i>                       | <b>Topo</b>   | Topoisomerase                                                           |
| <b>NEM</b>     | Nahrungsergänzungs-mittel                           | <b>WST-1</b>  | <i>water soluble tetrazolium salt</i>                                   |

## 1. Einleitung

Jährlich werden weltweit mehr als zwölf Millionen Neuerkrankungen an Krebs verzeichnet und nach Schätzungen der Internationalen Agentur für Krebsforschung wird die Zahl der Patienten in den nächsten Jahren weiter stark steigen (IARC, 2008). Dies unterstreicht den Bedarf der wissenschaftlichen Forschung im Bereich der Krebstherapie ebenso wie die zunehmende Bedeutung von Maßnahmen zur Krebsprävention.

Neben bisher im Zusammenhang mit der Krebsentstehung weithin diskutierten Faktoren wie dem Rauchen, der Exposition gegenüber Strahlung und karzinogenen Umweltgiften natürlichen sowie anthropogenen Ursprungs, rücken seit einiger Zeit zunehmend auch unterschiedliche Ernährungsgewohnheiten in den Fokus des Interesses bezüglich einer möglichen Bedeutung für die Krebsentstehung und –prävention. So legen zahlreiche Studien einen Zusammenhang zwischen gesunder Ernährung und einem verminderten Krebsrisiko nahe. Die Identifizierung möglicher chemopräventiver Lebensmittelinhaltsstoffe ist dabei in den letzten Jahren zunehmend in den Mittelpunkt wissenschaftlichen sowie medialen Interesses gerückt. Besondere Aufmerksamkeit wurde dabei der Substanzklasse der Polyphenole entgegengebracht, da diesen Verbindungen eine präventive Wirkung auf die Krebsentstehung, insbesondere bei der Entwicklung von Darmtumoren, zugesprochen wird. Im Zuge eines verstärkten Gesundheitsbewusstseins in der Bevölkerung hat auch die Popularität von Nahrungsergänzungsmitteln (NEM) stark zugenommen, die mitunter hohe Mengen isolierter Polyphenole enthalten können. Dadurch könnten höhere Konzentrationen dieser Verbindungen im menschlichen Körper erreicht werden als dies allein durch eine natürliche Nahrungsaufnahme zu erwarten wäre.

Potentiell nachteilige Effekte bei langfristiger Supplementierung mit diesen Substanzen sind jedoch bislang nur unzureichend untersucht. In einigen Studien wurde für einzelne Polyphenole, darunter Genistein und Resveratrol, eine Wirkung als Topoisomerase-Gift beschrieben. Topoisomerasen sind für die Regulation der DNA-Topologie essentielle Enzyme. Eine Hemmung dieser wichtigen Funktion durch bestimmte Substanzen kann zu genotoxischen oder zytotoxischen Effekten führen, wie dies für Genistein und Resveratrol bereits beschrieben wurde. Zudem wurde eine hohe maternale Aufnahme von Topoisomerase-Giften über die Nahrung mit einer erhöhten Inzidenz kindlicher Leukämien in Verbindung gebracht. Dies unterstreicht einerseits die Notwendigkeit der Identifizierung potentieller Topoisomerase-Hemmstoffe in Lebensmitteln und NEM, sowie andererseits die Aufklärung damit verbundener adverser Effekte. Den Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit bilden daher

Untersuchungen zur Topoisomerase-Hemmung durch ausgewählte Isoflavone sowie einen stilbenreichen Extrakt, insbesondere im Hinblick auf eine Topoisomerase-vermittelte Beeinflussung der DNA-Integrität.

## **2. Theoretischer Hintergrund**

### **2.1. Humane Topoisomerasen**

Der Umfang eines Zellkerns einer durchschnittlichen Säugerzelle ist nahezu eine Million Male kleiner als die Länge des Genoms, das in diesen Kern gepackt werden muss (Pommier et al., 2010). So erfordert die Länge und Struktur der DNA-Doppelhelix ein komplexes Ordnungssystem, welches die genetische Information zu einer kompakten Form komprimiert (Pommier, 2013). Prozesse wie die Replikation oder Transkription erfordern jedoch den Zugang zu einzelnen DNA-Segmenten und damit die kurzzeitige Auflösung des komprimierten Zustandes. Durch Trennung der DNA-Stränge im Zuge dieser Prozesse wird an beiden Enden des DNA-Segmentes eine Superspiralisierung erzeugt, welche die weitere Strangtrennung blockiert und den Stillstand der Polymerasen bewirkt (Vos et al., 2011). Topoisomerasen sind essentielle, zelluläre Enzyme, welche die entstehenden Torsionsspannungen aufheben, indem sie kovalent an die DNA binden und damit transiente DNA-Strangbrüche einführen. Dies ermöglicht die Rotation eines Stranges der Helix um den anderen sowie das Durchführen eines DNA-Segmentes durch ein zweites (Champoux, 2001).

#### **2.1.1. Klassifizierung**

Topoisomerasen sind an nahezu allen Vorgängen, die im Zusammenhang mit der DNA stehen, beteiligt (Nitiss, 2009b). Als gemeinsames Charakteristikum bilden sie durch eine Umesterungsreaktion kovalente Enzym-DNA-Intermediate, wobei der Tyrosinrest im aktiven Zentrum der Topoisomerase als Nukleophil an das Zuckerphosphat-Rückgrat der DNA bindet (Champoux, 2001). Basierend auf ihrem Reaktionsmechanismus lassen sich Topoisomerasen in drei Klassen unterteilen, die in Tabelle 2.1 zusammengefasst sind.

**Tabelle 2.1:** Unterschiede im katalytischen Mechanismus von humanen Topoisomerasen und die damit verbundene Einteilung in verschiedene Klassen; modifiziert nach (Pommier, 2013). PY: Phosphotyrosin-Bindung; mt: mitochondrial.

| Typ | DNA-Bindung | Mechanismus                                            | Protein                       | Klinischer Einsatz |
|-----|-------------|--------------------------------------------------------|-------------------------------|--------------------|
| IA  | 5'-PY       | Passage eines DNA-Segments durch ein zweites           | Top3 $\alpha$<br>Top3 $\beta$ | keine              |
| IB  | 3'-PY       | Rotation eines Stranges um den zweiten                 | Top1<br>Top1mt                |                    |
| IIA | 5'-PY       | Passage eines DNA-Segments durch ein zweites<br>ATPase | Top2 $\alpha$<br>Top2 $\beta$ | Chemotherapeutika  |

Während Typ I-Enzyme als Monomere kurzzeitig Einzelstrangbrüche in die DNA einführen, bilden Typ II-Enzyme Homodimere aus, wodurch in einer konzertierten Reaktion beide Stränge der DNA-Doppelhelix mit einem Überhang von 4 Basen am 5'-Ende geschnitten werden (Pommier et al., 2010; Wang, 1996). Topoisomerasen des Typs IA bzw. IIA binden über den Tyrosinrest im aktiven Zentrum an das 5'-Ende der DNA, wobei Enzyme des Typs IB eine 3'-Phosphotyrosin-Bindung ausbilden. Da in der vorliegenden Arbeit die Untersuchungen zur Topoisomerase II im Vordergrund standen, wird im Folgenden ausschließlich auf die Isoformen dieses Enzyms näher eingegangen.

### 2.1.2. Topoisomerase II

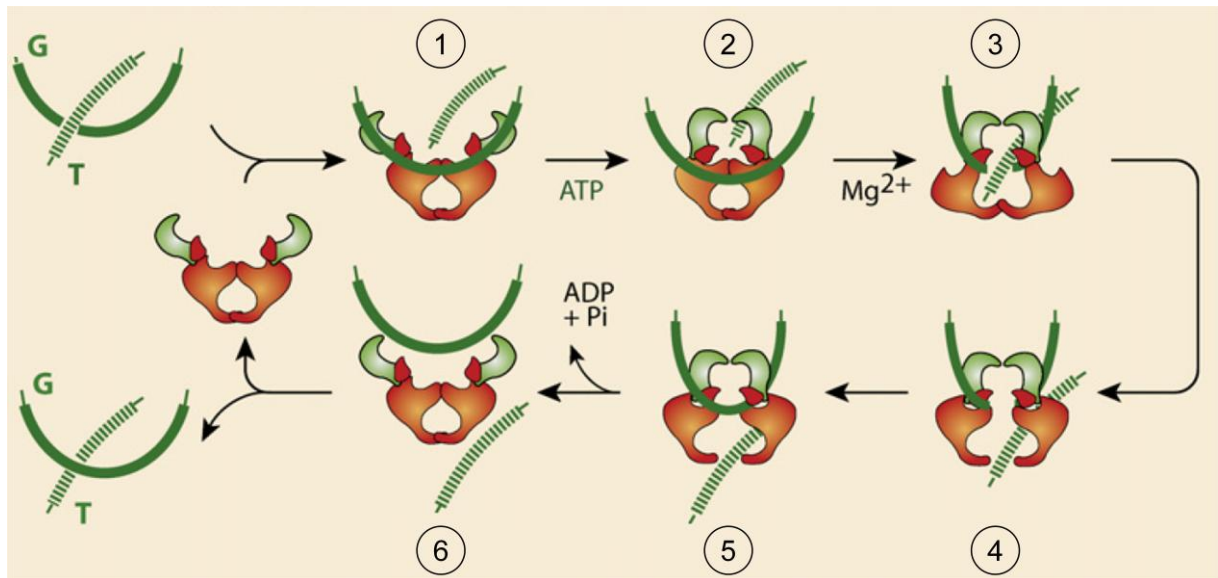
Topoisomerase II-Enzyme benötigen für ihre Katalyse neben ATP auch divalente Metallionen als Cofaktoren und binden bevorzugt an DNA-Regionen, an denen die DNA-Helices gekreuzt vorliegen (Deweese und Osheroff, 2009; Pommier et al., 2010). Bislang konnten zwei Isoformen, Topoisomerase II $\alpha$  und II $\beta$ , in humanen Zellen nachgewiesen werden, die sich hinsichtlich ihrer Funktion und Expression unterscheiden (Wang, 1996).

#### 2.1.2.1. Aufbau und Mechanismus

Topoisomerase II $\alpha$  und II $\beta$  weisen trotz ihrer Codierung auf unterschiedlichen Genen eine hohe Homologie in ihren Aminosäuresequenzen auf und unterscheiden sich nur geringfügig im Molekulargewicht ihrer Protomere (170 kDa bzw. 180 kDa) (Deweese und Osheroff, 2009; Tsai-Pflugfelder et al., 1988). Die Sequenz der Topoisomerase II-Enzyme lässt sich in drei Domänen einteilen, wobei das aktive Zentrum mit dem für die katalytische Reaktion

essentiellen Tyrosinrest (Tyr<sup>805</sup>: Topoisomerase II $\alpha$ ; Tyr<sup>821</sup>: Topoisomerase II $\beta$ ) in der mittleren Domäne lokalisiert ist (Champoux, 2001).

Der katalytische Mechanismus humaner Topoisomerase II kann in insgesamt sechs Schritte unterteilt werden und ist in Abbildung 2.1 dargestellt.



**Abb. 2.1:** Mechanismus der katalytischen Topoisomerase II-Reaktion. G: ‚Gate‘-Segment; T: ‚Transport‘-Segment; modifiziert nach (Pommier et al., 2010).

Nach Anlagerung des Homodimers an zwei DNA-Segmente und anschließender ATP-Bindung greifen die beiden Tyrosinreste des Enzyms am DNA-Rückgrat eines Segments an, wodurch kovalente Topoisomerase II-DNA-Intermediate, sogenannte ‚*Cleavage Komplexe*‘, gebildet werden. Dabei wird ein transients DNA-Doppelstrangbruch in das ‚Gate‘-Segment eingeführt (Abbildung 2.1, Nr. 3). In der Folge wird der zweite DNA-Strang (Transport-Segment) durch den DNA-Doppelstrangbruch des Gate-Segments geführt und es erfolgt die Religation des DNA-Strangbruchs. Unter Abspaltung von ADP werden das Transport-Segment wie auch das Gate-Segment aus der Umklammerung des Enzyms entlassen. Dadurch steht das Enzym für einen weiteren katalytischen Zyklus bereit (Berger und Wang, 1996; Champoux, 2001; Fortune und Osheroff, 2000).

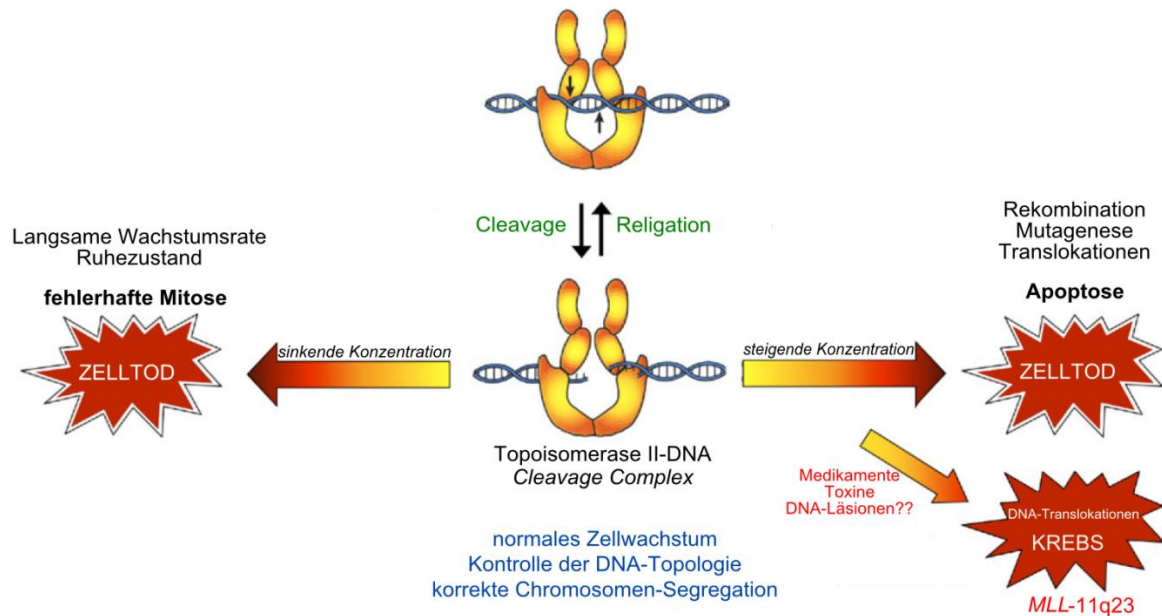
### 2.1.2.2. Expression und Funktion der Topoisomerase II-Isoformen

Topoisomerase II $\alpha$  ist für die Viabilität sich teilender Zellen essentiell, da diese Isoform mit der Replikationsgabel assoziiert und während der Mitose, insbesondere bei der Segregation der Tochterchromatiden, eine wichtige Rolle spielt (Nitiss, 2009a). Über die physiologischen Funktionen von Topoisomerase II $\beta$  ist bislang wenig bekannt, unter anderem wird eine

Beteiligung dieser Isoform an der Transkription hormonell regulierter Gene (Ju et al., 2006a) sowie von Genen der rRNA diskutiert (Danks et al., 1994). Die katalytische Aktivität von Topoisomerase II-Enzymen trägt darüber hinaus zur korrekten Faltung und Trennung der mitotischen Chromosomen bei. Da diese Enzyme im Chromatin-Metabolismus von Bedeutung sind, liegt die Vermutung nahe, dass ihre Aktivität je nach zellulärem Proliferationsstatus und Zellzyklus-Stadium variiert (Poot et al., 1995). Dementsprechend wird das II $\alpha$ -Isoenzym zellzyklusabhängig exprimiert und erreicht ein Maximum während der späten G<sub>2</sub>/M-Phase (Champoux, 2001; Deweese und Osheroff, 2009). Topoisomerase II $\beta$  hingegen wird konstitutiv während des Zellzyklus exprimiert, ist unabhängig vom Proliferations-Zustand der Zelle und wird für die neuronale Entwicklung benötigt (McClendon und Osheroff, 2007; Yang et al., 2000).

### 2.1.3. Hemmung humaner Topoisomerase II

Obwohl Topoisomerasen essentielle Enzyme sind, die für das Zellüberleben unabdingbar sind, bergen diese Enzyme gleichzeitig ein für die Zelle letales Potential in sich (Abbildung 2.2). Durch Überführen der transienten DNA-Strangbrüche in permanente DNA-Schäden können zytotoxische Effekte und chromosomale Translokationen entstehen (Fortune und Osheroff, 2000; McClendon und Osheroff, 2007; Wilstermann und Osheroff, 2003). Daher sind die zellulären Konzentrationen der kovalenten Topoisomerase-DNA-Intermediate strikt reguliert. Substanzen, die in diese fein abgestimmte Balance zwischen notwendiger und schädlicher Konzentration an DNA-gebundener Topoisomerase eingreifen, können dieses essentielle Enzym in ein zelluläres Gift umwandeln (McClendon und Osheroff, 2007).

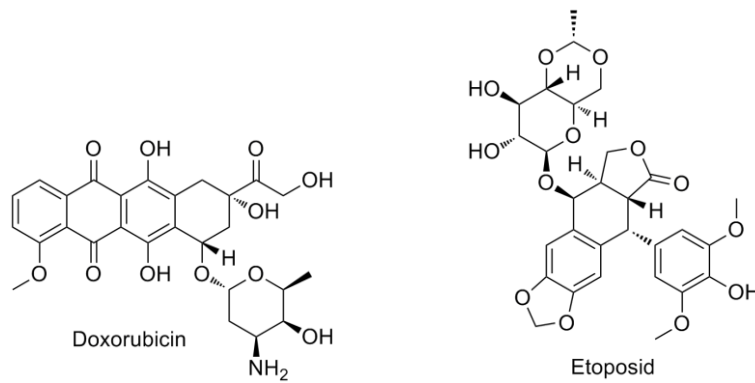


**Abb. 2.2:** Topoisomerase II als essentielles Enzym mit genotoxischem Potential; modifiziert nach (Deweese und Osheroff, 2009).

Anhand ihres Wirkmechanismus werden Verbindungen, die mit humanen Topoisomerasen interferieren, in katalytische Topoisomerase-Hemmstoffe und Topoisomerase-Gifte unterteilt (Pommier et al., 1998).

#### 2.1.3.1. Topoisomerase-Gifte

Topoisomerase-Gifte bewirken eine Erhöhung der Menge kovalenter Topoisomerase-DNA-Komplexe. Dabei kann die Zunahme der Intermediate über die Hemmung der DNA-Religation erfolgen oder über die beschleunigte Komplex-Bildung (Fortune und Osheroff, 2000). Zu den Topoisomerase II-Giften zählen Anthracycline wie Doxorubicin und Daunorubicin, Podophyllotoxine wie Etoposid und Teniposid, Aminoacridine wie *m*-AMSA sowie Chinolone wie Norfloxacin (Nitiss, 2009b; Pommier et al., 2010). Die Strukturen der in dieser Arbeit eingesetzten Topoisomerase II-Gifte sind in Abbildung 2.3 dargestellt.



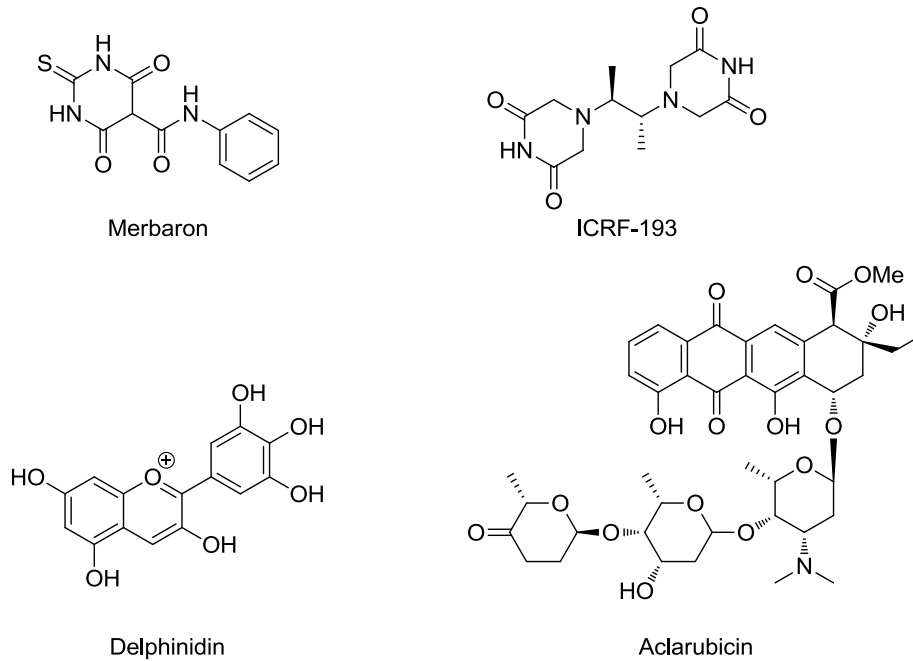
**Abb. 2.3:** Strukturen der Topoisomerase II-Gifte Doxorubicin und Etoposid.

Diese Agentien wirken letal für die Zelle, indem sie unphysiologisch hohe Konzentrationen der kovalenten Topoisomerase-DNA-Komplexe induzieren. Dies hat zur Folge, dass die transienten DNA-Strangbrüche durch Kollision mit Helikasen, dem Transkriptionsapparat oder der Replikationsgabel in permanente DNA-Schäden überführt werden können, wodurch bei gleichzeitig fehlerhafter DNA-Reparatur Insertionen, Deletionen, Translokationen oder chromosomale Aberrationen resultieren (Holden, 2001; Nitiss, 2009b). Dabei weisen Topoisomerase-Gifte Unterschiede in ihrer Bindungsstärke und -kinetik und somit auch in ihrer Topoisomerase-vermittelten genotoxischen Wirkung auf (Kalfalah et al., 2011; Pommier et al., 2010).

Über die Reparatur der induzierten Enzym-DNA-Komplexe ist bislang wenig bekannt. Es wird vermutet, dass ein proteasomaler Abbau der kovalent gebundenen Topoisomerase erfolgen muss, um DNA-Reparaturenzymen den Zugang zum DNA-Strangbruch zu ermöglichen (Zhang et al., 2006). Darüber hinaus kann die Tyrosin-DNA-Bindung von Phosphodiesterasen oder Endonukleasen getrennt werden (Pommier, 2013).

#### 2.1.3.2. Katalytische Hemmstoffe

Katalytische Topoisomerase-Hemmstoffe verringern die Enzymaktivität an einer Stelle des katalytischen Zyklus, an dem beide DNA-Stränge intakt vorliegen. Dementsprechend können diese Hemmstoffe die Bindung zwischen DNA und Enzym verhindern, die ATP-Bindung oder –Hydrolyse unterbinden oder die Dissoziation von ADP blockieren (Larsen et al., 2003). Diese Hemmstoffe wirken vermutlich antiproliferativ, indem sie der Zelle die essentielle Enzymaktivität der Topoisomerasen entziehen (Nitiss, 2009b). Katalytische Topoisomerase-Hemmstoffe umfassen eine heterogene Gruppe an Verbindungen, von denen einige Strukturen in Abbildung 2.4 abgebildet sind.



**Abb. 2.4:** Strukturen katalytischer Topoisomerase-Hemmstoffe.

Katalytische Topoisomerase-Hemmstoffe werden in der Medizin eingesetzt, da sie die Nebenwirkungen der Topoisomerase-Gifte, insbesondere die Kardiotoxizität der Anthracycline, mindern sowie zur Prävention von Resistenzentwicklungen gegenüber den als Chemotherapeutika eingesetzten Topoisomerase-Giften beitragen (Andoh und Ishida, 1998; Bailly, 2012).

### 2.1.3.3. Zelluläre Antwort

Da die Funktion von Topoisomerase II-Enzymen insbesondere während der Replikation und Mitose essentiell ist, liegt die Vermutung nahe, dass eine Hemmung dieser Enzyme Auswirkungen auf den Zellzyklus hat. So resultiert eine Topoisomerase-Hemmung aufgrund der bei der Replikation auftretenden Torsionsspannungen in einer Verzögerung des Übergangs der Zellen von der S- in die G<sub>2</sub>-Phase, in der die Zellen schließlich arretiert werden. Der Arrest in der G<sub>2</sub>/M-Phase des Zellzyklus beruht vermutlich auf der Aktivierung des G<sub>2</sub>-Kontrollpunktes, der nach Erkennung der DNA-Schäden die Reparatur vor Eintritt der Zelle in die Mitose-Phase erlaubt (Kallio und Lahdetie, 1997). Eine Interaktion der Topoisomerasen mit entsprechenden Hemmstoffen während der M-Phase führt aufgrund der Interferenz mit der Chromosomen-Segregation zu einer Blockierung der Zellen in der Metaphase, in deren Folge Polyploidien entstehen können (Downes et al., 1991).

Da Topoisomerase-Gifte das Potential besitzen permanente DNA-Strangbrüche zu generieren, kann der Zellzyklus auch durch die auftretenden DNA-Schäden beeinflusst werden. Beim

Durchlaufen des Zellzyklus wird die Integrität der DNA an drei Kontrollpunkten überprüft. Während durch den Restriktionspunkt das Wachstum der Zelle in der G<sub>1</sub>-Phase arretiert wird, wird durch den Kontrollpunkt in der S-Phase der Übergang zur G<sub>2</sub>-Phase verzögert. Der Kontrollpunkt in der G<sub>2</sub>-Phase schließlich verhindert den Eintritt der Zelle in die Mitose-Phase. Aufgrund ihrer DNA-schädigenden Wirkung können Topoisomerase-Gifte eine Arretierung der Zelle an allen drei Kontrollpunkten verursachen (Kaufmann, 1998).

Topoisomerase-Hemmstoffe zählen zu den wichtigsten Induktoren der Apoptose. So führt die Topoisomerase-vermittelte DNA-Schädigung durch Freisetzung pro-apoptotischer Signalmoleküle aus den Mitochondrien zur Aktivierung von Caspasen (*cysteiny-l-aspartate specific protease*). Weiterhin wird eine Beteiligung des Todesrezeptors Fas an der apoptotischen Antwort diskutiert, die jedoch bislang nicht ausreichend belegt ist. Als initialer Prozess nach Topoisomerase-vermittelter DNA-Schädigung werden die DNA-abhängige Proteinkinase (DNA-PK), die ‚*ataxia telangiectasia mutated*‘ Kinase (ATM) sowie die ‚*ataxia telangiectasia and Rad3-related protein*‘ Kinase (ATR) rekrutiert, die die Enden des DNA-Strangbruchs flankieren. Diese Kinasen fungieren als „DNA-Sensoren“ und phosphorylieren nach entsprechender Aktivierung zahlreiche Substrate wie die Tyrosinkinase ABL1 (*Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1*, c-Abl) und die Checkpoint Kinase 2 (Chk2). Während c-Abl die Induktion pro-apoptotischer Signalwege mit gleichzeitiger Hemmung anti-apoptotischer Stimuli bewirkt, führt Chk2 neben einer Arretierung des Zellzyklus ebenfalls über Aktivierung von p53 zur Einleitung apoptotischer Prozesse (Sordet et al., 2003).

#### 2.1.4. Topoisomerase-Gifte in der Chemotherapie

Aufgrund ihrer zytostatischen Wirkung werden mehrere Topoisomerase-Gifte in der Chemotherapie eingesetzt. Neben Etoposid, Doxorubicin und Teniposid, die Topoisomerase II als Zielenzym hemmen, finden auch verschiedene Topoisomerase I-Gifte wie Irinotecan klinischen Einsatz (Pommier, 2006). Die Sensitivität gegenüber Topoisomerase-Giften ist dabei vom zellulären Enzym-Gehalt abhängig. Dementsprechend steigt ihre DNA-schädigende Wirkung mit zunehmender Topoisomerase-Konzentration an (Holden, 2001). Da Topoisomerasen in schnell proliferierenden Zellen verstärkt exprimiert werden, sprechen insbesondere Tumorzellen auf die Topoisomerase-giftende Wirkung an. Dies erklärt zudem die größere Effizienz der in der Chemotherapie eingesetzten Topoisomerase-Gifte bei aggressiv wachsenden Tumoren (Pommier, 1993). Der Einsatz der

Topoisomerase-Gifte als Chemotherapeutika ist jedoch aufgrund ihrer geringen Selektivität begrenzt, da auch in gesunden Zellen eine Topoisomerase-Hemmung resultiert, wovon besonders die schnell proliferierenden Darmzellen und Vorläuferzellen des Knochenmarks betroffen sind (Pommier, 2013).

Katalytische Topoisomerase-Hemmstoffe hingegen entfalten ihre antineoplastische Wirkung, indem sie der Zelle durch Unterdrückung der Enzymaktivität die Fähigkeit entziehen, die Chromosomen vor der Mitose zu dekatenieren, was in einem verminderten Zellwachstum resultiert (Larsen et al., 2003). Entgegen den Topoisomerase-Giften ist die Wirkung der katalytischen Topoisomerase-Hemmstoffe reversibel und Zellen mit geringer Topoisomerase-Konzentration reagieren sensibler auf die Hemmung der katalytischen Enzymaktivität als Zellen mit hohen Konzentrationen (Holden, 2001). Derzeit finden hauptsächlich die katalytischen Topoisomerase-Hemmstoff Aclarubicin sowie die Bisdioxopiperazine klinische Verwendung, da sie die Kardiotoxizität der Anthracycline verringern (Nitiss, 2009b).

### 2.1.5. Topoisomerase II und Leukämie

Trotz der Bedeutung, die Topoisomerase-Hemmstoffe in der Chemotherapie erlangt haben, konnte inzwischen nachgewiesen werden, dass durch die Behandlung mit Topoisomerase-Giften chromosomale Translokationen entstehen, die zur Entwicklung sekundärer Leukämien führen können (Deweese und Osheroff, 2009). So entwickeln 2-3% der mit Topoisomerase-Giften wie Etoposid behandelten Patienten akute myeloische Leukämien (AML). Diesen Leukämien liegen Translokationen im *mixed lineage leukemia (MLL)*-Gen auf Chromosom 11q23 zugrunde. *MLL* codiert für eine Histonmethyltransferase, welche an der Regulation der *Hox*-Gene beteiligt ist, die eine Rolle in der Zellproliferation hämatopoetischer Zellen spielen (Felix, 2001; Felix et al., 2006). Auch die Entwicklung akuter Promyelozytenleukämien (APL) wird in Zusammenhang mit Topoisomerase-gerichteten Agentien gebracht (Deweese und Osheroff, 2009). Dabei scheint besonders die Topoisomerase II $\beta$ -Isoform für diese adversen Effekte verantwortlich zu sein (Azarova et al., 2010; Pommier, 2013).

Neben den Behandlungs-assoziierten Leukämien sind bei ungefähr 80% der Kinder mit AML oder akuter lymphoblastischer Leukämie (ALL) Translokationen im *MLL*-Gen involviert (Felix et al., 2006). Die chromosomalen Translokationen konnten bereits *in utero* nachgewiesen werden, was nahelegt, dass die kindlichen Leukämien während der Schwangerschaft initiiert werden. Epidemiologische Studien legen zudem nahe, dass das

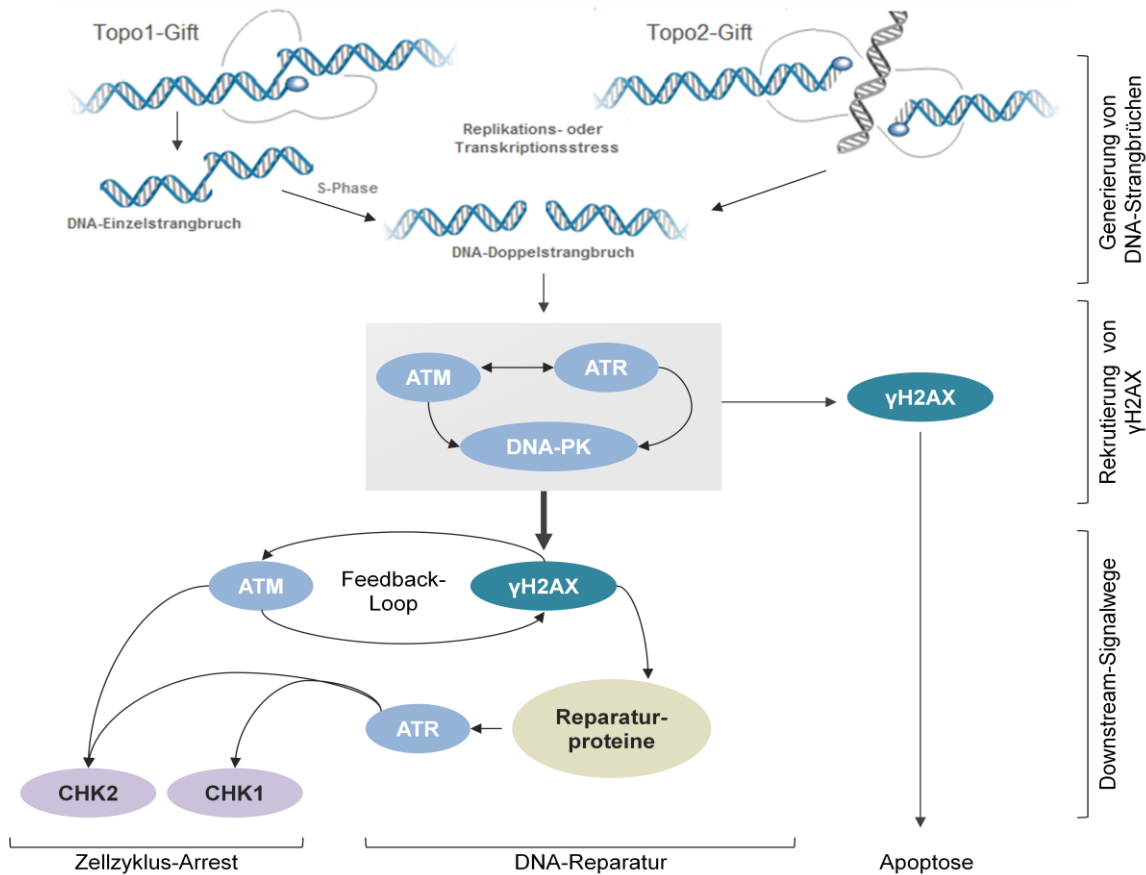
Risiko der Erkrankung an AML oder ALL um mehr als das Dreifache ansteigt, wenn die Ernährung der Mütter reich an natürlich vorkommenden Topoisomerase-Giften, wie beispielsweise Genistein, ist (Ross, 2000; Ross et al., 1994; Strick et al., 2000).

Ob Topoisomerase II-Gifte zur Krebsentstehung beitragen, wie im Falle der Entwicklung von Leukämien, oder ob sie als Chemotherapeutika eine Hemmung des Tumorwachstums bewirken, ist vermutlich von der zellulären Konzentration an kovalenten Topoisomerase-DNA-Komplexen abhängig. So könnten in Konzentrationen, welche die Kapazität einer effektiven DNA-Rekombination oder Reparatur übersteigen, eine zytotoxische Wirkung der Topoisomerase-Gifte resultieren, die in der Krebstherapie genutzt wird. Im Gegensatz dazu könnten niedrige Konzentrationen an DNA-Strangbrüchen, die nicht ausreichen, um den Zelltod einzuleiten, mit der Bildung chromosomaler Translokationen einhergehen, die schließlich zur Krebsentstehung führen können (Deweese und Osheroff, 2009; McClendon und Osheroff, 2007).

## 2.2. DNA-Integrität

DNA-Strangbrüche stellen schwerwiegende zelluläre Läsionen dar, die zur Instabilität des Genoms führen und schließlich Krebs verursachen können. Daher sind die Erkennung von DNA-Schäden und die Initiation der DNA-Reparatur für den Erhalt der DNA-Integrität von essentieller Bedeutung (Bonner et al., 2008). Diese Prozesse sind eng mit der Regulation des Zellzyklus verbunden, da durch eine Arretierung des Zellzyklus die Zeit für eine vollständige Reparatur des DNA-Schadens geschaffen wird. DNA-Strangbrüche können durch verschiedene Faktoren entstehen. So können reaktive Sauerstoffspezies (ROS), metabolische Prozesse, eine fehlerhafte DNA-Reparatur oder aber eine direkte Interaktion mit Xenobiotika DNA-Schäden hervorrufen (Hawkins et al., 2011; McKinnon und Caldecott, 2007).

Die geschätzte Induktion von bis zu zehntausend DNA-Schäden pro Zelle und Tag lässt die Notwendigkeit einer effizienten Detektion dieser Schäden mit nachfolgender Reparatur erkennen (McKinnon und Caldecott, 2007). Das Histon H2AX nimmt bei der DNA-Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen eine Schlüsselposition ein (Abbildung 2.5). H2AX wird dabei vornehmlich durch die drei Kinasen ATM, ATR und DNA-PK phosphoryliert (Sedelnikova et al., 2003), wonach sich das phosphorylierte  $\gamma$ H2AX an die naszierenden DNA-Enden anlagert. Durch Akkumulation bilden sich  $\gamma$ H2AX-Foci, die den DNA-Strangbruch flankieren und eine Anlagerung weiterer DNA-Reparaturproteine ermöglichen. Die zentrale Bedeutung von  $\gamma$ H2AX in der Erkennung von DNA-Doppelstrangbrüchen sowie die sich daraus ableitenden zellulären Antworten sind in Abbildung 2.5 am Beispiel der Topoisomerase-vermittelten DNA-Schädigung schematisch dargestellt.



**Abb. 2.5:** Zelluläre Antwort auf Topoisomerase-vermittelte DNA-Strangbrüche; modifiziert nach (Bonner et al., 2008). ATM: *ataxia telangiectasia mutated* Kinase; ATR: *ataxia telangiectasia and Rad2-related protein* Kinase; DNA-PK: DNA-abhängige Proteinkinase; CHK1: Checkpoint Kinase 1; CHK2: Checkpoint Kinase 2.

ATM wird durch  $\gamma$ H2AX-Foci über einen Feedback-Loop beständig phosphoryliert und aktiviert in der Folge Chk2, was eine Arretierung des Zellzyklus hervorruft (Bonner et al., 2008). ATR hingegen wird durch die sich an die Foci anlagernden DNA-Reparaturproteine rekrutiert und vermittelt einen Zellzyklus-Arrest durch Aktivierung von Chk1 und Chk2 (Podhorecka et al., 2010).

Die Phosphorylierung von H2AX spielt darüber hinaus auch in der frühen extrinsischen Apoptose eine Rolle. Durch Bindung von Liganden an die Todesrezeptoren wird  $\gamma$ H2AX umgehend in die Kernhülle rekrutiert, was zur Bildung eines sogenannten „apoptotischen Ringes“ führt. Dabei trägt vorrangig die DNA-PK als Effektorkinase zur apoptotischen Phosphorylierung von H2AX bei. Die apoptotische Rekrutierung von  $\gamma$ H2AX in die Kernhülle lässt sich anhand der damit verbundenen Ringbildung eindeutig von den  $\gamma$ H2AX-Foci infolge von DNA-Schäden unterscheiden (Solier und Pommier, 2009).

### 2.3. Oxidativer Stress

Oxidativer Stress bezeichnet die Verschiebung des Gleichgewichts zwischen reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und dem antioxidativen Abwehrsystem zugunsten der Oxidantien (Sies, 1993). Durch ROS können Makromoleküle wie die DNA, Proteine und Lipide geschädigt werden, was mit der Entstehung zahlreicher Erkrankungen, darunter Diabetes oder Arteriosklerose, in Zusammenhang gebracht wird. Oxidativer Stress trägt vermutlich zu pathobiochemisch relevanten Einzelphänomenen bei, jedoch ist eine ursächliche Wirkung für Erkrankungen derzeit nicht ausreichend belegt. Dennoch mehren sich die Hinweise, dass eine verstärkte Bildung von ROS und reaktiven Stickstoffspezies (RNS) die Krebsentstehung fördert (Kedzierska und Olas, 2012). Zahlreiche Xenobiotika führen durch Erhöhung des intrazellulären ROS- oder RNS-Gehaltes zu oxidativem Stress. Außerdem können sich durch eine Verminderung der antioxidativen Kapazität oder der DNA-Reparatur oxidative Schäden in der Zelle manifestieren (Klaunig et al., 2011).

#### 2.3.1. Reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies

Sowohl endogene als auch exogene Faktoren können eine Zunahme der freien Radikale in der Zelle bedingen. Zu den exogenen Noxen zählen neben ionisierender Strahlung auch Metallionen sowie zahlreiche Xenobiotika, die entweder durch den Stoffwechsel zu radikalen Intermediaten umgesetzt werden oder die endogene ROS-Bildung aktivieren (Klaunig et al., 2011). Im Organismus entstehen ROS in den Mitochondrien während der oxidativen Phosphorylierung als Teil der Atmungskette. Zudem werden in den Peroxisomen beim oxidativen Abbau verschiedener Biomoleküle ROS, vornehmlich in Form von Wasserstoffperoxid und Superoxid, generiert. Darüber hinaus werden ROS über die NADPH-Oxidase in inflammatorischen Zellen gebildet, wo ihnen eine wichtige Rolle in der Bekämpfung von Viren und Bakterien zukommt (Klaunig et al., 2011). Neben ROS können auch RNS in der Zelle entstehen, die ursächlich für nitrosativen Stress sind, der analog zu oxidativem Stress mit zahlreichen Erkrankungen assoziiert wird.

Zu den ROS zählen neben freien Radikalen auch Oxidantien wie Wasserstoffperoxid und Singulett-Sauerstoff, während Stickstoffmonoxid und sein Folgeprodukt Peroxynitrit die wichtigsten Vertreter der RNS darstellen (Chen et al., 2013). ROS und RNS unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Stabilität und somit auch in ihrem Diffusionsradius. Dementsprechend sind der Ort und Zeitverlauf ihrer Bildung entscheidend für die bevorzugt angegriffenen

Zielstrukturen. Tabelle 2.2 gibt einen Überblick über intrazellulär gebildete ROS und RNS und ihre geschätzte Halbwertszeit.

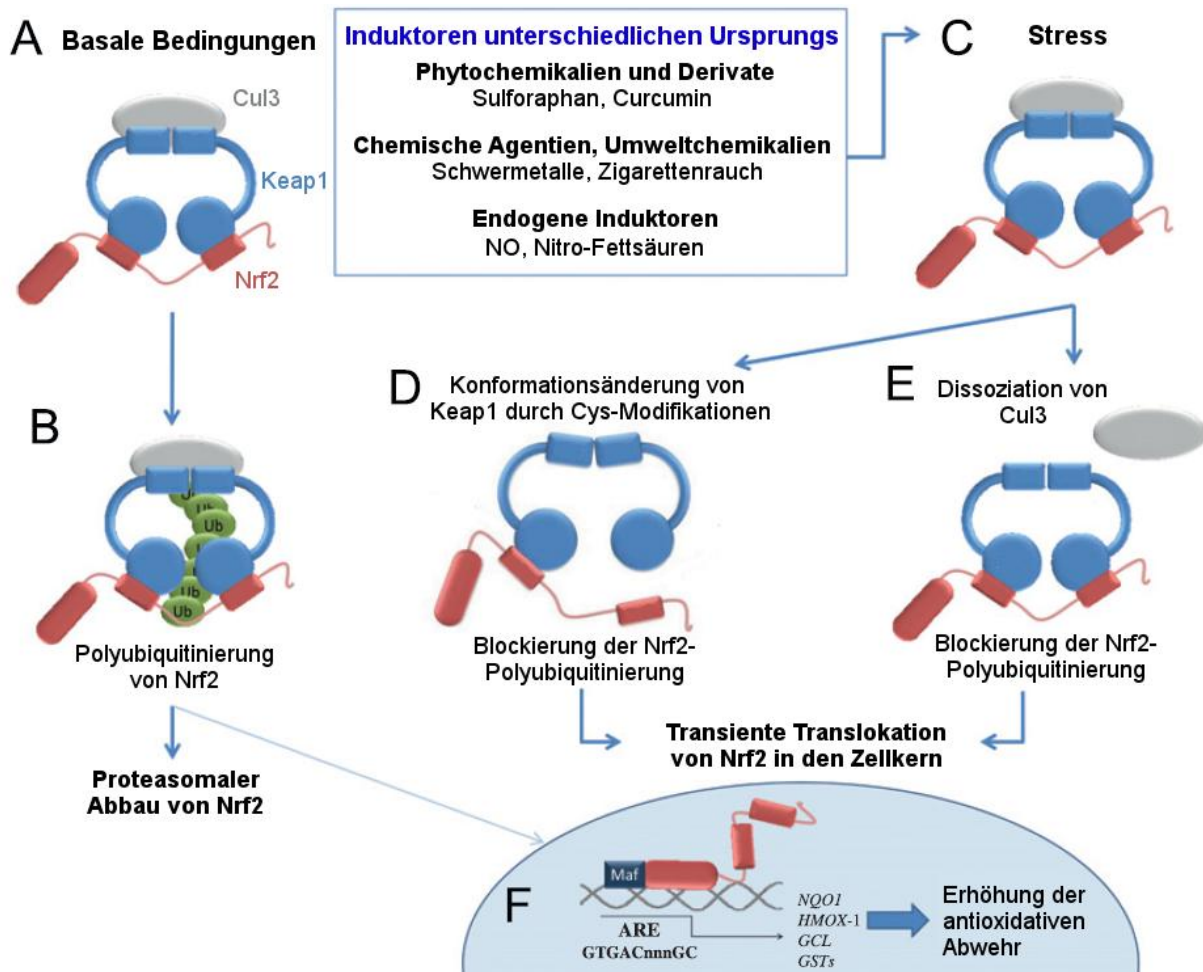
**Tabelle 2.2:** Geschätzte Lebensdauer von ROS und RNS (Sies, 1993).

| Reaktive Spezies                                      | Halbwertszeit [s]   |
|-------------------------------------------------------|---------------------|
| HO <sup>•</sup> , Hydroxylradikal                     | 10 <sup>-9</sup>    |
| RO <sup>•</sup> , Alkoxyradikal                       | 10 <sup>-6</sup>    |
| ROO <sup>•</sup> , Peroxylradikal                     | 7                   |
| Q <sup>•</sup> , Semichinon-Radikal                   | Tage                |
| O <sub>2</sub> <sup>-•</sup> , Superoxidanion-Radikal | enzymatischer Abbau |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , Wasserstoffperoxid    | enzymatischer Abbau |
| <sup>1</sup> O <sub>2</sub> , Singulett-Sauerstoff    | 10 <sup>-6</sup>    |
| NO <sup>•</sup> , Stickstoffmonoxid-Radikal           | 1-10                |
| ONOO <sup>-</sup> , Peroxynitrit                      | 0,05-1              |

Neben der vermehrten Bildung von ROS kann auch die Depletion von Antioxidantien oxidativen Stress hervorrufen. Zu den zellulären Antioxidantien zählen Glutathion, Thiole, Vitamin C und E, aber auch Enzyme wie Superoxiddismutasen, Peroxidasen, Reduktasen und diverse Phase I- und Phase II-Enzyme (Sies, 1993).

### 2.3.2. Nrf2-Signalweg

ROS können als Signalmoleküle auch zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren führen, wobei die Modulation des ‚*nuclear factor erythroid 2-related factor 2*‘ (Nrf2)-Signalwegs von besonderer Bedeutung ist (Klaunig et al., 2011). Unter physiologischen Bedingungen ist Nrf2 an das zytosolische Repressorprotein Keap1 (*Kelch-like ECH associating protein 1*) gebunden, das den proteasomalen Abbau von Nrf2 über die Cullin 3 (Cul-3)-basierte E3-Ligase vermittelt. Verschiedene Stressfaktoren bewirken mittels Konformationsänderung von Keap1 die Dissoziation des Keap1-Nrf2-Komplexes, wodurch freies Nrf2 im Zytoplasma akkumuliert und infolgedessen vermehrt in den Zellkern translozieren kann (Li und Kong, 2009). Im Zellkern bildet Nrf2 Heterodimere mit Mitgliedern der Maf-Familie, die an das antioxidativ responsive Element (ARE) binden, was zur transkriptionellen Expression ARE-regulierter Gene führt (Kansanen et al., 2013; Nguyen et al., 2009; Sporn und Liby, 2012). Abbildung 2.6 gibt einen Überblick über die Aktivierung des Nrf2-Keap1-Signalwegs.



**Abb. 2.6:** Der Nrf2-Keap1-Signalweg unter (A) basalen Bedingungen bzw. (B) nach Einwirkung von Stressfaktoren (Kansanen et al., 2013). Nrf2 (rot): *nuclear factor erythroid 2p45-related factor 2*; Keap1 (blau): *Kelch-like ECH associating protein*; Maf: Makrophagen-aktivierender Faktor; ARE: antioxidativ responsives Element; NQO1: NAD(P)H-Chinon-Oxidoreduktase-1; HMOX-1: Hämoxxygenase-1; GCL: Glutamylcysteinilgase; GSTs: Glutathion-S-Transferasen.

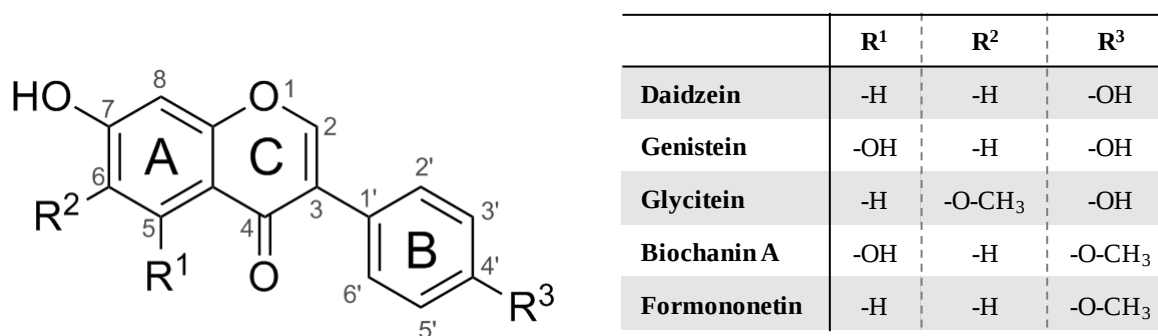
Zu den Aktivatoren des Nrf2-Signalweges zählen neben ROS, RNS und Lipidaldehyden auch elektrophile Xenobiotika wie Sulforaphan (Osburn und Kensler, 2008). Dabei können drei voneinander unabhängige Mechanismen zur Freisetzung von Nrf2 führen. Zum einen kann die Modulation von Cystein-Resten des Keap1 eine Konformationsänderung des Proteins hervorrufen, in deren Folge Nrf2 freigesetzt wird. Zum anderen führt die Abspaltung der Cul3-Ligase von Keap1 und die damit verbundene Blockierung des proteasomalen Abbaus zur verstärkten Freisetzung des Transkriptionsfaktors Nrf2. Weiterhin bewirkt die Phosphorylierung des Nrf2-Proteins durch Proteinkinase-Signalwege die Dissoziation des Keap1-Nrf2-Komplexes (Nguyen et al., 2009; Osburn und Kensler, 2008).

Durch die Aktivierung des Nrf2-Signalwegs wird die Transkription zahlreicher protektiver Enzyme induziert, die wichtige Funktionen im antioxidativen Abwehrsystem der Zelle sowie in der Detoxifikation von Xenobiotika einnehmen. Insbesondere antioxidativ wirksame

Enzyme wie die Glutathion-Reduktase, Katalase, Superoxiddismutase und Glutathion-Peroxidase werden infolge der ARE-Aktivierung gebildet (Nguyen et al., 2003). Eine Absenkung der Nrf2-Konzentration sowie ein Verlust der Nrf2-Aktivität sind mit einer erhöhten ROS-Bildung und DNA-Schädigung verbunden, wodurch kanzerogene Prozesse gefördert werden können. Aktuelle Studien zeigten allerdings auch, dass eine erhöhte Nrf2-Aktivität durch Induktion von Genen, die das Überleben und Wachstum von Krebszellen fördern, zur Krebsentstehung beitragen könnte (Klaunig et al., 2011; Rushworth und MacEwan, 2011; Sporn und Liby, 2012).

## 2.4. Isoflavone

Epidemiologische Studien zeigten, dass bei asiatischen Bevölkerungsgruppen eine geringere Inzidenz an kardiovaskulären Krankheiten, Osteoporose sowie Kolon-, Brust und Prostatakrebs zu beobachten ist als bei der Bevölkerung westlicher Industrieländer (Adlercreutz et al., 2004; Wuttke et al., 2007). Diese Unterschiede werden in Zusammenhang mit der asiatischen Ernährungsweise gebracht, die im Gegensatz zu den westlichen Ländern Soja und Soja-basierte Produkte als wesentliche Bestandteile enthält (Messina und Bennink, 1998). Die Aufmerksamkeit fokussierte sich zunehmend auf die in Soja enthaltenen Isoflavone als biologisch aktive Komponenten. Isoflavone sind Polyphenole, die zur Gruppe der Flavonoide gehören. Neben Genistein und Daidzein zählen Glycitein, Formononetin und Biochanin A zu den wichtigsten Vertretern dieser Substanzklasse. Die den Isoflavonen zugrundeliegende Flavon-Struktur ist in Abbildung 2.7 dargestellt.



**Abb. 2.7:** Chemische Grundstruktur der Isoflavone mit den Substitutionsmustern der wichtigsten Vertreter dieser Substanzklasse.

### 2.4.1. Vorkommen und Gehalte

Isoflavone sind vor allem in Pflanzen der Familie der *Fabaceae* in nennenswerten Konzentrationen enthalten (Botta et al., 2009). So stellen Hülsenfrüchte wie Soja, Erbsen und Erdnüsse, aber auch Rotklee reichhaltige Quellen für Isoflavone dar (Eisenbrand, 2007; Mazur, 1998). In Sojabohnen treten im Wesentlichen Daidzein, Genistein und Glycitein auf (Larkin et al., 2008), wobei der Gehalt von Genistein und Daidzein zwischen 0,3 - 1,2 µg Genistein/g Frischgewicht bzw. 0,4 - 1,1 µg Daidzein/g Frischgewicht schwankt (Eisenbrand, 2007). Genistein ist in den meisten Soja-basierten Produkten in höheren Mengen enthalten als Daidzein oder Glycitein (Setchell et al., 2001; Thompson et al., 2006). Allerdings unterliegen Isoflavon-Gehalt sowie -Zusammensetzung der Sojabohnen je nach Kultivar, Jahreszeit und

Weiterverarbeitung starken Schwankungen. In Rotklee wurden bislang über elf Isoflavone nachgewiesen, wobei Formononetin und Biochanin A als Hauptkomponenten identifiziert wurden (Wu et al., 2003).

Isoflavone werden von den Pflanzen über den Phenylpropanoid-Weg synthetisiert (Larkin et al., 2008), über den auch die Bildung weiterer Flavonoide erfolgt. Jedoch ist die Bildung von Isoflavonen auf wenige Pflanzenarten beschränkt, da nur in diesen Spezies das zur Isoflavon-Bildung essentielle Enzym Isoflavon-Synthase vertreten ist (Rolfe, 1988). In der Pflanze liegen Isoflavone häufig als Glykoside oder mit Glykosiden verestert vor, wobei der Zuckerrest überwiegend über den Sauerstoff in 7-Position gebunden ist (Andres et al., 2011). Hingegen sind in fermentierten Soja-Produkten wie Sojamehl, Sojamilch und Tofu Isoflavone maßgeblich in Form ihrer freien Aglyka enthalten (Fukutake et al., 1996).

Neben den in Pflanzenprodukten natürlich vorkommenden Isoflavonen sind zahlreiche Nahrungsergänzungsmittel (NEM) und diätetische Lebensmittel auf der Basis von Soja oder Rotklee erhältlich, die Isoflavone als Einzelsubstanz oder komplexe Isoflavon-Gemische enthalten (Eisenbrand, 2007). Da die Herstellung dieser Extrakte zumeist nicht nach standardisierten Verfahren erfolgt, können sich die daraus resultierenden NEM hinsichtlich ihrer Zusammensetzung und der darin enthaltenen Isoflavon-Konzentrationen stark unterscheiden (Fang et al., 2004). Mehrere Studien konnten zeigen, dass zwischen dem vom Hersteller angegebenen Isoflavon-Gehalt und den tatsächlich im Präparat enthaltenen Mengen bisweilen eine große Diskrepanz herrscht (Howes und Howes, 2002; Mortensen et al., 2009; Nurmi et al., 2002; Setchell et al., 2001). Diese Ergebnisse sind insofern mit Besorgnis zu betrachten, da NEM häufig zur Selbstmedikation eingenommen werden und ein Überschreiten der empfohlenen Dosierung in Erwägung gezogen werden muss.

#### 2.4.2. Exposition

Die durchschnittliche tägliche Aufnahmemenge an Isoflavonen unterliegt je nach Ernährungsgewohnheiten starken Schwankungen (Andres et al., 2011; COT, 2003). Da Soja in der traditionellen asiatischen Ernährung ein wichtiger Bestandteil darstellt und sowohl nativ als auch fermentiert verzehrt wird (Larkin et al., 2008), liegt die durchschnittliche Aufnahmemenge an Isoflavonen in diesen Ländern zwischen 15 und 50 mg pro Tag (Kikuchi et al., 2001; Setchell et al., 2001; Wakai et al., 1999). Hingegen werden in den westlichen Industrieländern deutlich geringere Mengen an Isoflavonen aufgenommen, da der Verzehr

von Soja und Sojaprodukten dort weniger verbreitet ist und Isoflavone hauptsächlich über andere Hülsenfrüchte und Sprossen aufgenommen werden (Andres et al., 2011). So liegt die tägliche Isoflavon-Aufnahme in den westlichen Industrieländern im Durchschnitt unter 3 mg (De et al., 2001; Eisenbrand, 2007; Mense et al., 2008), wobei bestimmte Ernährungsgruppen wie Vegetarier deutlich höhere Aufnahme-Mengen von bis zu 12 mg/Tag erzielen können (Clarke et al., 2003).

Hierbei muss beachtet werden, dass die Exposition gegenüber Isoflavonen in der asiatischen Bevölkerung bereits *in utero* beginnt, da Isoflavone die Plazentaschranke überwinden (Todaka et al., 2005) und auch postnatal findet eine Exposition der Säuglinge über die Muttermilch statt (Franke und Custer, 1996). Im Gegensatz dazu erfolgt in den westlichen Industrieländern die erstmalige Aufnahme von Isoflavonen zumeist erst im Erwachsenenalter. Besonders Frauen in der Menopause, die als Alternative zur hormonellen Ersatztherapie Soja-basierte NEM einnehmen, erreichen dabei oft hohe Expositionswerte von 29 - 88 mg Isoflavonen pro Tag (COT, 2003). Auch Säuglinge können durch die Gabe von Soja-basierter Säuglingsmilch täglichen Isoflavonmengen von 5 - 45 mg/kg KG ausgesetzt sein (COT, 2003; Rupp et al., 2000; Setchell et al., 1998).

### 2.4.3. Bioverfügbarkeit und Metabolismus

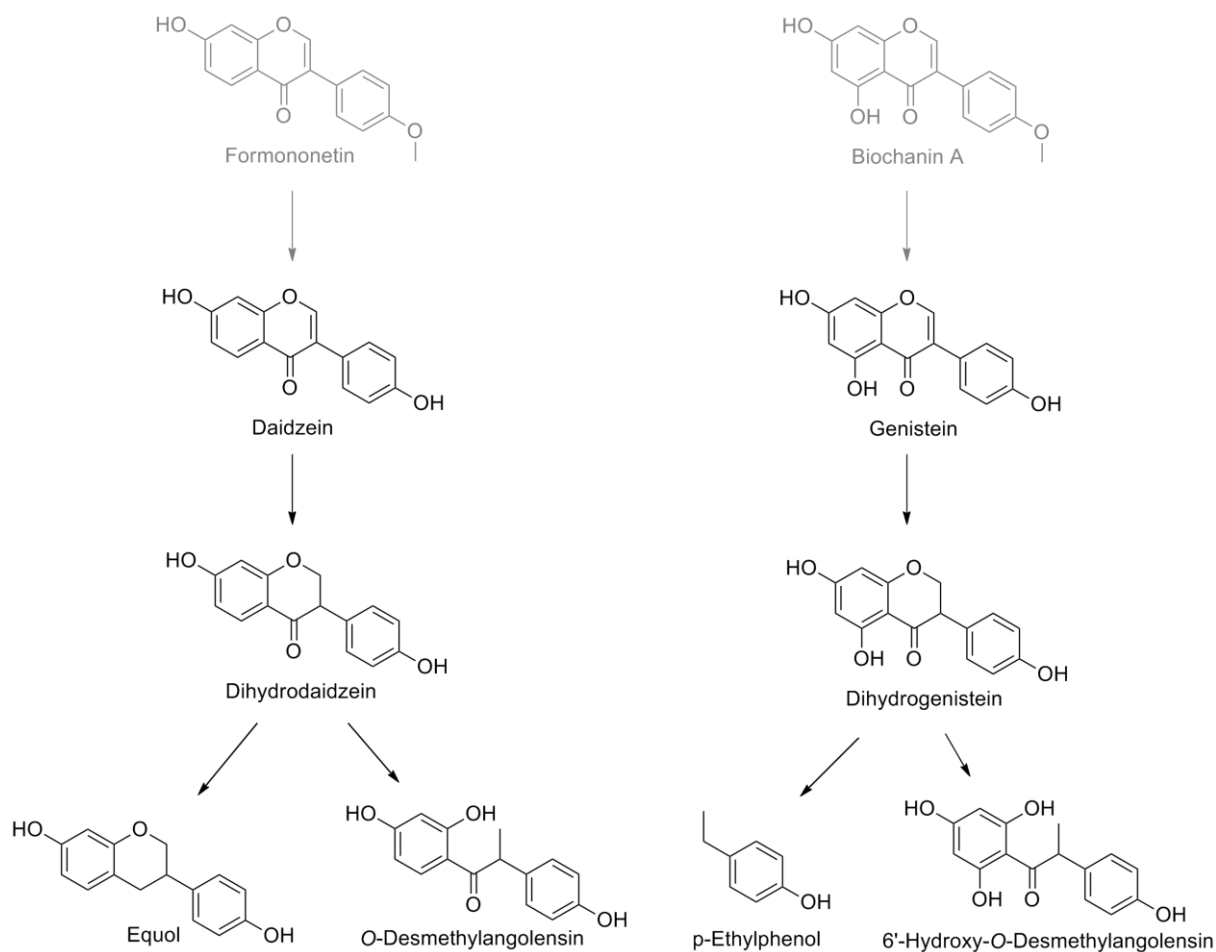
Die Bioverfügbarkeit von Isoflavonen ist zwar aufgrund ihrer raschen Metabolisierung verhältnismäßig niedrig, aber dennoch höher verglichen zu vielen anderen Polyphenolen. Zahlreiche Faktoren üben einen erheblichen Einfluss auf die Bioverfügbarkeit aus, so spielen neben der Lebensmittelmatrix und Isoflavon-Zusammensetzung der aufgenommenen Präparate auch das Alter der Konsumenten sowie die Häufigkeit der Isoflavon-Aufnahme eine tragende Rolle (Nielsen und Williamson, 2007).

Glykosidisch gebundene Isoflavone werden im Dünndarm aufgrund ihrer Hydrophilie und ihres Molekulargewichts schlecht absorbiert, wohingegen die Aglyka mittels passiver Diffusion leicht die Bürstensaummembran passieren können (Larkin et al., 2008; Scalbert und Williamson, 2000). Nach oraler Aufnahme von Isoflavon-Glykosiden wird der Zuckerrest durch im Dünndarm lokalisierte Glykosidasen, wie der membrangebundenen Laktat-Phlorizin-Hydrolase (Day et al., 2000), abgespalten und die Aglyka in die Enterozyten aufgenommen (Scalbert und Williamson, 2000). Isoflavon-Glykoside, die nicht im Dünndarm

absorbiert werden, gelangen in das Kolon, wo sie von bakteriellen  $\beta$ -Glykosidasen hydrolysiert und resorbiert werden können (Larkin et al., 2008).

Die absorbierten Isoflavone können in den Enterozyten mit Glukuronsäure oder Sulfat konjugiert werden (Adlercreutz et al., 1993; Setchell et al., 2001; Shelnutt et al., 2002), wonach sie in Form ihrer Metabolite oder aber auch in Form ihrer Aglyka über die Pfortader in die Leber gelangen. Nach intestinaler Konjugation können die Metabolite jedoch auch wieder ins Lumen sezerniert werden, wo sie nach wiederholter Hydrolyse erneut absorbiert und konjugiert werden können (Chen et al., 2003a). In der Leber unterliegen die Isoflavone dem sogenannten „*First-Pass-Effekt*“, da sie nahezu vollständig im Phase II-Metabolismus mit Glukuronsäure oder Sulfat konjugiert werden (Larkin et al., 2008). Die resultierenden Metabolite werden anschließend mit der Galle in den Darm abgegeben oder über systemische Zirkulation in die Gewebe transportiert, wonach sich die renale Ausscheidung anschließt (Larkin et al., 2008). Nach Abgabe in den Darm können die Konjugate erneut gespalten werden und die freigesetzten Aglyka in den enterohepatischen Kreislauf eintreten. Sowohl durch die Zirkulation im Darm als auch durch den enterohepatischen Kreislauf wird die systemische Exposition gegenüber den Isoflavonen signifikant verlängert (Chen et al., 2003a).

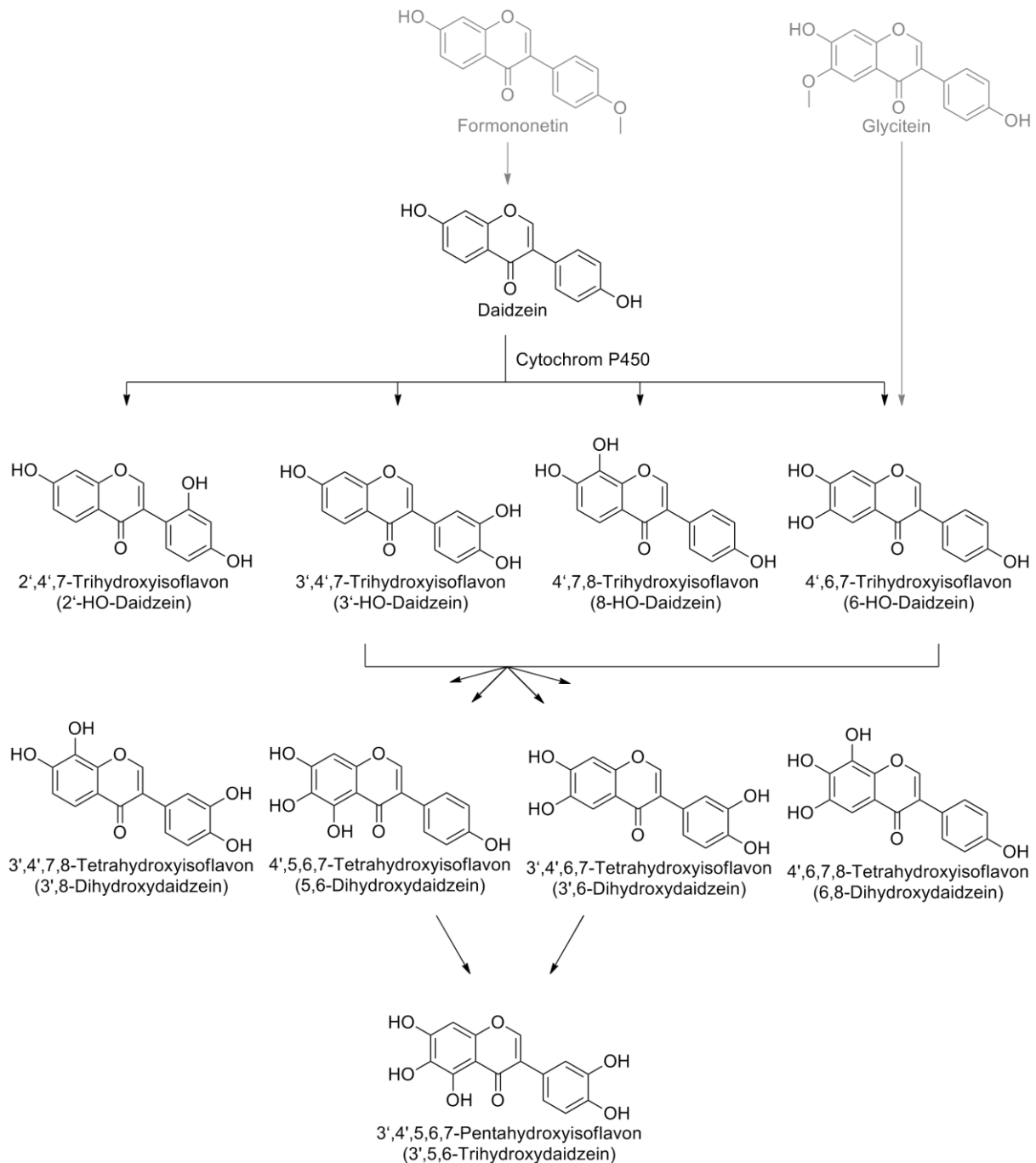
Im Kolon erfolgt die reduktive Umsetzung der Isoflavone durch die bakterielle Mikroflora zu Sekundärmetaboliten (Scalbert und Williamson, 2000). Abbildung 2.8 gibt einen Überblick über den reduktiven Metabolismus von Daidzein und Genistein. So entstehen zunächst die Intermediate Dihydrodaidzein bzw. Dihydrogenistein, wonach Daidzein zu Equol reduziert wird oder durch Öffnung des heterozyklischen Ringes O-Desmethylangolensin entsteht (Heinonen et al., 2003; Kurzer und Xu, 1997). Entsprechend kann Genistein zu 6'-Hydroxy-O-Desmethylangolensin abgebaut werden, welches weiter zu 4-Hydroxyphenyl-2-Propionsäure metabolisiert wird. Durch Decarboxylierung entsteht 4-Ethylphenol als vermutlicher Endmetabolit von Genistein (Coldham und Sauer, 2000; Heinonen et al., 2003).



**Abb. 2.8:** Schematische Darstellung des reduktiven Metabolismus von Daidzein und Genistein durch die menschliche Darmflora; modifiziert nach (Larkin et al., 2008).

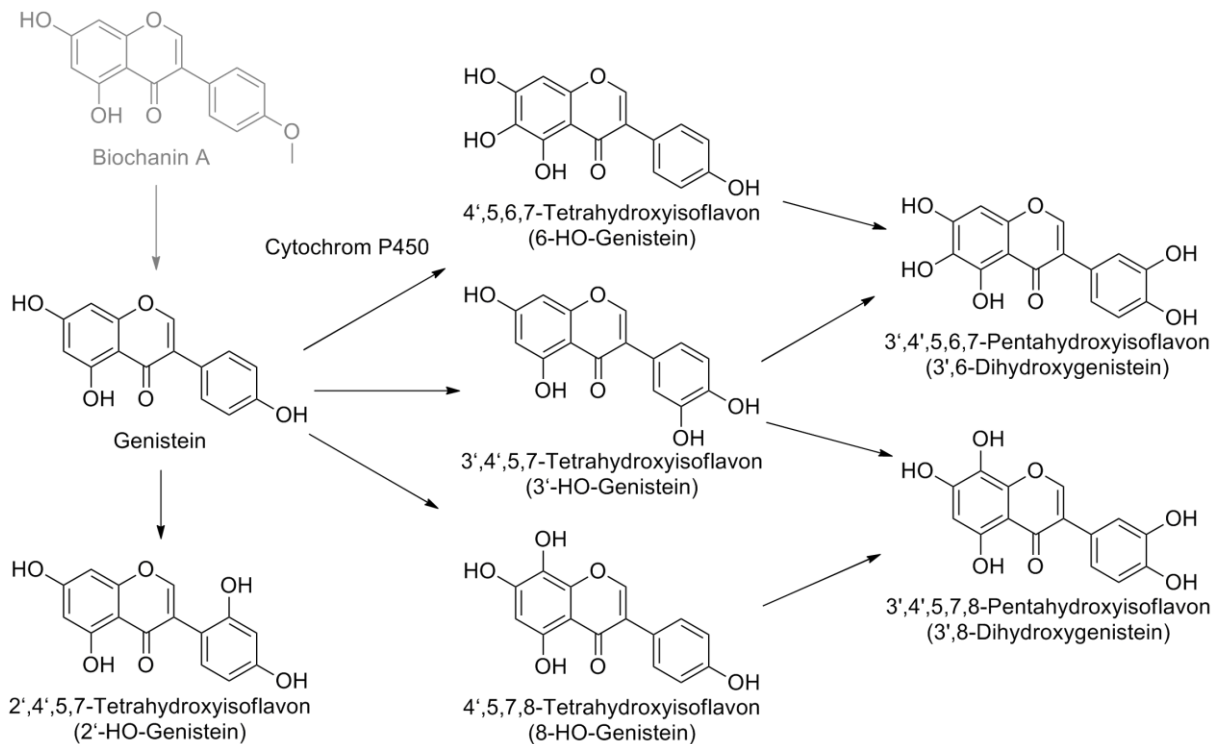
Lediglich 30-40% der Bevölkerung sind in der Lage Equol zu bilden, da für die reduktive Umsetzung von Daidzein Equol-bildende Bakterien notwendig sind (Larkin et al., 2008; Matthies et al., 2012). Fehlen diese Bakterien, wird Daidzein ausschließlich zu O-Desmethylangolensin umgesetzt. Da Equol als einziger reduktiver Metabolit biologisch aktiv ist, können die interindividuellen Unterschiede im Metabolismus in gänzlich verschiedenen Bioaktivitäten resultieren (Eisenbrand, 2007; Larkin et al., 2008).

Neben dem reduktiven Metabolismus können Isoflavone auch oxidativ umgesetzt werden, wodurch 6-Hydroxydaidzein (6-HO-DAI), 8-Hydroxydaidzein (8-HO-DAI) sowie 3'-Hydroxydaidzein (3'-HO-DAI) bzw. 3'-, 8- und 6-Hydroxygenistein gebildet werden, die allesamt eine katecholische Struktur aufweisen (Kulling et al., 2001; Kulling et al., 2000; Kulling et al., 2002). 6-HO-DAI entsteht darüber hinaus als Hauptmetabolit durch Demethylierung im Glycitein-Stoffwechsel (Ruefer et al., 2007). Der oxidative Metabolismus von Daidzein bzw. Genistein ist in Abbildung 2.9 und 2.10 dargestellt.



**Abb. 2.9:** Schematische Darstellung des oxidativen Phase I-Metabolismus von Daidzein; modifiziert nach (Kulling et al., 2002).

Im Falle von Genistein erfolgt die Hydroxylierung in 3'-Position hauptsächlich über die CYP-Enzyme CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19 und CYP2D6, während CYP3A4 eine zentrale Rolle bei der Hydroxylierung in 6- und 8-Position einnimmt (Bursztyka et al., 2008). Die oxidativen Metabolite konnten bereits 2 h nach Isoflavon-Gabe im Plasma nachgewiesen werden, was auf ihre unmittelbare Bildung in den Enterozyten oder Hepatozyten nach Absorption schließen lässt (Ruefer et al., 2008).



**Abb. 2.10:** Verstoffwechslung von Genistein im Phase I-Metabolismus durch Cytochrom P450-abhängige Monooxygenasen; modifiziert nach (Kulling et al., 2002).

Bereits 30 Minuten nach oraler Aufnahme sind Isoflavone im Plasma detektierbar (King und Bursill, 1998), wobei maximale Plasmakonzentrationen von Daidzein und Genistein 6 - 8 Stunden nach Soja-Verzehr erreicht werden (King und Bursill, 1998; Setchell et al., 2003). Isoflavone zeigen eine hohe Plasmaproteinbindung mit 80 - 90% (Coldham und Sauer, 2000) und liegen im Plasma hauptsächlich als Monoglukuronide vor (Shelnutt et al., 2002). Die kulturellen Unterschiede in der Ernährungsweise spiegeln sich auch in den Plasmakonzentrationen wider. So beträgt die durchschnittliche Gesamtisoflavon-Konzentration bestimmter asiatischer Populationsgruppen 870 nM im Plasma, wohingegen eine westliche Ernährung in Plasmaspiegeln von ca. 10 nM resultiert (Adlercreutz et al., 1993; Morton et al., 1997). In Säuglingen, die mit Soja-basierter Ergänzungsmilch ernährt werden, können Isoflavon-Spiegel von bis zu 5 µM im Plasma erreicht werden (Setchell et al., 1998). Dabei sind die Plasmakonzentrationen von Genistein nach Soja-Verzehr prinzipiell höher als von Daidzein (King und Bursill, 1998), was zum einen auf die bessere Bioverfügbarkeit von Genistein und zum anderen auf die erhöhte Verteilung von Daidzein ins Gewebe zurückgeführt wird (Setchell et al., 2001). Für die oxidativen Isoflavon-Metabolite kann entsprechend ihrer Bildung durch die Darmflora eine Lag-Phase im Blutplasma beobachtet werden (Ruefer et al., 2008). Etwa 8 - 10 Stunden nach Daidzein-Gabe (1 mg/kg KG) sind die

Plasmakonzentrationen der oxidativen Metabolite mit 10 - 30 nM maximal (Ruefer et al., 2008).

Isoflavone konnten nach Soja-Verzehr im Brustgewebe und der Muttermilch prämenopausaler Frauen sowie in der Prostataflüssigkeit von Männern nachgewiesen werden (Andres et al., 2011; Franke und Custer, 1996). Des Weiteren können Isoflavone sowohl die Blut-Hirn-Schranke als auch die Plazentaschranke überwinden (Maubach et al., 2003; Morton et al., 1997). Das Verteilungsvolumen von Daidzein und Genistein ist größer als das ihrer Konjugate, wobei die Aglyka in einzelnen Geweben Konzentrationen erreichen könnten, in denen die Modulation physiologischer Wirkungen möglich wäre (Setchell et al., 2001). Dementsprechend konnte für Genistein gezeigt werden, dass weitaus höhere Konzentrationen an freiem Genistein im Gewebe erreicht werden als im Plasma. So betrug der Aglykon-Anteil im Brustdrüsengewebe weiblicher Ratten nach Genistein-Applikation 49%, in den Ovarien und im Uterus 80 - 100%, während weniger als 5% im Plasma als freies Genistein vorlag (Coldham et al., 2002). Inwiefern diese Ergebnisse für den Menschen von Relevanz sind, ist bislang ungeklärt, auch fehlen humane Daten zu Gewebskonzentrationen der Isoflavone unter Berücksichtigung ihrer Metabolite gänzlich (Eisenbrand, 2007).

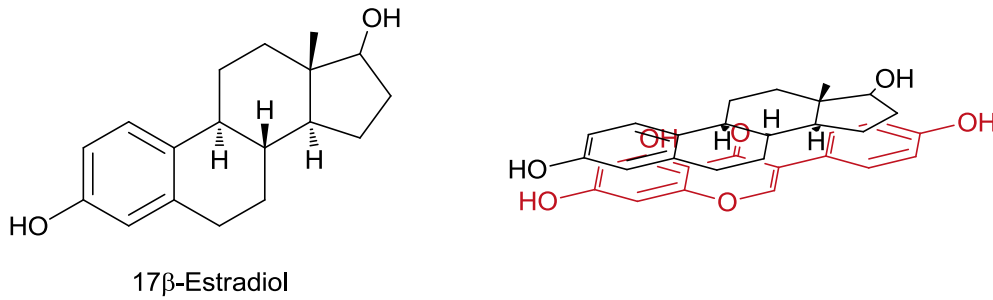
Isoflavone werden im Urin nahezu ausschließlich als saure Konjugate, meist in Form ihrer Glukuronide, ausgeschieden (Adlercreutz et al., 1993). Dabei erreicht die renale Ausscheidung 6 - 12 Stunden nach Soja-Gabe ein Maximum (King und Bursill, 1998; Watanabe et al., 1998) und der Großteil der Isoflavone wird binnen 24 Stunden nach Aufnahme eliminiert (Setchell et al., 2001). Lediglich 10 - 50% der aufgenommenen Isoflavon-Menge können im Urin nachgewiesen werden, was darauf schließen lässt, dass sowohl der reduktive Abbau der Isoflavone im Kolon als auch der oxidative Metabolismus in der Leber eine tragende Rolle spielen (Kulling et al., 2000; Larkin et al., 2008). So macht die mit dem Urin ausgeschiedene Menge an oxidativen Metaboliten bis zu 10% der Gesamtisoflavon-Menge aus (Heinonen et al., 2003; Kulling et al., 2001). Etwa 15 - 30% der verabreichten Isoflavon-Dosis werden mit den Fäzes ausgeschieden (Larkin et al., 2008).

#### 2.4.4. Biologische Wirkungen

Die Aufnahme von Isoflavonen wird mit zahlreichen gesundheitsfördernden Wirkungen in Verbindung gebracht. So wird eine präventive bis therapeutische Wirkung der Isoflavone auf das klimakterische Syndrom, kardiovaskuläre Krankheiten, Osteoporose sowie bestimmte Krebsarten postuliert (Andres et al., 2011; Banerjee et al., 2008; Scalbert et al., 2005). Diese Effekte beruhen zum Teil auf ihren phytoestrogenen, antioxidativen oder antiproliferativen Eigenschaften. Obwohl Isoflavone neben ihrer Phytoestrogenität auch mit dem Hormonstoffwechsel interagieren und mit einer Vielzahl weiterer biologischer Wirkungen assoziiert werden, beschränkt sich dieses Kapitel auf die phytoestrogene Wirkung der Isoflavone sowie ihre Bedeutung im Zusammenhang mit der Kanzerogenese.

##### 2.4.4.1. Phytoestrogene Eigenschaften

Isoflavone werden zusammen mit den Lignanen und Coumestanen zu den Phytoestrogenen gezählt. Als Phytoestrogene werden nicht-steroidale Verbindungen pflanzlicher Herkunft bezeichnet, die an den Estrogenrezeptor binden können (Eisenbrand, 2007). Bereits Anfang des letzten Jahrhunderts wurden Reproduktionsstörungen bei Schafen festgestellt, deren Futter überwiegend Rotklee enthielt (Hearnshaw et al., 1972; Loewe S., 1927). Diese sogenannte „Clover Disease“ konnte auf die phytoestrogene Wirkung der im Rotklee enthaltenen Isoflavone zurückgeführt werden (Lundh et al., 1988). Aufgrund ihrer Strukturähnlichkeit zu 17 $\beta$ -Estradiol (Abbildung 2.11) binden Isoflavone an die Estrogenrezeptoren (ER), welche in die Subtypen ER $\alpha$  und ER $\beta$  unterteilt werden (Andres et al., 2011). ER $\alpha$  und ER $\beta$  regulieren gewebespezifisch die Expression unterschiedlicher Gene, was vermutlich auf die Rekrutierung verschiedener Co-Faktoren bzw. -Repressoren zurückzuführen ist (Murphy, 2011). Zudem weisen die Rezeptor-Subtypen Unterschiede in ihren Expressionsmustern in verschiedenen Organen auf (Kuiper et al., 1998). Während der Aktivierung von ER $\alpha$  eine vornehmlich proliferative Wirkung zugeschrieben wird, wird die Aktivierung von ER $\beta$  vermehrt mit antiproliferativen Effekten assoziiert (Lindberg et al., 2002; Oesterreich et al., 2001). Dementsprechend können durch Estrogen-Agonisten zum Teil gegensätzliche Wirkungen in unterschiedlichen Geweben resultieren.



**Abb. 2.11:** Vergleich der Strukturähnlichkeit von 17β-Estradiol (schwarz) und dem Isoflavon Genistein (rot).

Daidzein und Genistein sind zwar in der Lage beide ER zu transaktivieren, zeigen aber eine höhere Affinität zu ERβ (Kuiper et al., 1998; Morito et al., 2002). Hingegen wurde für die hydroxylierten Metabolite von Genistein und Daidzein keine oder lediglich eine schwache Bindung an die ER beobachtet (Lehmann et al., 2005; Murata et al., 2004). Die durch Isoflavone vermittelte Wirkung scheint vom zirkulierenden Estradiol-Spiegel abhängig zu sein und ist bislang nicht vollständig geklärt (Andres et al., 2011; Dixon und Ferreira, 2002). So könnte bei Frauen vor der Menopause mit hohem endogenem Estradiol-Spiegel eine antagonistische Wirkung der Isoflavone in Betracht gezogen werden, indem sie mit geringerer intrinsischer Aktivität kompetitiv an die ER binden. Bei postmenopausalen Frauen mit niedrigem endogenem Estradiol-Spiegel könnten Isoflavone hingegen einen additiven Effekt zu 17β-Estradiol ausüben (Dixon und Ferreira, 2002; Ju et al., 2006b).

Frauen in den Wechseljahren leiden häufig am sogenannten klimakterischen Syndrom, welches zahlreiche Beschwerden wie Hitzewallungen, ein erhöhtes Risiko an Arteriosklerose und Osteoporose umfasst (Branca, 2003; Clarkson et al., 1998). Zur Linderung der Symptome werden oft Isoflavone aufgrund ihrer phytoestrogenen Wirkung als Alternative zur klassischen Hormonersatztherapie eingesetzt (Andres et al., 2011), obwohl die Wirksamkeit von Isoflavon-Präparaten bislang wissenschaftlich nicht belegt ist (Jacobs et al., 2009; Kurzer, 2003). Da auch die Langzeitfolgen einer Supplementierung mit Isoflavonen nur unzureichend untersucht sind, wird die Einnahme dieser NEM als nicht sicher eingestuft (Andres et al., 2011; Eisenbrand, 2007).

#### 2.4.4.2. Einfluss von Isoflavonen auf die Kanzerogenese

Isoflavone werden häufig im Zusammenhang mit einer präventiven oder therapeutischen Wirkung auf Krebs diskutiert, da die Inzidenz insbesondere an hormonvermittelten Krebsarten in asiatischen Ländern mit hoher Isoflavon-Exposition deutlich geringer ist als in den westlichen Industrieländern (Adlercreutz, 2002; Andres et al., 2011; Messina et al., 1994). Zudem konnten in Tierstudien positive Effekte auf zahlreiche weitere Krebsarten

gezeigt werden, jedoch liegen nur wenige Daten zur Wirkung im Menschen vor (Andres et al., 2011; Dixon und Ferreira, 2002).

Neben einer positiven Wirkung auf Brustkrebs werden auch nachteilige Effekte wie eine tumorpromovierende Wirkung diskutiert (Andres et al., 2011; Ju et al., 2006b; Lamartiniere, 2000). Die protektiven Effekte der Isoflavone auf das weibliche Brustdrüsengewebe sind stark vom Expositionszeitpunkt abhängig (Bouker und Hilakivi-Clarke, 2000; Limer und Speirs, 2004). So konnte eine Verringerung des Wachstums und der Häufigkeit chemisch induzierter Mammatumore gezeigt werden, wenn die Exposition gegenüber den Isoflavonen neonatal oder präpubertär erfolgte (Lamartiniere, 2000). Durch eine erste Exposition in diesem Entwicklungsstadium wird eine frühe Ausdifferenzierung des Brustdrüsengewebes erzielt, wonach die Epithelzellen eine geringere Empfindlichkeit gegenüber krebsinitiiierenden Prozessen aufweisen (Lamartiniere, 2000). Eine wichtige Rolle in der Zelldifferenzierung könnte die Hochregulierung der Expression des epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors (EGFR) durch Genistein spielen (Lamartiniere et al., 2002). Neben dem Expositionszeitpunkt und der -dauer sind die Fähigkeit Equol zu bilden sowie der individuelle genetische Hintergrund für die positive Wirkung von Isoflavonen auf die Entwicklung von Brustkrebs von tragender Bedeutung (Andres et al., 2011; Lamartiniere et al., 2002).

In Nagern fördert die Gabe von Isoflavonen die Stimulation der Zellproliferation von estrogen-sensitiven Tumorzellen (Allred et al., 2001; Ju et al., 2006b; Seo et al., 2006). Daher ist nicht auszuschließen, dass Isoflavone eine tumorpromovierende Wirkung in estrogen-sensitivem Gewebe wie der Brust oder dem Endometrium besitzen (Ju et al., 2006b; Unfer et al., 2004). In weiblichen Ratten konnte bereits eine tumorpromovierende Wirkung von Genistein auf Brusttumore nachgewiesen werden (Allred et al., 2004). Weiterhin erhöht die Gabe von Genistein die Häufigkeit chemisch induzierter Kolonkarzinome in Ratten (Rao et al., 1997) und beschleunigt die Entwicklung chemisch induzierter Lungenkarzinome durch Induktion von DNA-Addukten mittels oxidativem Stress (Seike et al., 2003). In klinischen Studien konnten erste Hinweise auf eine Stimulation der Zellproliferation durch Soja-Supplementierung in prämenopausalen Frauen gezeigt werden (McMichael-Phillips et al., 1998). Die Datenlage zur Wirkung der Isoflavone im Menschen ist jedoch derzeit unzureichend, so dass weitere Studien notwendig sind, um die Sicherheit einer Supplementierung mit Isoflavon-Präparaten beurteilen zu können (Eisenbrand, 2007).

#### 2.4.5. Molekulare Wirkmechanismen

Die postulierten gesundheitsfördernden Wirkungen der Isoflavone veranlassten zahlreiche Studien zur Untersuchung der zugrundeliegenden molekularen Mechanismen. In Proteomic-Analysen konnte gezeigt werden, dass Genistein die Aktivität von über 215 Phosphoproteinen moduliert, die an einer Vielzahl biologischer Prozesse wie Zellzyklus, Apoptose, Angiogenese, Zelladhäsion und -kommunikation beteiligt sind (Yan et al., 2011). Da die Soja-Isoflavone Genistein und Daidzein im Fokus dieser Arbeit standen, wird deren biologische Wirksamkeit unter Berücksichtigung der oxidativen Daidzein-Metabolite hier näher beleuchtet.

##### 2.4.5.1. Genistein

Durch Genistein wurde eine Wachstumshemmung von Krebszellen unterschiedlichen Ursprungs beschrieben, darunter Kolonkarzinom- (Kim et al., 2005), Melanom- (Kuzumaki et al., 1998), und Prostatakrebszellen (Banerjee et al., 2008; Choi et al., 2000). In estrogen-sensitiven Brustkrebszellen wurde eine biphasische Wirkung von Genistein beobachtet, da es in niedrigen Konzentrationen (0,01 - 10  $\mu$ M) die Zellproliferation stimulierte, wohingegen eine weitere Erhöhung der Konzentration zur Wachstumshemmung führte (Klein und King, 2007). Die wachstumshemmenden Eigenschaften von Genistein könnten durch Arretierung der Zellen in der G<sub>2</sub>/M-Phase des Zellzyklus bedingt sein (Matsukawa et al., 1993; Schmidt et al., 2008), wobei die Genistein-vermittelte Expressions-Abnahme von Cyclin B eine Rolle spielen könnte (Davis et al., 1998). Weiterhin könnte die Wachstumshemmung auch auf der pro-apoptotischen Wirkung von Genistein beruhen. Apoptotische Prozesse werden zum einen von Mitgliedern der Bcl-2-Familie und zum anderen von proteolytisch aktiven Caspasen reguliert, die den Abbau von Strukturproteinen sowie der DNA veranlassen und schließlich die Phagozytose einleiten (Banerjee et al., 2008). Genistein induziert Apoptose einerseits durch Aktivierung von Caspase 3 (Kumi-Diaka et al., 2000) und andererseits durch die Unterdrückung der Expression anti-apoptotischer Mitglieder der Bcl-2 Familie wie Bcl-2 und Bcl-xL (Banerjee et al., 2008; Davis et al., 1998). Eine Beteiligung des Tumorsuppressorproteins p53 in der Genistein-vermittelten Apoptose ist nicht eindeutig belegt und könnte von der untersuchten Zelllinie abhängig sein (Choi et al., 2000; Ding et al., 2003).

Genistein moduliert die Aktivität des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B, indem es dessen Translokation in den Zellkern inhibiert. Infolgedessen wird die Transkription NF- $\kappa$ B-abhängiger Gene gehemmt, welche eine wichtige Rolle in der Zellproliferation und Apoptose-Induktion spielen (Banerjee et al., 2008). Die Hemmung von NF- $\kappa$ B durch Genistein erfolgt

vermutlich über Interaktion mit dem Akt-Signalweg (Morris et al., 1998), dem in der zellulären Balance zwischen Wachstums- und Apoptose-Stimuli eine tragende Bedeutung zukommt und dessen Hemmung ebenfalls zur pro-apoptotischen Wirkung von Genistein beitragen könnte (Banerjee et al., 2008).

Genistein hemmt darüber hinaus für die Zellproliferation essentielle Enzyme wie die 5 $\alpha$ -Reduktase (Evans et al., 1995), die Protein-Histidin-Kinase (Huang et al., 1992) und Topoisomerase II (Bandelet und Osheroff, 2007; Kalfalah et al., 2011). Dabei konnte gezeigt werden, dass Genistein als Topoisomerase II-Gift wirkt, indem es das kovalente Intermediat aus Enzym und DNA stabilisiert, während kein Einfluss auf Topoisomerase I beobachtet werden konnte (Constantinou et al., 1995; Lopez-Lazaro et al., 2007). Infolge der Topoisomerase II-Giftung resultieren DNA-Strangbrüche (Bandelet und Osheroff, 2008; Kalfalah et al., 2011; Pool-Zobel et al., 2000; Salti et al., 2000), was möglicherweise einen Zellzyklus-Arrest in der G<sub>2</sub>/M-Phase bewirkt (Schmidt et al., 2008).

Rezeptortyrosinkinasen (RTK) stellen weitere zelluläre Targets von Genistein dar. So hemmt das Isoflavon Mitglieder der ErbB-Familie sowie der Insulin-Wachstumsfaktor-Rezeptor-Familie (Akiyama et al., 1987; Kim et al., 2005). Die Reduktion der EGFR-Phosphorylierung nach Genistein-Aufnahme wird mit einem verminderten Wachstum von Blasentumoren in Verbindung gebracht (Messing et al., 2012). Genistein wirkt darüber hinaus modulierend auf den Mitogen-aktivierten Proteinkinase- (MAPK) Signalweg und hemmt dabei die Aktivierung von ERK1/2, was ein vermindertes Zellwachstum zur Folge haben könnte (Banerjee et al., 2008).

Die Wirkung von Genistein auf das intrazelluläre Gleichgewicht zwischen Pro- und Antioxidantien wird kontrovers diskutiert. Mehrere Studien beschreiben Genistein als Antioxidans, indem es zum einen Radikale direkt abfängt und zum anderen über die Aktivierung des Transkriptionsfaktors Nrf2 die Expression antioxidativ wirksamer Gene erhöht (Mann et al., 2009). Auch konnte in Nagern eine protektive Wirkung gegenüber oxidativem Stress in den Nieren durch Genistein in Folge einer Ovariectomie gezeigt werden (Choi und Song, 2009). In weiteren Studien konnte hingegen keine antioxidative Kapazität des Isoflavons nachgewiesen werden; so bewirkte Genistein keine Abnahme der durch Wasserstoffperoxid induzierten oxidativen DNA-Schäden (Di et al., 2004). Auch wird eine mögliche pro-oxidative Wirkung von Genistein in Erwägung gezogen, da das Isoflavon mit Prozessen der Atmungskette interagiert und dadurch die Freisetzung von ROS fördern könnte (Salvi et al., 2002).

#### 2.4.5.2. *Daidzein und seine oxidativen Metabolite*

Daidzein hemmt das Wachstum diverser humaner Krebszelllinien (Choi und Kim, 2008; Hibasami et al., 2003; Murata et al., 2004), wobei in Zellen des Kolons eine biphasische Wirkung des Isoflavons festgestellt wurde. Während das Zellwachstum in hohen Konzentrationen gehemmt wird (MacDonald et al., 2005), bewirken geringe Daidzein-Konzentrationen einen wachstumsstimulierenden Effekt (Guo et al., 2004). Auch die oxidativen Daidzein-Metabolite 6-HO-DAI und 8-HO-DAI besitzen wachstumshemmende Eigenschaften gegenüber Krebszellen unterschiedlichen Ursprungs mit zum Teil größerer Wirksamkeit als die Muttersubstanz (Atherton et al., 2006; Lee et al., 2011; Tang et al., 2011). In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass die antiproliferativen Eigenschaften von Daidzein mit der Induktion von Apoptose assoziiert sind (Choi und Kim, 2008; Guo et al., 2004; Su et al., 2003). Dabei aktiviert Daidzein Caspase 3, verringert die Expression anti-apoptotischer Signalmoleküle wie Bcl-2 und erhöht gleichzeitig die Expression pro-apoptotischer Proteine wie Bax (Jin et al., 2010). Allerdings wird eine Beteiligung apoptotischer Prozesse an der Hemmung des Zellwachstums kontrovers betrachtet und könnte vom Typ der untersuchten Zelllinie abhängig sein. Dementsprechend konnte in Magenkarzinomzellen weder nach Daidzein- noch nach 8-HO-DAI-Exposition eine Einleitung der Apoptose beobachtet werden (Hibasami et al., 2003).

Für die Muttersubstanz Daidzein könnte weiterhin die Arretierung des Zellzyklus einen wichtigen Beitrag zu den wachstumshemmenden Eigenschaften leisten (Choi und Kim, 2008). So wird ein Zellzyklusarrest sowohl in der G<sub>1</sub>-Phase (Matsukawa et al., 1997) als auch in der G<sub>2</sub>/M-Phase nach Daidzein-Exposition beschrieben (Choi und Kim, 2008; Jin et al., 2010). In welcher Phase das Fortschreiten des Zellzyklus durch Daidzein beeinflusst wird, scheint von der getesteten Zelllinie abhängig zu sein (Giri und Lu, 1995). 6-HO-DAI bewirkt eine Arretierung von Kolonkarzinomzellen in der S und G<sub>2</sub>/M-Phase des Zellzyklus (Lee et al., 2011), während 3'-HO-DAI einen Zellzyklus-Arrest in der G<sub>1</sub>-Phase veranlasst (Lo et al., 2012). Ein leichter Anstieg der Zellpopulation in der G<sub>2</sub>/M-Phase konnte auch nach 8-HO-DAI-Inkubation von Kolonkarzinomzellen beobachtet werden, jedoch war der Anstieg der Zellzahl in der Sub-G<sub>1</sub>-Phase prominenter, was auf die Einleitung apoptotischer Prozesse schließen lässt (Lo, 2013).

Im Gegensatz zu Genistein führt Daidzein zu keiner Hemmung der Topoisomerase II-Enzyme. 6-HO-DAI hingegen besitzt eine ähnliche Wirksamkeit hinsichtlich der Topoisomerase II-Hemmung im zellfreien System wie Genistein, wohingegen 3'-HO-DAI

analog zur Muttersubstanz Daidzein keinen Effekt auf Topoisomerase II ausübte (Constantinou et al., 1995). Sowohl Daidzein als auch seine oxidativen Metabolite 6-HO-DAI und 8-HO-DAI bewirken eine potente Hemmung der Tyrosinase-Aktivität, jedoch weisen die Verbindungen Unterschiede im Wirkmechanismus auf. Während Daidzein und 6-HO-DAI die Monophenolase-Aktivität kompetitiv hemmen (Chang et al., 2005), agiert 8-HO-DAI als irreversibler Tyrosinase-Hemmstoff (Chang et al., 2007). Entgegen der Wirkung von Genistein zeigt Daidzein keinen Einfluss auf Rezeptortyrosinkinasen (Huang et al., 1999), wobei zur Wirkung seiner oxidativen Metabolite bislang keine Daten vorliegen.

Daidzein wird in Zusammenhang mit einer antioxidativen Wirkung gebracht, jedoch wird auch von möglichen pro-oxidativen Effekten des Isoflavons berichtet (Choi, 2006; Foti et al., 2005). Daidzein wirkt als Radikalfänger und erhöht sowohl *in vitro* als auch *in vivo* die Transkription antioxidativ wirksamer Enzyme wie Katalase, Superoxiddismutase und Glutathion-Peroxidase (Foti et al., 2005; Kampkoetter et al., 2008; Yen und Lai, 2003). Allerdings muss in Betracht gezogen werden, dass Daidzein in hohen Konzentrationen oxidativen Stress verursachen könnte, weswegen die intrazelluläre antioxidative Abwehr aktiviert werden könnte (Kampkoetter et al., 2008). Chronische Gabe von Daidzein verringert die Lipidperoxidation in Ratten, indem es die Regeneration und Aufrechterhaltung des Tocopherol-Spiegels fördert. Andererseits bewirkt das Isoflavon auch eine Absenkung des Glutathion-Levels im Gehirn der behandelten Ratten. Diese Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass Daidzein neben seiner antioxidativen Wirkung auch pro-oxidativ wirksam ist (Choi, 2006). Die oxidativen Daidzein-Metabolite 3'-, 6- und 8-HO-DAI verfügen allesamt über antioxidatives Potential und weisen dabei eine höhere Aktivität als die der Muttersubstanz Daidzein auf (Rüfer und Kulling, 2006). Dementsprechend könnten die Metabolite zu den antioxidativen Effekten von Daidzein *in vivo* beitragen (Kampkoetter et al., 2008).

### 2.4.6. Toxikologische Betrachtung

#### 2.4.6.1. Genistein

Die Generierung von DNA-Doppelstrangbrüchen durch Topoisomerase-Gifte wirft die Frage einer möglichen genotoxischen Wirkung von Genistein auf. Die Datenlage zur Genotoxizität von Genistein ist bislang nicht eindeutig und wird kontrovers diskutiert. Die Induktion von Mikrokernen durch das Isoflavon ist *in vitro* anhand mehrerer Studien belegt, wo zudem eine

klastogene Wirkung beschrieben wird (Di et al., 2004; Kulling et al., 2002; Kulling und Metzler, 1997; Morris et al., 1998). Die klastogene Wirkung des Isoflavons konnte zudem im Mauslymphom-Test bestätigt werden, wo Genistein zu einer signifikanten Erhöhung der Mutantenzahl führte (McClain et al., 2006). Lynch et al. (2003) prägten das Konzept eines Grenzwertes für Substanzen, die nur indirekt als Klastogene wirken. So wurde für Genistein als Topoisomerase II-Gift ein Grenzwert von 1 mg/mL postuliert, jedoch ist dieser Wert abhängig vom Zelltyp und den Zellkulturbedingungen (Lynch et al., 2003). Dieser pragmatische Grenzwert könnte als die Konzentration definiert werden, unterhalb welcher die Effekte als biologisch nicht relevant betrachtet werden könnten, da Topoisomerase-Gifte nur indirekt als Klastogene wirken. Im Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (HPRT) - Test wurde eine schwach mutagene Wirkung von Genistein nachgewiesen (Kulling et al., 2002; Kulling und Metzler, 1997). Des Weiteren verursacht das Isoflavon *ex vivo* Chromosomenaberrationen in humanen Lymphozyten (Abe, 1999), wohingegen im Ames-Test unabhängig einer metabolischen Aktivierung keine mutagene Wirkung zu beobachten war (Bartholomew und Ryan, 1980; Xu et al., 2003). Entgegen den *in vitro* Ergebnissen besitzt Genistein in Nagerstudien keine klastogene Wirkung, obwohl die Genistein-Konzentration im Plasma der Tiere die der im Menschen zu erwartenden Werte weit überstieg (McClain et al., 2006; Record et al., 1995; Taylor et al., 2009). Auch in Krebspatienten mit Prostatatumoren konnte nach Gabe eines isoflavonreichen Präparates weder eine Erhöhung der DNA-Strangbruchrate noch die Bildung von Mikrokernen in den peripheren Lymphozyten festgestellt werden (Miltyk et al., 2003). Diese Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass die *in vitro* erhaltenen Ergebnisse zur Genotoxizität von Genistein nicht prädiktiv für die *in vivo* Situation sind (Harvey et al., 2005). Genistein zeigte weiterhin keine kanzerogene Wirkung in p53-defizienten, transgenen Mäusen (Misra et al., 2002). Allerdings induziert das Isoflavon sowohl benigne als auch maligne Läsionen im Reproduktionstrakt von Nagern (Newbold et al., 2001). Dabei wird jedoch die kanzerogene Wirkung von Genistein vermutlich eher durch seine estrogene Wirkung als durch seine genotoxischen Eigenschaften vermittelt (Ashby, 2001).

Epidemiologische Studien legen einen Zusammenhang zwischen einer hohen mütterlichen Aufnahme an Topoisomerase-Hemmstoffen und der erhöhten Inzidenz kindlicher Leukämien nahe (Ross, 2000; Ross et al., 1996). Genistein induziert Translokationen und Deletionen im *MLL*-Gen, welches mit der Entwicklung dieser Leukämien assoziiert ist (Strick et al., 2000; van Waalwijk van Doorn-Khosrovani et al., 2007). Dementsprechend könnte Genistein Topoisomerase-vermittelt zur Entstehung kindlicher Leukämien beitragen (Felix et al., 2006).

#### 2.4.6.2. *Daidzein und seine oxidativen Metabolite*

Im Gegensatz zu Genistein konnte für das Isoflavon Daidzein *in vitro* kein genotoxisches Potential nachgewiesen werden (Kulling et al., 2002; Pool-Zobel et al., 2000; Schmitt et al., 2003). Lediglich eine Studie berichtet von einem leichten Anstieg an Mikrokernen ab einer Konzentration von 75  $\mu\text{M}$  (Di et al., 2004), wohingegen keine DNA-schädigende Wirkung im Comet Assay festgestellt werden konnte (Di et al., 2004). In Konzentrationen von 100 - 400  $\mu\text{M}$  verursacht Daidzein DNA-Schäden in humanem Sperma und peripheren Lymphozyten (Anderson et al., 2003). Indessen bewirkte die Behandlung mit den oxidativen Daidzein-Metaboliten 6-HO-DAI und 3'-HO-DAI die Induktion von Mikrokernen ab Konzentrationen von 50 - 100  $\mu\text{M}$  (Schmitt et al., 2003). Dabei könnte die Generierung der Mikrokerne auf der Oxidation der Metabolite zu ortho-Chinonen beruhen, für die eine klastogene Wirkung beschrieben ist (Schmitt et al., 2003). Im Ames Test konnten keine Hinweise auf eine mutagene Wirkung von Daidzein gefunden werden (Stopper et al., 2005). Vielmehr konnte sowohl für 6- und 8-HO-DAI als auch für Daidzein eine antimutagene Aktivität gezeigt werden, wobei 8-HO-DAI das stärkste antimutagene Potential aufweist (Chen et al., 2003b).

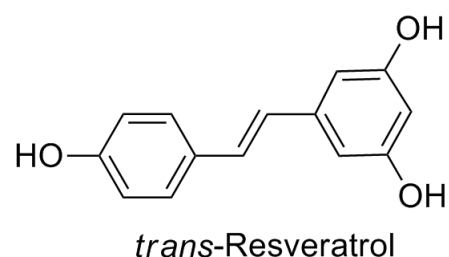
## 2.5. Vineatrol®30 und darin enthaltene Inhaltsstoffe

Der mediterranen Ernährungsweise und den darin enthaltenen Polyphenolen wurde in den letzten Jahrzehnten große Aufmerksamkeit zuteil, da sie in Zusammenhang mit dem sogenannten ‚French Paradox‘ gebracht wurde. Dabei bezeichnet der Begriff ‚French Paradox‘ die in Frankreich beobachtete geringe Inzidenz koronarer Herzkrankheiten trotz gleichzeitig hoher Aufnahme von gesättigten Fettsäuren und Cholesterol (Artaud-Wild et al., 1993; Renaud und de Lorgeril, 1992). Dem im Vergleich zu anderen Ländern erhöhten Rotweinkonsum der französischen Bevölkerung wurde dabei eine maßgebliche Rolle zugeschrieben, was zu einer intensiven Untersuchung der in Rotwein enthaltenen biologisch aktiven Komponenten, insbesondere des Resveratrols, führte (Lippi et al., 2010; Renaud und de Lorgeril, 1992). So konnte gezeigt werden, dass geringe bis moderate Mengen Rotwein einen positiven Einfluss in Bezug auf kardiovaskuläre Krankheiten ausüben, indem sie die Entstehung von Arteriosklerose verringern (Lippi et al., 2010). Dieser Effekt wurde hauptsächlich auf die Bioaktivität von Polyphenolen, Alkohol und Resveratrol zurückgeführt (Dohadwala und Vita, 2009; Lippi et al., 2010; Opie und Lecour, 2007; Perez-Vizcaino et al., 2006). Darüber hinaus rückte Resveratrol in den letzten Jahren erneut in den Fokus zahlreicher Studien, nachdem gezeigt worden war, dass das Stilben eine präventive Wirkung gegenüber einigen Krebserkrankungen besitzt (Bishayee, 2009; Jang et al., 1997; Pezzuto et al., 2006).

### 2.5.1. Resveratrol

#### 2.5.1.1. Vorkommen

Resveratrol (3,4',5-Trihydroxy-*trans*-Stilben, Abbildung 2.12) ist ein Phytoalexin, welches in Pflanzen zum Schutz vor pathogenen Angriffen sowie abiotischem Stress gebildet wird (Harikumar und Aggarwal, 2008; Langcake und Pryce, 1976). Das Stilben wird als sekundärer Metabolit in einer Vielzahl an Pflanzenspezies wie Weintrauben, Beeren, Pflaumen und Erdnüssen synthetisiert und wird als bioaktiver Inhaltsstoff von Rotwein diskutiert (Harikumar und Aggarwal, 2008; Shishodia und Aggarwal, 2006). Der Gehalt an *trans*-Resveratrol in Rotweinen unterliegt starken Schwankungen und beträgt im Durchschnitt



**Abb. 2.12:** Chemische Struktur von *trans*-Resveratrol.

1,9 ± 1,7 mg/L (8,2 ± 7,5 µM), wobei in einigen Sorten bis zu 14 mg/L *trans*-Resveratrol nachgewiesen wurden (Sternbo et al., 2006). In Weintrauben ist das Polyphenol hauptsächlich in der Schale enthalten, aber auch die Kerne sowie die Traubenstiele weisen geringe Konzentrationen an Resveratrol auf (LeBlanc, 2005).

### 2.5.1.2. *Biologische Wirkungen und molekulare Mechanismen*

Neben seiner positiven Wirkung auf koronare Herzerkrankungen wird in zahlreichen Studien ein chemopräventives sowie ein chemotherapeutisches Potential von Resveratrol diskutiert, da es alle drei Stadien der chemischen Kanzerogenese hemmen kann (Aggarwal et al., 2004; Jang et al., 1997; Pezzuto et al., 2006). Darüber hinaus soll Resveratrol heilsam auf altersassoziierte Krankheiten wie Diabetes, Arthritis und Neurodegenerationen wie Alzheimer wirken (Baur und Sinclair, 2006; Harikumar und Aggarwal, 2008; Saiko et al., 2008). All diese gesundheitsfördernden Eigenschaften werden mit der Aktivierung der Sirtuin-Proteine in Verbindung gebracht, welche in Mikroorganismen ähnlich einer Kalorienrestriktion wirken und dadurch den Alterungsprozess der Zelle verlangsamen (Baur und Sinclair, 2006; Lagouge et al., 2006; Quideau et al., 2012). Neben einer direkten Aktivierung des zur Familie der Sirtuin-Proteine gehörenden Sirt1 durch Resveratrol (Hubbard et al., 2013) wird inzwischen auch eine indirekte Wirkung des Stilbens auf diese Deacetylase diskutiert. So erhöht Resveratrol ( $\leq 50 \mu\text{M}$ ) die cAMP-Konzentration in Muskelzellen durch Hemmung von Phosphodiesterasen, wodurch schließlich die indirekte Aktivierung von Sirt1 resultiert (Park et al., 2012).

Resveratrol entfaltet seine antineoplastischen, antiinflammatorischen und antioxidativen Wirkungen über die Modulation zahlreicher intrazellulärer Signalwege (Aggarwal et al., 2004; Bishayee, 2009; Shankar et al., 2007). So konnte gezeigt werden, dass es zur Inhibierung von Kinasen und Cyclooxygenasen führt (Saiko et al., 2008) und auch Enzyme des DNA-Metabolismus, wie DNA-Polymerasen und Topoisomerasen, hemmt (Leone et al., 2012; Sun et al., 1998). Weiterhin induziert Resveratrol neben seiner intrinsischen Wirkung als Antioxidans die Expression antioxidativ wirksamer Enzyme (Smoliga et al., 2011).

### 2.5.1.3. *Pharmakokinetik*

Resveratrol besitzt eine niedrige Bioverfügbarkeit, da es einem schnellen Metabolismus unterliegt und rasch ausgeschieden wird. Nach oraler Aufnahme erfolgt die Absorption im Darm durch passive trans-epitheliale Diffusion in die Enterozyten, wonach Resveratrol zum Sulfat oder Glukuronid konjugiert, und das Konjugat wieder ins Lumen abgegeben wird. Dort

erfolgt entweder eine Dekonjugation mit anschließender Rückabsorption oder die Ausscheidung mit den Fäzes (Asensi et al., 2002; Goldberg et al., 2003; Walle et al., 2004). Eine orale Resveratrol-Gabe von 25 mg/kg KG führt beim Menschen nach ca. 0,5 - 2 h zu einer maximalen Plasmakonzentration von  $< 10$  ng/mL. Unter Berücksichtigung der Metabolite wurde eine weitaus höhere Konzentration von rund 400 - 500 ng/mL (ca. 2  $\mu$ M) erreicht (Goldberg et al., 2003; Walle et al., 2004). Nahezu 50% des im Plasma zirkulierenden Resveratrols sind an Plasmaproteine gebunden und die Ausscheidung erfolgt hauptsächlich über die Niere. Binnen 24 h werden insgesamt 70 - 98% des aufgenommenen Resveratrols mit dem Urin oder den Fäzes ausgeschieden (Chachay et al., 2011). Obwohl *in vivo* durch Resveratrol-Gabe nicht die Konzentrationen erreicht werden, die *in vitro* zu den gesundheitsfördernden Wirkungen führen, muss berücksichtigt werden, dass Resveratrol als lipophile Verbindung schnell durch Zellmembranen diffundieren kann (Timmers et al., 2012). In der Folge könnten höhere Konzentrationen im Gewebe erreicht werden als durch die gemessenen Plasmaspiegel angenommen (Timmers et al., 2012). Dementsprechend konnte gezeigt werden, dass Resveratrol und seine Metabolite in den Geweben Darm, Leber und Niere akkumulieren (Patel et al., 2010; Smoliga et al., 2011; Walle, 2011). Darüber hinaus ist das Stilben aufgrund seiner Lipophilie in der Lage die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden (Mokni et al., 2007).

## 2.5.2. Vineatrol®30

### 2.5.2.1. Herstellung und Zusammensetzung

Vineatrol®30 ist ein polyphenolreicher Extrakt, der aus jungen Trieben der Weinrebe (*Vitis vinifera*) in der Bordeaux-Region mittels ethanolischer Extraktion gewonnen wird (Billard et al., 2002; Nevo-Koch, 2010). Der Weinrebensprösslingextrakt weist einen Gehalt an Resveratrol und dessen Derivaten von ca. 37% auf, wobei neben *trans*-Resveratrol hohe Konzentrationen an Resveratrol-Oligomeren und -Polymeren enthalten sind (Macke et al., 2012). Nach Angaben des Herstellers Actichem (Montauban, Frankreich) ist die Zusammensetzung der restlichen 63% des Extraktes derzeit nicht bekannt, jedoch kann die Anwesenheit weiterer Polyphenole ausgeschlossen werden. Die Zusammensetzung des stilbenreichen Anteils von Vineatrol®30 ist in Tabelle 2.3 aufgeführt.

**Tabelle 2.3:** Prozentualer Anteil der in Vineatrol®30 enthaltenen Resveratrol-Derivate (Nevo-Koch, 2010).

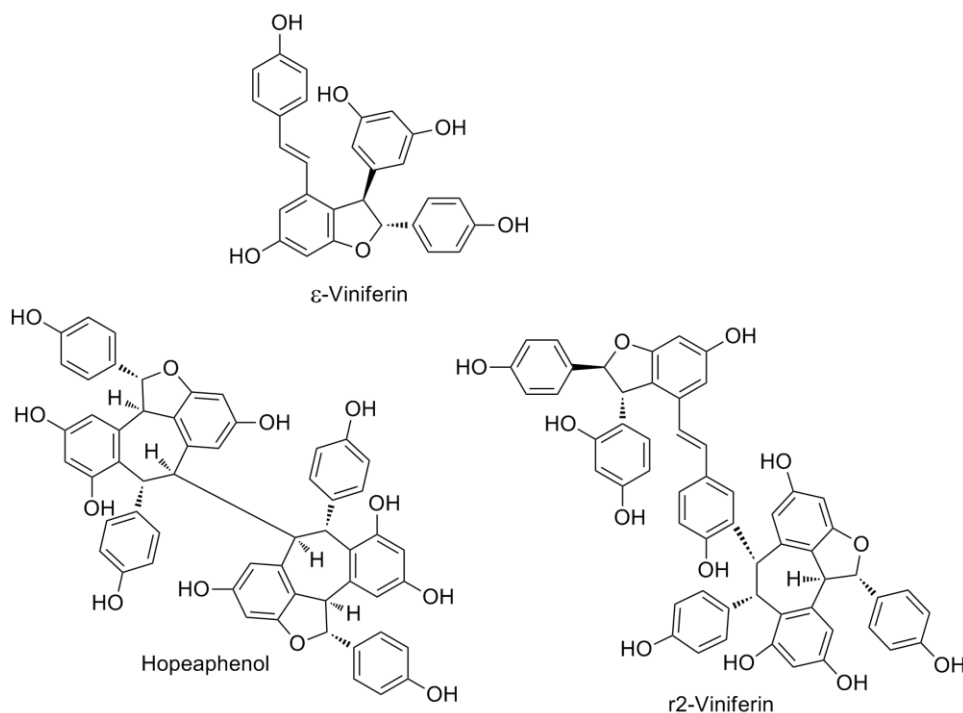
| Resveratrol-Monomer/Oligomer              | Anteil im Extrakt [%] |
|-------------------------------------------|-----------------------|
| $\epsilon$ -Viniferin                     | 14,6                  |
| <i>trans</i> -Resveratrol                 | 7,7                   |
| Ampelopsin A                              | 3,4                   |
| Miyabenol C                               | 2,5                   |
| r-Viniferin (Visitin B)                   | 2,5                   |
| Iso- <i>trans</i> - $\epsilon$ -Viniferin | 2,4                   |
| Hopeaphenol                               | 1,8                   |
| r <sup>2</sup> -Viniferin (Visitin A)     | 1,6                   |
| <i>trans</i> -Piceatannol                 | 0,6                   |
| <b>Gesamt</b>                             | <b>37,1</b>           |

#### 2.5.2.2. Biologische Aktivität von Vineatrol®30

Aufgrund seines hohen Gehaltes an *trans*-Resveratrol wurde Vineatrol®30 hinsichtlich potentieller gesundheitsfördernder Wirkungen untersucht, unter Berücksichtigung möglicher additiver oder synergistischer Effekte von Resveratrol, daraus abgeleiteten Oligomeren sowie weiteren Polyphenolen. So konnte gezeigt werden, dass Vineatrol®30 antiproliferativ, proapoptotisch und antioxidativ auf verschiedene Krebszelllinien wirkt (Billard et al., 2002; Brizuela et al., 2010; Gupta und Briyal, 2006; Marel et al., 2008). Dabei wurden für den Extrakt mitunter stärkere Effekte beobachtet als für die Einzelsubstanz *trans*-Resveratrol, was nahelegt, dass Vineatrol®30 weitere bioaktive Komponenten enthält (Billard et al., 2002). Die Resveratrol-Tetramere r<sup>2</sup>-Viniferin und Hopeaphenol sowie das Dimer  $\epsilon$ -Viniferin wurden als ebenfalls bioaktive Inhaltsstoffe identifiziert und tragen dementsprechend maßgeblich zur antiproliferativen Wirkung von Vineatrol®30 in humanen, epidermoiden Karzinomzellen bei (Macke et al., 2012). Die wachstumshemmenden Eigenschaften von Vineatrol®30 könnten auf einem Zellzyklusarrest in der frühen S-Phase beruhen, wodurch in der Folge apoptotische Prozesse eingeleitet werden (Colin et al., 2009; Marel et al., 2008). Ebenso wie Resveratrol stellt auch der Extrakt ein potentes Antioxidans dar und induziert die Expression antioxidativ-wirksamer Enzyme wie der Glutathion-Peroxidase oder der Superoxiddismutase (Mueller et al., 2009). Weiterhin konnte eine Aktivierung des Sirt1-Proteins durch Vineatrol®30 beobachtet werden, was eine präventive Wirkung des Extrakts gegenüber Arteriosklerose nahelegt (Romain et al., 2012).

### 2.5.3. Resveratrol-Oligomere

Trauben sowie Weinreben enthalten neben *trans*-Resveratrol auch Resveratrol-Derivate, die durch oxidative Oligomerisierung des Stilbens gebildet werden (Langcake und Pryce, 1976; Sotheeswaran und Pasupathy, 1993). Darüber hinaus kann die Oligomerisierung von Resveratrol in Trauben durch den Befall mit Pathogenen induziert werden, was in einer vermehrten Produktion von Viniferinen resultiert (Mattivi et al., 2011). In gesundem Traubengewebe konnten bislang die Resveratrol-Dimere  $\epsilon$ -Viniferin und Ampelopsin A sowie die Tetramere r2-Viniferin und Hopeaphenol nachgewiesen werden (Nevo-Koch, 2010). In Abbildung 2.13 sind die in dieser Arbeit untersuchten Resveratrol-Oligomere dargestellt.



**Abb. 2.13:** Chemische Strukturen der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Resveratrol-Derivate.

Einige der Resveratrol-Oligomere besitzen fungizide Wirkung, jedoch ist die Bioaktivität der Stilben-Derivate bislang nur unzureichend untersucht (Mattivi et al., 2011; Sotheeswaran und Pasupathy, 1993). Sowohl  $\epsilon$ -Viniferin, r2-Viniferin als auch Hopeaphenol besitzen antiproliferative Eigenschaften (Colin et al., 2008; Macke et al., 2012; Ohya et al., 1999; Zghonda et al., 2011), wobei das Wachstum von Krebszellen durch die Tetramere stärker gehemmt wird als durch das Dimer  $\epsilon$ -Viniferin (Steinberg, 2011). Die Resveratrol-Oligomere führen dabei zu einer teilweise stärker wachstumshemmenden Wirkung gegenüber Krebszellen als reines *trans*-Resveratrol selbst (Steinberg, 2011; Zghonda et al., 2011). Sowohl  $\epsilon$ -Viniferin als auch r2-Viniferin und Hopeaphenol induzieren erst einen Zellzyklusarrest in der S-Phase und aktivieren nachfolgend apoptotische Prozesse (Empl et

al., 2012; Kang et al., 2003; Steinberg, 2011).  $\epsilon$ -Viniferin, Hopeaphenol und r2-Viniferin wirken entzündungshemmend (Huang et al., 2001; Zhang et al., 2004), während r2-Viniferin und  $\epsilon$ -Viniferin darüber hinaus antioxidative Eigenschaften aufweisen (Jang et al., 2007; Kim et al., 2002).

$\epsilon$ -Viniferin wird analog zu Resveratrol schnell in die Zelle aufgenommen und metabolisiert. Hingegen stellt Hopeaphenol kein Substrat für die UDP-Glukuronosyltransferasen (UGT) der Leber dar und weist infolge der unterbleibenden Glukuronidierung eine bessere Bioverfügbarkeit als Resveratrol und  $\epsilon$ -Viniferin auf (Willenberg et al., 2012).

### 3. Ziele der Arbeit

Eine polyphenolreiche Ernährung wird mit zahlreichen gesundheitsfördernden Eigenschaften, darunter auch einer potentiell chemopräventiven Wirkung, in Verbindung gebracht. Produkte mit hohen Gehalten an Polyphenolen, wie NEM oder entsprechende diätetische Lebensmittel, werden daher zunehmend populärer; allerdings liegen bislang nur wenige Untersuchungen zu potentiell unerwünschten Effekten, insbesondere bei langfristiger Supplementierung, vor (Eisenbrand, 2007). Dies wirft Fragen nach der Sicherheit und Unbedenklichkeit dieser Präparate auf. Im Fokus dieser Arbeit standen daher Untersuchungen von ausgewählten Polyphenolen zur potentiellen Hemmung von Topoisomerasen und einer damit verbundenen DNA-Schädigung als mögliche, unerwünschte Wirkung dieser Verbindungen.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde der Frage nachgegangen, inwiefern das Isoflavon Genistein nach subkutaner bzw. oraler Gabe in der Lage ist, Topoisomerasen im Gastrointestinaltrakt männlicher Ratten zu beeinflussen. Dafür wurden Duodenum und Kolon der Tiere hinsichtlich einer Topoisomerase-giftenden Wirkung von Genistein untersucht. Messungen zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Genistein-Verabreichung sollten dabei Hinweise auf den zeitlichen Verlauf dieser Effekte ermöglichen. Ergänzend wurden die Genistein-Konzentrationen in den untersuchten Geweben ermittelt, um mögliche biologische Wirkungen im Zusammenhang mit den tatsächlich erreichten lokalen Konzentrationen interpretieren zu können.

Den zweiten Teil der Arbeit bildeten Untersuchungen zur biologischen Aktivität von Daidzein und zwei seiner oxidativen Metaboliten in humanen Kolonkarzinomzellen. Im Fokus standen dabei mögliche Einflüsse der oxidativen Daidzein-Metabolite auf Topoisomerasen, die DNA-Integrität, den Zellzyklus sowie die Apoptose-Induktion. Zudem wurde eine potentielle Modulation des intrazellulären Redoxgleichgewichts durch die Metabolite im Vergleich zur Muttersubstanz untersucht. Ziel war es, Erkenntnisse darüber zu gewinnen, ob und wie sich die im oxidativen Stoffwechsel von Daidzein gebildeten Metabolite in ihrer biologischen Aktivität von der Muttersubstanz unterscheiden.

Untersuchungen zur Hemmung humaner Topoisomerasen sowie eine mögliche Beeinflussung der DNA-Integrität in humanen, epidermoiden Krebszellen durch den stilbenreichen Weinrebensprösslingextrakt Vineatrol®<sup>30</sup> waren Gegenstand des letzten Teils der vorliegenden Arbeit. Zudem sollte untersucht werden, welchen Beitrag einzelne, im Extrakt enthaltene Resveratrol-Oligomere zur biologischen Wirkung des Gesamtextrakts leisten.

Insgesamt soll diese Arbeit zur Aufklärung möglicher unerwünschter Effekte infolge einer Topoisomerase-Hemmung durch Polyphenole beitragen.

In Anbetracht der vergleichsweise geringen Datenlage in der bisher zu diesem Thema publizierten Literatur wird nochmals deutlich, wie notwendig die weitere Identifizierung und Charakterisierung potentieller Topoisomerase-Hemmstoffe in Lebensmitteln und NEM ist. Ebenso ist die Aufklärung damit verbundener toxikologischer Effekte für eine verbesserte, spätere Risikoabschätzung und eventuell –minimierung bedeutsam.

## 4. Ergebnisse und Diskussion

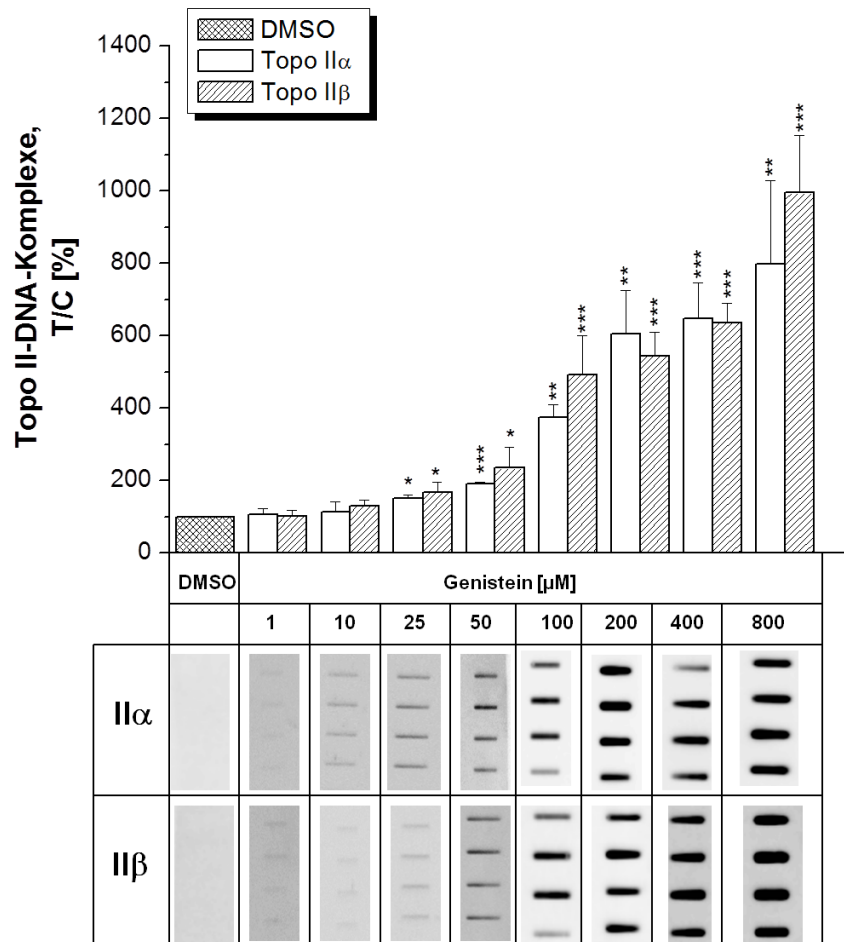
### 4.1. Untersuchungen zur biologischen Wirkung von Genistein

Das Isoflavon Genistein wird mit einem breiten Spektrum an gesundheitsfördernden Eigenschaften assoziiert (Adlercreutz et al., 2004; Andres et al., 2011), jedoch liegen wenige Daten zu potentiell nachteiligen Wirkungen im Menschen vor. Zahlreiche Studien beschäftigten sich mit der Aufklärung der zellulären Wirkmechanismen von Genistein. So wurden unter anderem Topoisomerasen als zelluläre Zielenzyme identifiziert (Bandeletti und Osheroff, 2007; Constantinou et al., 1995), deren Hemmung einen Beitrag zur DNA-schädigenden Wirkung von Genistein leistet (Salti et al., 2000). Im Fokus dieser Arbeit stand daher die eingehendere Untersuchung der Wirkung von Genistein auf Topoisomerasen *in vitro* wie auch *in vivo*, sowie eine mit einer Topoisomerase-Hemmung verbundene DNA-schädigende Wirkung in humanen Kolonkarzinomzellen. Die Inkubationsbedingungen der einzelnen, durchgeführten Versuche sind in Kapitel 6.2.3 detailliert beschrieben.

#### 4.1.1. Einfluss auf humane Topoisomerasen in HT1080-Zellen

In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass Genistein in leukämischen Zellen als Topoisomerase II-Gift wirkt, indem es die kovalenten Enzym-DNA-Intermediate im Zustand des DNA-Strangbruchs stabilisiert (Bandeletti und Osheroff, 2007). Ob die Wirkung des Isoflavons als Topoisomerase-Gift auch in humanen Fibrosarkomzellen besteht, wurde mit Hilfe des ‚*Isolating in vivo complexes of enzyme to DNA*‘ (ICE)-Bioassays untersucht. Durch Ultrazentrifugation im Dichtegradienten mit anschließender Fraktionierung erfolgt eine Auftrennung von DNA und Proteinen. In der Folge kann kovalent an die DNA gebundene Topoisomerase sowie freies Enzym mit Hilfe von spezifischen Antikörpern detektiert werden. Mit dem Nanodrop2000-Spektrophotometer wird der DNA-Gehalt der einzelnen Fraktionen gemessen und die Menge der ermittelten Topoisomerase II-DNA-Komplexe auf den DNA-Gehalt bezogen.

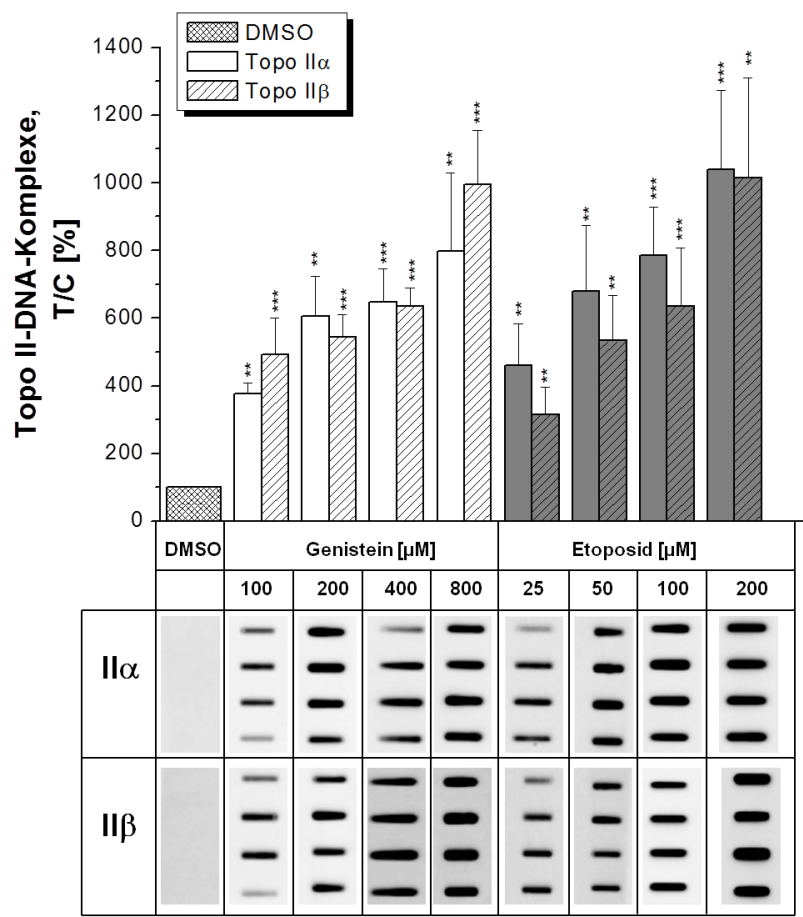
Für den ICE-Bioassay wurden HT1080-Zellen eine Stunde lang mit unterschiedlichen Genistein-Konzentrationen behandelt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.1 dargestellt.



**Abb. 4.1:** Stabilisierung kovalenter Topoisomerase II-DNA-Komplexe durch Genistein. HT1080-Zellen wurden nach einstündiger, serumfreier Inkubation mit Genistein in Anwesenheit von Katalase (100 U/mL) im ICE-Bioassay untersucht. Abgebildet sind die arithmetischen Mittelwerte  $\pm$  SD aus mind. drei unabhängigen Versuchen nach Normalisierung auf den DNA-Gehalt. Die angegebenen Signifikanzen beziehen sich auf die Lösungsmittelkontrolle DMSO (1%) und wurden mittels Student's *t*-Test berechnet (\*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$ ). Repräsentative Membranausschnitte der DNA-haltigen Fraktionen sind für beide Topoisomerase II-Isoformen gezeigt.

Das Isoflavon Genistein bewirkte nach einstündiger Inkubation von HT1080-Zellen eine konzentrationsabhängige Zunahme an Topoisomerase II-DNA-Komplexen. Bereits ab einer Konzentration von 25  $\mu$ M war die Menge der kovalenten Intermediate im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle DMSO signifikant erhöht und erreichte in der höchsten getesteten Konzentration von 800  $\mu$ M Werte um 900 - 1000%. Der konzentrationsabhängige Anstieg des Gehaltes an Enzym-DNA-Komplexen wurde auch auf den Immunoblots anhand der Intensitätszunahme des Lumineszenz-Signals in den DNA-haltigen Fraktionen deutlich sichtbar. Dabei zeigte Genistein keine Präferenz zu einer der beiden Topoisomerase II-Isoformen.

Um die Hemmeffizienz von Genistein als Topoisomerase-Gift abschätzen zu können, wurde es im direkten Vergleich zu dem als Chemotherapeutikum eingesetzten Topoisomerase II-Gift Etoposid (Abbildung 2.3) untersucht. Zur besseren Vergleichbarkeit sind die Ergebnisse des direkten Vergleiches dieser beiden Substanzen in Abbildung 4.2 einander gegenübergestellt.



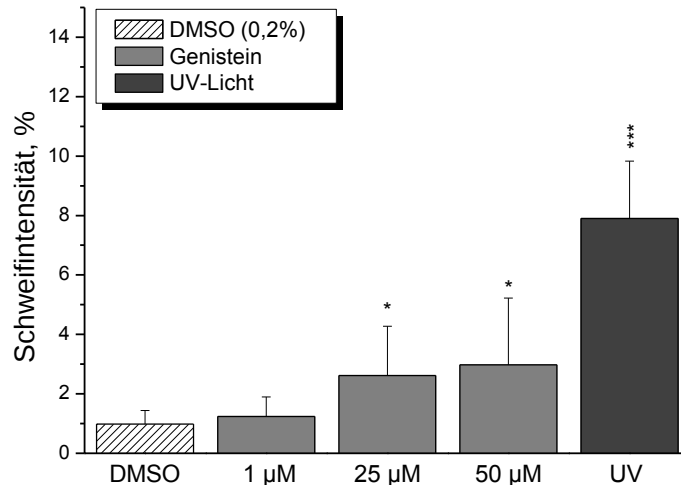
**Abb. 4.2:** Stabilisierung kovalenter Topoisomerase II-DNA-Intermediate durch Genistein bzw. Etoposid. Die Menge an DNA-gebundener Topoisomerase wurde nach einstündiger, serumfreier Inkubation von HT1080-Zellen mit Genistein bzw. Etoposid in Anwesenheit von Katalase (100 U/mL) im ICE-Bioassay bestimmt. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte  $\pm$  SD aus mind. drei unabhängigen Versuchen nach Normalisierung auf den DNA-Gehalt. Repräsentative Membranausschnitte der DNA-haltigen Fraktionen sind für beide Topoisomerase-Isoformen abgebildet (Kalfalah et al., 2011).

Die Behandlung von HT1080-Zellen sowohl mit Genistein als auch mit Etoposid führte zu einem konzentrationsabhängigen Anstieg der Menge kovalenter Topoisomerase II-DNA-Komplexe (Kalfalah et al., 2011), die in der jeweils höchsten untersuchten Konzentration um etwa den Faktor 10-11 gegenüber der Lösungsmittelkontrolle DMSO erhöht waren. Die zur Inkubation verwendeten Konzentrationsbereiche (100 - 800  $\mu$ M Genistein bzw. 25 - 200  $\mu$ M Etoposid) führten nach einstündiger Inkubation zu vergleichbaren, konzentrationsabhängigen Erhöhungen der Mengen an Topoisomerase II-DNA-Komplexen. In HT1080-Zellen entsprach

die Wirkung des Isoflavons als Topoisomerase II-Gift etwa einem Viertel der Wirkung des chemotherapeutisch eingesetzten Etoposids. Im unteren Konzentrationsbereich von  $< 100 \mu\text{M}$  wurde für Etoposid im Gegensatz zu Genistein eine leichte Affinität zu Topoisomerase II $\alpha$  beobachtet.

### 4.1.2. Einfluss auf die DNA-Integrität humaner Kolonkarzinomzellen

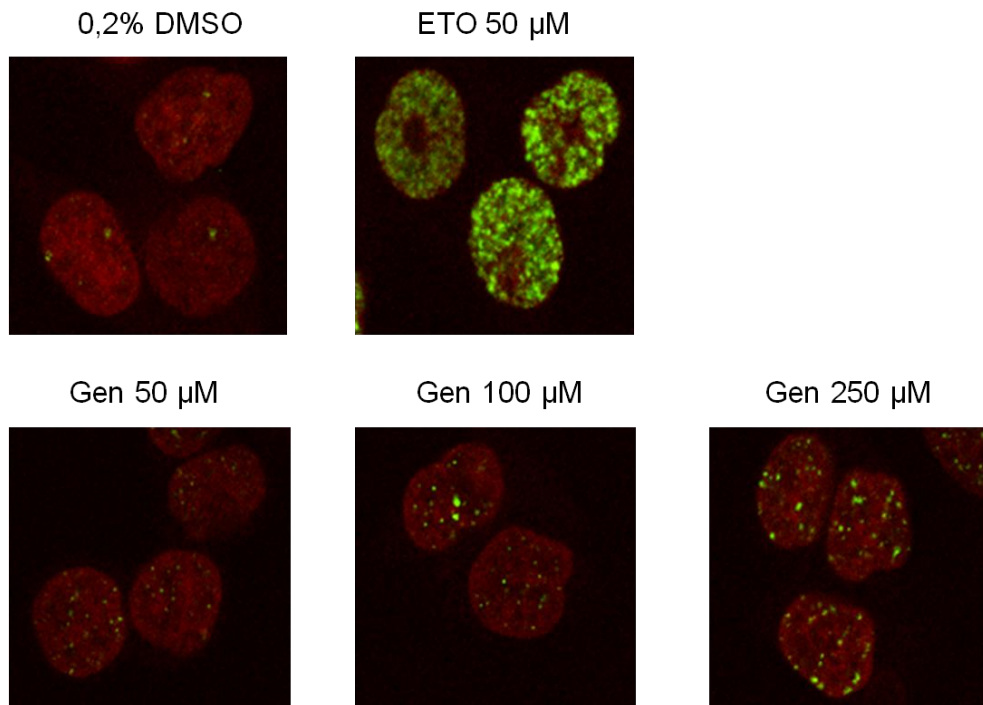
Indem Topoisomerase-Gifte die Religation der DNA-Segmente verhindern, können durch Kollision der kovalenten Enzym-DNA-Komplexe mit der Replikations- oder Transkriptionsmaschinerie DNA-Strangbrüche entstehen (Fortune und Osheroff, 2000). Eine mögliche DNA-schädigende Wirkung von Genistein wurde daher mittels alkalischer Einzelzellgelelektrophorese (Comet Assay) sowie mithilfe immunohistochemischer Detektion von  $\gamma\text{H2AX}$ -Foci in humanen Kolonkarzinomzellen untersucht. Die Phosphorylierung des Histons H2AX stellt dabei einen Biomarker für die Erkennung von DNA-Doppelstrangbrüchen dar. Das Histon wird umgehend nach auftretender DNA-Schädigung phosphoryliert, wobei die entstehenden  $\gamma\text{H2AX}$ -Foci den DNA-Doppelstrangbruch flankieren und somit die Detektion von DNA-Doppelstrangbrüchen erlauben (Bonner et al., 2008). Hingegen werden im alkalischen Comet Assay neben DNA-Doppelstrangbrüchen auch DNA-Einzelstrangbrüche, apurine und apyrimidine Stellen, DNA-Protein- sowie DNA-DNA-Crosslinks erfasst (Tice et al., 2000). Darüber hinaus werden auch transiente Strangbrüche erkannt, die während der DNA-Reparatur auftreten (Collins, 2004). Im Comet Assay wird die Schweifintensität erfasst, die das Verhältnis der DNA im Kometenkopf zum Schweif beschreibt und daher mit zunehmender DNA-Schädigung ansteigt. Die Ergebnisse zur DNA-strangbrechenden Wirkung von Genistein im Comet Assay unter alkalischen Bedingungen sind in Abbildung 4.3 dargestellt.



**Abb. 4.3:** DNA-strangbrechende Wirkung von Genistein in HT29-Zellen, bestimmt mittels Comet Assay unter alkalischen Bedingungen. Die Zellen wurden serumfrei für 1 h mit den angegebenen Genistein-Konzentrationen (in 0,2% DMSO) unter Katalase-Zusatz (100 U/mL) behandelt. Bestrahlung mit UV-Licht (312 nm; 2 min) wurde als Positivkontrolle eingesetzt. Die Ergebnisse sind als arithmetische Mittelwerte  $\pm$  SD aus mind. 6 unabhängigen Versuchen, jeweils als Doppelbestimmungen durchgeführt, dargestellt. Die angegebenen Signifikanzen beziehen sich auf die Lösungsmittelkontrolle DMSO und wurden mittels Student's *t*-Test berechnet (\*,  $p < 0,05$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$ ).

Nach einstündiger Inkubation von HT29-Zellen mit dem Isoflavon war die Schweifintensität ab einer Konzentration von 25  $\mu$ M signifikant gegenüber der Lösungsmittelkontrolle DMSO erhöht. Durch Behandlung der Zellen mit 50  $\mu$ M Genistein stieg die Schweifintensität auf ca. 3% an, was ein schwaches DNA-schädigendes Potential des Isoflavons im untersuchten Konzentrationsbereich nahelegt. Die Bestrahlung der HT29-Zellen mit UV-Licht (312 nm, 2 min) als Positivkontrolle verursachte ebenfalls einen signifikanten Anstieg der Schweifintensität im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle DMSO auf ca. 7%.

In Abbildung 4.4 sind die Ergebnisse der Untersuchungen zur H2AX-Phosphorylierung nach Genistein-Inkubation von humanen Kolonkarzinomzellen anhand repräsentativer Zellen gezeigt.

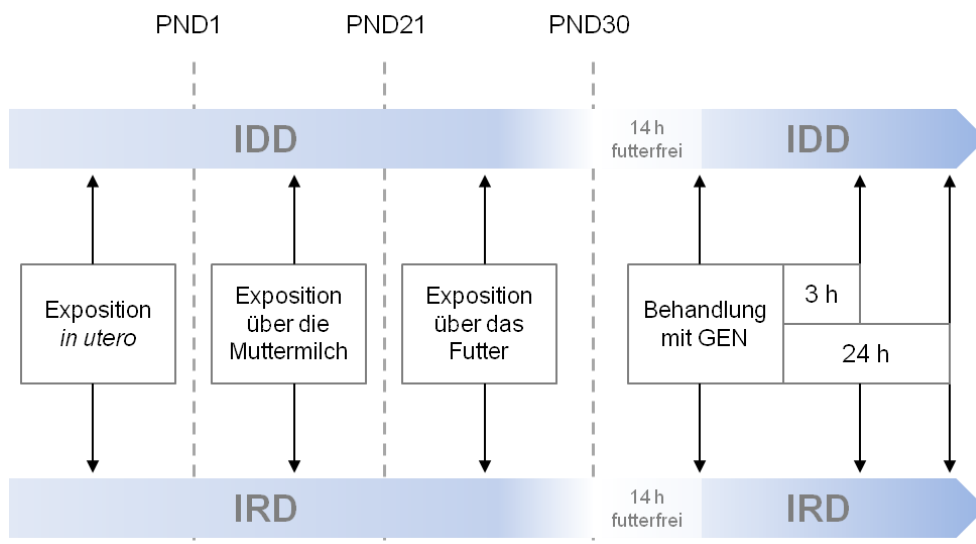


**Abb. 4.4:** Immunofluoreszenz-Detektion von  $\gamma$ H2AX-Foci nach Behandlung humaner Kolonkarzinomzellen mit Genistein. HCT116-Zellen wurden nach einstündiger, serumhaltiger Genistein-Inkubation in Anwesenheit von Katalase (100 U/mL) fixiert und die entstandenen  $\gamma$ H2AX-Foci mit spezifischen Antikörpern gefärbt (grün). Gleichzeitig wurde die DNA mit Propidiumiodid (rot) gegengefärbt. Das Topoisomerase II-Gift Etoposid (50  $\mu$ M) wurde als Positivkontrolle mitgeführt. Abgebildet sind repräsentative Zellen zweier unabhängig voneinander durchgeführter Experimente. Die Versuche wurden mit freundlicher Genehmigung von Y. Pommier, MD, im 'Laboratory of Molecular Pharmacology', NIH, Bethesda, durchgeführt.

Die obere Reihe von Abbildung 4.4 zeigt die Bildung von  $\gamma$ H2AX-Foci in HCT116-Zellen nach Etoposid-Exposition (50  $\mu$ M) im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle DMSO. Zur Auswertung wurde die Anzahl der Foci in insgesamt 100 Zellen bestimmt. Nach Behandlung mit der Lösungsmittelkontrolle waren durchschnittlich 1,3  $\gamma$ H2AX-Foci pro Zelle zu erkennen, was einem normalen Grundzustand an DNA-Doppelstrangbrüchen in Krebszellen entspricht. Hingegen war die Anzahl an  $\gamma$ H2AX-Foci nach einstündiger Behandlung mit Etoposid (50  $\mu$ M) stark erhöht, so dass die Foci den Zellkern nahezu vollständig bedeckten. Die einstündige Inkubation von humanen Kolonkarzinomzellen mit Genistein führte zu einer konzentrationsabhängigen Zunahme an  $\gamma$ H2AX-Foci. Dabei konnte bereits ab einer Genistein-Konzentration von 50  $\mu$ M mit durchschnittlich etwa 1,7 Foci pro Zelle ein marginaler Anstieg beobachtet werden, der in der höchsten getesteten Konzentration von 250  $\mu$ M etwa um den Faktor 4, verglichen zur Lösungsmittelkontrolle, anstieg. Demzufolge induzierte Genistein nach einstündiger Inkubation konzentrationsabhängig DNA-Doppelstrangbrüche in HCT116-Zellen.

#### 4.1.3. Wirkung von Genistein auf Topoisomerase II im Gastrointestinaltrakt männlicher Wistar Ratten

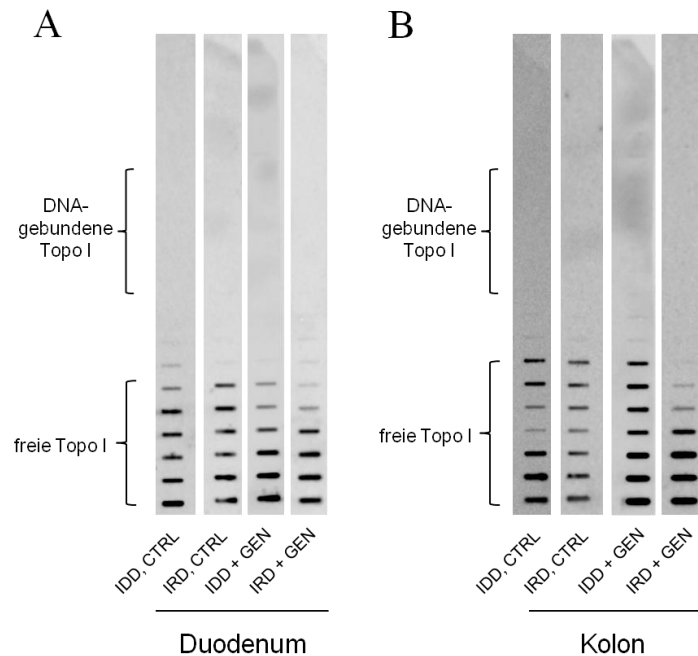
Das Isoflavon Genistein wirkt in verschiedenen Krebszelllinien als Topoisomerase-Gift (Bandeletti und Osheroff, 2007; Kalfalah et al., 2011) und wird darüber hinaus in Zusammenhang mit Topoisomerase-vermittelten chromosomalen Translokationen als Ursache kindlicher Leukämien gebracht (Azarova et al., 2010). Da derzeit wenig über die Wirkung von Genistein im Gewebe bekannt ist, wurde im Rahmen dieser Arbeit eine mögliche Topoisomerase-giftende Wirkung des Isoflavons *in vivo* untersucht. Die Behandlung der Tiere einschließlich der Gewebeentnahme wurde freundlicherweise von der Gruppe von Prof. Dr. Patrick Diel, Sporthochschule Köln, durchgeführt. Der zeitliche Ablauf der Tierstudie ist in Abbildung 4.5 schematisch dargestellt.



**Abb. 4.5:** Zeitliche Abfolge und Design der Tierstudie mit Genistein. Die lebenslange Exposition gegenüber einer isoflavonreichen oder isoflavonarmen Diät erfolgte bereits *in utero* über die Muttertiere. Männlichen Wistar Ratten wurde nach 14-stündiger futterfreier Phase Genistein (10 mg/kg KG) bzw. DMSO/Erdnussöl subkutan appliziert. Im Anschluss erhielten die Tiere wieder Zugang zum jeweiligen Futter und die Sektion erfolgte 3 h bzw. 24 h nach Behandlung. Die Behandlung der Tiere wurde von der Gruppe von Prof. Dr. Patrick Diel, Sporthochschule Köln, durchgeführt, wonach das Darmgewebe zur Verfügung gestellt wurde. GEN: Genistein; IDD: isoflavone depleted diet; IRD: isoflavone rich diet; PND: postnataler Tag.

Männliche Wistar Ratten wurden subkutan mit Genistein (10 mg/kg KG, in 20% DMSO/Erdnussöl) bzw. DMSO (Kontrollgruppe: 20% DMSO in Erdnussöl) behandelt, wonach die Stabilisierung von Topoisomerase-DNA-Intermediaten im Duodenum sowie Kolon mittels ICE-Bioassay erfasst wurde. Um zusätzlich den Einfluss einer lebenslangen Isoflavon-Exposition zu ermitteln, wurden die Ratten in zwei Gruppen unterteilt. Während die eine Gruppe mit einer isoflavonarmen Diät (IDD) gefüttert wurde, war die zweite Gruppe bereits pränatal über die Muttertiere, die isoflavonreiches Futter (isoflavone-rich diet; IRD)

erhielten, gegenüber Isoflavonen exponiert. Die Organe wurden 3 h bzw. 24 h nach subkutaner Behandlung entnommen und mittels ICE-Bioassay auf mögliche Topoisomerase-DNA-Komplexe untersucht. Abbildung 4.6 zeigt repräsentative Membranen für Duodenum- sowie Kolonproben nach Topoisomerase I-Detektion.

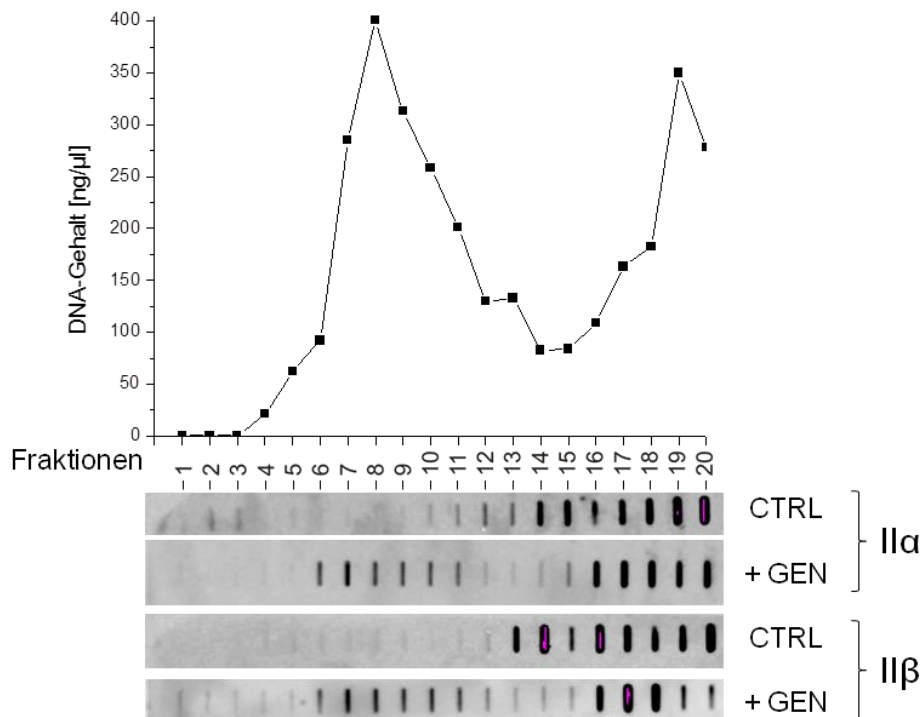


**Abb. 4.6:** Bestimmung DNA-gebundener Topoisomerase I im (A) Duodenum bzw. (B) Kolon männlicher Wistar Ratten 3 h nach subkutaner Genistein-Applikation (10 mg/kg KG; in 20% DMSO/Erdnussöl) (n>6). Repräsentative Membranausschnitte sind gezeigt. IDD: isoflavone depleted diet; IRD: isoflavone rich diet; CTRL: Kontrollgruppe (20% DMSO in Erdnussöl); GEN: Genistein.

Im Darmgewebe von Tieren der Kontrollgruppen konnten, unabhängig von der verabreichten Diät, keine Topoisomerase I-DNA-Komplexe in den DNA-haltigen Fraktionen detektiert werden. Auch bei den mit Genistein behandelten Tieren war weder im Duodenum noch im Kolon 3 h nach subkutaner Applikation DNA-gebundene Topoisomerase I erkennbar. Hingegen zeigten die Fraktionen niedriger Dichte ein deutliches Proteinsignal, was einen Hinweis auf ungebundenes Enzym darstellt. Auch 24 h nach Verabreichung des Vehikels oder Genistein konnte in keiner der Gruppen eine Zunahme der Topoisomerase I-DNA-Komplexe im Darm der Ratten nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Dementsprechend kann davon ausgegangen werden, dass Genistein unter den verwendeten Bedingungen weder im Duodenum noch im Kolon von Ratten als Topoisomerase I-Gift wirkt.

Im Weiteren wurde die Stabilisierung kovalenter Topoisomerase II-DNA-Komplexe durch das Sojaisoflavon Genistein im Duodenum von männlichen Wistar Ratten im ICE-Bioassay

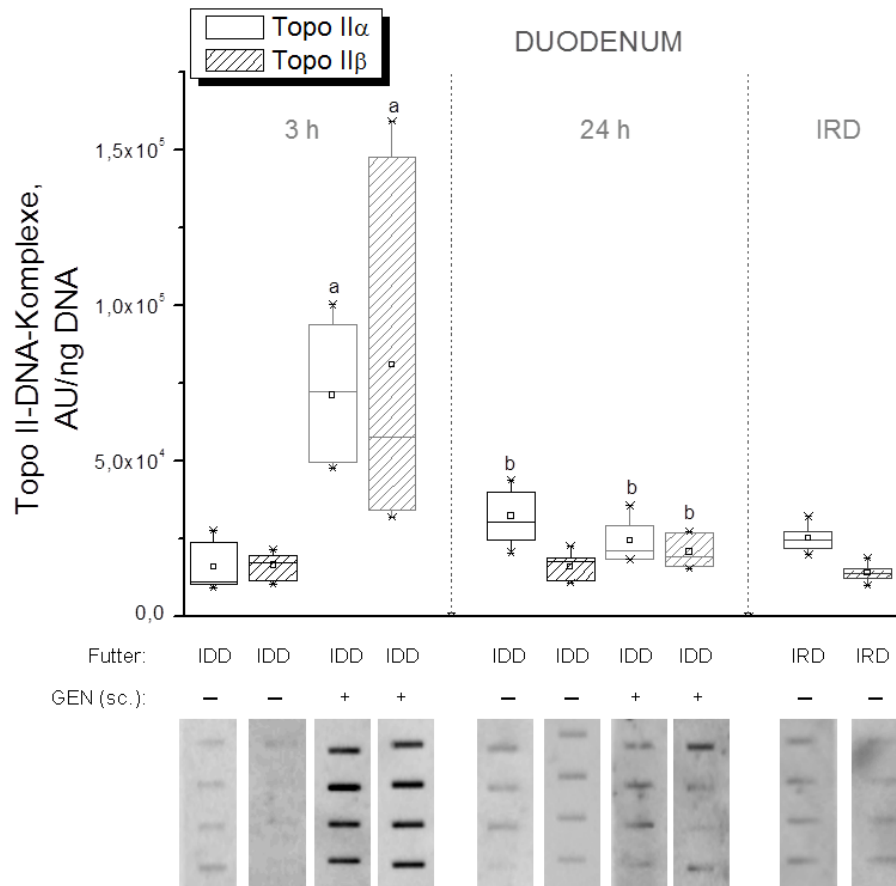
untersucht. Abbildung 4.7 zeigt repräsentative Membranen nach Immunodetektion von Topoisomerase II $\alpha$  bzw. II $\beta$ .



**Abb. 4.7:** Wirkung von Genistein auf die Stabilisierung kovalenter Topoisomerase II-DNA-Komplexe im Duodenum männlicher Wistar Ratten (ICE-Bioassay). Die Ratten wurden nach lebenslanger isoflavonarmer Ernährung (IDD) 3 h mit Genistein (10 mg/kg KG, subkutan) bzw. leerem Vehikel (DMSO/Erdnussöl) behandelt. Der DNA-Gehalt wurde mittels Nandrop2000-Spektrophotometer ermittelt und ist exemplarisch für eine Probe der Kontrollgruppe gegen die einzelnen Fraktionen aufgetragen. Repräsentative Immunoblots sind gezeigt. CTRL: Kontrollgruppe; GEN: Genistein.

Am exemplarisch dargestellten Verlauf des DNA-Gehalts für eine Probe der IDD-Kontrollgruppe ist ein Maximum in den Fraktionen hoher Dichte (Fraktionen 7-11) zu erkennen. Die einzelnen Zentrifugat-Fractionen wurden photometrisch mittels ihres UV-Absorptionsquotienten bei 260 nm und 280 nm ( $A_{260/280}$ ) auf ihr Verhältnis an enthaltener DNA und Proteinen untersucht. Ab etwa Fraktion 16 wurde eine Zunahme der Proteinmenge beobachtet, die in Einklang mit der ebenfalls erhöhten Chemilumineszenz-Zunahme ebendieser Fraktionen im Immunoblot war (Ergebnisse nicht gezeigt). Eine Behandlung der Tiere mit Genistein (10 mg/kg KG) resultierte in einem Anstieg an Topoisomerase II-DNA-Intermediaten im Duodenum, was sich in dem deutlichen Signal für Topoisomerase II $\alpha$  bzw. II $\beta$  in den DNA-haltigen Fraktionen der Genistein-behandelten Gruppen im Vergleich zu den Kontrollgruppen widerspiegelt. In den Kontrollgruppen hingegen waren die Topoisomerase II-Enzyme lediglich als freie Enzyme detektierbar. Die Ergebnisse des ICE-Bioassays zum Duodenum sind nach Semiquantifizierung in Abbildung 4.8 gezeigt. Eine

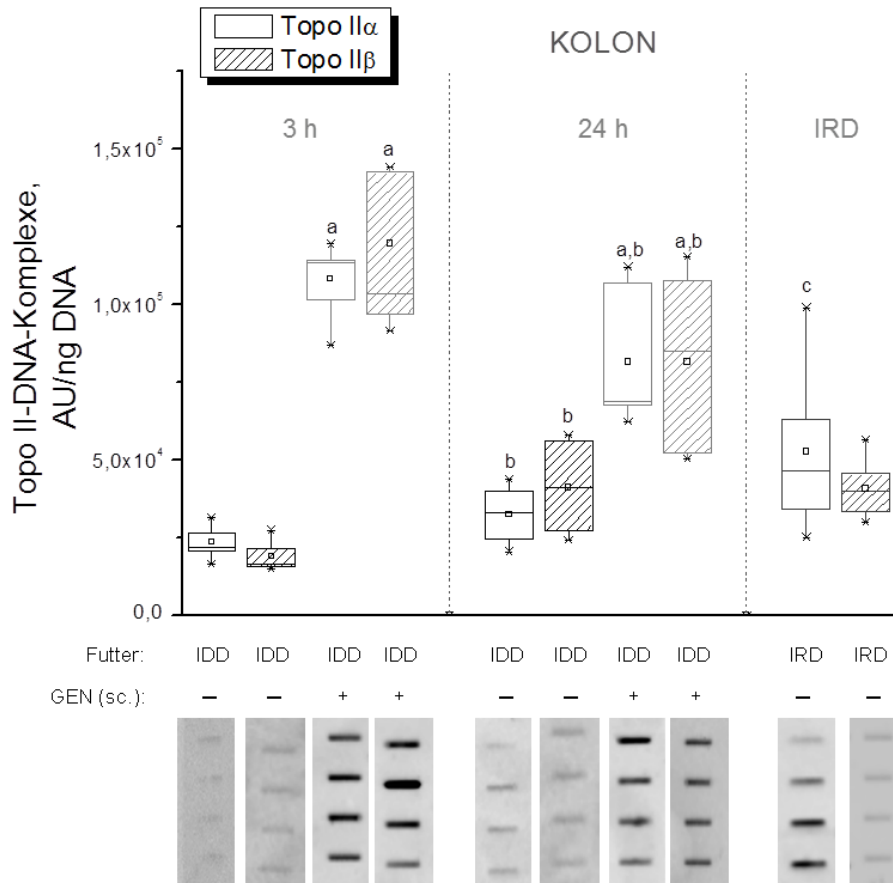
Stabilisierung der kovalenten Topoisomerase II-DNA-Komplexe wurde durch computergestützte Integration der Intensität der Chemilumineszenz-Signale ermittelt und auf den DNA-Gehalt normiert.



**Abb. 4.8:** Stabilisierung kovalenter Topoisomerase II-DNA-Komplexe im Duodenum von Wistar Ratten nach lebenslanger IDD (ICE-Bioassay). Die Anzahl der Enzym-DNA-Intermediate wurde 3 h bzw. 24 h nach subkutaner Genistein-Applikation (10 mg/kg KG) im ICE-Bioassay untersucht. Ergänzend sind die Werte der IRD-Kontrollgruppe gezeigt. Repräsentative Membranausschnitte der DNA-haltigen Fraktionen sind abgebildet. Der Median ist durch eine horizontale Linie gekennzeichnet, während die Box die 25-75sten Perzentile umfasst. Die Ergebnisse sind normalverteilt (Shapiro-Wilk Test).  $n=5-10$ . Die angegebenen Signifikanzen wurden mittels Student's  $t$ -Test berechnet ( $p<0,05$ ) und beziehen sich auf (a) die jeweilige Kontrollgruppe oder zeigen (b) Unterschiede zwischen den Ergebnissen nach 24 h und 3 h an.

Die Semiquantifizierung ergab für die IDD-Kontrollgruppen einen niedrigen Grundlevel an Topoisomerase II-DNA-Komplexen mit geringer Varianz. Lediglich für Topoisomerase II $\alpha$  war die Zahl der ermittelten Intermediate 24 h nach Verabreichung des Vehikels leicht erhöht. Drei Stunden nach subkutaner Genistein-Applikation war für beide Topoisomerase-Isoformen ein signifikanter Anstieg der Anzahl an Enzym-DNA-Komplexen gegenüber den Kontrollen um etwa den Faktor 4 - 5 zu beobachten, der jedoch mit einer hohen Schwankungsbreite verbunden war. Hingegen erreichte die Anzahl der ‚Cleavage Komplexe‘ 24 h nach Genistein-Verabreichung wieder das Grundniveau der Kontrollen. Die Tiere, die lebenslang

isoflavonreiches Futter erhalten hatten, wiesen ebenfalls einen verhältnismäßig niedrigen Grundlevel an Topoisomerase II-DNA-Intermediaten im Duodenum auf. Dabei konnten keine signifikanten Unterschiede basierend auf den Futterarten festgestellt werden.

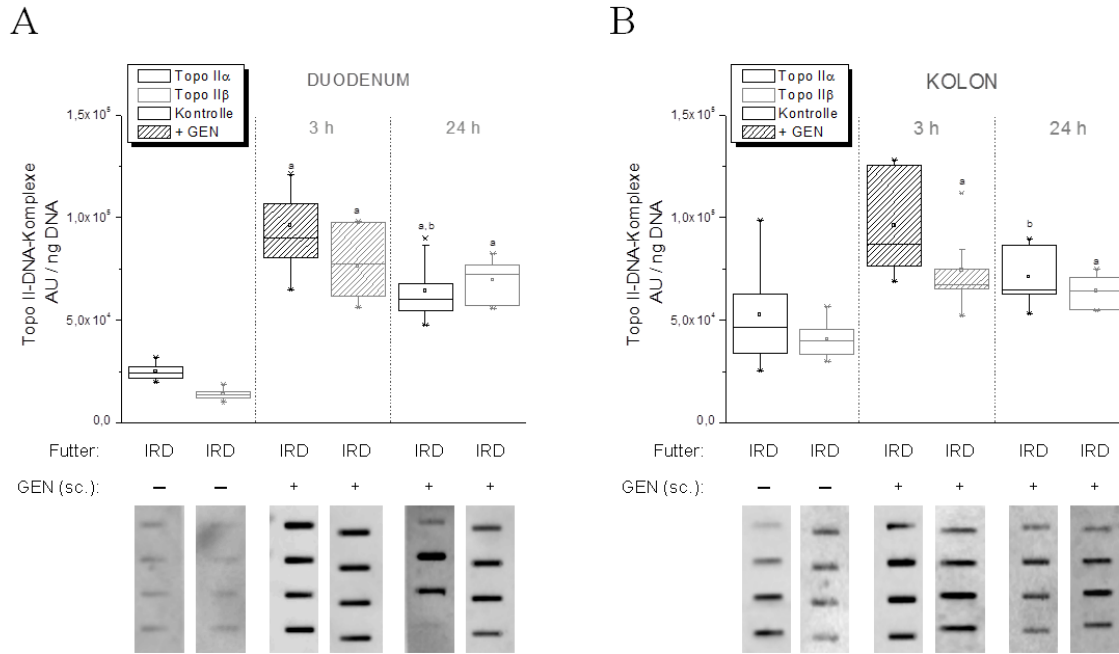


**Abb. 4.9:** Einfluss subkutaner Genistein-Gabe auf die Stabilisierung kovalenter Topoisomerase II-DNA-Komplexe im Kolon von Wistar Ratten nach lebenslanger isoflavonarmer Ernährung (ICE-Bioassay). Zusätzlich sind die Werte der Tiere nach lebenslanger isoflavonreicher Futteraufnahme gezeigt. Repräsentative Membranausschnitte der DNA-haltigen Fraktionen sind abgebildet. Die Boxen umfassen die 25-75sten Perzentile, während der Median durch eine horizontale Linie gekennzeichnet ist.  $n=5-10$ . Die Ergebnisse genügen der Normalverteilung nach Shapiro-Wilk. Die angegebenen Signifikanzen wurden mittels Student's *t*-Test berechnet ( $p<0,05$ ) und beziehen sich auf (a) die jeweilige Kontrollgruppe oder kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen (b) den Ergebnissen nach 24 h und 3 h oder (c) der IRD-Gruppe und der IDD-Kontrollgruppe (24 h).

Die durch Semiquantifizierung erhaltenen Ergebnisse der Stabilisierung kovalenter Topoisomerase II-DNA-Intermediate im Kolon männlicher Wistar Ratten sind in Abbildung 4.9 dargestellt. Der Grundgehalt an kovalenten Intermediaten 3 h nach Applikation des Vehikels liegt im Kolon in einem vergleichbaren Bereich wie im Duodenum der IDD-Ratten. Nach 24 h steigt der Gehalt an Enzym-DNA-Intermediaten in den Kontrollgruppen für beide Topoisomerase-Isoformen leicht, dennoch signifikant, gegenüber den Ergebnissen nach 3 h an

(Faktor 1,4 - 2,1). Die Genistein-Behandlung der Tiere führte 3 h nach Applikation zu einer signifikanten Zunahme der Topoisomerase II-DNA-Komplexe im Kolon, wobei der Gehalt um etwa den Faktor 5 - 6 anstieg. Signifikant unterschiedliche Ergebnisse zwischen den untersuchten Geweben waren 24 h nach Genistein-Applikation zu beobachten. Im Gegensatz zum Duodenum blieben die durch Genistein induzierten Level an Topoisomerase II-DNA-Intermediaten im Kolon bestehen. Allerdings war die Menge kovalenter Komplexe 24 h nach Genistein-Behandlung im Vergleich zu den Werten nach 3 h deutlich reduziert, was zu der Annahme führt, dass das Maximum der Topoisomerase-Giftung durch Genistein nach 24 h bereits überschritten ist. Insgesamt konnten keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Affinität von Genistein zu einer Topoisomerase-Isoform im Kolon nachgewiesen werden. Eine orale Isoflavon-Aufnahme über das Futter bewirkte eine signifikante Erhöhung der Anzahl an kovalenten Topoisomerase II $\alpha$ -DNA-Intermediaten um etwa den Faktor 2 verglichen mit der IDD-Kontrollgruppe.

Um mögliche Einflüsse einer lebenslangen Isoflavon-Exposition auf die Wirkung von Genistein als Topoisomerase-Gift zu untersuchen, erhielten die betreffenden Versuchstiere sowohl vor, als auch nach der subkutanen Genistein-Applikation IRD-Futter. Abbildung 4.10 zeigt die Ergebnisse zur Untersuchung des Einflusses von Genistein auf die Stabilisierung kovalenter Topoisomerase II-DNA-Komplexe im Duodenum (A) bzw. Kolon (B) männlicher Wistar Ratten, die bereits prä- sowie postnatal gegenüber Isoflavonen exponiert waren.

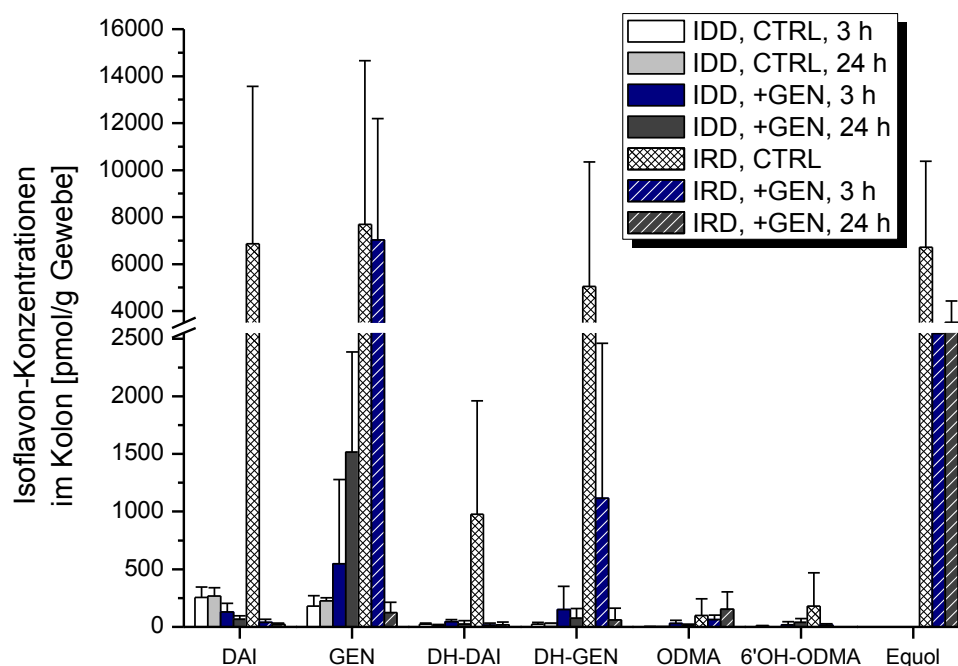


**Abb. 4.10:** Wirkung von Genistein auf die Stabilisierung von Topoisomerase II-DNA-Komplexen im (A) Duodenum bzw. (B) Kolon von Wistar Ratten nach lebenslanger isoflavonreicher Futteraufnahme (ICE-Bioassay). Die Anzahl an kovalent gebundenen Enzym-DNA-Intermediaten wurde 3 h bzw. 24 h nach subkutaner Genistein-Applikation (10 mg/kg KG) im ICE-Bioassay untersucht. Repräsentative Membranausschnitte der DNA-haltigen Fraktionen sind abgebildet. Der Median ist durch eine horizontale Linie gekennzeichnet, während die Box die 25-75sten Perzentile umfasst. Die Enden der Whisker schließen die 10-90sten Perzentile mit ein.  $n=5-10$ . Die Ergebnisse sind normalverteilt (Shapiro-Wilk Test) und die angegebenen Signifikanzen wurden mittels Student's  $t$ -Test berechnet ( $p<0,05$ ). Signifikante Unterschiede zwischen (a) GEN-Behandlung und Kontrollgruppe, (b) den Ergebnissen nach 3 h und 24 h.

Der Grundgehalt an Enzym-DNA-Intermediaten war nach Vehikel-Gabe im Duodenum relativ niedrig angesiedelt und zeigte für beide Topoisomerase-Isoformen eine geringe Varianz. Eine subkutane Genistein-Applikation bewirkte einen signifikanten Anstieg der kovalenten Enzym-DNA-Komplexe im Duodenum sowohl 3 h als auch 24 h nach Verabreichung des Isoflavons. Während die Menge an Topoisomerase II $\alpha$ -DNA-Intermediaten nach 24 h tendenziell gegenüber den nach 3 h beobachteten Werten abnahm, blieb die Anzahl an Topoisomerase II $\beta$ -DNA-Intermediaten im Wesentlichen unverändert. Im Kolon der Tiere zeichnete sich ein leicht verändertes Bild ab, da das Grundniveau an stabilisierten Topoisomerase II-DNA-Komplexen der Kontrollgruppen gegenüber den Werten des Duodenums deutlich erhöht waren. Zudem wies die IRD-Kontrollgruppe für die Stabilisierung der Topoisomerase II $\alpha$ -DNA-Intermediate eine hohe Schwankungsbreite auf. Genistein bewirkte 3 h nach Applikation eine Zunahme der ‚Cleavage Komplexe‘ im Kolon der Ratten um etwa Faktor 1,4 (II $\alpha$ ) bzw. 2,3 (II $\beta$ ). So unterschied sich die Menge kovalenter Intermediate für die Topoisomerase II $\beta$ -Isoform signifikant gegenüber der Kontrollgruppe. Die Stabilisierung der kovalenten Komplexe für die Topoisomerase II $\beta$ -Isoform konnte auch

24 h nach Isoflavon-Applikation beobachtet werden, wohingegen für Topoisomerase II $\alpha$  keine signifikanten Unterschiede zur Kontrollgruppe festgestellt werden konnten. Die durch Genistein induzierten Topoisomerase II $\beta$ -DNA-Komplexe ließen dabei keine Abnahme gegenüber dem früheren Zeitpunkt von 3 h erkennen.

Zusätzlich zu den Untersuchungen im ICE-Bioassay wurden von der Gruppe von Frau Prof. Kulling, Max Rubner-Institut Karlsruhe, die Isoflavon-Konzentrationen im Serum sowie im Kolon der Tiere mittels UHPLC-MS/MS bestimmt. Die Messergebnisse wurden freundlicherweise von Frau Prof. Dr. Kulling zur Verfügung gestellt und sind in Abbildung 4.11 zusammengefasst.



**Abb. 4.11:** Messung der Isoflavon-Konzentrationen nach enzymatischer Spaltung der Konjugate im Kolon männlicher Wistar Ratten mittels UHPLC-MS/MS (persönliche Mitteilung von Frau Prof. Dr. Kulling, Max Rubner-Institut, Karlsruhe). Die arithmetischen Mittelwerte  $\pm$  SD der einzelnen Gruppen sind dargestellt. DAI: Daidzein, GEN: Genistein, DH-DAI: Dihydrodaidzein; DH-GEN: Dihydrogenistein; ODMA: O-Desmethylangolensin; 6'-OH-ODMA: 6'-Hydroxy-O-Desmethylangolensin.

Die Gewebeskonzentrationen an freiem Daidzein waren in den Kontrollgruppen relativ niedrig mit Ausnahme der IRD-Kontrollgruppe, in der die Daidzein-Konzentration  $6867 \pm 6694$  pmol/g Gewebe betrug. Die Genistein-Konzentration stieg 3 h nach Applikation in den IDD-Tieren um etwa den Faktor 3 an und erreichte nach 24 h Werte von  $1516 \pm 869$  pmol/g Kolon. Hingegen betrug die Genistein-Konzentration im Kolon der Tiere, die lebenslang isoflavonreiches Futter erhalten hatten, ohne zusätzliche Genistein-Behandlung mit  $7694 \pm 6957$  pmol/g Kolon bereits ein Vielfaches der Genistein-Konzentrationen der

IDD-Tiere. Durch zusätzliche subkutane Genistein-Applikation stieg die Gewebekonzentration des Isoflavons in den IRD-Tieren nicht weiter an – im Gegenteil konnte nach 24-stündiger Genistein-Behandlung lediglich ein Genistein-Gehalt von  $124 \pm 88$  pmol/g Kolon detektiert werden. Die reduktiven Metabolite von Genistein und Daidzein erreichten lediglich bei den IRD-Tieren höhere Konzentrationen, so wurde Equol ausschließlich in Tieren mit isoflavonreichem Futter erfasst.

#### 4.1.4. Tabellarischer Überblick über die Ergebnisse

Tabelle 4.1 gibt eine Übersicht über die Ergebnisse zu den *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen mit Genistein.

**Tabelle 4.1:** Tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse zur biologischen Wirkung von Genistein. <sup>1</sup>Erhöhung um den angegebenen Faktor im Vergleich zu den jeweiligen Kontrolltieren; <sup>2</sup>angegeben in Genistein-Äquivalenten. – kein Unterschied zur Kontrolle; n.b. nicht bestimmt.

| <i>in vitro</i>                   |             | Topo II-Giftung<br>(HT1080)            | DNA-Strangbrüche<br>(HT29)          | $\gamma$ H2AX-Foci<br>(HCT116)  |                 |
|-----------------------------------|-------------|----------------------------------------|-------------------------------------|---------------------------------|-----------------|
| <b>Genistein</b>                  |             | $\geq 25 \mu\text{M}$                  | $\geq 25 \mu\text{M}$               | $\geq 100 \mu\text{M}$          |                 |
| <i>in vivo</i>                    |             | Topo II-Giftung <sup>1</sup>           |                                     | Konzentration <sup>2</sup> [nM] |                 |
|                                   |             | Duodenum<br>(II $\alpha$ /II $\beta$ ) | Kolon<br>(II $\alpha$ /II $\beta$ ) | Plasma                          | Kolon           |
| <b>Subkutan<br/>(10 mg/kg KG)</b> | <b>3 h</b>  | 4,5/4,9                                | 4,6/6,3                             | $184 \pm 114$                   | $547 \pm 731$   |
|                                   | <b>24 h</b> | – /–                                   | 2,5/2,0                             | $2730 \pm 2636$                 | $1516 \pm 869$  |
| <b>Oral<br/>(25-50 mg/kg KG)</b>  |             | – /–                                   | 2,2/1,3                             | $1301 \pm 494$                  | $7694 \pm 6957$ |
| <b>Oral +<br/>subkutan</b>        | <b>3 h</b>  | 3,8/5,7                                | 1,4/2,3                             | n.b.                            | $7026 \pm 5173$ |
|                                   | <b>24 h</b> | 2,6/5,0                                | 1,1/1,8                             |                                 | $124 \pm 88$    |

### 4.1.5. Diskussion der biologischen Wirkungen von Genistein

Dem Isoflavon Genistein wurde in den letzten Jahren besondere Aufmerksamkeit zuteil, da es in Zusammenhang mit zahlreichen gesundheitsfördernden Eigenschaften gebracht wird (Adlercreutz et al., 2004; Andres et al., 2011; Banerjee et al., 2008). So nehmen immer mehr Frauen in der Menopause Genistein-Präparate ein, da diese aufgrund ihrer phytoestrogenen Wirkung zur Linderung klimakterischer Beschwerden beitragen sollen (Eisenbrand, 2007). Des Weiteren sind Neugeborene, die Soja-basierte Säuglingsnahrung erhalten, gegenüber Isoflavonen besonders hoch exponiert (Setchell et al., 1998). Dies wirft die Frage nach möglichen adversen Effekten von Genistein auf, insbesondere bei frühkindlicher und langfristiger Exposition.

Eine Reihe von Studien befasste sich mit der Aufklärung der zellulären Wirkmechanismen von Genistein. Es konnte gezeigt werden, dass Genistein neben weiteren zellulären Targets die Aktivität von Topoisomerase II-Enzymen hemmt (Bandelet und Osheroff, 2007; Constantinou et al., 1995). Auch im Rahmen dieser Arbeit konnte eine Topoisomerase-Giftung in Fibrosarkomzellen gezeigt werden. Dabei induzierte das Isoflavon im Konzentrationsbereich von 100 - 800  $\mu\text{M}$  eine vergleichbare Erhöhung der Menge kovalenter Topoisomerase II-DNA-Intermediate wie das als Chemotherapeutikum eingesetzte Topoisomerase II-Gift Etoposid in Konzentrationen von 25 - 200  $\mu\text{M}$  (Kalfalah et al., 2011). Dies stimmt mit Ergebnissen früherer Studien überein, in denen Genistein äquimolar zu Etoposid eine Zunahme an ‚*Cleavage Komplexen*‘ in humanen Leukämiezellen bewirkte (Bandelet und Osheroff, 2008). Obwohl Genistein im zellfreien System eine höhere Affinität zur II $\beta$ -Isoform zeigte (Bandelet und Osheroff, 2007), konnte in humanen Fibrosarkomzellen keine Präferenz des Isoflavons zu einem Topoisomerase II-Isoenzym festgestellt werden.

Da Topoisomerase II-Gifte die Menge kovalenter Enzym-DNA-Intermediate erhöhen, können durch Kollision dieser Komplexe mit der Replikations- oder Transkriptionsmaschinerie permanente DNA-Doppelstrangbrüche entstehen (McClendon und Osheroff, 2007). Genistein führte in humanen Kolonkarzinomzellen im gleichen Konzentrationsbereich zur Induktion von DNA-Schäden, in dem zuvor eine Topoisomerase II-Giftung in Fibrosarkomzellen beobachtet worden war. Die zusätzliche Detektion von  $\gamma\text{H2AX}$ -Foci legt dabei die Bildung von Topoisomerase II-vermittelten DNA-Doppelstrangbrüchen durch Genistein nahe. Dies steht im Einklang mit Ergebnissen früherer Studien, in denen ebenfalls eine Erhöhung der DNA-Strangbruchrate durch Genistein in verschiedenen Krebszelllinien beschrieben wird (Bandelet und Osheroff, 2008; Darbon et al., 2000; Salti et al., 2000). Die Bildung von

$\gamma$ H2AX-Foci erfolgt dabei vermutlich ATM-abhängig und nimmt eine Schlüsselfunktion in der zellulären DNA-Schadensantwort ein. In der Folge werden weitere Downstream-Signale aktiviert, die schließlich zur Arretierung des Zellzyklus sowie zur Einleitung der Apoptose führen (Tominaga et al., 2007; Ye et al., 2004).

Im Gegensatz zu dem als Chemotherapeutikum eingesetzten Topoisomerase II-Gift Etoposid besitzt Genistein nur schwaches DNA-strangbrechendes Potential in humanen Krebszelllinien (Bandelet und Osheroff, 2008; Darbon et al., 2000; Kalfalah et al., 2011). Dies ist insofern überraschend, da das Isoflavon eine vergleichbare Induktion kovalenter Topoisomerase II-DNA-Intermediate bewirkte wie Etoposid (Bandelet und Osheroff, 2008; Kalfalah et al., 2011). Es konnte gezeigt werden, dass Etoposid die Halbwertszeit der kovalenten Komplexe im Gegensatz zu Genistein deutlich verlängert, wodurch sich die Wahrscheinlichkeit einer Kollision des ‚*Cleavage Komplexes*‘ mit der Replikations- oder Transkriptionsmaschinerie erhöht. Demzufolge stellt nicht die Menge, sondern die Persistenz, der stabilisierten Topoisomerase II-DNA-Intermediate den entscheidenden Parameter für eine potentielle Topoisomerase-vermittelte DNA-Schädigung dar (Bandelet und Osheroff, 2008; Kalfalah et al., 2011). Da die durch Genistein induzierten ‚*Cleavage Komplexe*‘ im Gegensatz zu Etoposid nur eine geringe Halbwertszeit aufweisen (Kalfalah et al., 2011), könnte dies den beobachteten Unterschied zwischen den beiden Verbindungen in der DNA-schädigenden Wirkung trotz Induktion ähnlicher Mengen kovalenter Topoisomerase II-DNA-Intermediate erklären (Bandelet und Osheroff, 2008).

Die in humanen Krebszellen durch Genistein induzierte Topoisomerase II-Giftung wirft die Frage auf, ob das Isoflavon auch im Organismus eine Interferenz mit dem Enzym zeigt. Zur Untersuchung einer möglichen Topoisomerase II-Giftung *in vivo* wurde männlichen Wistar Ratten Genistein (10 mg/kg KG) subkutan appliziert und 3 h bzw. 24 h nach Verabreichung die Menge kovalenter Topoisomerase-DNA-Intermediate im Darmgewebe der Tiere untersucht. Um einen möglichen Einfluss über die Nahrung zugeführter Isoflavone ausschließen zu können, erhielten die Nager eine isoflavonarmer Diät.

Genistein zeigte keinen Einfluss auf die Menge kovalenter Topoisomerase I-DNA-Intermediate im Darmgewebe der Ratten. Dies steht im Einklang mit früheren Untersuchungen, in denen Genistein weder eine Topoisomerase I-Giftung noch eine katalytische Hemmung des Enzyms in humanen Leukämiezellen verursachte (Lopez-Lazaro et al., 2007). Hingegen bewirkte Genistein sowohl im Duodenum als auch im Kolon eine potente Erhöhung kovalenter Topoisomerase II-DNA-Komplexe, was eine Topoisomerase II-

Giftung des Isoflavons anzeigt. Während die Werte im Duodenum 3 h nach Genistein-Applikation um etwa Faktor 4-5 gegenüber den Kontrolltieren anstiegen, war die Menge kovalenter Intermediate durch Genistein im Kolon, verglichen zu den Kontrolltieren, um etwa Faktor 5-6 erhöht. Analog zur Zunahme der Menge kovalenter Enzym-DNA-Intermediate stieg auch die Konzentration an Genistein-Äquivalenten im Plasma und im Kolon der Tiere an. So erreichte die Gewebskonzentration an Genistein-Äquivalenten im Kolon 3 h nach subkutaner Applikation Werte von  $547 \pm 731$  nM. Dies legt nahe, dass das Isoflavon bereits 3 h nach subkutaner Verabreichung im Kolon der Tiere bioverfügbar ist und Konzentrationen erreichen kann, die einen Einfluss auf Topoisomerasen erlauben.

Am zweiten erfassten Zeitpunkt von 24 h nach Genistein-Applikation waren keine kovalenten Topoisomerase II-DNA-Intermediate im Duodenum mehr detektierbar, wohingegen der Level an ‚*Cleavage Komplexen*‘ im Kolon noch immer signifikant gegenüber den Kontrolltieren erhöht war. Allerdings zeichnete sich auch im Kolon nach 24 h bereits eine Abnahme der Menge kovalenter Enzym-DNA-Komplexe ab, verglichen zu den Ergebnissen nach 3 h. Der sich bereits andeutende Rückgang der kovalenten Intermediate ist insofern überraschend, da die Konzentration an Genistein-Äquivalenten im Plasma wie auch im Gewebe der Tiere 24 h nach Genistein-Applikation weiter anstieg, wodurch im Kolon Werte von  $1516 \pm 869$  nM erreicht wurden. Es muss jedoch berücksichtigt werden, dass die Bestimmung der Gewebskonzentration nach vorausgegangener enzymatischer Spaltung der Genistein-Konjugate erfolgte und somit nicht nur freies Aglykon umfasst. So könnte angenommen werden, dass 24 h nach Genistein-Verabreichung vermehrt Konjugate im Kolon vorliegen, die zu den hohen Gewebskonzentration beitragen. Dementsprechend könnte die geringere, beobachtete biologische Wirkung trotz gleichzeitig stark erhöhter Gewebskonzentration auf eine Zunahme biologisch inaktiver Genistein-Konjugate zurückgeführt werden. Zudem wäre denkbar, dass zelluläre Efflux-Pumpen wie das „*Multidrug Resistance Protein*“ (MDR2) über den Zeitverlauf induziert werden und das freie Aglykon wieder ins intestinale Lumen ausschleußen (Sepehr et al., 2007), wodurch eine geringere effektive Konzentration des freien Aglykons in der Zelle resultieren würde. Darüber hinaus könnten auch weitere zelluläre Prozesse wie eine verstärkte Reparatur der ‚*Cleavage-Komplexe*‘ durch Tyrsoyl-DNA-Phosphodiesterasen oder die Modulation des Zellzyklus eine Rolle in der verringerten Aktivität des Isoflavons gegenüber Topoisomerasen spielen.

Der deutliche Anstieg der Plasma- und Kolonkonzentrationen an Genistein über den Zeitraum von 3 - 24 h nach subkutaner Applikation könnte in einem Depoteffekt begründet sein, durch

den sich die systemische Verfügbarkeit von Genistein verzögert. Jedoch zeigen frühere Untersuchungen zur Pharmakokinetik eine kontinuierliche Abnahme des Plasmaspiegels in jungen Ratten über einen Zeitraum von 24 h nach subkutaner Applikation von 40 mg/kg KG Genistein (Lewis et al., 2003). Diese Beobachtungen stehen im Einklang mit Studien zur Pharmakokinetik des Isoflavons nach oraler Aufnahme, in denen ebenfalls ein Rückgang der Plasmaspiegel an Genistein-Äquivalenten über einen Zeitraum von 24 h nachgewiesen wurde (Coldham und Sauer, 2000; Sepehr et al., 2007). Da in der vorliegenden Studie nur zwei Zeitpunkte erfasst wurden, lässt sich keine Aussage über das Konzentrationsprofil der Genistein-Äquivalente im Plasma und Kolon über den Zeitverlauf treffen. Daher sind weitere Studien erforderlich, um die Pharmakokinetik von Genistein nach subkutaner Applikation unter den verwendeten Bedingungen aufzuzeichnen und die Diskrepanz zu den Ergebnissen früherer Studien aufzuklären.

Genistein bewirkte insgesamt im Kolon der Tiere eine deutlichere Erhöhung der Menge kovalenter Topoisomerase II-DNA-Komplexe als im Duodenum. Es wäre zwar denkbar, dass sich die Gewebe hinsichtlich ihrer Topoisomerase II-Expression oder -Aktivität und damit im Grundlevel an aktivem Enzym unterscheiden, jedoch war die physiologische Menge kovalenter Topoisomerase II-DNA-Intermediate der Kontrolltiere in beiden Geweben vergleichbar. Es wäre weiterhin in Betracht zu ziehen, dass Genistein im Duodenum eine geringere Bioverfügbarkeit aufweist, verglichen zum Kolon. Derzeit liegen allerdings keine Daten zu den Gewebekonzentrationen des Isoflavons im Duodenum vor, die diese Annahme bestätigen würden. Dies unterstreicht den Bedarf weiterer Studien zur Bioverfügbarkeit von Genistein, insbesondere hinsichtlich der resultierenden Konzentrationen im Gewebe.

Da die humane Exposition gegenüber Isoflavonen ausschließlich über die Nahrung erfolgt, wurde weiterhin untersucht, inwiefern die nach subkutaner Applikation beobachtete Topoisomerase II-Giftung auch nach oraler Genistein-Aufnahme eine Rolle spielt. Dementsprechend erhielten männliche Wistar Ratten eine lebenslange isoflavonreiche Diät, wodurch eine tägliche Exposition im Bereich von 25 - 50 mg/kg KG Genistein-Äquivalenten resultierte. Durch die Nahrung aufgenommenes Genistein bewirkte im Duodenum keine Stabilisierung kovalenter Topoisomerase II-DNA-Intermediate, während die Menge der ‚*Cleavage Komplexe*‘ im Kolon, verglichen zu den Kontrolltieren der isoflavonarmen Diät, um etwa den Faktor 2 anstieg. Zwar lag der Median für beide Topoisomerase II-Isoformen der Kolonproben in einem ähnlichen Bereich, jedoch war die Zunahme nur für die II $\alpha$ -Isoform gegenüber den isoflavonarmen Kontrolltieren signifikant.

Diese Ergebnisse zeigen einerseits, dass die Interferenz von Genistein mit Topoisomerasen, unabhängig von der gewählten Applikationsform, im Kolon von größerer Relevanz zu sein scheint als im Duodenum. Andererseits bewirkt die orale Genistein-Aufnahme eine geringere Erhöhung kovalenter Topoisomerase II-DNA-Komplexe als die subkutane Applikation des Isoflavons. Dafür könnte eine geringere Bioverfügbarkeit von Genistein nach oraler Verabreichung, verglichen zur subkutanen Applikation, verantwortlich sein. Nach oraler Aufnahme wird Genistein umfassend im ‚First-Pass-Metabolismus‘ verstoffwechselt, wodurch hauptsächlich Sulfate und Glukuronide gebildet werden (Barnes, 1998; Chen et al., 2003a). Infolge der im Darmgewebe vorherrschenden Glukuronidierung ist dementsprechend anzunehmen, dass Genistein-Konjugate, insbesondere Genistein-Glukuronide, einen Großteil der ermittelten Kolonkonzentration von  $7694 \pm 6957$  nM an Genistein-Äquivalenten ausmachen. Diese Annahme wird durch die detektierten Plasmaspiegel mit  $1301 \pm 494$  nM an Genistein-Äquivalenten und lediglich  $40 \pm 13$  nM an freiem Aglykon gestützt, wobei der Metabolit Genistein-4'-Glucuronid den Hauptteil der Phase II-Konjugate im Plasma ausmachte. Die geringe Zunahme kovalenter Topoisomerase II-DNA-Komplexe trotz hoher Kolonkonzentrationen an Genistein-Äquivalenten nach oraler Aufnahme des Isoflavons ist somit vermutlich auf die Bildung biologisch inaktiver Metabolite zurückzuführen.

Weiterhin wäre denkbar, dass weitere, im Futter enthaltene, bioaktive Komponenten als katalytische Topoisomerase-Hemmstoffe wirken und dadurch eine Stabilisierung des kovalenten Enzym-DNA-Intermediates verhindern. So konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass 6-HO-DAI als oxidativer Daidzein-Metabolit die katalytische Aktivität von Topoisomerase II hemmt (siehe Kapitel 4.2). Dementsprechend könnte 6-HO-DAI neben weiteren, bislang nicht identifizierten Verbindungen im Futter die Induktion kovalenter Topoisomerase II-DNA-Intermediate durch Genistein unterdrücken. Als weitere Möglichkeit ist in Betracht zu ziehen, dass die lebenslange Genistein-Exposition zu einer Resistenz gegenüber Topoisomerase-Giften führen könnte. So könnte eine zelluläre Resistenz durch mehrere Mechanismen wie die Überexpression des ‚*Multidrug Resistance-Related Protein*‘, durch Veränderung der subzellulären Enzym-Lokalisierung oder durch Phosphorylierung der Topoisomerase-Enzyme hervorgerufen werden (Pommier et al., 2010).

Die nach oraler Aufnahme um etwa den Faktor 5 gegenüber der subkutanen Applikation erhöhten Konzentrationen an Genistein-Äquivalenten im Kolon zeigen eine gute Korrelation mit der in etwa fünffach höheren, verabreichten Dosis von bis zu 50 mg Genistein-Äquivalenten/kg KG. Dies legt nahe, dass einerseits die Futtermatrix die Bioverfügbarkeit der

Isoflavone nicht wesentlich beeinträchtigt und dass andererseits das im Futter enthaltene Genistein sowie seine Konjugate umfassend absorbiert werden. So konnte bereits in früheren Studien gezeigt werden, dass etwa 67% des oral aufgenommenen Genisteins im Gastrointestinaltrakt absorbiert werden (Coldham et al., 2002). In Anbetracht der guten Übereinstimmung zwischen verabreichter Dosis und den ermittelten Gewebskonzentrationen an Genistein-Äquivalenten trotz unterschiedlicher Applikationsarten könnte angenommen werden, dass die Verabreichungsform keinen wesentlichen Einfluss auf die resultierenden Gewebskonzentrationen und damit auf die biologischen Wirkungen ausübt. So wurde in früheren Untersuchungen gezeigt, dass die subkutane und orale Applikation von Genistein in jungen Mäusen in vergleichbaren Serumkonzentrationen resultieren (Kaludjerovic et al., 2012). Allerdings wurde in dieser Studie nicht die Pharmakokinetik des Isoflavons herangezogen, sodass die Annahme einer Vergleichbarkeit der Applikationsarten nur für den gemessenen Zeitpunkt von 1 h nach Genistein-Verabreichung belegt wurde. Da bei subkutaner Applikation der ‚*First-Pass*‘-Metabolismus umgangen wird, wären durchaus Unterschiede in der Pharmakokinetik sowie im gebildeten Metaboliten-Muster gegenüber einer oralen Aufnahme zu erwarten. Da im ‚*First-Pass*‘-Metabolismus die Bioverfügbarkeit von Genistein mittels Konjugation in Darm und Leber gesenkt wird (Sfakianos et al., 1997), könnten eine subkutane Verabreichung des Isoflavons höhere Plasma- und Gewebskonzentrationen des freien Aglykons zur Folge haben. Dementsprechend lagen die ermittelten Plasmaspiegel an freiem Aglykon 24 h nach subkutaner Genistein-Applikation bei  $1151 \pm 1882$  nM, während eine orale Aufnahme in Genistein-Konzentrationen von  $40 \pm 13$  nM resultierte. Analog zu den Plasmaspiegeln könnten auch im Gewebe höhere Konzentrationen an freiem Genistein resultieren, was die potentere Topoisomerase-Giftung nach subkutaner Applikation im Vergleich zur oralen Aufnahme erklären würde.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass nach oraler Aufnahme von Genistein die Gewebskonzentrationen im Kolon gegenüber den Plasmakonzentrationen an Genistein-Äquivalenten um nahezu den Faktor 6 erhöht waren, wohingegen nach subkutaner Applikation die Serumspiegel die Konzentrationen im Kolon überstiegen. Die Anreicherung im Darm nach oraler Genistein-Aufnahme konnte bereits in früheren Studien gezeigt werden, in denen die Konzentrationen der Genistein-Äquivalente im Dünndarm gegenüber den Plasmaspiegeln um ein Vielfaches erhöht waren (Coldham und Sauer, 2000). Da eine subkutane Applikation weder die Biotransformation in Darm und Leber noch das Konzentrationsverhältnis der Genistein-Äquivalente von Plasma zu Gewebe berücksichtigt, sind hierbei erhaltene biologische Daten nur begrenzt auf eine orale Exposition übertragbar.

Eine subkutane Genistein-Verabreichung, zusätzlich zur isoflavonreichen Ernährung, resultierte sowohl im Duodenum als auch im Kolon in einem Anstieg der Menge kovalenter Topoisomerase II-DNA-Komplexe, wobei sich der Gehalt kovalenter Intermediate im Kolon für die II $\alpha$ -Form allerdings nicht signifikant vom Grundlevel unterschied. Die Zunahme der Menge kovalenter Enzym-DNA-Komplexe durch Genistein-Applikation war bei lebenslanger isoflavonreicher Ernährung weniger stark ausgeprägt als bei den Tieren, die isoflavonarm ernährt worden waren. Dies könnte zum einen darauf beruhen, dass die Menge der ‚*Cleavage Komplexe*‘ nicht weiter induzierbar ist, da alles aktive Enzym bereits in den ternären Komplexen gehalten wird und kein freies Enzym für eine zusätzliche Interaktion zur Verfügung steht. Zum anderen könnte infolge der lebenslangen Isoflavon-Exposition eine Anpassung der Darmflora der Ratten stattgefunden haben, sodass im Isoflavon-Metabolismus involvierte Enzyme induziert sind und eine schnelle Konjugation des zusätzlich verabreichten Genisteins veranlassen (Coldham et al., 2002). Da jedoch keine Zunahme der Konzentration an Genistein-Äquivalenten zu beobachten war, könnte stattdessen angenommen werden, dass eine geringere zelluläre Aufnahme des Isoflavons stattfindet. Allerdings lässt sich anhand der vorliegenden Daten keine eindeutige Aussage über die Zusammenhänge zwischen biologischer Wirkung und Pharmakokinetik treffen.

Topoisomerase-Gifte besitzen genotoxisches Potential, da sie durch Stabilisierung kovalenter Enzym-DNA-Intermediate die Möglichkeit einer Kollision mit der DNA- oder Transkriptionsmaschinerie erhöhen, wodurch permanente DNA-Strangbrüche entstehen können (McClendon und Osheroff, 2007). Dementsprechend konnte für Genistein bereits eine Topoisomerase-vermittelte DNA-Schädigung in mehreren humanen Krebszelllinien nachgewiesen werden (Bandelet und Osheroff, 2008; Kalfalah et al., 2011; Salti et al., 2000). Hingegen wird eine mögliche Genotoxizität von Genistein *in vivo* in der Literatur kontrovers diskutiert. So konnte einerseits kein Anstieg der DNA-Strangbruchrate sowie der Mikrokern-Häufigkeit in peripheren Lymphozyten von Patienten mit Prostatakrebs nachgewiesen werden, die ein Isoflavon-Präparat mit hohem Genistein-Gehalt erhielten (Miltyk et al., 2003). Ebenso konnte in Untersuchungen mit Ratten oder Mäusen keine genotoxische Wirkung von Genistein festgestellt werden, obwohl die erreichten Plasmalevel der Nager die im Menschen zu erwartenden Serumspiegel um ein Vielfaches überstiegen (McClain et al., 2006; Record et al., 1995). So wurde die Wahrscheinlichkeit, dass Genistein als genotoxisches Karzinogen in Nagern wirkt, als sehr gering eingestuft (Harvey et al., 2005). Im Gegensatz dazu bewirkte Genistein in hohen Dosen einen vermehrten Austausch von Schwesterchromatiden in murinen Knochenmarkzellen, was mit seiner Topoisomerase-giftenden Wirkung in Verbindung

gebracht wurde (Giri und Lu, 1995). Des Weiteren konnte eine Zunahme der Häufigkeit von polychromatischen mikrokernhaltigen Erythrozyten in männlichen Ratten nach Aufnahme hoher Dosierungen von 500 - 1000 mg/kg KG eines Sojaextraktes beobachtet werden, wobei in weiblichen Ratten unter gleichen Bedingungen keine Effekte festgestellt werden konnten (Misra et al., 2002). Es wäre denkbar, dass Genistein, entsprechend den Ergebnissen in humanen Krebszelllinien, zwar die Menge kovalenter Topoisomerase II-DNA-Komplexe im Darm deutlich erhöht, jedoch aufgrund der kurzen Halbwertszeit der ternären Komplexe keine, oder nur eine schwache, DNA-schädigende Wirkung resultiert (Bandelet und Osheroff, 2008; Kalfalah et al., 2011). Dennoch kann eine genotoxische Wirkung des Isoflavons im Gewebe, insbesondere in Anbetracht einer möglichen Anreicherung von Genistein in bestimmten Geweben, nicht ausgeschlossen werden. Ob Genistein eine Topoisomerase II-vermittelte Induktion von DNA-Strangbrüchen im Darm bewirkt, ist daher Gegenstand weiterführender Untersuchungen.

Eine hohe maternale Aufnahme an natürlich vorkommenden Topoisomerase-Giften wie Genistein wird mit einer erhöhten Inzidenz frühkindlicher Leukämien in Zusammenhang gebracht (Ross et al., 1996). Die den kindlichen Leukämien zumeist zugrundeliegenden Translokationen oder Deletionen im *MLL*-Gen werden vermutlich bereits während der Schwangerschaft initiiert (Ross et al., 1994; Strick et al., 2000). Es konnte gezeigt werden, dass Genistein durch seine Interferenz mit Topoisomerasen chromosomale Veränderungen im *MLL*-Gen hervorruft (Felix et al., 2006; van Waalwijk van Doorn-Khosrovani et al., 2007). Daher ist eine hohe maternale Genistein-Aufnahme mit einem um etwa den Faktor zehn erhöhten Risiko der Entwicklung frühkindlicher AML verbunden (Ross, 2000). Die vorliegenden Ergebnisse zeigen erstmals, dass Genistein *in vivo* mit Topoisomerase II interagiert, was die bisherigen Annahmen einer Beteiligung dieser Enzyme an der Entwicklung kindlicher Leukämien stützt. Da bislang keine genotoxische Wirkung von Genistein in nahrungsmittelrelevanten Konzentrationen nachgewiesen werden konnte, könnte vermutet werden, dass die durch Genistein induzierten ‚*Cleavage Komplexe*‘ nur kurzzeitig stabilisiert werden, wodurch nur geringe Mengen an DNA-Strangbrüchen entstehen. Durch die geringe Konzentration an DNA-Schäden könnte die Einleitung eines Zellzyklus-Arrestes oder apoptotischer Prozesse ausbleiben (Deweese und Osheroff, 2009). Bei gleichzeitig unzureichender DNA-Reparatur könnten sich dementsprechend chromosomale Translokationen manifestieren, die in der Folge zur Entwicklung von Leukämien beitragen könnten.

Die subkutan verabreichte Genistein-Dosis wurde mit 10 mg/kg KG verhältnismäßig hoch gewählt, was die Frage der Relevanz für die menschliche Exposition aufwirft. Säuglinge, die Soja-basierte Ergänzungsmilch erhalten, nehmen der britischen Behörde für Lebensmittelsicherheit zufolge durchschnittlich ca. 4,5 mg Isoflavone pro Tag auf, wobei frühere Studien Werte von 6 - 11 mg/kg/d nahelegen (Ashby et al., 2001; Setchell et al., 1998). Diese Aufnahmemengen führen zu Isoflavon-Spiegeln im Plasma von bis zu 1 - 5  $\mu\text{M}$  (Jefferson et al., 2012; Setchell et al., 1998). Die in der vorliegenden Studie subkutan applizierte Dosis von 10 mg/kg KG Genistein resultierte in Plasmakonzentrationen von  $2,7 \pm 2,6 \mu\text{M}$ , berechnet als Genistein-Äquivalente, während nach oraler Aufnahme von ca. 25 - 50 mg/kg KG Genistein Serumspiegel von  $1,3 \pm 0,4 \mu\text{M}$  Genistein-Äquivalenten resultierten. Diese Werte liegen somit in dem Konzentrationsbereich, der auch in Säuglingen durch Soja-basierte Ergänzungsmilch erreicht werden kann. Allerdings ist zu berücksichtigen, dass keine Angaben vorliegen, zu welchem Zeitpunkt die Messung der Plasmaspiegel in den Säuglingen erfolgte. Zudem wurde der Gesamt-Isoflavongehalt und nicht die Genistein-Konzentration in den Säuglingen bestimmt, was die Vergleichbarkeit dieser Werte mit den in dieser Studie verwendeten Bedingungen einschränkt. Ob die Einnahme von Isoflavon-Supplementen ebenfalls zu derart hohen Isoflavon-Spiegeln führen kann, ist in weiterführenden Untersuchungen aufzuklären. Es ist festzuhalten, dass die beobachteten Plasmakonzentrationen an Gesamti Isoflavonen in Säuglingen, deren Nahrung Soja-basiert ist, die durchschnittlichen Serumspiegel asiatischer Frauen um Faktor 10 - 50 und die Plasmaspiegel von Europäern mit nicht-vegetarischer Ernährung um Faktor 100 - 700 übersteigt (Jefferson et al., 2012). Daher sollte eine Genistein-Aufnahme über die Nahrung für einen gesunden Menschen kein Risiko hinsichtlich einer Topoisomerase-Giftung darstellen. Da allerdings eine Topoisomerase-Interferenz insbesondere in Neugeborenen zur Entwicklung frühkindlicher Leukämien beitragen könnte, erscheinen Untersuchungen adverser Effekte, die durch Soja-basierte Säuglingsnahrung auftreten könnten, essentiell.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass das Isoflavon Genistein sowohl *in vitro* als auch *in vivo* als Topoisomerase II-Gift wirkt. Dabei führt Genistein zu einer potenten Erhöhung der Menge kovalenter Topoisomerase II-DNA-Komplexe ohne dabei die Halbwertszeit der Intermediate bedeutend zu verlängern (Kalfalah et al., 2011). Eine subkutane Genistein-Applikation resultierte im Darm männlicher Ratten in einer stärkeren Zunahme der Menge an ‚*Cleavage Komplexen*‘, verglichen zur oralen Aufnahme des Isoflavons, obwohl das Futter einen höheren Gehalt an Genistein-Äquivalenten enthielt. Dies könnte auf eine unterschiedliche Metabolisierung des Isoflavons zurückgeführt werden, da bei

subkutaner Verabreichung der ‚*First-Pass*‘-Metabolismus umgangen wird und somit eine höhere Konzentration an freiem Aglykon im Darm vorliegen könnte. Darüber hinaus können weitere im Futter enthaltene bioaktive Komponenten durch katalytische Topoisomerase-Hemmung den Einfluss von Genistein auf das Enzym verringern. Sowohl im Kolon als auch im Plasma konnten Konzentrationen an Genistein-Äquivalenten im niedrigen mikromolaren Bereich nachgewiesen werden, wobei die Gewebskonzentrationen im Kolon nach oraler Isoflavon-Aufnahme gegenüber den Plasmaspiegeln um etwa den Faktor 6 erhöht waren. Daher wäre denkbar, dass nach oraler Aufnahme eine Anreicherung des Isoflavons im Darm stattfindet. Somit scheint eine Risikobewertung hinsichtlich der Modulation möglicher biologischer Wirkungen oder über potentielle adverse Effekte auf Basis der Plasmaspiegel nicht prädiktiv für einzelne Gewebe. Die verwendeten Dosierungen orientierten sich an den Plasmakonzentrationen der Isoflavone in Säuglingen, die mit Soja-basierter Ergänzungsmilch ernährt werden. Daher ist bei einer normalen westlichen Diät ohne zusätzliche Isoflavon-Supplementierung nicht davon auszugehen, dass derart hohe Gewebskonzentrationen erreicht werden, in denen eine Topoisomerase-Giftung eine Rolle spielen könnte. Allerdings liegen bislang keine Daten über die erreichten Plasmaspiegel von Genistein nach Einnahme von Isoflavon-Präparaten vor, wodurch ein potentieller Einfluss von Genistein auf Topoisomerasen nach Isoflavon-Supplementierung nicht ausgeschlossen werden kann.

Mittlerweile werden 20 - 25% der Säuglingsnahrung auf Soja-Basis hergestellt (Jefferson et al., 2012). Durch Soja-basierte Ergänzungsmilch können in Säuglingen Plasmakonzentrationen der Isoflavone im niedrigen mikromolaren Bereich erreicht werden. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Genistein in diesem Konzentrationsbereich als Topoisomerase II-Gift im Darm männlicher Ratten wirkt. Dementsprechend stellt sich die Frage nach möglichen Topoisomerase-vermittelten Wirkungen von Genistein, wie potentiellen genotoxischen Effekten oder chromosomalen Translokationen, die im Zusammenhang mit der Entwicklung frühkindlicher Leukämien stehen. Dies gilt es in weiterführenden Studien zu untersuchen, wobei Erhebungen zur Pharmakokinetik des Isoflavons in Säuglingen wie auch im Tiermodell voranzustellen sind, um eine Übertragbarkeit der Ergebnisse auf die humane Situation beurteilen zu können. Die Ergebnisse dieser Arbeit liefern somit Hinweise zu möglichen adversen Effekten von Genistein im Gewebe und zeigen damit den Bedarf weiterer Untersuchungen zur Risikobewertung von Soja-basierter Säuglingsnahrung auf.

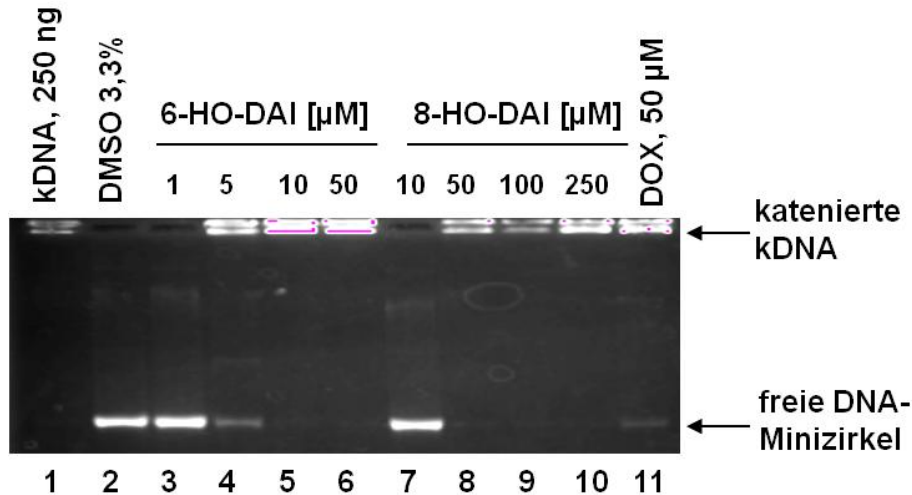
## 4.2. Einfluss des oxidativen Metabolismus auf die biologische Aktivität von Daidzein

Im oxidativen Stoffwechsel von Daidzein entstehen monohydroxylierte Metabolite (Abbildung 2.9), die sich von dem biologisch aktiveren Genistein lediglich in der Anordnung der Hydroxylgruppen unterscheiden. Derzeit liegen nur wenige Untersuchungen zu den möglichen biologischen Wirkungen der oxidativen Daidzein-Metabolite vor. Daher wurden im Rahmen dieser Arbeit insbesondere die Modulation der katalytischen Aktivität humaner Topoisomerasen sowie mögliche Topoisomerase-vermittelte, zelluläre Effekte durch oxidative Daidzein-Metabolite im Vergleich zur Muttersubstanz untersucht.

Vor Beginn der biologischen Experimente wurden die oxidativen Daidzein-Metabolite mittels NMR auf ihre Reinheit und Stabilität untersucht. Die Stammlösungen von 6-HO-DAI und 8-HO-DAI (jeweils 25 mM, in DMSO) waren bei Raumtemperatur über einen Zeitraum von 48 h stabil und wiesen Verunreinigungen <10% auf, was weitgehend den Herstellerangaben entsprach (Extrasynthese, FR: Reinheit von 6-HO-DAI  $\geq 95\%$ ; Plantec, UK: Reinheit von 6-HO-DAI bzw. 8-HO-DAI  $\geq 97\%$ ). Die detaillierten Inkubationsbedingungen der in Kapitel 4.2 durchgeführten Versuche sind in Kapitel 6.2.3 beschrieben.

### 4.2.1. Einfluss der oxidativen Daidzein-Metabolite auf die katalytische Aktivität humaner Topoisomerase II

Topoisomerase II-Enzyme stellen wichtige zelluläre Targets in der Chemotherapie dar; so finden zahlreiche Inhibitoren dieser Enzyme klinischen Einsatz. Genistein führt zu einer potenten Unterdrückung der Topoisomerase II-Aktivität (Bandeletti und Osheroff, 2007; Peterson, 1995), während Daidzein keine biologische Aktivität gegenüber diesen Enzymen aufweist. Aufgrund ihrer Strukturähnlichkeit mit Genistein wurden die im oxidativen Stoffwechsel von Daidzein gebildeten Metabolite hinsichtlich ihrer Wirkung auf humane Topoisomerasen im Dekatenierungsassay untersucht. Ein repräsentatives Elektrophoresegelel, das Inkubationen von Kinetoplasten-DNA (kDNA) mit Topoisomerase II $\alpha$  sowie verschiedenen Konzentrationen an 6-HO-DAI bzw. 8-HO-DAI zeigt, ist in Abbildung 4.12 dargestellt.



**Abb. 4.12:** Einfluss von 6-HO-DAI bzw. 8-HO-DAI auf die katalytische Aktivität von Topoisomerase II $\alpha$  im Dekatenierungsassay. Kinetoplasten DNA (kDNA) wurde mit Topoisomerase II $\alpha$  (40 ng) und steigenden Konzentrationen der Daidzein-Metabolite für 60 min inkubiert. Die durch katalytisch aktive Topoisomerase freigesetzten DNA-Minizirkel wurden anschließend im Agarosegel von der hochmolekularen kDNA getrennt. Doxorubicin (50  $\mu$ M) wurde als Positivkontrolle eingesetzt. Lane 1: kDNA. Lane 2: kDNA + Topoisomerase II $\alpha$  + DMSO. Lane 3-6: kDNA + Topoisomerase II $\alpha$  + 6-HO-DAI. Lane 7-10: kDNA + Topoisomerase II $\alpha$  + 8-HO-DAI. Lane 11: kDNA + Topoisomerase II $\alpha$  + Doxorubicin (50  $\mu$ M).

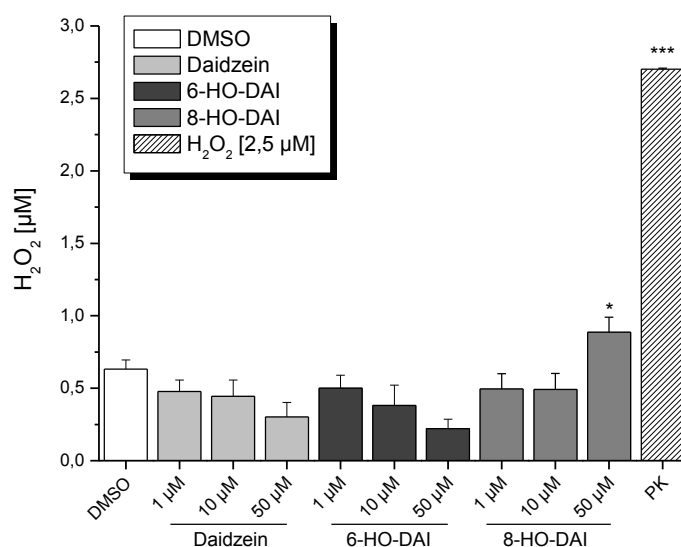
Im Dekatenierungsassay werden durch katalytisch aktive Topoisomerase II $\alpha$  aus der hochmolekularen Kinetoplasten-DNA einzelne Minizirkel herausgelöst, die durch Anlegen eines elektrischen Feldes in das Agarosegel migrieren können (Abbildung 4.12; Lane 2), während die vergleichsweise hochmolekulare kDNA in der Geltasche verbleibt (Abbildung 4.12; Lane 1). Durch Hemmung der katalytischen Topoisomerase-Aktivität nimmt der Anteil an migrierenden DNA-Minizirkeln entsprechend der Hemmwirkung der Testsubstanz ab. Daidzein zeigte bis zu einer Konzentration von 250  $\mu$ M keine Hemmung der katalytischen Aktivität von Topoisomerase II $\alpha$  (Fritz, 2004). Im Gegensatz dazu führten sowohl 6-HO-DAI als auch 8-HO-DAI zu einer potenten Unterdrückung der katalytischen Topoisomerase-Aktivität. Dementsprechend verminderte 6-HO-DAI die Enzymaktivität bereits ab einer Konzentration von 5  $\mu$ M nahezu vollständig, während 8-HO-DAI ab einer Konzentration von 50  $\mu$ M eine deutliche Abnahme der katalytischen Aktivität von Topoisomerase II $\alpha$  bewirkte. Das Topoisomerase-Gift Doxorubicin (Abbildung 2.3) wurde in einer Konzentration von 50  $\mu$ M als Positivkontrolle eingesetzt und zeigte eine potente Unterdrückung der Topoisomerase II-Aktivität.

Die Wirkung von 3'-HO-DAI auf die katalytische Aktivität von Topoisomerase II war bereits in vorausgegangenen Studien untersucht worden, wobei keine Hemmung des Enzyms nach 3'-HO-DAI-Inkubation nachgewiesen werden konnte (Fritz, 2004). Da sich die biologische

Aktivität von 3'-HO-DAI im zellfreien Systemen nur marginal von der Muttersubstanz unterschied, wurde dieser Metabolit nicht in die weiterführenden zellulären Untersuchungen mit einbezogen.

#### 4.2.2. Bildung von Wasserstoffperoxid durch Daidzein und seine oxidativen Metabolite unter Zellkulturbedingungen

Einige Polyphenole sind in der Lage im Zellkulturmedium durch bislang nicht vollständig aufgeklärte Mechanismen Wasserstoffperoxid zu generieren (Fridrich et al., 2007; Wee et al., 2003). Da das entstandene Wasserstoffperoxid durch Zellmembranen diffundieren kann, könnte dies zur Artefaktbildung in verschiedenen biologischen Testsystemen führen. Daher wurden die oxidativen Daidzein-Metabolite hinsichtlich einer möglichen Wasserstoffperoxid-Bildung im Zellkulturmedium (DMEM) mittels Amplex<sup>®</sup> Red Hydrogen Peroxide Assay (Invitrogen) untersucht, um mögliche Artefakte aufgrund einer Wasserstoffperoxid-Bildung unter den verwendeten Versuchsbedingungen ausschließen zu können.



**Abb. 4.13:** Untersuchung der möglichen Bildung von Wasserstoffperoxid im Zellkulturmedium (DMEM) durch Daidzein und seine oxidativen Metabolite. HT29-Zellen wurden für 1 h mit dem jeweiligen Isoflavon behandelt und der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Gehalt mittels Amplex<sup>®</sup> Red Hydrogen Peroxide Assay (Invitrogen) gemessen. Die arithmetischen Mittelwerte  $\pm$  SD von drei unabhängigen Versuchen, die jeweils eine Doppelbestimmung enthalten, sind abgebildet. Die angegebenen Signifikanzen beziehen sich auf die Lösungsmittelkontrolle DMSO (Student's *t*-Test: \*,  $p < 0,05$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$ ). PK, Positivkontrolle H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

In Abbildung 4.13 sind die Ergebnisse der Wasserstoffperoxid-Bildung durch Daidzein, 6-HO-DAI bzw. 8-HO-DAI nach einstündiger Inkubation von HT29-Zellen zusammengefasst. Als Positivkontrolle wurde dem Zellkulturmedium Wasserstoffperoxid (2,5 μM) zugesetzt,

wobei die Wiederfindungsrate mit 108% akzeptabel ist. Lediglich 8-HO-DAI bewirkte in der höchsten getesteten Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  einen signifikanten Anstieg der Wasserstoffperoxid-Konzentration im Zellkulturmedium. Hingegen bewirkten weder Daidzein noch 6-HO-DAI die Bildung von Wasserstoffperoxid im Medium von HT29-Zellen. Um mögliche Artefakte durch die erhöhte Wasserstoffperoxid-Konzentration nach 8-HO-DAI-Exposition in den zellulären Tests ausschließen zu können, wurde dem Zellkulturmedium bei der Durchführung aller weiterer Versuche das Enzym Katalase (100 U/mL) zugesetzt. Eine Ausnahme bildete die Durchführung des DCF-Assays, da in orientierenden Messungen eine Interferenz des Enzyms mit dem Testsystem festgestellt wurde. In früheren Studien wurde beschrieben, dass das Enzym Katalase einen Anstieg der Wasserstoffperoxid-Konzentration im Medium durch Disproportionierung effizient unterbindet (Nakagawa et al., 2004). Daher wurde das Zellkulturmedium sowohl bei der Inkubation mit der Muttersubstanz wie auch bei der Behandlung mit den oxidativen Metaboliten mit Katalase versetzt, um eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten.

#### 4.2.3. Einfluss von Daidzein, 6-HO-DAI und 8-HO-DAI auf die Proliferation von HT29-Zellen

Ein mögliches zytotoxisches Potential der oxidativen Daidzein-Metabolite wurde in humanen Kolonkarzinomzellen untersucht. Hierzu wurde zum einen der Einfluss der Isoflavone auf die Membranintegrität im Laktatdehydrogenase (LDH) Assay ermittelt, zum anderen wurde die Modulation der mitochondrialen Aktivität durch die oxidativen Daidzein-Metabolite im WST-1 (*water soluble tetrazolium salt*) Assay erfasst.

Im LDH-Assay wird die Aktivität der LDH im Überstand des Zellkulturmediums mithilfe einer Farbreaktion photometrisch bestimmt. Die LDH-Aktivität im Medium stellt einen Biomarker für die Membranintegrität der Zellen dar, da infolge einer Zellmembranschädigung das Enzym aus dem Zytosol in den Mediumüberstand übertritt. Das Detergenz Triton X-100 (Abbildung 4.14) wurde als Positivkontrolle eingesetzt, da es eine vollständige Lyse der Zellmembran bewirkt.

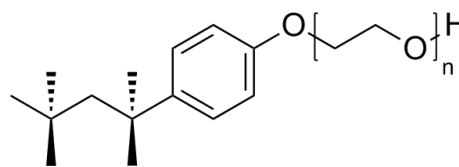
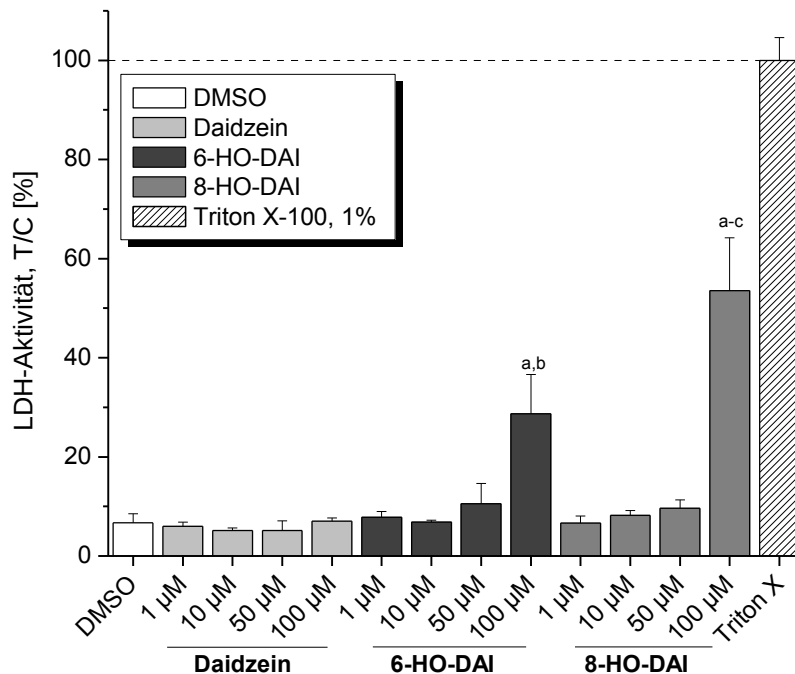


Abb. 4.14: Struktur von Triton X-100

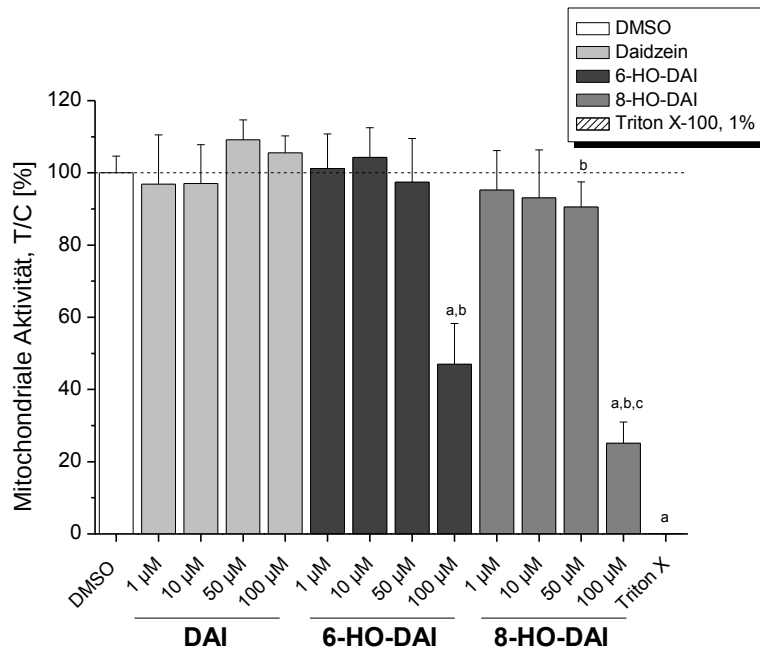
Dementsprechend wurde die LDH-Aktivität nach Triton X-100-Behandlung einer LDH-Aktivität im Mediumüberstand von 100% gleichgesetzt. Die Werte der Testsubstanzen beziehen sich auf die Positivkontrolle und sind als T/C (%) angegeben (Abbildung 4.15).



**Abb. 4.15:** Einfluss von Daidzein und dessen Metaboliten auf die Membranintegrität von HT29-Zellen nach 24-stündiger Exposition im LDH-Assay. Das Detergenz Triton X-100 wurde als Positivkontrolle eingesetzt. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte  $\pm$  SD von mind. 3 unabhängigen Versuchen in einer Vierfachbestimmung bezogen auf die Positivkontrolle (LDH-Aktivität nach Triton X-100-Behandlung  $\equiv$  100%). Die angegebenen Signifikanzen wurden mittels Student's *t*-Test ermittelt und beziehen sich (a) auf die Lösungsmittelkontrolle DMSO, (b) auf Daidzein in derselben Konzentration (c) auf 6-HO-DAI in der jeweils selben Konzentration und genügen dabei mind. einem Signifikanzlevel von  $p < 0,05$ .

Eine 24-stündige Inkubation humaner Kolonkarzinomzellen mit Daidzein zeigte bis zur höchsten eingesetzten Konzentration von 100  $\mu$ M keinen Einfluss auf die Membranintegrität. Im Gegensatz dazu konnte für beide oxidativen Daidzein-Metabolite ein zytotoxisches Potential beobachtet werden, da sie ab einer Konzentration von 100  $\mu$ M einen signifikanten Anstieg der LDH-Aktivität im Medium induzierten. Dabei stieg die LDH-Aktivität im Mediumüberstand durch 6-HO-DAI-Behandlung (100  $\mu$ M) auf 29% bzw. nach 8-HO-DAI-Inkubation (100  $\mu$ M) auf 54% der Positivkontrolle an.

Die Vitalität der Mitochondrien wurde im WST-1-Assay bestimmt. Dabei setzen mitochondriale Dehydrogenasen vitaler Zellen das Tetrazoliumsalz (WST-1) zum dunkelroten Formazan um, das photometrisch erfasst werden kann. Die Messwerte der Testsubstanzen wurden auf die Lösungsmittelkontrolle DMSO bezogen, bei der eine maximale mitochondriale Aktivität angenommen wird (Abbildung 4.16).



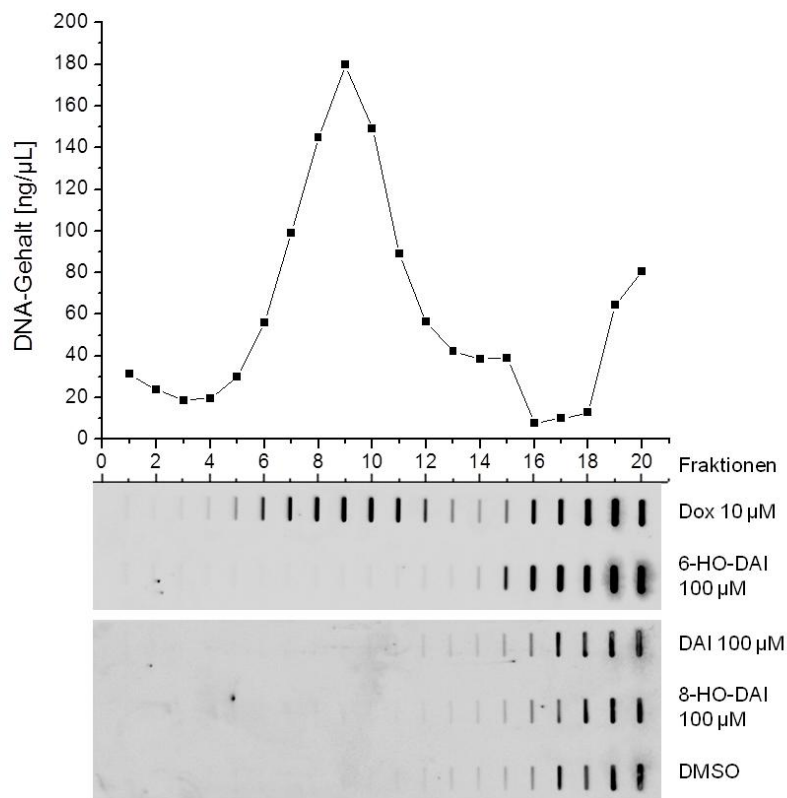
**Abb. 4.16:** Modulation der mitochondrialen Aktivität durch Daidzein und seine oxidativen Metabolite im WST-1 Assay. HT29-Zellen wurden für 24 h mit ansteigenden Konzentrationen der Isoflavone bzw. der Positivkontrolle Triton X-100 behandelt. Abgebildet sind die arithmetischen Mittelwerte  $\pm$  SD von mind. 3 unabhängigen Versuchen, jeweils als Vierfachbestimmung durchgeführt und als Prozentwert der Kontrolle angegeben (T/C [%]). Die angegebenen Signifikanzen genügen mind. einem Signifikanzniveau von  $p < 0,05$  und wurden mittels Student's *t*-Test berechnet. (a) Signifikant unterschiedlich zur Lösungsmittelkontrolle DMSO, (b) signifikant unterschiedlich zu Daidzein, (c) signifikant unterschiedlich zu 6-HO-DAI.

Entsprechend den Ergebnissen des LDH-Assays war nach 24-stündiger Daidzein-Inkubation keine Abnahme der mitochondrialen Aktivität in humanen Kolonkarzinomzellen zu erkennen. Hingegen verringerten beide oxidativen Daidzein-Metabolite die Vitalität der Mitochondrien signifikant in der höchsten getesteten Konzentration von 100  $\mu$ M. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen des LDH-Assays besaß 8-HO-DAI auch im WST-1-Assay ein signifikant höheres zytotoxisches Potential als 6-HO-DAI. So sank die mitochondriale Aktivität nach Behandlung mit 8-HO-DAI auf  $25 \pm 6\%$ , verglichen zur Lösungsmittelkontrolle, wohingegen nach Inkubation mit 6-HO-DAI eine Vitalität der Mitochondrien von  $47 \pm 11\%$  resultierte. Im Falle der Positivkontrolle Triton X-100 war keine mitochondriale Aktivität in HT29-Zellen mehr messbar.

#### 4.2.4. Einfluss auf humane Topoisomerasen in HT29-Zellen

Topoisomerase-Hemmstoffe werden aufgrund ihres Wirkmechanismus in rein katalytische Hemmstoffe und Topoisomerase-Gifte unterteilt (Pommier et al., 1998). Während Topoisomerase-Gifte das kovalente Enzym-DNA-Intermediat stabilisieren, unterdrücken katalytische Hemmstoffe die Aktivität des Enzyms, indem sie die Anlagerung des Enzyms an die DNA verhindern oder in die ATP-Bindung/-Hydrolyse eingreifen (Larsen et al., 2003). Der Wirkmechanismus der Topoisomerase-Hemmung durch die oxidativen Daidzein-Metabolite wurde mittels ICE-Bioassay in humanen Kolonkarzinomzellen untersucht. Die Trennung der freien Proteine von kovalent an die DNA gebundener Topoisomerase durch Ultrazentrifugation im Dichtegradienten ermöglicht dabei die Unterscheidung zwischen katalytischen Hemmstoffen und Topoisomerase-Giften.

Zunächst wurde die Wirkung der oxidativen Metabolite im Vergleich zu Daidzein auf Topoisomerase I in humanen Kolonkarzinomzellen bestimmt. Keines der untersuchten Isoflavone zeigte im ICE-Bioassay nach einstündiger Behandlung einen Einfluss auf Topoisomerase I in HT29-Zellen, was im Einklang mit den Ergebnissen des zellfreien Dekatenierungsassays steht (Fritz, 2004) (Daten nicht gezeigt). Die Ergebnisse der Untersuchungen zur Modulation von Topoisomerase II $\alpha$  durch die oxidativen Daidzein-Metabolite sind in Abbildung 4.17 gezeigt.



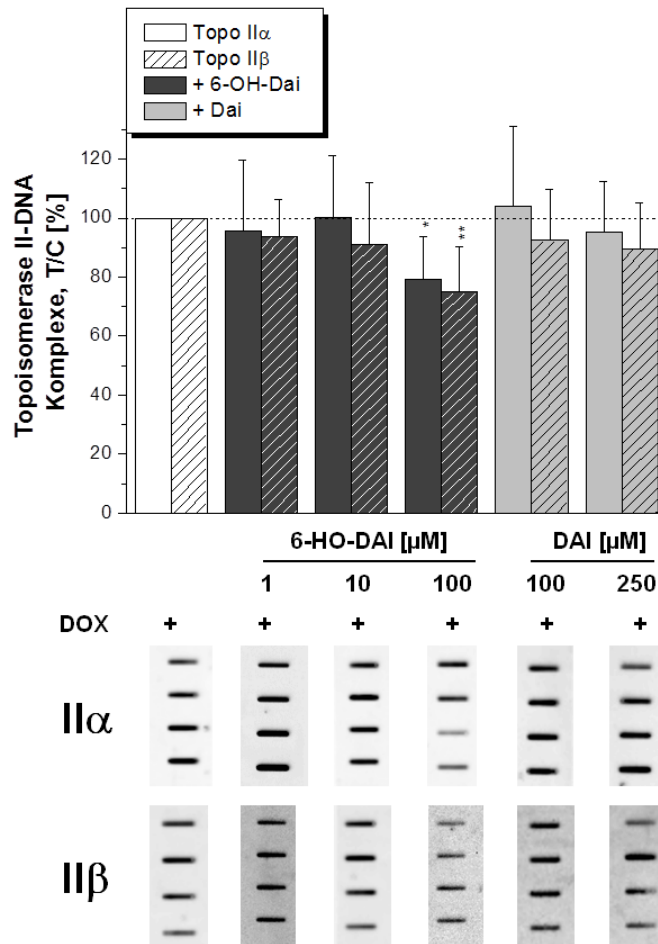
**Abb. 4.17:** Wirkung von Daidzein, 6-HO-DAI und 8-HO-DAI auf die Stabilisierung kovalenter Topoisomerase II-DNA-Intermediate in HT29-Zellen (ICE-Bioassay). Repräsentative Membranen nach Trennung des freien Enzyms von DNA-gebundener Topoisomerase mittels Ultrazentrifugation im Dichtegradienten und anschließender Immunodetektion von Topoisomerase II $\alpha$  sind abgebildet. Doxorubicin (10  $\mu$ M) wurde als Positivkontrolle eingesetzt. Der DNA-Gehalt [ng/ $\mu$ L] der Fraktionen ist am Beispiel der Lösungsmittelkontrolle DMSO gezeigt.

Der DNA-Gehalt der einzelnen Fraktionen wurde exemplarisch für die Lösungsmittelkontrolle DMSO aufgetragen und lässt ein Maximum in den Fraktionen 7-11 erkennen. In diesen Fraktionen wäre im Falle einer Topoisomerase-Giftung immunochemisch detektierbare Topoisomerase II $\alpha$  zu erwarten. Weder Daidzein noch 6-HO-DAI oder 8-HO-DAI bewirkten folglich eine Stabilisierung der kovalenten Topoisomerase II $\alpha$ -DNA-Intermediate, da keine Intensitätszunahme des Topoisomerase II $\alpha$ -Signals in den DNA-haltigen Fraktionen (7-11) ersichtlich war. Das als Positivkontrolle eingesetzte Topoisomerase II-Gift Doxorubicin (10  $\mu$ M) hingegen führte zu einem deutlichen Anstieg des Topoisomerase II $\alpha$ -Signals in den DNA-haltigen Fraktionen.

Aufgrund dieser Ergebnisse ist in Betracht zu ziehen, dass die untersuchten Daidzein-Metabolite entweder keinen Einfluss auf Topoisomerase II-Enzyme in intakten Zellen nehmen oder aber dass sie als katalytische Hemmstoffe agieren. Katalytische Topoisomerase-Hemmstoffe sind in der Lage die Bildung der kovalenten Enzym-DNA-Intermediate zu

verhindern, indem sie die katalytische Aktivität der Topoisomerase hemmen und dadurch die Ausbildung einer kovalenten Bindung zur DNA unterdrücken. Daher kann eine kombinierte Inkubation mit den Metaboliten und einem bekannten Topoisomerase II-Gift darüber Aufschluss geben, ob eine rein katalytische Hemmung der Topoisomerase II vorliegt. Dazu wurden HT29-Zellen für 30 min mit Daidzein bzw. 6-HO-DAI vorinkubiert, wonach sich eine einstündige Koinkubation des jeweiligen Isoflavons mit dem Topoisomerase II-Gift Doxorubicin anschloss. 8-HO-DAI wurde aufgrund seiner geringeren Wirksamkeit im Dekatenierungsassay verglichen zu 6-HO-DAI nicht in die Koinkubations-Experimente mit einbezogen.

In Abbildung 4.18 sind die Ergebnisse der Koinkubation von HT29-Zellen mit Daidzein bzw. 6-HO-DAI und Doxorubicin (10  $\mu$ M) dargestellt. Die nach den Koinkubationen ermittelten Werte wurden auf die durch reines Doxorubicin ( $\equiv$ 100%) erhaltene Menge an Topoisomerase II-DNA-Komplexen bezogen.

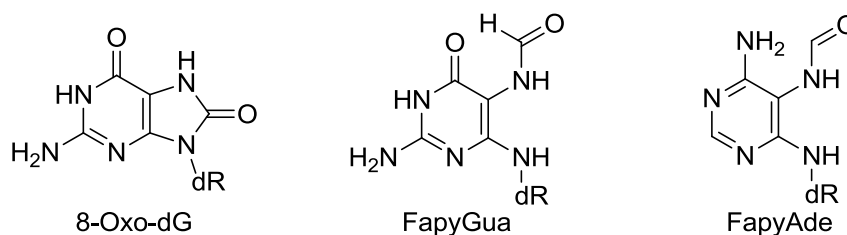


**Abb. 4.18:** Modulation der Topoisomerase II-giftenden Wirkung von Doxorubicin durch 6-HO-DAI bzw. Daidzein im ICE-Bioassay. Nach 30 minütiger Vorinkubation mit dem jeweiligen Isoflavon folgte eine einstündige Koinkubation der HT29-Zellen mit Doxorubicin (10 μM). Gezeigt sind die arithmetischen Mittelwerte  $\pm$  SD aus drei unabhängigen Versuchen nach Normalisierung auf den DNA-Gehalt sowie repräsentative Membranausschnitte der DNA-haltigen Fraktionen. Angegebene Signifikanzen beziehen sich auf die Behandlung mit Doxorubicin (Student's *t*-Test: \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ).

Doxorubicin (10 μM) verursachte eine potente Erhöhung der Anzahl an Topoisomerase II-DNA-Komplexen, wie den Membranausschnitten der DNA-haltigen Fraktionen zu entnehmen ist. Daidzein zeigte auch in der höchsten eingesetzten Konzentration von 250 μM keinen Einfluss auf die Stabilisierung der Topoisomerase II-DNA-Intermediate durch Doxorubicin. Hingegen wurde durch die kombinierte Inkubation von Doxorubicin mit 6-HO-DAI (100 μM) eine signifikante Abnahme der Anzahl an stabilisierten Enzym-DNA-Komplexen beobachtet. Dabei ging die Menge der kovalenten Intermediate für beide Isoformen auf ca. 80% im Vergleich zu reinem Doxorubicin zurück, was auf eine Hemmung der katalytischen Topoisomerase II-Aktivität durch 6-HO-DAI hinweist.

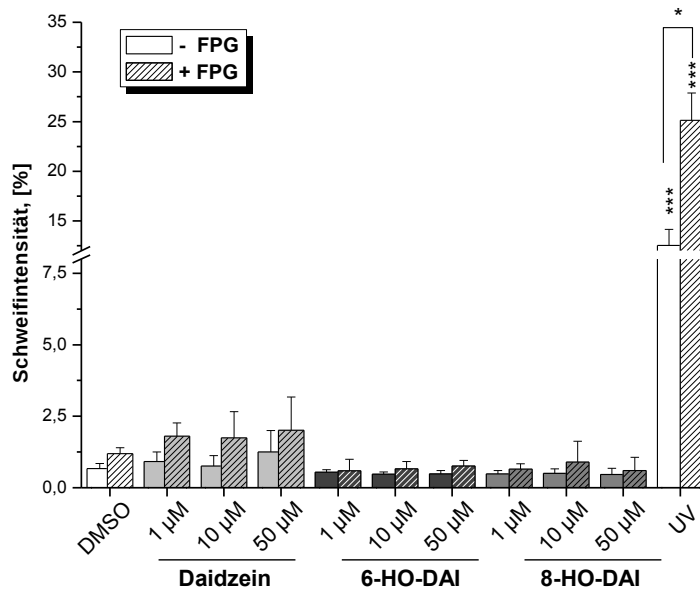
#### 4.2.5. Einfluss auf die DNA-Integrität

Eine Hemmung der physiologischen Topoisomerase-Aktivität, beispielsweise durch katalytische Hemmstoffe, könnte zu einer erhöhten Torsionsspannung der DNA-Helix führen, infolge derer DNA-Strangbrüche resultieren können. Daher wurde der Einfluss von Daidzein, 6-HO-DAI und 8-HO-DAI auf die DNA-Integrität in HT29-Zellen mittels Comet Assay unter alkalischen Bedingungen untersucht (siehe Kapitel 4.1.2). Zusätzlich wurden die Proben mit dem DNA-Reparaturenzym Formamidopyrimidin-DNA-Glykosylase (FPG) behandelt, um die prämutagene Basen-Läsion 7-Hydro-8-Oxo-2'-Deoxyguanosin (8-Oxo-dG) zu erfassen (Abbildung 4.19), welche einen zuverlässigen Biomarker für oxidative DNA-Basenschäden darstellt (Collins et al., 1997; Moller, 2006). FPG erkennt darüber hinaus Formamidopyrimidine (Abb. 4.19), die durch Öffnung des Imidazol-Rings infolge einer Oxidation entstehen (Collins et al., 1996; Gedik et al., 1998) sowie alkylierte Formamidopyrimidine, die aus alkylierten DNA-Addukten resultieren (Boiteux et al., 1992).



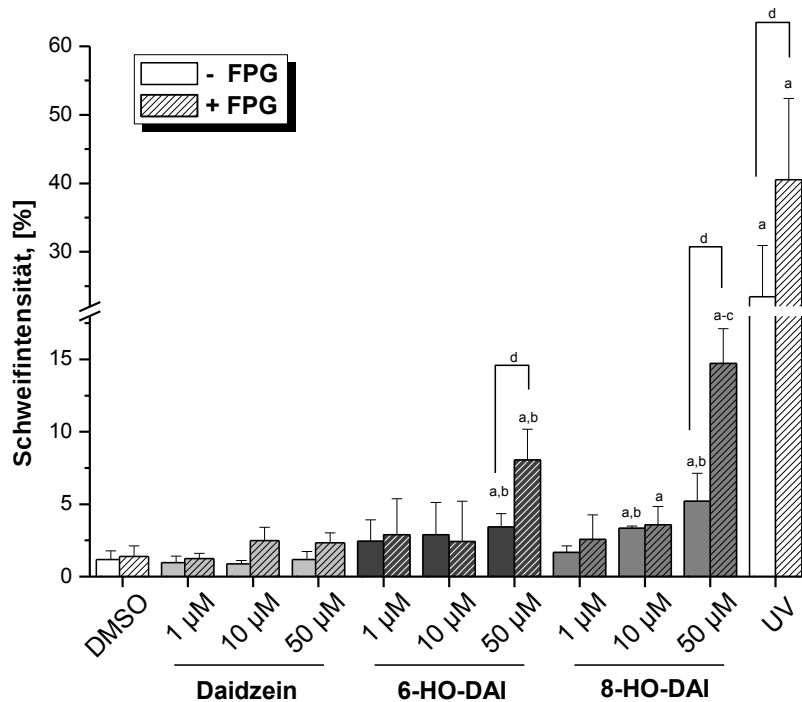
**Abb. 4.19:** Strukturen oxidativer DNA-Basenmodifikationen, die von dem DNA-Reparaturenzym Formamidopyrimidin-DNA-Glykosylase (FPG) erkannt werden. 8-Oxo-dG: 7-Hydro-8-Oxo-2'-Deoxyguanosin; FapyGua: 2,6-Diamino-4-Hydroxy-5-Formamidopyrimidin; FapyAde: 4,6-Diamino-5-Formamidopyrimidin.

Als DNA-Reparaturenzym schneidet FPG mithilfe seiner DNA-Glykosylase-Aktivität in einem ersten Schritt die modifizierte Base aus, wodurch eine apurine Stelle entsteht, die in der Folge durch die Endonuklease-Aktivität des Enzyms in einen Strangbruch überführt wird (Collins et al., 1996).



**Abb. 4.20:** Induktion von DNA-Strangbrüchen nach einstündiger Inkubation von HT29-Zellen mit Daidzein, 6-HO-DAI oder 8-HO-DAI im Comet Assay unter alkalischen Bedingungen. FPG-sensitive DNA-Stellen wurden durch zusätzliche Behandlung mit dem DNA-Reparaturenzym Formamidopyrimidin-DNA-Glykosylase (FPG) erfasst. Bestrahlung mit UV-Licht (312 nm; 2 min) wurde als Positivkontrolle eingesetzt. Die Ergebnisse sind als arithmetische Mittelwerte  $\pm$  SD der ermittelten Schweifintensitäten [%] von mind. vier unabhängigen Inkubationen dargestellt. Die angegebenen Signifikanzniveaus beziehen sich auf die jeweilige Lösungsmittelkontrolle und wurden mittels Student's *t*-Test ermittelt (\*,  $p < 0,05$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$ ).

Nach einstündiger Exposition von HT29-Zellen gegenüber Daidzein, 6-HO-DAI oder 8-HO-DAI konnte keine Induktion von DNA-Strangbrüchen im alkalischen Comet Assay nachgewiesen werden (Abbildung 4.20). Auch die zusätzliche Behandlung mit FPG ergab keine Erhöhung der DNA-Strangbruchrate, was darauf hindeutet, dass in HT29-Zellen keine oxidativen DNA-Basenschäden basierend auf FPG-sensitiven Stellen durch die eingesetzten Konzentrationen an 6-HO-DAI bzw. 8-HO-DAI verursacht werden. Hingegen bewirkte die Bestrahlung der Zellen mit UV-Licht (312 nm, 2 min) eine signifikante Erhöhung der DNA-Schäden gegenüber der Lösungsmittelkontrolle DMSO, was vermutlich auf eine direkte Anregung der DNA durch Photonen-Absorption zurückgeführt werden kann (Kielbassa et al., 1997). Zusätzlich war die Schweifintensität der FPG-behandelten UV-Probe signifikant zu den unbehandelten UV-Proben erhöht, was auf oxidative DNA-Schäden hinweist.

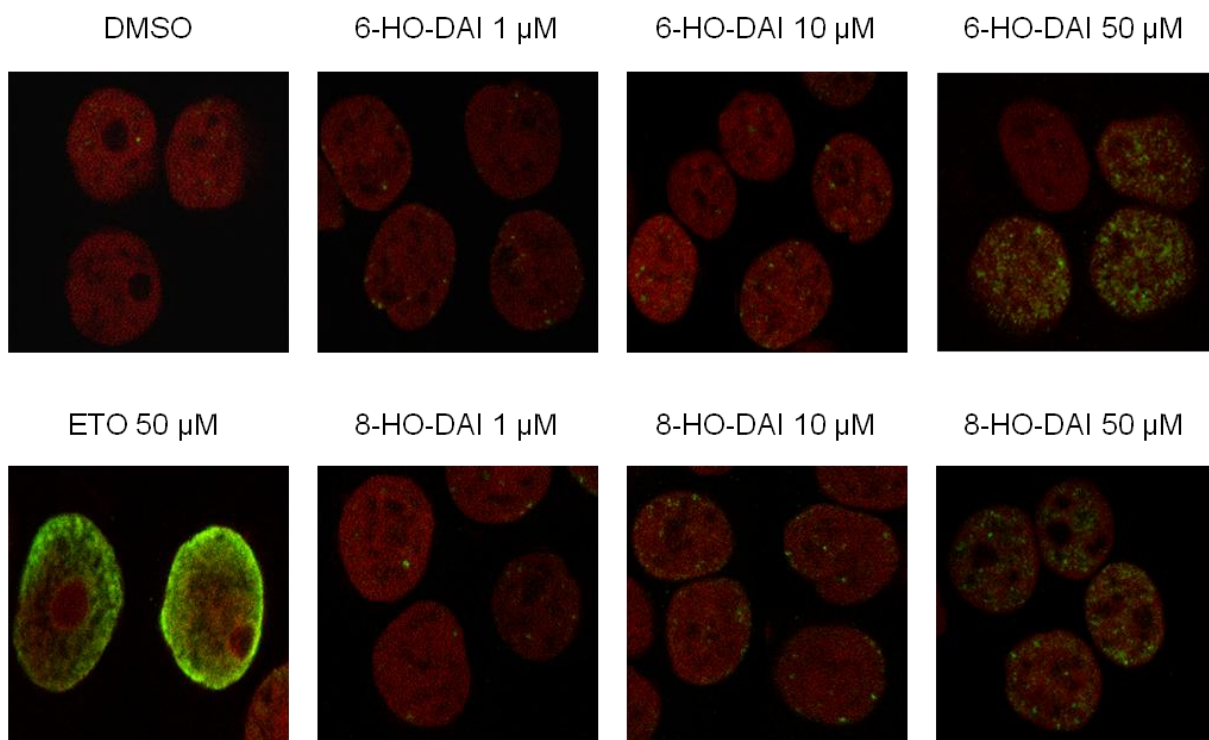


**Abb. 4.21:** DNA-schädigende Wirkung von Daidzein und seinen oxidativen Metaboliten in HT29-Zellen. Die DNA-Strangbruchrate wurde nach 24-stündiger Inkubation im Comet Assay unter alkalischen Bedingungen bestimmt, wobei oxidativ modifizierte DNA-Basen durch zusätzliche Behandlung mit Formamidopyrimidin-DNA-Glykosylase (FPG) erfasst wurden. Bestrahlung mit UV-Licht (312 nm; 2 min) wurde als Positivkontrolle eingesetzt. Die arithmetischen Mittelwerte  $\pm$  SD von mind. vier unabhängigen Inkubationen aus Duplikatsbestimmungen sind dargestellt. Die angegebenen Signifikanzen wurden mittels Student's *t*-Test ermittelt ( $p < 0,05$ ) und beziehen sich (a) auf die jeweilige Lösungsmittelkontrolle, (b) die Muttersubstanz Daidzein oder beschreiben signifikante Unterschiede (c) zwischen den Metaboliten oder (d) zwischen den FPG-behandelten und unbehandelten Proben.

Auch nach 24-stündiger Inkubation der HT29-Zellen mit Daidzein war keine DNA-schädigende Wirkung des Isoflavons bis zu einer Konzentration von 50  $\mu$ M erkennbar (Abbildung 4.21). Hingegen zeigten beide Daidzein-Metabolite bei dieser Inkubationszeit DNA-strangbrechendes Potential. So nahm die Schweifintensität nach 24-stündiger Inkubation der HT29-Zellen mit 8-HO-DAI ab einer Konzentration von 10  $\mu$ M signifikant zu und erreichte in der höchsten getesteten Konzentration von 50  $\mu$ M eine Schweifintensität von  $5,2 \pm 1,9\%$ . Eine DNA-schädigende Wirkung durch 6-HO-DAI war ab einer Konzentration von 50  $\mu$ M mit einer Schweifintensität von  $3,4 \pm 0,9\%$  zu beobachten. Darüber hinaus wurden für beide Metabolite in der höchsten getesteten Konzentration von 50  $\mu$ M FPG-sensitive Stellen detektiert, was auf eine mögliche oxidative DNA-Schädigung hinweist. 6-HO-DAI bewirkte dabei nach zusätzlicher FPG-Behandlung eine Zunahme der Schweifintensität auf  $8 \pm 2\%$ , während die Schweifintensität für 8-HO-DAI auf  $15 \pm 2\%$  anstieg und somit signifikant gegenüber den durch 6-HO-DAI erhaltenen FPG-sensitiven Stellen erhöht war. Die Bestrahlung mit UV-Licht führte zu einer signifikanten Erhöhung der DNA-

Strangbruchrate sowie zu einer zusätzlichen Erhöhung der FPG-sensitiven Stellen, was in der Literatur auf die direkte Anregung der DNA durch das UV-Licht zurückgeführt wird (Kielbassa et al., 1997).

Weiterhin wurde die Bildung von  $\gamma$ H2AX-Foci in humanen Kolonkarzinomzellen immunohistochemisch detektiert, da die Phosphorylierung des Histons H2AX als Biomarker für DNA-Doppelstrangbrüche gilt (siehe Kapitel 4.1.2) (Bonner et al., 2008). Die Bildung von  $\gamma$ H2AX-Foci wurde mittels Immunohistochemie in humanen Kolonkarzinomzellen bestimmt (Abbildung 4.22).



**Abb. 4.22:** Detektion von  $\gamma$ H2AX-Foci nach Behandlung humaner Kolonkarzinomzellen mit 6-HO-DAI und 8-HO-DAI. HT29-Zellen wurden nach 24-stündiger Inkubation fixiert und die entstandenen  $\gamma$ H2AX-Foci mithilfe spezifischer Antikörper angefärbt (grün), während die DNA mit Propidiumiodid (rot) gegengefärbt wurde. Das Topoisomerase II-Gift Etoposid (ETO, 50  $\mu$ M) wurde als Positivkontrolle mitgeführt. Repräsentative Zellen zweier unabhängig voneinander durchgeführter Experimente sind abgebildet. Die Versuche wurden mit freundlicher Genehmigung von Y. Pommier, MD, im ‚Laboratory of Molecular Pharmacology‘, NIH, Bethesda, durchgeführt.

Das linke Bild der oberen Reihe zeigt repräsentative Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit der Lösungsmittelkontrolle DMSO. Das Grundniveau an DNA-Doppelstrangbrüchen lag mit durchschnittlich einem  $\gamma$ H2AX-Focus pro Zelle in dem für Karzinomzellen basalen Bereich. Die Zahl der detektierten  $\gamma$ H2AX-Foci pro Zelle nahm nach 24-stündiger Inkubation mit 8-HO-DAI konzentrationsabhängig zu. Ab einer Konzentration von 10  $\mu$ M waren dabei bereits durchschnittlich etwa drei  $\gamma$ H2AX-Foci pro Zelle zu erkennen, während die Zahl der Foci auf

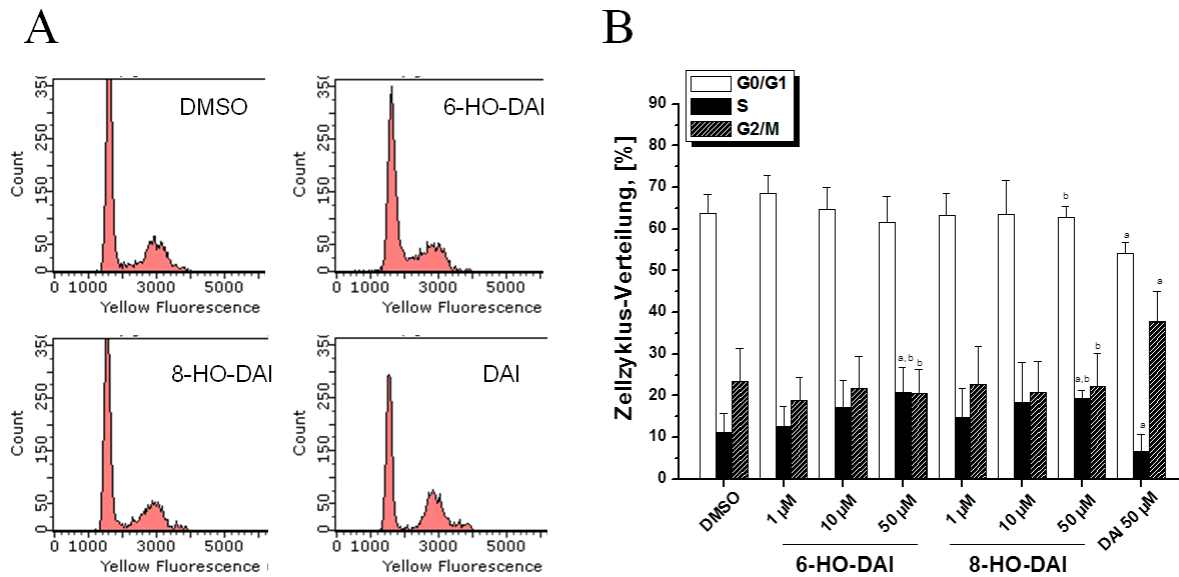
mindestens fünf pro Zelle in der höchsten getesteten Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  anstieg. Auch 6-HO-DAI bewirkte nach 24-stündiger Inkubation einen deutlichen Anstieg der  $\gamma\text{H2AX}$ -Foci in HT29-Zellen ab einer Konzentration von 50  $\mu\text{M}$ . Nach Behandlung mit dem Topoisomerase-Gift Etoposid (50  $\mu\text{M}$ ) zeigten die HT29-Zellen ein starkes, grünes Fluoreszenzsignal, das sich bereits über den gesamten Nukleus erstreckte. Dies spricht für eine potente Erhöhung der H2AX-Phosphorylierung, sodass eine Auszählung der einzelnen Foci nicht mehr möglich ist und bereits einsetzende apoptotische Prozesse nicht mehr ausgeschlossen werden können.

Die Ergebnisse der Untersuchungen zur Phosphorylierung des Histons H2AX zeigen eine gute Übereinstimmung mit den Beobachtungen des Comet Assays. So wies 8-HO-DAI in beiden Testsystemen bereits ab einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  ein DNA-strangbrechendes Potential auf, während 6-HO-DAI in einer Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  sowohl zur Erhöhung der Schweifintensität als auch zur Bildung von  $\gamma\text{H2AX}$ -Foci führte.

### 4.2.6. Einfluss auf die Zellzyklusverteilung

Die DNA-Integrität wird beim Durchlaufen des Zellzyklus an drei Checkpoints überprüft, was zur Erhaltung der genetischen Information essentiell ist. Durch DNA-Schäden erfolgt die Aktivierung der Kontrollpunkte in der  $G_1$ - und  $G_2$ -Phase, während der Checkpoint in der S-Phase eine Hemmung der DNA-Replikation erkennt. Durch Aktivierung der Kontrollpunkte erfolgt die Arretierung des Zellzyklus, was der Zelle die Möglichkeit zur DNA-Reparatur gibt. Bei irreparabler DNA-Schädigung kann schließlich die Seneszenz oder die Apoptose eingeleitet werden (Malumbres und Barbacid, 2009). Da Topoisomerasen eine wichtige Rolle beim Durchlaufen des Zellzyklus, insbesondere der S-Phase, spielen, kann eine Hemmung dieser essentiellen Enzyme eine Verzögerung des Zellzyklus zur Folge haben.

Daher wurde nachfolgend die Wirkung der oxidativen Daidzein-Metabolite auf die Zellzyklus-Verteilung von HT29-Zellen mittels Durchflusszytometrie untersucht. Hierfür wurde die DNA der Zellen mit Propidiumiodid angefärbt und anschließend die Fluoreszenzintensität der einzelnen Zellen als Maß für ihren DNA-Gehalt ermittelt. Infolge der DNA-Replikation in der S-Phase verdoppelt sich der DNA-Gehalt der Zellen, wodurch der DNA-Gehalt der Zellen in der  $G_2$ -Phase vor Eintritt in die Mitose um den Faktor zwei gegenüber den Zellen der  $G_0/G_1$ -Phase erhöht ist.



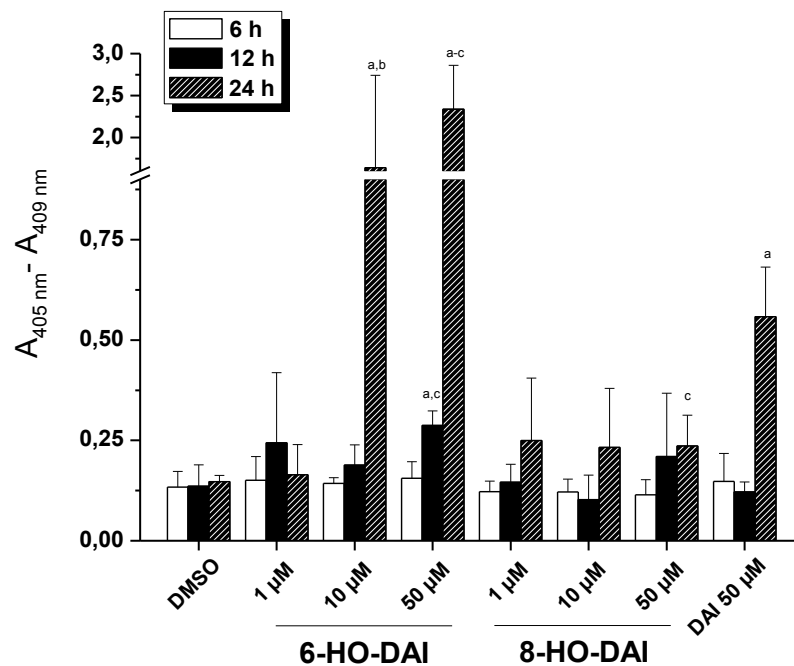
**Abb. 4.23:** Modulation der Zellzyklus-Verteilung durch 6-HO-DAI, 8-HO-DAI und Daidzein in HT29-Zellen. Nach 24-stündiger Inkubation wurde die Zellzyklus-Verteilung mittels Durchflusszytometrie (Guava EasyCyte Durchflusszytometer) bestimmt. (A) Repräsentative Histogramme für die jeweils höchste Konzentration der oxidativen Metabolite (50 µM) im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle DMSO bzw. zur Muttersubstanz Daidzein (50 µM) sind gezeigt. (B) Prozentuale Verteilung der HT29-Zellen auf die Phasen des Zellzyklus bezogen auf die Lösungsmittelkontrolle DMSO. Gezeigt sind die arithmetischen Mittelwerte  $\pm$  SD von drei unabhängigen Experimenten. Signifikante Unterschiede (a) zur Lösungsmittelkontrolle oder (b) zu Daidzein wurden mittels Student's *t*-Test berechnet ( $p < 0,05$ ).

Die Zellzyklus-Verteilung von HT29-Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit den oxidativen Daidzein-Metaboliten ist in Abbildung 4.23 dargestellt. Der Anteil der Zellen in der S-Phase nahm nach 24-stündiger Inkubation sowohl mit 6-HO-DAI (50 µM) als auch mit 8-HO-DAI (50 µM) signifikant gegenüber der Lösungsmittelkontrolle zu. Hingegen wurde die Zellzahl der übrigen Zellzyklus-Phasen durch die oxidativen Daidzein-Metabolite nicht beeinflusst. Die Muttersubstanz Daidzein wurde zum Vergleich in der Konzentration von 50 µM mitgeführt und bewirkte nach 24-stündiger Inkubation einen signifikanten Anstieg an HT29-Zellen in der G<sub>2</sub>/M-Phase des Zellzyklus, womit eine gleichzeitige Abnahme der Zellzahl in der G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>- und S-Phase verbunden war. Dementsprechend zeigten die oxidativen Metabolite eine signifikant unterschiedliche Wirkung auf den Zellzyklus als die Muttersubstanz, indem die Metabolite eine Verzögerung der S-Phase bewirkten, wohingegen Daidzein zu einer Senkung der Zellzahl in der S-Phase und einem Anstieg der Zellzahl in der G<sub>2</sub>/M-Phase führte.

#### 4.2.7. Bestimmung der Apoptose-Induktion durch oxidative Daidzein-Metabolite

Neben einer Arretierung des Zellzyklus können DNA-Schäden Apoptose induzieren, insbesondere wenn die auftretenden Schäden nicht ausreichend repariert werden können. Die Apoptose umfasst dabei eine Vielzahl zellulärer Prozesse, um einen kontrollierten Abbau der Zellbestandteile sowie der DNA mit anschließender Phagozytose des Zelldebris zu ermöglichen (Taylor et al., 2008). Um die mögliche Induktion apoptotischer Prozesse durch die oxidativen Daidzein-Metabolite in HT29-Zellen zu erfassen, wurde ein „enzyme-linked immunosorbent assay“ (ELISA) basierend auf einem „Sandwich-Enzym-Immunoassay“ durchgeführt (Cell Death Detection ELISA<sup>PLUS</sup> Assay, Roche). Durch den Einsatz Peroxidase-gekoppelter, monoklonaler Antikörper, welche gegen die DNA bzw. Histone gerichtet sind, wird eine photometrische Detektion von Mono- und Oligonukleosomen ermöglicht.

HT29-Zellen wurden für 6 h, 12 h bzw. 24 h gegenüber den Testsubstanzen exponiert, um eine mögliche Apoptose-Induktion aufzuzeichnen (Abbildung 4.24).



**Abb. 4.24:** Bestimmung der zeitabhängigen Apoptose-Induktion durch Daidzein und seine oxidativen Metabolite im Cell Death Detection ELISA<sup>PLUS</sup> (Roche). HT29-Zellen wurden für 6 h, 12 h oder 24 h mit steigenden Konzentrationen der Isoflavone behandelt. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte  $\pm$  SD von mind. drei unabhängigen Experimenten. Signifikante Unterschiede (a) zur Lösungsmittelkontrolle DMSO, (b) zu 8-HO-DAI oder (c) zu DAI wurden mittels Student's *t*-Test berechnet ( $p < 0,05$ ).

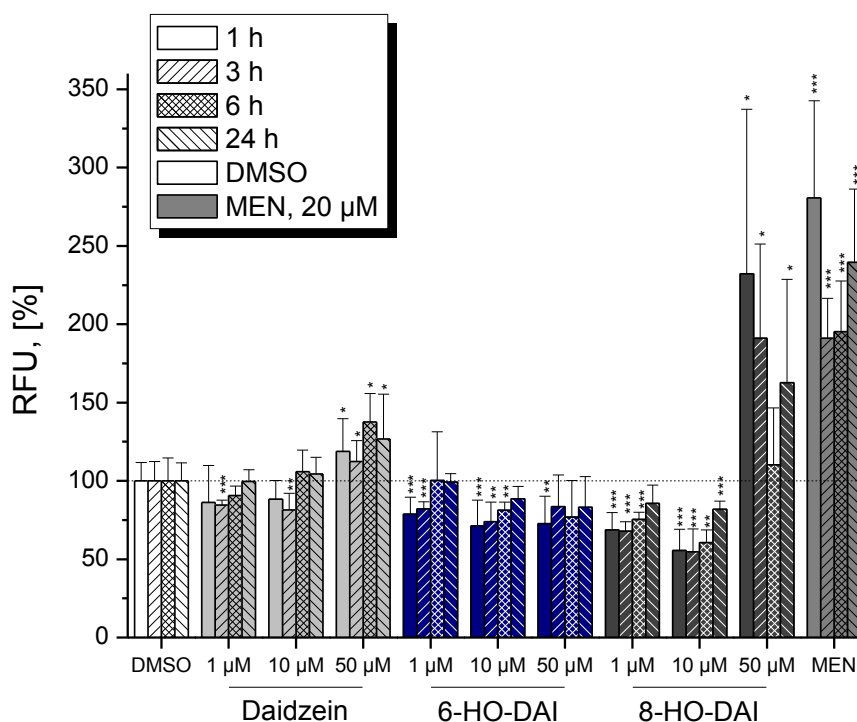
8-HO-DAI zeigte zu keinem der untersuchten Zeitpunkte einen statistisch signifikanten Einfluss auf die Apoptose-Induktion in humanen Kolonkarzinomzellen. Hingegen stieg die Anzahl an Mono- und Oligonukleosomen in HT29-Zellen nach 6-HO-DAI-Behandlung zeitabhängig an. Während eine 6-stündige Inkubation noch keine Änderung in der DNA-Fragmentierung verglichen zur Lösungsmittelkontrolle DMSO ergab, war nach 12-stündiger Behandlung von HT29-Zellen mit 6-HO-DAI ein signifikanter Anstieg an Mono- und Oligonukleosomen in der höchsten getesteten Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  erkennbar. Nach verlängerter Expositionsdauer von 24 h führte der an 6-Position hydroxylierte Metabolit bereits ab einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  zu einer potenten Apoptose-Induktion. Die Muttersubstanz Daidzein (50  $\mu\text{M}$ ) ließ ebenfalls eine pro-apoptotische Wirkung nach 24-stündiger Behandlung von HT29-Zellen erkennen, wobei zu den früheren Zeitpunkten keine Anzeichen für eine Erhöhung der Mono- und Oligonukleosomen erkennbar waren.

#### **4.2.8. Modulation des zellulären Redoxstatus durch oxidative Daidzein-Metabolite**

Im Comet Assay konnte eine signifikante Erhöhung der FPG-sensitiven Stellen nach Inkubation mit den oxidativen Daidzein-Metaboliten beobachtet werden (siehe Kapitel 4.2.5). Dies wirft die Frage einer möglichen DNA-Schädigung durch oxidativen Stress auf. Da 6-HO-DAI und 8-HO-DAI darüber hinaus eine katecholische Struktur besitzen, liegt die Möglichkeit der intrazellulären ROS-Bildung nahe. Daher wurde eine mögliche Modulation des zellulären Redoxstatus durch die oxidativen Daidzein-Metabolite untersucht. Hierzu wurden zwei unterschiedliche Endpunkte gewählt, die mit oxidativem Stress assoziiert sind. Zum einen wurde eine mögliche Verschiebung des intrazellulären Redox-Gleichgewichtes zugunsten der Oxidantien durch die oxidativen Daidzein-Metabolite im Dichlorofluorescein (DCF)-Assay untersucht. Zum anderen wurde der Einfluss der Metabolite auf den Transkriptionsfaktor Nrf2 auf Protein- und Expressionsebene mittels Western Blot Analyse bzw. Reporteragen Assay bestimmt.

##### **4.2.8.1. Modulation des zellulären Redoxstatus**

Eine mögliche zeitabhängige Verschiebung des zellulären Redoxstatus zugunsten der Oxidantien infolge der Behandlung von HT29-Zellen mit den oxidativen Daidzein-Metaboliten wurde mittels DCF-Assay untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.25 zusammengefasst.

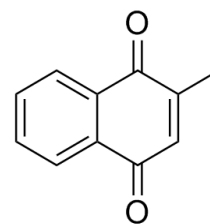


**Abb. 4.25:** Modulation des ROS-Gehaltes in HT29-Zellen durch Daidzein und seine oxidativen Metabolite im DCF-Assay. Menadion (20 µM) wurde als Positivkontrolle eingesetzt. Die arithmetischen Mittelwerte  $\pm$  SD von mind. drei unabhängigen Experimenten, die je eine Vierfachbestimmung enthalten, sind dargestellt. Die angegebenen Signifikanzniveaus beziehen sich auf die Lösungsmittelkontrolle DMSO zum jeweiligen Zeitpunkt und wurden mittels Student's *t*-Test ermittelt (\*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$ ). RFU: relative Fluoreszenzeinheiten.

Daidzein zeigte in der höchsten getesteten Konzentration von 50 µM eine signifikante pro-oxidative Veränderung des intrazellulären Redoxstatus in HT29-Zellen, die sich bereits nach einstündiger Inkubation leicht andeutete. Nach 6 h stieg der intrazelluläre ROS-Gehalt auf  $138 \pm 18\%$ , verglichen zur Lösungsmittelkontrolle, an. Eine Behandlung der HT29-Zellen mit 6-HO-DAI hingegen führte zu keiner messbaren Veränderung des zellulären Redoxstatus – im Gegenteil konnte eine tendenzielle Abnahme der detektierten Fluoreszenzintensität, verglichen zur Lösungsmittelkontrolle DMSO, verzeichnet werden. Die potenteste Abnahme des Fluoreszenz-Signals war dabei nach einstündiger Inkubation zu verzeichnen. Ebenso bewirkte 8-HO-DAI im niedrigen Konzentrationsbereich (1 - 10 µM) eine deutliche Erniedrigung der Fluoreszenzintensität verglichen zu DMSO, während die Werte nach 24-stündiger Inkubation leicht anstiegen, jedoch unter dem für DMSO erhaltenen Grundlevel blieben. Bei einer Konzentration von 50 µM erhöhte 8-HO-DAI den intrazellulären ROS-Gehalt signifikant, wobei die maximalen Werte mit  $232 \pm 104\%$  nach einstündiger Inkubation erfasst wurden und das Fluoreszenzsignal über den untersuchten Zeitverlauf wieder abnahm. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass der DCF-Assay ohne den Zusatz von Katalase

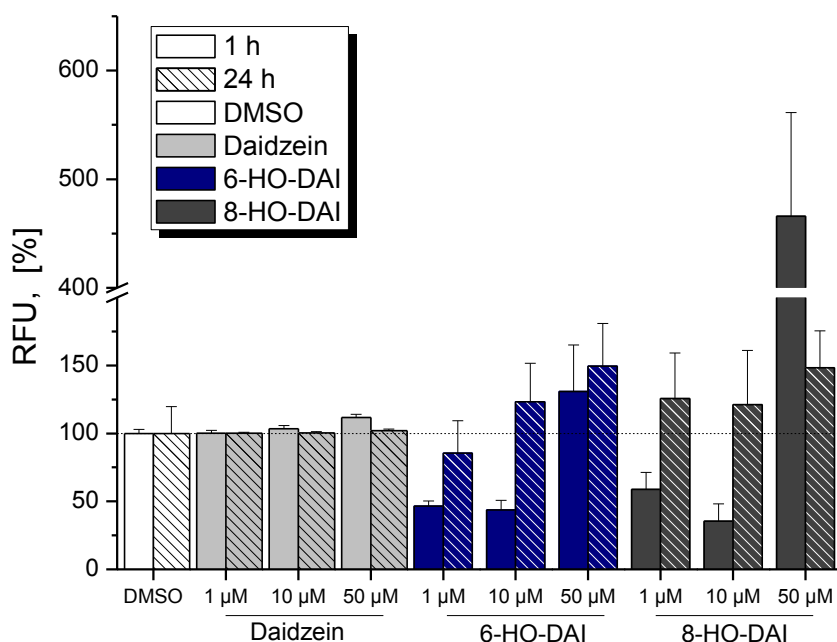
durchgeführt wurde und bereits zuvor gezeigt werden konnte, dass 8-HO-DAI in einer Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  Wasserstoffperoxid im Zellkulturmedium generiert.

Das gebildete Wasserstoffperoxid könnte daher durch Diffusion in die Zellen gelangen und maßgeblich zu der gemessenen Erhöhung an intrazellulären ROS beitragen. Als Positivkontrolle wurde das Vitamin K-Derivat Menadion (Abbildung 4.26) mitgeführt, das als potenter Redoxcyclus einen starken Anstieg des ROS-Gehaltes (>190%) in HT29-Zellen veranlasste, der auch nach 24-stündiger Inkubation noch bestehen blieb.



**Abb. 4.26:** Struktur von Menadion

Das Ergebnis des DCF-Assays in HT29-Zellen warf die Frage einer möglichen direkten Interaktion der Metabolite mit dem Substrat Dichlorofluorescein-Diacetat (DCFH-DA) auf, was möglicherweise für die Erniedrigung des Fluoreszenzsignals im niedrigen Konzentrationsbereich der Metabolite Rechnung tragen könnte. Um direkte Reaktionen zwischen den Testsubstanzen und dem Fluoreszenzfarbstoff DCFH-DA ausschließen zu können, wurde im Folgenden ein zellfreier DCF-Assay durchgeführt.

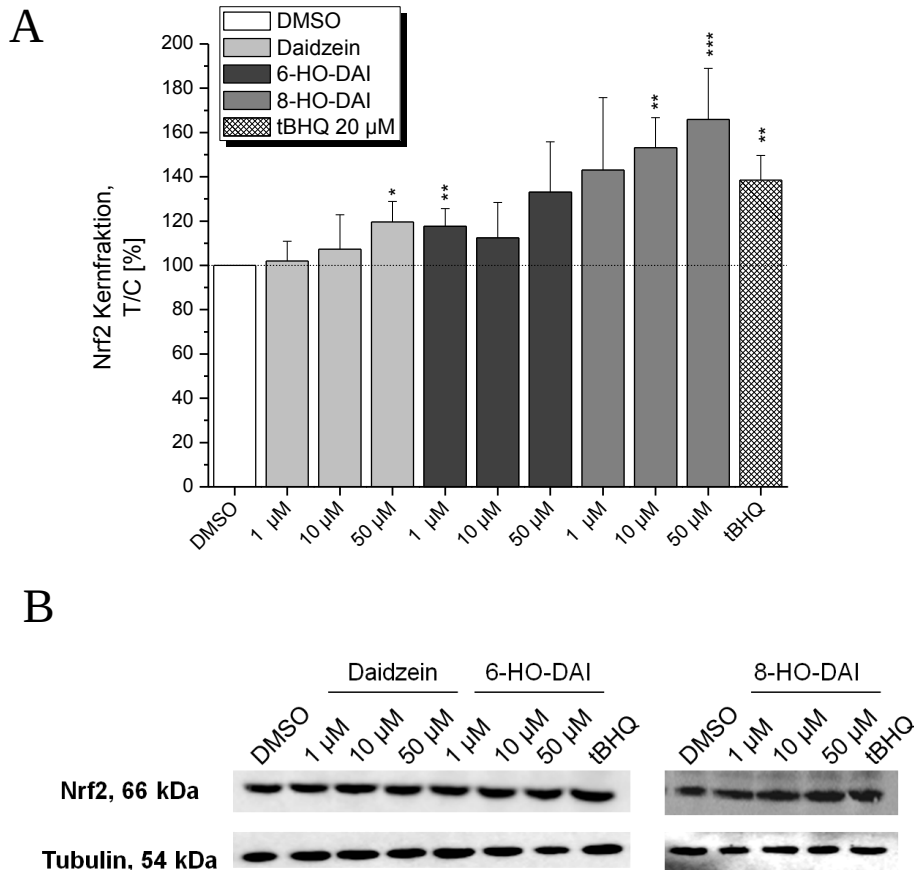


**Abb. 4.27:** Zellfreie Interaktion von DCFH-DA mit Daidzein, 6-HO-DAI oder 8-HO-DAI nach ein- bzw. 24-stündiger Inkubation. Die arithmetischen Mittelwerte  $\pm$  SD von drei unabhängigen Experimenten in einer Vierfachbestimmung sind dargestellt. RFU: relative Fluoreszenzeinheiten.

Während die Muttersubstanz Daidzein dabei weder nach 1 h noch nach 24 h nennenswerte Effekte auf die gemessene relative Fluoreszenzintensität ausübte, bewirkten beide Metabolite im niedrigen Konzentrationsbereich von 1 - 10  $\mu\text{M}$  nach einstündiger Inkubation eine potente Unterdrückung der Fluoreszenz (Abbildung 4.27). Nach 24 h stiegen die Werte auf das Grundniveau der Lösungsmittelkontrolle an. Auch im zellfreien System konnte ein potenter Anstieg der Fluoreszenzintensität durch 8-HO-DAI in der höchsten getesteten Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  beobachtet werden, der nach 24 h zwar gegenüber der einstündigen Inkubation abnahm, jedoch verglichen zur Lösungsmittelkontrolle DMSO noch immer deutlich erhöht war. Somit kann eine direkte Interaktion der oxidativen Metabolite mit dem Substrat DCFH-DA nicht ausgeschlossen werden. Insbesondere der Einfluss des zur Messung gewählten Zeitfensters könnte in sich überlagernden Effekten resultieren, da einerseits eine Dämpfung der Fluoreszenz durch die Testsubstanzen und andererseits eine zeitabhängige Fluoreszenz-Zunahme durch Wasserstoffperoxid-Bildung auftreten könnte.

### *4.2.8.2. Modulation des Nrf2-Signalweges*

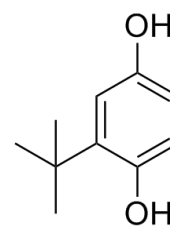
Da aufgrund der im letzten Absatz genannten Anzeichen für mögliche direkte Wechselwirkungen zwischen den Testsubstanzen und dem Fluoreszenzfarbstoff die Aussagekraft der DCF-Assays eingeschränkt sein könnte, wurde weiterhin der Einfluss der Daidzein-Metabolite auf den Transkriptionsfaktor Nrf2 untersucht. So bewirkt oxidativer Stress eine Translokation des zytosolischen Nrf2 in den Zellkern, wo es an das antioxidativ responsive Element (ARE) bindet und dadurch die Genexpression detoxifizierender Phase II-Enzyme aktiviert.



**Abb. 4.28:** Modulation des Nrf2-Gehaltes im Kern von HT29-Zellen durch Daidzein, 6-HO-DAI bzw. 8-HO-DAI. Die relative Konzentration an Nrf2 im Zellkern wurde nach einstündiger Inkubation mittels Western Blot Analyse bestimmt. *Tert*-Butylhydrochinon (20 µM) wurde als Positivkontrolle eingesetzt. (A) Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte  $\pm$  SD von mind. drei unabhängigen Experimenten, bezogen auf die Lösungsmittelkontrolle DMSO. (B) Repräsentative Membranen nach Detektion von Nrf2 bzw.  $\alpha$ -Tubulin als Beladungskontrolle sind abgebildet. Die angegebenen Signifikanzniveaus beziehen sich auf die Lösungsmittelkontrolle DMSO und wurden mittels Student's *t*-Test ermittelt (\*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ , \*\*\*,  $p < 0,001$ ).

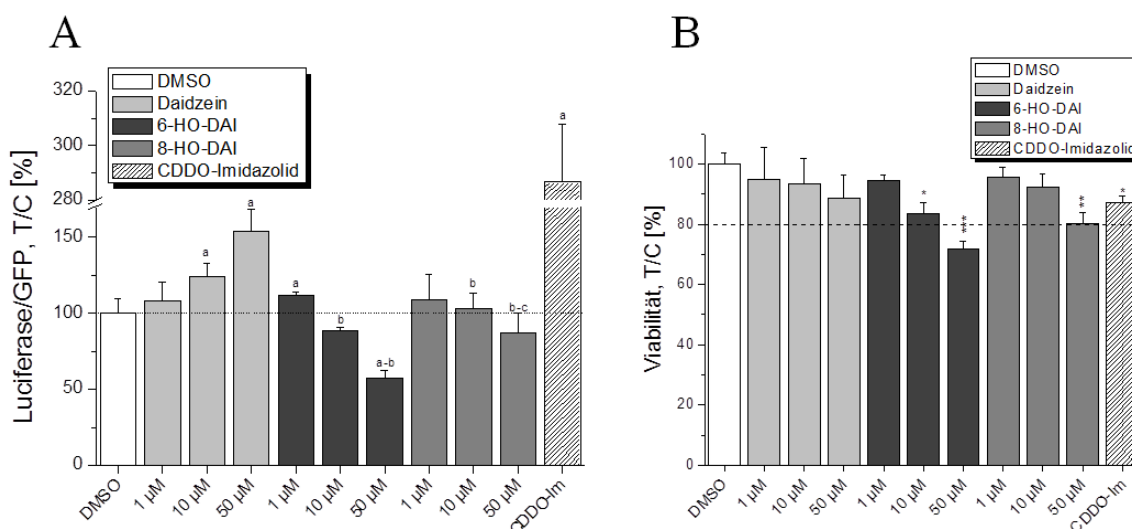
Die relative Konzentration des Transkriptionsfaktors Nrf2 im Zellkern wurde mittels Western Blot Analyse in HT29-Zellen bestimmt (Abbildung 4.28). Nach einstündiger Inkubation stieg die Konzentration des Transkriptionsfaktors im Zellkern in der höchsten getesteten Konzentration von 50 µM Daidzein auf  $120 \pm 9\%$  der Lösungsmittelkontrolle an. Auch 6-HO-DAI (50 µM) bewirkte eine Zunahme an Nrf2 im Kern der HT29-Zellen auf  $133 \pm 23\%$  bei jedoch gleichzeitig höherer Varianz.

Der an 8-Position hydroxylierte Daidzein-Metabolit führte zu einem konzentrationsabhängigen Anstieg des Nrf2-Gehaltes in der Kernfraktion und erreichte in der höchsten eingesetzten Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  Werte von  $165 \pm 23\%$ . Das als Positivkontrolle eingesetzte *tert*-Butylhydrochinon (Abbildung 4.29) verursachte mit  $138 \pm 11\%$ , verglichen mit der Lösungsmittelkontrolle DMSO, eine signifikante Erhöhung der Nrf2-Konzentration im Zellkern.



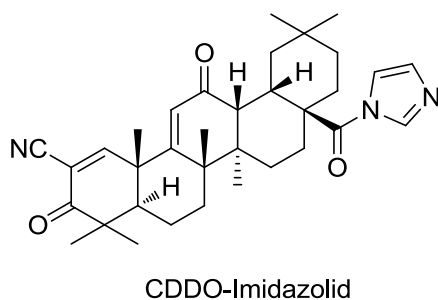
**Abb. 4.29:** Struktur von *tert*-Butylhydrochinon

Um zusätzlich den Einfluss der oxidativen Daidzein-Metabolite auf ARE-regulierte Gene zu untersuchen, wurde ein in CHO (*chinese hamster ovary*)-Zellen etablierter Reporter-Gen Assay durchgeführt. Hierzu wurde mittels transients Transfektion das für Luciferase kodierende Reporter-Gen in die Promoterregion des ARE-Gens von CHO-Zellen eingebracht. Nach 20-stündiger Inkubation der CHO-Zellen mit den oxidativen Daidzein-Metaboliten wurde die Intensität des Luciferase-Signals bestimmt, wodurch Rückschlüsse auf die Modulation der Genexpression ARE-regulierter Gene gezogen werden können.



**Abb. 4.30:** Modulation ARE-regulierter Gene durch Daidzein bzw. die oxidativen Metabolite im Luciferase Reporter-Gen Assay. Nach 20-stündiger Inkubation von CHO transient transfizierten Zellen wurde die Intensität des Luciferase- bzw. GFP-Signals gemessen. CDDO-Imidazole (100 nM) wurde als Positivkontrolle eingesetzt. (A) Die arithmetischen Mittelwerte  $\pm$  SD des Lumineszenz-Signals der Luciferase-Aktivität nach Normalisierung auf das GFP-Signal aus mind. drei unabhängigen Experimenten in einer Vierfachbestimmung sind dargestellt. Die Signifikanzen wurden mittels Student's *t*-Test berechnet ( $p < 0,05$ ) und beziehen sich auf (a) die Lösungsmittelkontrolle, (b) Daidzein bzw. (c) 6-HO-DAI. (B) Die Viabilität der CHO-Zellen, bezogen auf die Lösungsmittelkontrolle DMSO, wurde anhand der Fluoreszenzintensität des GFP-Signals ermittelt. Die angegebenen Signifikanzen beziehen sich auf die Lösungsmittelkontrolle DMSO (Student's *t*-Test: \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$ ). GFP: *green fluorescence protein*.

Daidzein aktivierte nach 20-stündiger Inkubation transient transfizierter CHO-Zellen die Luciferase-Expression konzentrationsabhängig (Abbildung 4.30, A). So konnte bereits ab einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  ein signifikanter Anstieg des Luciferase-Signals detektiert werden, der in der höchsten getesteten Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  Werte von  $154 \pm 14\%$  erreichte. Zudem verursachte 6-HO-DAI in der niedrigsten eingesetzten Konzentration eine geringfügige Erhöhung der Genexpression ARE-regulierter Gene auf  $111 \pm 2\%$ . Hingegen war im höheren Konzentrationsbereich eine potente Verringerung des Luciferase-Signals zu beobachten, die mit einer gleichzeitigen Abnahme der Viabilität der CHO-Zellen nach 20-stündiger 6-HO-DAI-Behandlung einherging (Abbildung 4.30, B). Da die Viabilität in der 10  $\mu\text{M}$  6-HO-DAI-Konzentration bereits nur knapp über 80% betrug, lässt sich für diese hohen Konzentrationen keine schlüssige Aussage über die Wirkung des oxidativen Daidzein-Metaboliten auf die Expression ARE-regulierter Gene treffen.



**Abb. 4.31:** Struktur des Nrf2-Aktivators CDDO-Imidazolid (1-[2-Cyano-3,12-Dioxooleana-1,9(11)-Dien-28-oyl]-Imidazolid)

8-HO-DAI zeigte bis zu einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  keinen Einfluss auf das detektierte Luciferase-Signal, lediglich in der höchsten getesteten Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  verringerte es sowohl die Intensität des Luciferase-Signals, als auch die Viabilität der CHO-Zellen signifikant. Infolge der in dieser Konzentration (50  $\mu\text{M}$ ) auftretenden Zytotoxizität können auch für 8-HO-DAI keine fundierten Rückschlüsse auf eine mögliche Modulation ARE-regulierter Gene gezogen werden.

Das als Positivkontrolle eingesetzte CDDO-Imidazolid (100 nM, Abbildung 4.31) führte zu einer signifikanten Zunahme des Luciferase-Signals auf  $287 \pm 21\%$ , was auf die potente Aktivierung des Nrf2-Signalweges und die damit verbundene erhöhte Expression Nrf2-abhängiger Gene zurückzuführen ist (Liby et al., 2005).

#### 4.2.9. Tabellarischer Überblick über die Ergebnisse

Tabelle 4.2 fasst die Ergebnisse der Untersuchungen zu den oxidativen Daidzein-Metaboliten im Vergleich zur Muttersubstanz zusammen.

**Tabelle 4.2:** Tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse.–keine Effekte bis zu einer Konzentration von <sup>a</sup> 250 µM, <sup>b</sup> 100 µM, <sup>c</sup> 50 µM; n.b. nicht bestimmt; k.A. keine Aussage möglich.

|                                                         |                         | Daidzein                 | 6-HO-DAI                   | 8-HO-DAI                   |
|---------------------------------------------------------|-------------------------|--------------------------|----------------------------|----------------------------|
| <b>EGFR-Aktivität im ELISA (IC<sub>50</sub>)</b>        |                         | – <sup>a</sup>           | 0,4 ± 0,1 µM               | 10,8 ± 6,0 µM              |
| <b>Topo II-Hemmung (zellfrei)</b>                       |                         | – <sup>a</sup>           | ≥ 5 µM                     | ≥ 50 µM                    |
| <b>Humane Kolonkarzinomzellen</b>                       |                         |                          |                            |                            |
| <b>Zytotoxi-<br/>zität</b>                              | <b>LDH-<br/>Assay</b>   | – <sup>b</sup>           | 100 µM                     | 100 µM                     |
|                                                         | <b>WST-1-<br/>Assay</b> | – <sup>b</sup>           | 100 µM                     | 100 µM                     |
| <b>Topo II-Giftung</b>                                  |                         | – <sup>b</sup>           | – <sup>b</sup>             | – <sup>b</sup>             |
| <b>Katalytische Topo-<br/>Hemmung</b>                   |                         | – <sup>a</sup>           | 100 µM                     | n. b.                      |
| <b>DNA-<br/>Integrität</b>                              | <b>1 h</b>              | – <sup>c</sup>           | – <sup>c</sup>             | – <sup>c</sup>             |
|                                                         | <b>24 h</b>             | – <sup>c</sup>           | 50 µM                      | ≥ 10 µM                    |
| <b>γH2AX-Foci<sup>1</sup></b>                           |                         | n. b.                    | 50 µM                      | ≥ 10 µM                    |
| <b>Zellzyklus (24 h)</b>                                |                         | G <sub>2</sub> /M-Arrest | Verzögerung<br>der S-Phase | Verzögerung<br>der S-Phase |
| <b>Apoptose-Induktion<br/>(24 h)</b>                    |                         | 50 µM                    | >10 µM                     | – <sup>c</sup>             |
| <b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Bildung im<br/>Medium</b> |                         | – <sup>c</sup>           | – <sup>c</sup>             | 50 µM                      |
| <b>DCF</b>                                              |                         | 50 µM                    | k.A.                       | k.A.                       |
| <b>Nrf2-Translokation</b>                               |                         | 50 µM                    | 50 µM                      | ≥ 10 µM                    |
| <b>Induktion (Nrf2)-<br/>ARE-regulierter<br/>Gene</b>   |                         | ≥ 10 µM                  | k.A.                       | k.A.                       |

#### 4.2.10. Diskussion der Ergebnisse zur biologischen Aktivität der oxidativen Daidzein-Metabolite

Im oxidativen Stoffwechsel von Daidzein können Metabolite mit Katechol-Struktur gebildet werden, die sich von dem Isoflavon Genistein lediglich in der Anordnung der Hydroxygruppen unterscheiden (Kulling et al., 2000; Kulling et al., 2002). Genistein moduliert unter anderem die Aktivität von RTKs und humanen Topoisomerasen (Akiyama et al., 1987; Bandele und Osheroff, 2007; Kalfalah et al., 2011), wohingegen Daidzein keinen Einfluss auf diese Enzyme zeigt (Bandele und Osheroff, 2007; Du et al., 2004). Im Fokus der durchgeführten Untersuchungen stand daher die Frage einer möglichen Veränderung der biologischen Aktivität von Daidzein durch den oxidativen Metabolismus.

Eine Hydroxylierung am A-Ring führte zu einer potenten Hemmung der katalytischen Topoisomerase II-Aktivität, während Daidzein und 3'-HO-DAI keinen Einfluss auf die Enzymaktivität zeigten. In vorausgegangenen Studien konnte zudem die Unterdrückung der Proteintyrosinkinase-Aktivität des isolierten EGFR durch 6-HO-DAI und 8-HO-DAI nachgewiesen werden, wobei 6-HO-DAI eine stärkere Hemmwirkung vermittelte als 8-HO-DAI. 3'-HO-DAI hingegen ließ analog zur Muttersubstanz Daidzein keinen Einfluss auf die EGFR-Aktivität erkennen (Fritz, 2004). Dies stimmt mit Studien überein, in denen weder eine verminderte Aktivität des EGF-Rezeptors (Peterson und Barnes, 1993) noch eine Unterdrückung der EGFR-Expression in Myoblasten durch Daidzein beobachtet wurde (Kalbe et al., 2008; Mau et al., 2008). Die Ergebnisse der zellfreien Untersuchungen legen nahe, dass eine Dihydroxylierung am A-Ring für die Modulation der Aktivität humaner Topoisomerasen wie auch der RTKs essentiell ist. Zudem zeigen die Ergebnisse, dass das biologische Aktivitätsprofil von Daidzein durch die im oxidativen Metabolismus erfolgte Einführung einer zusätzlichen Hydroxygruppe verändert wird. Daher wurden in humanen Kolonkarzinomzellen weitere Untersuchungen zum Wirkmechanismus der Topoisomerase-Hemmung und zu möglichen Topoisomerase-vermittelten Effekten angeschlossen. Da sich der am B-Ring hydroxylierte Metabolit im zellfreien System nicht wesentlich von der Muttersubstanz unterschied, wurde 3'-HO-DAI nicht in die weiterführenden, zellulären Tests mit einbezogen.

Zur Abschätzung des geeigneten Konzentrationsbereiches für die zellulären Untersuchungen wurde ein mögliches zytotoxisches Potential der oxidativen Daidzein-Metabolite in humanen Kolonkarzinomzellen bestimmt. 6-HO-DAI und 8-HO-DAI zeigten ab einer Konzentration von 100  $\mu$ M antiproliferative und zytotoxische Eigenschaften, während die Muttersubstanz

Daidzein selbst in der höchsten untersuchten Konzentration noch keine Wirkung auf HT29-Zellen ausübte. Dies steht im Einklang mit früheren Untersuchungen, in denen die oxidativen Daidzein-Metabolite im Gegensatz zur Muttersubstanz ebenfalls antiproliferativ auf Kolonkarzinomzellen wirkten (Kim et al., 2005; Lee et al., 2011; Tang et al., 2011). Allerdings ist die Datenlage zur antiproliferativen Wirkung von Daidzein nicht eindeutig und scheint von der untersuchten Zelllinie abhängig zu sein (Choi und Kim, 2008). Die im zellfreien System beobachtete Topoisomerase-Hemmung wie auch die Unterdrückung der EGFR-Aktivität könnten einen Beitrag zu den zytotoxischen und antiproliferativen Eigenschaften der oxidativen Daidzein-Metabolite leisten. Ob eine Topoisomerase-Hemmung durch 6-HO-DAI und 8-HO-DAI auch im zellulären System vorliegt, wurde daher unter Berücksichtigung des zugrundeliegenden Wirkmechanismus in humanen Kolonkarzinomzellen untersucht. Weder Daidzein noch seine oxidativen Metabolite bewirkten eine Stabilisierung der kovalenten Topoisomerase-DNA-Komplexe, was eine Topoisomerase-Giftung dieser Isoflavone ausschließt. Vielmehr konnte nachgewiesen werden, dass 6-HO-DAI als katalytischer Hemmstoff agiert, indem es durch Hemmung der katalytischen Enzymaktivität die Stabilisierung kovalenter Topoisomerase II-DNA-Intermediate durch das Topoisomerase-Gift Doxorubicin unterdrückt. Jedoch wurde nur eine schwache Abnahme der Menge an durch Doxorubicin induzierten ‚*Cleavage-Komplexen*‘ beobachtet, und dies auch nur bei hohen Konzentrationen von 6-HO-DAI. Für 8-HO-DAI wird ebenfalls eine Wirkung als katalytischer Topoisomerase II-Hemmstoff vermutet, was jedoch im Rahmen weiterführender Untersuchungen überprüft werden müsste. Die verringerte Hemmwirkung von 6-HO-DAI in humanen Kolonkarzinomzellen, verglichen mit dem zellfreien System, könnte in einer verminderten Bioverfügbarkeit des Metaboliten begründet sein. So könnten eine limitierte zelluläre Aufnahme, intrazelluläre Entgiftungsprozesse wie Konjugationsreaktionen sowie aktives Ausschleusen aus der Zelle in einer verminderten effektiven Konzentration von 6-HO-DAI in der Zelle resultieren. Daidzein hingegen zeigte in Übereinstimmung mit früheren Ergebnissen weder eine Topoisomerase II-Giftung noch eine katalytische Hemmung der Enzymaktivität (Bandeletti und Osheroff, 2007). Demzufolge scheint eine zweite Hydroxygruppe am A-Ring essentiell für eine Hemmung der Topoisomerasen zu sein, wobei die Anordnung der Hydroxygruppen möglicherweise ausschlaggebend für den Wirkmechanismus der Topoisomerase-Hemmung ist.

Eine Hemmung der katalytischen Topoisomerase II-Aktivität kann Torsionsspannungen in der DNA-Helix hervorrufen, in deren Folge DNA-Schäden entstehen können (Larsen et al., 2003). Daher wurde eine potentielle DNA-strangbrechende Wirkung der oxidativen Daidzein-

Metabolite in humanen Kolonkarzinomzellen untersucht. Während nach einstündiger Inkubation keine DNA-schädigende Wirkung durch Daidzein oder seine oxidativen Metabolite beobachtet werden konnte, zeigte sich nach längeren Inkubationszeiten mit 6-HO-DAI und 8-HO-DAI eine konzentrationsabhängige Zunahme der DNA-Strangbruchrate. Dies könnte darin begründet sein, dass sich die Topoisomerase-vermittelten DNA-Schäden insbesondere während der S-Phase infolge von Torsionsspannungen manifestieren und durch Verlängerung der Inkubationszeit die Menge an Zellen, die die S-Phase durchlaufen, zunimmt (Chen und Beck, 1995; Larsen et al., 2003). Daidzein zeigte, unabhängig von der Inkubationsdauer, keinen Einfluss auf die DNA-Integrität in humanen Kolonkarzinomzellen. Dies steht im Einklang mit früheren Untersuchungen, in denen kein genotoxisches Potential von Daidzein in mehreren Karzinomzelllinien nachgewiesen wurde (Kulling et al., 2002; Pool-Zobel et al., 2000; Schmitt et al., 2003). Dem entgegen stehen Berichte einer schwachen genotoxischen Wirkung des Isoflavons in V79-Zellen und Lymphozyten (Anderson et al., 2003; Di et al., 2004). Diese Diskrepanz könnte auf die unterschiedlichen, verwendeten Bedingungen, insbesondere hinsichtlich des Konzentrationsbereiches und der Verdopplungszeit der eingesetzten Zelllinien, zurückzuführen sein. Für 6-HO-DAI wurde bereits in Mauslymphom-Zellen eine konzentrationsabhängige Induktion von Mikrokernen beschrieben (Schmitt et al., 2003), wobei die genotoxische Wirkung des Metaboliten im gleichen Konzentrationsbereich auftrat wie die DNA-schädigende Wirkung in den humanen Kolonkarzinomzellen. Die DNA-strangbrechende Wirkung durch die Metabolite wurde weiterhin mit der Bildung von  $\gamma$ H2AX-Foci belegt, wobei 8-HO-DAI in beiden Testsystemen die DNA-Integrität bereits in niedrigeren Konzentrationen beeinflusste als 6-HO-DAI. Die Phosphorylierung des Histons H2AX nimmt eine Schlüsselposition in der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen ein, da es Foci ausbildet, an die sich Proteine der DNA-Reparatur und Chromatin-Organisation anlagern können. Da  $\gamma$ H2AX einen sensitiven Biomarker für DNA-Doppelstrangbrüche darstellt (Bonner et al., 2008), legt dies den Schluss nahe, dass die im Comet Assay detektierte DNA-schädigende Wirkung der oxidativen Metabolite auf DNA-Doppelstrangbrüchen beruht.

Zusätzlich konnten nach Behandlung der humanen Kolonkarzinomzellen mit den oxidativen Daidzein-Metaboliten FPG-sensitive Stellen detektiert werden, was eine mögliche oxidative DNA-Schädigung impliziert. Zwar wurde in einer früheren Studie keine oxidative DNA-Schädigung durch 6-HO-DAI in humanen Mammaepithelzellen beobachtet (Murata et al., 2004), jedoch könnte dies auf die unterschiedlichen Versuchsbedingungen, wie die Expositionsdauer und den verwendeten Konzentrationsbereich, zurückzuführen sein. Die

beobachteten FPG-sensitiven Stellen in humanen Kolonkarzinomzellen führen zu der Annahme, dass die Daidzein-Metabolite aufgrund ihrer katecholischen Struktur Redoxcycling und damit oxidativen Stress verursachen. Daher könnten neben der Hemmung der katalytischen Topoisomerase II-Aktivität auch eine Modulation des zellulären Redoxstatus zur DNA-strangbrechenden Wirkung der oxidativen Daidzein-Metabolite beitragen.

Topoisomerase II-Enzyme spielen eine wichtige Rolle während des Zellzyklus. Insbesondere in der S-Phase ist die katalytische Aktivität dieser Enzyme essentiell, um Torsionsspannungen infolge der DNA-Replikation zu verhindern und die Trennung der Tochterchromatiden zu ermöglichen (Kallio und Lahdetie, 1997). Eine verminderte Enzymaktivität führt daher zu einer Verzögerung der S-Phase und mündet schließlich in einen G<sub>2</sub>-Phase-Arrest (Kallio und Lahdetie, 1997; Stewart et al., 1995). Sowohl 6-HO-DAI als auch 8-HO-DAI erhöhten den Anteil der humanen Kolonkarzinomzellen in der S-Phase, was zu den antiproliferativen Eigenschaften der oxidativen Daidzein-Metabolite beitragen könnte. Eine Arretierung von Karzinomzellen in der S-Phase durch 6-HO-DAI konnte bereits in früheren Untersuchungen beobachtet werden (Lee et al., 2011; Lehmann et al., 2005). Die Verzögerung des Zellzyklus in der S-Phase stützt die Annahme, dass die oxidativen Daidzein-Metabolite die katalytische Topoisomerase II-Aktivität hemmen. So könnten die infolge der Topoisomerase-Hemmung entstandenen DNA-Doppelstrangbrüche zur Bildung von  $\gamma$ H2AX-Foci führen, die über einen positiven Feedback-Loop die Kinase ATM aktivieren, wodurch Komponenten der Zellzyklus-Regulation wie der MRN (MRE11-RAD50-NBS1)-Komplex, Chk2, p53 und BRCA1 (*breast cancer 1, early onset*) phosphoryliert werden (Branzei und Foiani, 2005). Die Rekrutierung von BRCA1 und des MRN-Komplexes steht dabei im Zusammenhang mit einer Verzögerung der S-Phase, wodurch die DNA-Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen begünstigt wird (Furuta et al., 2003; Noguchi, 2010). Die Aktivierung der Downstream-Signale nach Induktion der  $\gamma$ H2AX-Foci durch die oxidativen Daidzein-Metabolite sollte jedoch in weiterführenden Untersuchungen verifiziert werden.

Daidzein führte zu einer Zunahme der humanen Kolonkarzinomzellen in der G<sub>2</sub>/M-Phase, während der Anteil der Zellen in der G<sub>1</sub>- und S-Phase abnahm. Die Wirkung von Daidzein auf den Zellzyklus wird in der Literatur kontrovers diskutiert. So wird in einigen Studien von einer Arretierung der Zellen in der G<sub>1</sub>-Phase berichtet (Hedlund et al., 2006; Matsukawa et al., 1997), während das Isoflavon in anderen Zelllinien eine Verzögerung der S-Phase oder einen G<sub>1</sub>- und G<sub>2</sub>/M-Arrest hervorrief (Choi und Kim, 2008; Wang et al., 2002). Einer Arretierung der Zellen in der G<sub>2</sub>/M -Phase liegt zumeist eine durch den G<sub>2</sub>-Kontrollpunkt

erkannte DNA-Schädigung zugrunde (DiPaola, 2002). Da Daidzein in den vorangegangenen Untersuchungen keine DNA-strangbrechende Wirkung erkennen ließ, könnten andere Effekte wie Interferenzen mit dem mitotischen Spindelapparat, den Mikrotubuli oder der Chromosomen-Segregation für die Zunahme der Zellen in der G<sub>2</sub>/M-Phase verantwortlich sein. Zudem wäre denkbar, dass sich die durch Daidzein induzierte Arretierung des Zellzyklus auch in einer antiproliferativen Wirkung widerspiegelt. Aufgrund einer Verdopplungszeit der humanen Kolonkarzinomzellen von 40-60 Stunden ist jedoch anzunehmen, dass eine antiproliferative Wirkung von Daidzein infolge des G<sub>2</sub>/M-Arrests erst nach längeren Inkubationszeiten deutlich wird. Weiterführende Untersuchungen zur Aufklärung der Mechanismen, die zur beobachteten Akkumulation der humanen Kolonkarzinomzellen in der G<sub>2</sub>/M-Phase führen, sind daher notwendig.

Wenn die Bildung von DNA-Schäden die Kapazität der DNA-Reparatur übersteigt, kann neben der Arretierung des Zellzyklus auch die Apoptose eingeleitet werden. Dabei kann die Apoptose-Induktion unter anderem über die Aktivierung von ATM und nachgeschalteten Transkriptionsfaktoren wie p53 erfolgen (Sedelnikova et al., 2003; Su et al., 2003). Insbesondere Zellen, die während der DNA-Replikation gegenüber Topoisomerase II-Hemmstoffen exponiert sind, gehen bevorzugt in die Apoptose (Kurose et al., 2005). So könnten die Topoisomerase-Hemmung sowie die damit verbundene DNA-schädigende Wirkung der oxidativen Daidzein-Metabolite in einer Apoptose-Induktion resultieren. Die Untersuchungen zur Apoptose ergaben ein unterschiedliches Bild für die zwei oxidativen Daidzein-Metabolite. Während 6-HO-DAI eine konzentrationsabhängige Zunahme der Mono- und Oligonukleosomen bewirkte, ließ der an 8-Position hydroxylierte Metabolit kein proapoptotisches Potential erkennen. Die Apoptose-Induktion durch 6-HO-DAI könnte somit neben der Arretierung des Zellzyklus einen wesentlichen Beitrag zur antiproliferativen Wirkung des Daidzein-Metaboliten leisten. Dabei könnten die Topoisomerase II-vermittelten DNA-Doppelstrangbrüche über die Aktivierung von ATM und p53 zur Einleitung apoptotischer Prozesse führen, wobei weitere Untersuchungen notwendig sind, um die Beteiligung dieser Downstream-Signalwege zu bestätigen. Weiterhin könnten neben der Topoisomerase-Hemmung auch weitere zelluläre Mechanismen zu der potenten Fragmentierung der DNA nach 6-HO-DAI-Behandlung beitragen. 8-HO-DAI zeigte hingegen unter den verwendeten Versuchsbedingungen keine Induktion apoptotischer Prozesse. Dies führt zu der Annahme, dass die durch 8-HO-DAI induzierten DNA-Doppelstrangbrüche während der Verzögerung der S-Phase ausreichend repariert werden. Das geringere DNA-schädigende Potential von 6-HO-DAI im Vergleich zu 8-HO-DAI spricht jedoch dafür, dass

neben der DNA-Schädigung weitere Prozesse in die Apoptose-Induktion durch 6-HO-DAI involviert sind.

Die Ergebnisse zur Einleitung der Apoptose werfen weiterhin die Frage auf, ob die mittels Comet Assay detektierten DNA-Strangbrüche im Falle von 6-HO-DAI auf einer bereits beginnenden, apoptotischen DNA-Fragmentierung beruhen. In der Literatur wird die Erfassung apoptotischer DNA-Oligonukleosomen im Comet Assay kritisch betrachtet, da die DNA-Fragmente vermutlich bei der Zellaufarbeitung, insbesondere während der Zelllyse und Elektrophorese, aufgrund ihrer geringen Größe verloren gehen (Collins, 2004; Tice et al., 2000). So konnte für den Apoptose-Induktor Staurosporin trotz DNA-Fragmentation keine erhöhte Schweifintensität in humanen Kolonkarzinomzellen nachgewiesen werden (Roser et al., 2001). Andererseits wird die Erfassung apoptotischer Zellen im Comet Assay in Form sogenannter ‚Ghosts‘ erwogen, die sich durch einen kleinen Kopf und langen Schweif auszeichnen. Die Fragmentierung der DNA in diesen Zellen ist derart fortgeschritten, dass über 90% der DNA im Schweif erfasst wird (Tice et al., 2000). Da nach Behandlung mit 6-HO-DAI weniger als 0,3% aller untersuchten Zellen eine Schweifintensität größer 90% aufwiesen, scheint die Detektion der DNA-Strangbrüche im Comet Assay aufgrund von Apoptose unwahrscheinlich, kann jedoch nicht vollständig ausgeschlossen werden. Auch für Daidzein deutete sich eine pro-apoptotische Wirkung in humanen Kolonkarzinomzellen an, die verglichen zum 6-Hydroxy-Metaboliten deutlich schwächer ausfiel. Die Apoptose-Einleitung durch Daidzein über den intrinsischen Weg wurde bereits in verschiedenen humanen Krebszelllinien beschrieben, wobei neben der Aktivierung von Caspase-3 auch die Interferenz mit Mitgliedern der Bcl-2 Familie eine Rolle spielt (Guo et al., 2004; Su et al., 2003; Tang et al., 2013). Da im Comet Assay nach 24-stündiger Inkubation mit Daidzein keine erhöhte Schweifintensität detektiert werden konnte, bekräftigt dies die Annahme, dass die DNA-Fragmentierung infolge apoptotischer Prozesse nicht in der Einzelzellgelelektrophorese erfasst wird.

Der Anstieg an FPG-sensitiven Stellen nach Behandlung mit den oxidativen Daidzein-Metaboliten bei der Einzelzellgelelektrophorese weist auf eine mögliche oxidative DNA-Schädigung hin, weshalb der Einfluss der Metabolite auf den zellulären Redoxstatus untersucht wurde. Die oxidativen Daidzein-Metabolite bewirkten eine Abnahme des relativen Fluoreszenzsignals im DCF-Assay. Eine Ausnahme bildete 8-HO-DAI in einer Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  mit einem deutlichen Anstieg des Fluoreszenzsignals, was auf die Modulation des zellulären Redox-Gleichgewichtes schließen lässt. Aufgrund der ebenfalls in dieser

Konzentration beobachteten Wasserstoffperoxid-Bildung im Zellkulturmedium liegt nahe, dass die Beeinflussung des zellulären Redoxstatus auf dem Anstieg der Wasserstoffperoxid-Konzentration beruht, da in diesem Testsystem ohne Zusatz von Katalase gearbeitet wurde. Die Abnahme des Fluoreszenzsignals für 6-HO-DAI und 8-HO-DAI im Konzentrationsbereich von 1 - 10  $\mu\text{M}$  könnte durch eine Interferenz der Testsubstanzen mit dem Substrat 2',7'-Dichlorofluorescein-Diacetat hervorgerufen werden, da auch im zellfreien System eine Erniedrigung des Fluoreszenzsignals gegenüber der Lösungsmittelkontrolle beobachtet wurde. Eine mögliche Absorption der Metabolite im Anregungs- bzw. Emissionsbereich des DCF-Substrates kann ausgeschlossen werden, da die Absorptionsmaxima der Metabolite mit 260 nm und 327 nm für 6-HO-DAI bzw. 260 nm und 330 nm für 8-HO-DAI (Daten nicht gezeigt) außerhalb des im DCF-Assay gemessenen Bereiches liegen ( $\lambda_{\text{abs}}=485\text{ nm}$ ;  $\lambda_{\text{em}}=530\text{ nm}$ ). Dies führt zu der Annahme, dass die oxidativen Daidzein-Metabolite mit dem Substrat des DCF-Assays entweder direkt oder indirekt interagieren. Neben einer möglichen direkten chemischen Interaktion und einer damit verbundenen Senkung der zellulären Substratkonzentration ist ein Quenchen des Fluoreszenz-Signals in Betracht zu ziehen, indem die Anregungsenergie auf die oxidativen Daidzein-Metabolite übertragen werden könnte. Folglich kann alleine anhand der Ergebnisse des DCF-Assays keine eindeutige Aussage über eine mögliche Modulation des zellulären Redoxstatus durch die oxidativen Daidzein-Metabolite getroffen werden. Für Daidzein deutete sich eine leichte Beeinflussung des zellulären Redoxstatus zugunsten der Oxidantien in humanen Kolonkarzinomzellen an. In früheren Studien konnte eine Induktion der Katalase-Transkription in Hepatomazellen gezeigt werden, was als zelluläre Antwort auf den durch Daidzein induzierten oxidativen Stress diskutiert wird (Kampkoetter et al., 2008).

Um dennoch Anhaltspunkte für eine mögliche Beeinflussung des zellulären Redoxstatus durch die oxidativen Daidzein-Metabolite zu gewinnen, wurde die Translokation des Transkriptionsfaktors Nrf2 in den Zellkern untersucht. Durch oxidative Einflüsse wie ROS oder RNS, aber auch durch Elektrophile oder den Crosstalk mit anderen Signalwegen wird Nrf2 von dem zytosolischen Ankerprotein Keap1 gelöst und kann in den Zellkern translozieren, wo es durch Bindung an das ARE die Genexpression antioxidativ wirksamer Enzyme induziert (Mitsuishi et al., 2012; Saw und Kong, 2011). Nach 6-HO-DAI-Behandlung von humanen Kolonkarzinomzellen deutete sich lediglich in der höchsten verwendeten Konzentration eine Zunahme des Nrf2-Gehaltes im Kern an, wohingegen 8-HO-DAI einen konzentrationsabhängigen Anstieg des Nrf2-Signals bewirkte. Diese Ergebnisse legen nahe, dass die oxidativen Daidzein-Metabolite aufgrund ihrer Katecholstruktur

Redoxcycling induzieren und durch Modulation des intrazellulären Redoxstatus oxidativen Stress verursachen, der zur Aktivierung des Nrf2-ARE-Signalwegs führt. Diese Beobachtungen stehen im Einklang mit der beobachteten Erhöhung FPG-sensitiver Stellen. Dabei scheint 8-HO-DAI ein stärkeres pro-oxidatives Potential zu besitzen als 6-HO-DAI, was sich sowohl in der potenteren Aktivierung des Nrf2-ARE-Signalweges als auch in den vermehrten FPG-sensitiven-Stellen nach 8-HO-DAI-Exposition widerspiegelt. Ob die Modulation des zellulären Redoxstatus auf einer vermehrten ROS-Bildung oder aber einem Absenken der antioxidativen Abwehr beruht, ist in weiterführenden Untersuchungen zu ermitteln. Im Nrf2-Reportergen Assay konnte lediglich für 6-HO-DAI in einer Konzentration von 1  $\mu$ M eine Aktivierung der Expression ARE-regulierter Gene beobachtet werden. Allerdings ist die Aussagekraft und Vergleichbarkeit der Ergebnisse dieses Testsystems begrenzt, da die oxidativen Daidzein-Metabolite in den verwendeten transient transfizierten CHO-Zellen eine potente Abnahme der Viabilität verursachten. Die erhöhte Zytotoxizität der oxidativen Daidzein-Metabolite in den CHO-Zellen verglichen mit den humanen Kolonkarzinomzellen könnte durch eine unterschiedliche Proteinausstattung der beiden Zelllinien und somit einer veränderten Bioverfügbarkeit oder Sensitivität aufgrund des Fehlens oder der Überexpression bestimmter zellulärer Zielenzyme hervorgerufen werden. Daidzein bewirkte einen geringfügigen Anstieg des Nrf2-Gehaltes im Kern sowie eine konzentrationsabhängige Induktion ARE-regulierter Gene, was die Ergebnisse des DCF-Assays bestätigt. So könnte Daidzein durch Modulation des zellulären Redoxstatus einen leichten Anstieg intrazellulärer ROS hervorrufen, was die Translokation von Nrf2 in den Zellkern und somit die Expression Nrf2-ARE-abhängiger Gene induziert. Diese Ergebnisse stimmen mit früheren Untersuchungen überein, in denen Daidzein sowohl die Modulation des Transkriptionsfaktors Nrf2 als auch die Induktion ARE-regulierter Gene wie der Katalase oder Chinonreduktase bewirkte (Froyen und Steinberg, 2011; Kampkoetter et al., 2008).

Insgesamt ist festzuhalten, dass die eingesetzten oxidativen Daidzein-Metabolite mit einer Reinheit von ca. 95% auch einen geringen Anteil an Verunreinigungen enthalten. Eine mögliche Beteiligung dieser Verunreinigungen an der Modulation der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten molekularen Zielenzyme oder Signalwege kann daher nicht vollständig ausgeschlossen werden.

Der Konzentrationsbereich für die biologischen Untersuchungen zu den oxidativen Daidzein-Metaboliten wurde verhältnismäßig hoch gewählt, was die Frage nach der Relevanz der Ergebnisse für die Situation im Gewebe aufwirft. Es ist jedoch zu berücksichtigen, dass die

oxidativen Daidzein-Metabolite nicht nur endogen gebildet werden, sondern auch exogen über fermentierte Sojaprodukte aufgenommen werden können. So beträgt der Gehalt an 6-HO-DAI und 8-HO-DAI in fermentierten Sojaprodukten bis zu 10 Gew.-% des enthaltenen Daidzein (Esaki et al., 2005; Hirota et al., 2004). Derzeit liegen nur wenige Studien zur Bioverfügbarkeit der oxidativen Daidzein-Metabolite vor. Nach oraler Applikation von 8-HO-DAI wurden in Ratten Plasmakonzentrationen im niedrigen nanomolaren Bereich erreicht, während in den Nieren Konzentrationen von bis zu 39 nmol/g Gewebe resultierten (Esaki et al., 2005). Daher ist fraglich, ob die beobachtete toxische Wirkung der oxidativen Metabolite auch im Gewebe von Bedeutung ist. Weitere Untersuchungen zur Bioverfügbarkeit der oxidativen Daidzein-Metabolite sind daher dringend erforderlich, um Aussagen über die Plasma- und Gewebekonzentrationen zu erlauben, die durch eine an fermentierten Sojaprodukten reiche Ernährung oder durch Isoflavon-Supplementierung erreicht werden können.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass das biologische Wirkprofil von Daidzein durch den oxidativen Metabolismus verändert wird. So resultierte die Bildung der katecholischen Metabolite 6-HO-DAI und 8-HO-DAI in einer Erhöhung des antiproliferativen und genotoxischen Potentials in humanen Kolonkarzinomzellen. Dies könnte, zumindest zum Teil, auf die katalytische Hemmung der Topoisomerase II-Aktivität zurückgeführt werden, die mit einer Verzögerung des Zellzyklus in der S-Phase einhergeht. Weiterhin konnte eine Translokation des Transkriptionsfaktors Nrf2 in den Zellkern beobachtet werden, was zu der Annahme führt, dass die untersuchten Daidzein-Metabolite oxidativen Stress in der Zelle verursachen. Dies wird weiterhin durch die beobachtete oxidative DNA-Basenschädigung durch 6-HO-DAI und 8-HO-DAI bestätigt. Die Ergebnisse legen nahe, dass die Modulation des zellulären Redoxstatus für 8-HO-DAI im Vordergrund steht, während im Falle von 6-HO-DAI vermutlich weitere zelluläre Mechanismen beeinflusst werden, die zur Apoptose-Induktion durch den Metaboliten beitragen. Dementsprechend liefern die vorliegenden Untersuchungen Erkenntnisse zu den zellulären Wirkmechanismen der oxidativen Daidzein-Metabolite und bieten zahlreiche Anknüpfungspunkte für weitere Studien, in denen insbesondere das Downstream-Signalling der in die DNA-Reparatur, Zellzyklus-Regulation und Apoptose-Induktion involvierten Komponenten sowie eine mögliche Beteiligung der EGFR-vermittelten Signalkaskade eingehender betrachtet werden könnten.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein mögliches toxisches Potential der oxidativen Daidzein-Metabolite 6-HO-DAI und 8-HO-DAI im direkten Vergleich zur Muttersubstanz untersucht.

Dabei konnten sowohl zytotoxische als auch genotoxische Eigenschaften der oxidativen Metabolite, möglicherweise basierend auf einer katalytischen Topoisomerase II-Hemmung, nachgewiesen werden. Obwohl die DNA-strangbrechende Wirkung der Metabolite erst in hohen Konzentrationen auftrat, können mögliche adverse Effekte infolge einer Supplementierung mit Isoflavon-Präparaten derzeit nicht ausgeschlossen werden. In weiterführenden Untersuchungen ist daher zu klären, welche Plasma- und Gewebs-Konzentrationen der oxidativen Daidzein-Metabolite nach Aufnahme von fermentierten Sojaprodukten oder Daidzein-reichen NEM erreicht werden können. Da unter anderem Säuglinge über Soja-basierte Anfangsnahrung gegenüber Isoflavonen hoch exponiert sind und gleichzeitig keine vollständig entwickelte Darmflora für den reduktiven Metabolismus der Isoflavone besitzen, könnten hohe Konzentrationen der oxidativen Daidzein-Metaboliten im Plasma oder einzelnen Geweben resultieren. Die Ergebnisse dieser Arbeit betonen somit die Notwendigkeit einer Berücksichtigung im Organismus gebildeter Metabolite in der Risikobewertung der Muttersubstanz.

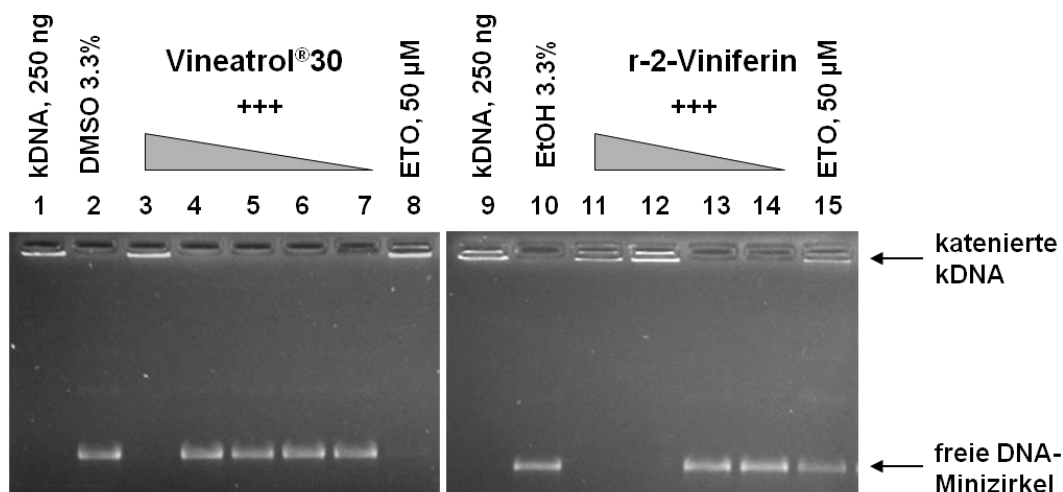
### 4.3. Untersuchungen zur biologischen Aktivität von Vineatrol®30 und darin enthaltenen Resveratrol-Oligomeren

#### 4.3.1. Einfluss auf humane Topoisomerase II

Das Stilben *trans*-Resveratrol wurde in früheren Studien als Topoisomerase-Gift beschrieben (Leone et al., 2012). Da der Weinrebensprösslingextrakt Vineatrol®30 einen hohen Anteil an Resveratrol-Derivaten aufweist (siehe Tabelle 2.3), die möglicherweise additive oder synergistische Wirkungen entfalten, wurde die Bioaktivität des Extraktes auf humane Topoisomerasen untersucht. Die detaillierten Inkubationsbedingungen der durchgeführten Versuche sind in Kapitel 6.2.3 beschrieben.

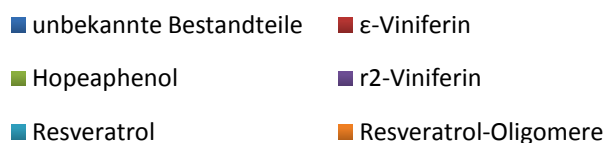
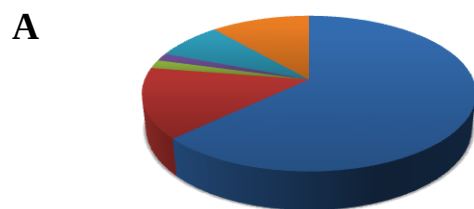
Mittels Dekatenierungsassay wurde der Einfluss von Vineatrol®30 sowie den darin enthaltenen Resveratrol-Oligomeren r2-Viniferin,  $\epsilon$ -Viniferin und Hopeaphenol auf die Enzymaktivität humaner Topoisomerase II $\alpha$  bestimmt (Abbildung 4.32 und 4.34). Katalytisch aktive Topoisomerase II dekateniert die eingesetzte kDNA, wodurch die herausgelösten DNA-Minizirkel bei der Elektrophorese in das Gel wandern können. Der Anteil der migrierenden DNA-Minizirkel nimmt entsprechend der Hemmwirkung eingesetzter Topoisomerase-Hemmstoffe ab.

Repräsentative Gele für die Behandlung von kDNA und Topoisomerase II $\alpha$  mit dem Gesamtextrakt Vineatrol®30 bzw. dem Resveratrol-Tetramer r2-Viniferin sind in Abbildung 4.32 dargestellt.



**Abb. 4.32:** Einfluss des Weinrebensprösslingextraktes Vineatrol®30 und des Resveratrol-Oligomers r-2-Viniferin auf die katalytische Aktivität von Topoisomerase II $\alpha$  im Dekatenierungsassay (M. Dicker, Masterarbeit, Universität Wien, 2012). Ein repräsentatives Gel von drei unabhängigen Experimenten mit ähnlichem Ergebnis ist abgebildet. Lane 1,9: katenierte kDNA (250 ng). Lane 2, 10: kDNA + Topoisomerase II $\alpha$  + jeweilige Lösungsmittelkontrolle. Lane 3-7: kDNA + Topoisomerase II $\alpha$  + Vineatrol®30 in den Konzentrationen 5; 1; 0,1; 0,05; 0,01  $\mu$ g/mL. Lane 8,15: kDNA + Topoisomerase II $\alpha$  + Etoposid (50  $\mu$ M). Lane 11-14: kDNA + Topoisomerase II $\alpha$  + r-2-Viniferin in den Konzentrationen 25; 10; 1; 0,1  $\mu$ M.

Vineatrol®30 zeigte eine potente Hemmung der katalytischen Topoisomerase II $\alpha$ -Aktivität mit einer vollständigen Unterdrückung der Enzymaktivität ab einer Konzentration von 5  $\mu$ g/mL (Lane 3). Hingegen ist für die Vineatrol®30-Konzentrationen 0,01 - 1  $\mu$ g/mL (Lane 4-7) sowie für die Lösungsmittelkontrolle DMSO (Lane 2) keine kDNA in der Geltasche detektierbar, was darauf schließen lässt, dass in diesem Konzentrationsbereich keine Hemmung des Enzyms vorliegt. Die Konzentrationen der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Resveratrol-Oligomere in einer 5  $\mu$ g/mL-Lösung von Vineatrol®30 sind in Abbildung 4.33 aufgeführt.

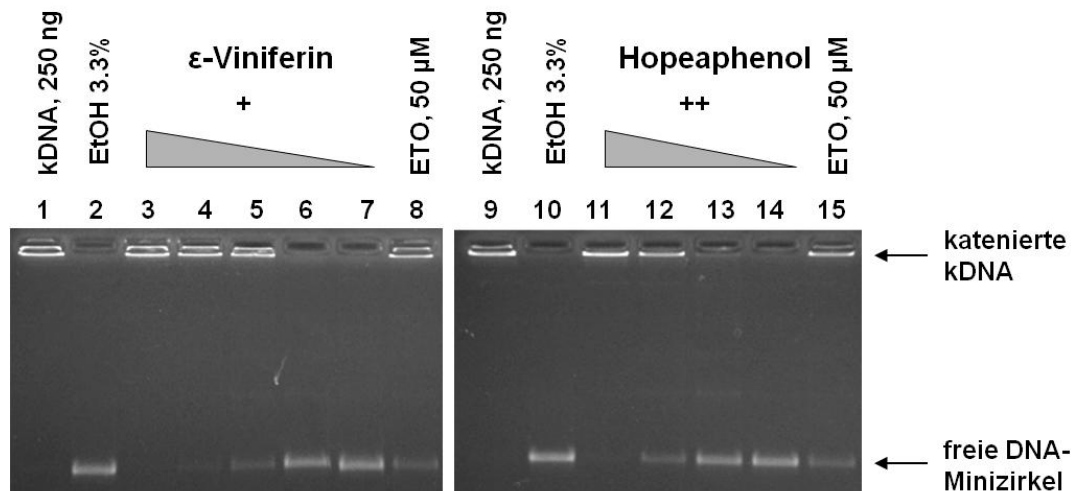


**B**

| 5 $\mu$ g/mL Vineatrol®30 entsprechen folgenden Konzentrationen der Einzelsubstanzen: |                 |             |
|---------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|-------------|
| <b>ε-Viniferin</b>                                                                    | 0,73 $\mu$ g/mL | 1,6 $\mu$ M |
| <b>r-2-Viniferin</b>                                                                  | 0,08 $\mu$ g/mL | 89,9 nM     |
| <b>Hopeaphenol</b>                                                                    | 0,09 $\mu$ g/mL | 99,2 nM     |

**Abb. 4.33:** (A) Prozentualer Anteil der Resveratrol-Derivate im Weinrebensprösslingextrakt Vineatrol®30. (B) Konzentration der Resveratrol-Oligomere ε-Viniferin, r-2-Viniferin und Hopeaphenol in 5  $\mu$ g/mL Vineatrol®30.

Sowohl  $\epsilon$ -Viniferin als auch r2-Viniferin und Hopeaphenol zeigten einen Einfluss auf die katalytische Aktivität von Topoisomerase II $\alpha$ . r2-Viniferin besaß dabei die potenteste Hemmwirkung, indem es die Enzymaktivität bereits ab einer Konzentration von 10  $\mu$ M vollständig unterdrückte (Abbildung 4.32, Lane 12). Allerdings überstieg die effektive Wirkkonzentration des Oligomers die im Extrakt (5  $\mu$ g/mL) enthaltene Konzentration um Faktor 100.



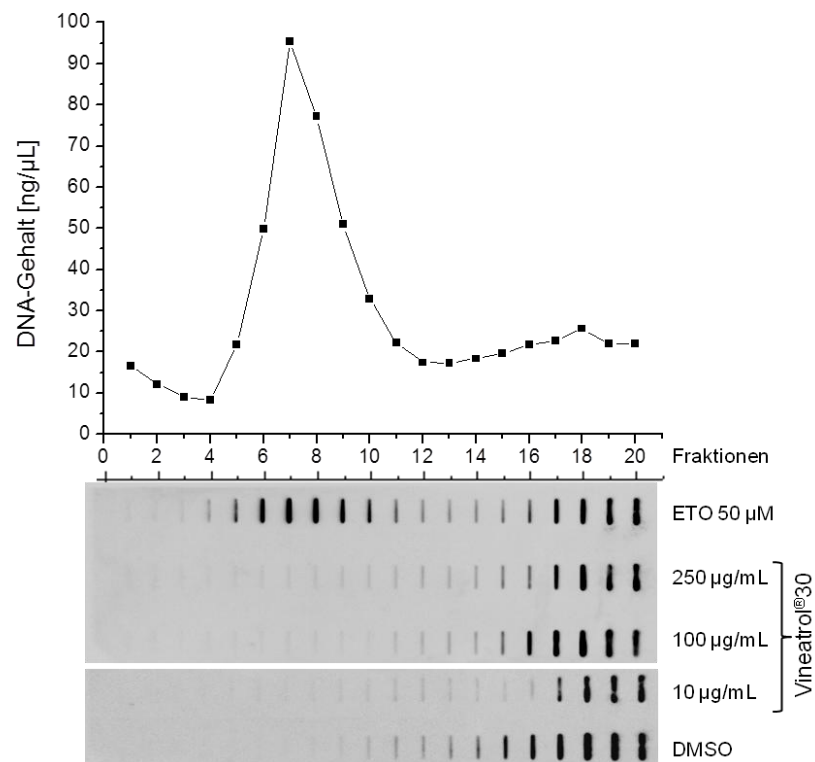
**Abb. 4.34:** Hemmung der katalytischen Aktivität von Topoisomerase II $\alpha$  durch die Resveratrol-Oligomere  $\epsilon$ -Viniferin und Hopeaphenol im Dekatenierungsassay (M. Dicker, Masterarbeit, Universität Wien, 2012). Ein repräsentatives Gel von drei unabhängigen Experimenten mit ähnlichem Ergebnis ist abgebildet. Lane 1,9: katenierte kDNA (250 ng). Lane 2, 10: kDNA + Topoisomerase II $\alpha$  + Lösungsmittelkontrolle EtOH. Lane 3-7: kDNA + Topoisomerase II $\alpha$  +  $\epsilon$ -Viniferin in den Konzentrationen 100; 50; 25; 10; 1  $\mu$ M. Lane 8,15: kDNA + Topoisomerase II $\alpha$  + Etoposid (50  $\mu$ M). Lane 11-14: kDNA + Topoisomerase II $\alpha$  + Hopeaphenol in den Konzentrationen 25; 10; 5; 1  $\mu$ M. ++ moderate Hemmwirkung; + leichte Hemmwirkung.

Hopeaphenol führte bereits ab einer Konzentration von 5  $\mu$ M (Abbildung 4.34, Lane 12) zu einer schwachen Hemmung der katalytischen Aktivität von Topoisomerase II $\alpha$ , wohingegen ab einer Konzentration von 25  $\mu$ M (Lane 11) die Dekatenierung der kDNA vollständig unterdrückt wurde. Dementsprechend war eine um den Faktor 250 höhere Konzentration des Tetramers, als im Extrakt (5  $\mu$ g/mL) vorhanden, notwendig, um die Enzymaktivität vollständig zu hemmen.  $\epsilon$ -Viniferin zeigte von den getesteten Resveratrol-Oligomeren die geringste Hemmwirkung gegenüber Topoisomerase II $\alpha$ . Ab einer Konzentration von 25  $\mu$ M (Lane 5) konnte zwar bereits eine schwache Hemmung der katalytischen Topoisomerase-Aktivität detektiert werden, eine vollständige Unterdrückung der Enzymaktivität wurde jedoch erst ab einer Konzentration von 100  $\mu$ M (Lane 3) erreicht. Dies entspricht einer um etwa Faktor 60 höheren Konzentration der Einzelsubstanz als des in Vineatrol<sup>®</sup>30 enthaltenen Gehaltes dieses Dimers. Die Lösungsmittelkontrolle Ethanol ließ keinen Einfluss auf die Dekatenierungs-Aktivität von Topoisomerase II $\alpha$  erkennen (Lane 2 und 10), wohingegen das

Topoisomerase II-Gift Etoposid (50  $\mu\text{M}$ ) die katalytische Aktivität des Enzyms hemmte (Lane 8 und 15).

Da der Weinrebensprösslingextrakt Vineatrol®30 eine potente Hemmung der katalytischen Topoisomerase-Aktivität im zellfreien System zeigte, wurde in der Folge der Wirkmechanismus der Topoisomerase-Hemmung in humanen, epidermoiden Karzinomzellen mithilfe des ICE-Bioassays näher untersucht. Durch Zentrifugation im Dichtegradienten erfolgt eine Auftrennung von freier und kovalent an die DNA gebundener Topoisomerase. Dementsprechend erlaubt die Methode die selektive Detektion durch Topoisomerase-Gifte stabilisierter, kovalenter Enzym-DNA-Intermediate, was eine Unterscheidung zu katalytischen Hemmstoffen erlaubt.

Der Weinrebensprösslingextrakt verursachte bis zu einer Konzentration von 250  $\mu\text{M}$  keine messbare Stabilisierung kovalenter Topoisomerase I-DNA-Intermediate in A431-Zellen (Daten nicht gezeigt) und wirkte demnach nicht als Topoisomerase I-Gift. Abbildung 4.35 zeigt die Ergebnisse des ICE-Bioassay nach Detektion von Topoisomerase II $\alpha$ .

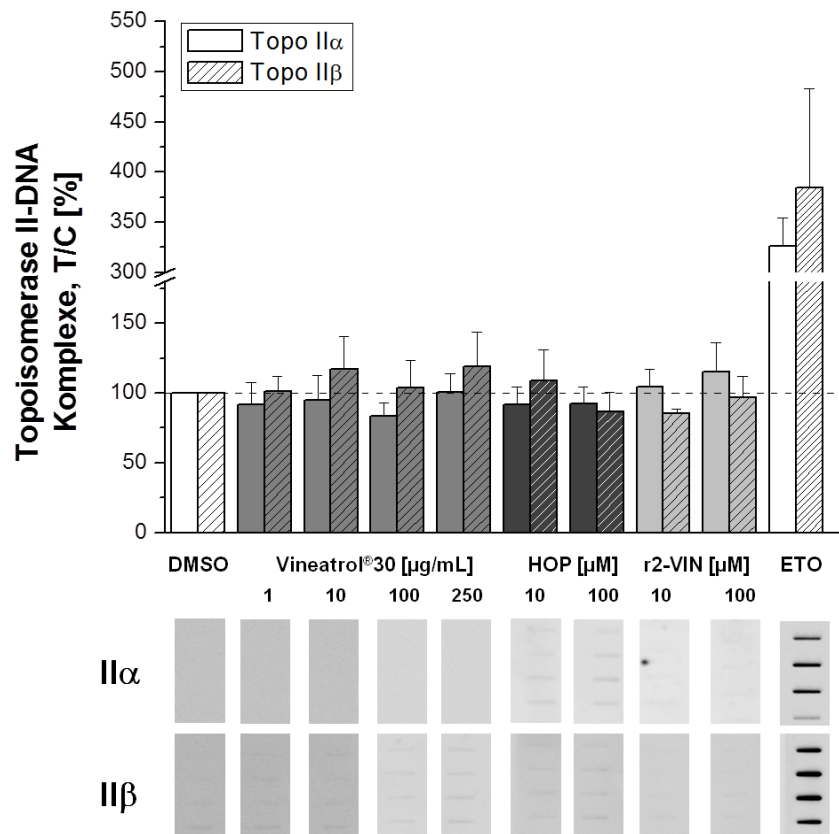


**Abb. 4.35:** Stabilisierung von Topoisomerase II $\alpha$ -DNA-Komplexen durch Vineatrol®30 in A431-Zellen (ICE-Bioassay). Freies Enzym wurde von DNA-gebundener Topoisomerase II $\alpha$  mittels Ultrazentrifugation im Dichtegradienten getrennt und repräsentative Membranen des SlotBlots sind nach Immunodetektion von Topoisomerase II $\alpha$  abgebildet. Etoposid (50  $\mu\text{M}$ ) wurde als Positivkontrolle eingesetzt. Der DNA-Gehalt [ng/μL] der einzelnen Fraktionen ist exemplarisch für die Positivkontrolle Etoposid gezeigt.

Nach Zentrifugation im Dichtegradienten wurde der DNA-Gehalt der einzelnen Fraktionen mithilfe des Nanodrop2000 Spektrophotometers ermittelt und ist in Abbildung 4.35 exemplarisch für die Positivkontrolle Etoposid dargestellt. Das Maximum in den Fraktionen hoher Dichte (Fraktion 6-9) kennzeichnet dabei die DNA-haltigen Fraktionen. Nach einstündiger Inkubation mit Vineatrol<sup>®</sup>30 konnte bis zu einer Konzentration von 250 µg/mL keine Zunahme des Topoisomerase II $\alpha$ -Signals in den DNA-haltigen Fraktionen im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle beobachtet werden. Vineatrol<sup>®</sup>30 führte demnach nicht zu einer Stabilisierung kovalenter Topoisomerase II $\alpha$ -DNA-Komplexe in A431-Zellen. Hingegen war bei der Positivkontrolle Etoposid (50 µM) ein deutliches Proteinsignal in den DNA-haltigen Fraktionen (6-9) erkennbar.

Da die Resveratrol-Tetramere Hopeaphenol und r2-Viniferin im zellfreien System eine potente Inhibierung der katalytischen Aktivität von Topoisomerase II $\alpha$  hervorriefen, wurde mittels ICE-Bioassay eine mögliche zelluläre Wirkung der Testsubstanzen auf das Enzym sowie der zugrundeliegende Wirkmechanismus der Topoisomerase-Hemmung untersucht. Aufgrund limitierter Verfügbarkeit der Resveratrol-Oligomere wurden exemplarisch die Konzentrationen 10 und 100 µM gewählt, da im zellfreien System erst ab Konzentrationen  $\geq 10$  µM die Topoisomerase II-Aktivität durch die Tetramere gehemmt wurde.

Abbildung 4.36 zeigt die Ergebnisse der Semiquantifizierung des Gehaltes an kovalenten Topoisomerase II-DNA-Intermediaten nach einstündiger Inkubation mit den Resveratrol-Tetrameren im Vergleich zum Gesamtextrakt.



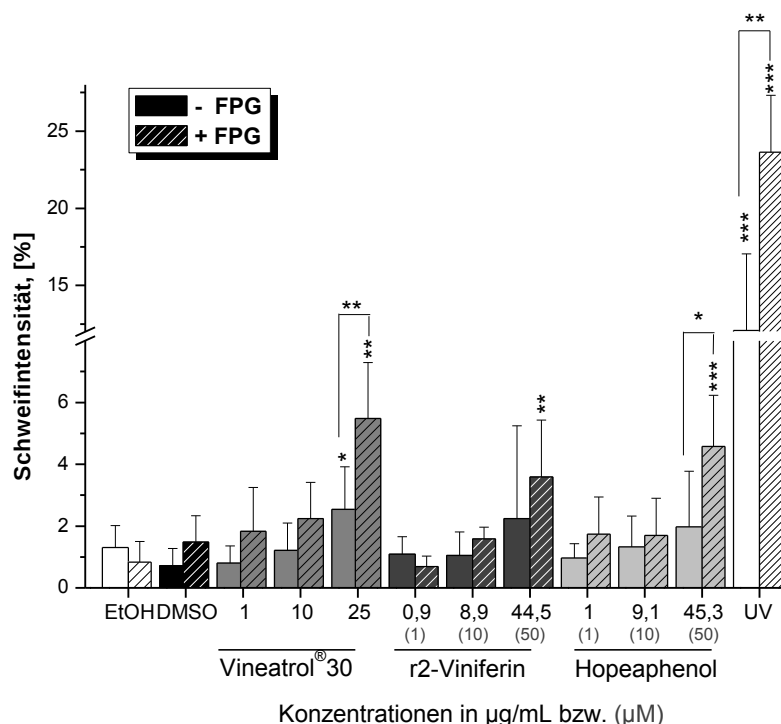
**Abb. 4.36:** Wirkung von Hopeaphenol und r2-Viniferin im Vergleich zum Gesamtextrakt Vineatrol®30 auf Topoisomerase II in humanen, epidermoiden Karzinomzellen (A431). Eine potentielle Stabilisierung von Topoisomerase II-DNA-Komplexen durch die Oligostilbene bzw. den stilbenreichen Extrakt wurde mittels ICE-Bioassay nach einstündiger Behandlung von A431-Zellen untersucht. Abgebildet sind die nach Semiquantifizierung (Integration der Lumineszenz-Intensität der SlotBlot-Banden) ermittelten arithmetischen Mittelwerte  $\pm$  SD aus drei unabhängigen Versuchen nach Normalisierung auf den DNA-Gehalt. Repräsentative Membranausschnitte der DNA-haltigen Fraktionen sind für beide Topoisomerase II-Isoformen gezeigt.

Die Semiquantifizierung der Ergebnisse des ICE-Bioassays bestätigte die bereits den Blotbildern zu entnehmende Beobachtung, dass Vineatrol®30 die Anzahl an kovalenten Enzym-DNA-Intermediaten gegenüber der Lösungsmittelkontrolle DMSO nicht signifikant erhöhte. Auch nach einstündiger Inkubation von A431-Zellen mit den Resveratrol-Oligomeren konnte keine Stabilisierung der kovalenten Topoisomerase II-DNA-Komplexe beobachtet werden. Dabei induzierten die Resveratrol-Oligomere weder signifikante Unterschiede zur Lösungsmittelkontrolle noch ließen sie eine Präferenz zu einer Topoisomerase-Isoform erkennen. Hingegen war die Anzahl an kovalenten Topoisomerase II-DNA-Intermediaten nach einstündiger Behandlung der A431-Zellen mit dem Topoisomerase-Gift Etoposid (50 µM) erwartungsgemäß deutlich erhöht.

#### 4.3.2. Einfluss auf die DNA-Integrität

Indem Topoisomerasen die Topologie der DNA-Doppelhelix regulieren, leisten sie einen wesentlichen Beitrag zur DNA-Integrität. Eine Hemmung ihrer Funktion könnte folglich zu hohen Torsionsspannungen und in deren Folge letztlich zu DNA-Strangbrüchen führen. Deshalb wurden die DNA-strangbrechenden Eigenschaften von Vineatrol®<sup>30</sup> mittels alkalischem Comet Assay (siehe Kapitel 4.1.2, 4.2.5) in humanen, epidermoiden Karzinomzellen untersucht. Die Resveratrol-Tetramere, die sich im Dekatenierungsassay als potente Topoisomerase-Hemmstoffe erwiesen hatten, wurden ebenfalls auf ihre möglicherweise DNA-schädigenden Eigenschaften in A431-Zellen untersucht, um einen möglichen Beitrag dieser Resveratrol-Derivate zur beobachteten Wirkung des Gesamtextraktes zu erkennen.

In Abbildung 4.37 sind die Ergebnisse des Comet Assays unter alkalischen Bedingungen nach einstündiger Behandlung von A431-Zellen mit dem Extrakt Vineatrol®<sup>30</sup> im Vergleich zu den Einzelsubstanzen r2-Viniferin und Hopeaphenol dargestellt.



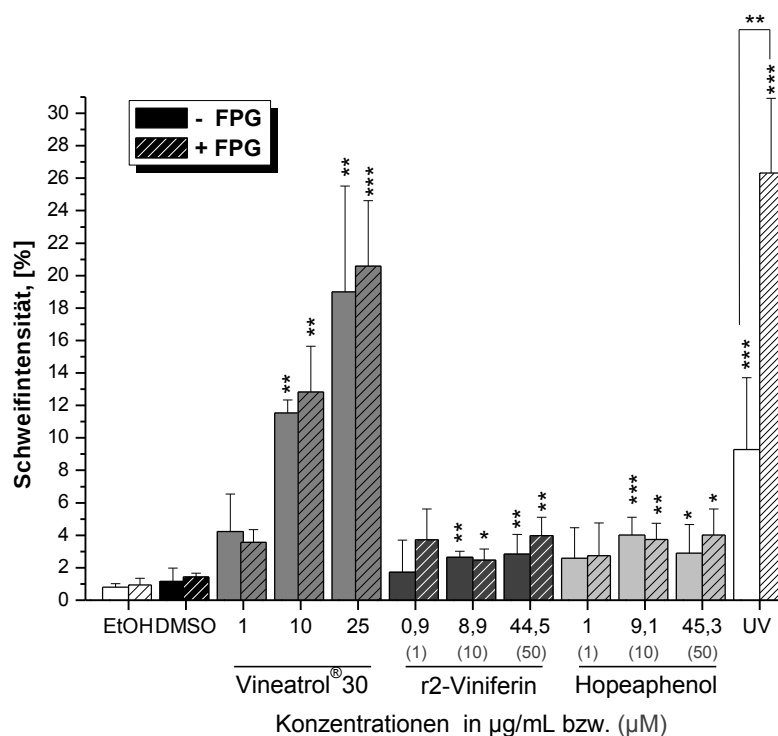
**Abb. 4.37:** Einfluss von Vineatrol®30 und darin enthaltenen Resveratrol-Oligomeren auf die DNA-Integrität von A431-Zellen. Die DNA-Strangbruchrate wurde mittels Einzelzellgelelektrophorese (Comet Assay) unter alkalischen Bedingungen nach einstündiger Inkubation bestimmt. Durch Behandlung mit Formamidopyrimidin-DNA-Glykosylase (FPG) wurden zusätzlich oxidativ modifizierte DNA-Basen erfasst. Bestrahlung mit UV-Licht (312 nm; 2 min) wurde als Positivkontrolle eingesetzt. Die arithmetischen Mittelwerte  $\pm$  SD der ermittelten Schweifintensitäten (%) als Maß für die DNA-Schädigung aus mind. drei unabhängigen Inkubationen sind dargestellt. Die angegebenen Signifikanzen beziehen sich auf die jeweilige Lösungsmittelkontrolle oder kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen FPG-behandelten und unbehandelten Proben. Die Signifikanzniveaus wurden mittels Student's *t*-Test berechnet (\*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$ ).

Der Weinrebensprösslingextrakt Vineatrol®30 zeigte eine leichte, dennoch signifikante, Erhöhung der Schweifintensität auf  $2,5 \pm 1,3\%$  in der höchsten getesteten Konzentration von 25  $\mu\text{g/mL}$ , was auf eine erhöhte DNA-Strangbruchrate durch den Extrakt schließen lässt. Hingegen ließen die Resveratrol-Oligomere nach einstündiger Inkubation keinen Anstieg der Schweifintensität in A431-Zellen erkennen. Nach Bestrahlung mit UV-Licht stieg die Schweifintensität signifikant gegenüber der Lösungsmittelkontrolle auf  $12 \pm 4,9\%$  an, was vermutlich auf eine direkte DNA-Schädigung durch die energiereiche Strahlung zurückzuführen ist (Kielbassa et al., 1997).

Eine zusätzliche Behandlung mit dem DNA-Reparaturenzym FPG führte zu einem signifikanten Anstieg der DNA-Strangbruchrate nach Exposition der A431-Zellen gegenüber der höchsten getesteten Konzentration von Extrakt bzw. Oligomeren. Dabei wurde für Vineatrol®30 (25  $\mu\text{g/mL}$ ) eine Schweifintensität von  $5,5 \pm 1,8\%$  ermittelt, während nach Behandlung mit r2-Viniferin (50  $\mu\text{M}$ ) und Hopeaphenol (50  $\mu\text{M}$ ) Werte von  $3,6 \pm 1,8\%$  bzw.

4,6 ± 1,7% resultierten. Die DNA-schädigenden Konzentrationen der Tetramere (50 µM) überstiegen dementsprechend die im Extrakt (25 µg/mL) enthaltene Konzentration um jeweils Faktor 100. Die ermittelten Schweifintensitäten nach FPG-Behandlung unterschieden sich gegenüber den unbehandelten Proben im Falle von Vineatrol®30 und Hopeaphenol signifikant. Ebenso konnte für die Positivkontrolle (UV-B; 312 nm; 2 min) ein signifikanter Unterschied zwischen FPG-behandelter und –unbehandelter Probe festgestellt werden, da UV-B Bestrahlung neben direkten DNA-Schäden auch zu einer Erhöhung des 8-Oxo-Guanin-Level führt (Watanabe et al., 2006).

Die Expositionsdauer wurde nachfolgend auf 24 h verlängert, um einen möglichen Zeitverlauf der DNA-schädigenden Wirkung des Extraktes zu erfassen (Abbildung 4.38).



**Abb. 4.38:** DNA-schädigende Wirkung des Weinrebspfropflingextraktes Vineatrol®30 sowie der darin enthaltenen Resveratrol-Tetramere r2-Viniferin und Hopeaphenol. Die DNA-strangbrechende Wirkung wurde nach 24-stündiger Inkubation von A431-Zellen mittels Comet Assay unter alkalischen Bedingungen bestimmt. Eine etwaige oxidative Modifizierung der DNA-Basen wurde durch Behandlung mit Formamidopyrimidin-DNA-Glykosylase (FPG) detektiert. Als Positivkontrolle wurden die Zellen für 2 min mit UV-Licht (312 nm) bestrahlt. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte ± SD von mind. drei unabhängigen Inkubationen. Die angegebenen Signifikanzen beziehen sich auf die jeweilige Lösungsmittelkontrolle oder kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen FPG-behandelten und unbehandelten Proben. Die Signifikanzniveaus wurden mittels Student's *t*-Test ermittelt (\*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$ ).

Nach 24-stündiger Inkubation von A431-Zellen mit Vineatrol®30 zeigte sich eine konzentrationsabhängige Zunahme der DNA-Strangbruchrate. Ab einer Konzentration von 10 µg/mL Vineatrol®30 war die Schweifintensität gegenüber der Lösungsmittelkontrolle

DMSO signifikant erhöht und erreichte bei einer Konzentration von 25 µg/mL eine Schweifintensität von  $19 \pm 6,5\%$ . Auch für die Resveratrol-Oligomere ließ sich ab einer Konzentration von 10 µM eine signifikante Erhöhung der DNA-schädigenden Wirkung auf 2,7 - 4% erkennen, wobei eine Konzentrationserhöhung keinen weiteren Anstieg der DNA-Strangbruchrate bewirkte. Im Vergleich zu Vineatrol®30 resultierte die Behandlung von A431-Zellen mit den Resveratrol-Oligomeren in deutlich niedrigeren Schweifintensitäten, was eine geringere DNA-schädigende Wirkung durch r2-Viniferin und Hopeaphenol im Vergleich zum Gesamtextrakt impliziert. Darüber hinaus übersteigen die Konzentrationen der Tetramere (10 µM) mit DNA-schädigender Wirkung die im Extrakt (10 µg/mL) vorhandenen Konzentrationen um den Faktor 50. Mittels FPG-Behandlung konnten keine zusätzlichen oxidativen DNA-Schäden nach 24-stündiger Exposition von A431-Zellen gegenüber Vineatrol®30 bzw. den Resveratrol-Oligomeren r2-Viniferin und Hopeaphenol detektiert werden. Hingegen stieg die Schweifintensität nach FPG-Behandlung für die Positivkontrolle, die 2 min mit UV-B-Licht bestrahlt worden war, im Vergleich zur unbehandelten Probe signifikant an.

Während nach Inkubation von A431-Zellen mit den Resveratrol-Oligomeren unabhängig von der Inkubationsdauer keine Abnahme der Viabilität unter 80% zu beobachten war, sank die Zahl der vitalen Zellen nach 24-stündiger Exposition gegenüber 25 µg/mL Vineatrol®30 auf 73% (Daten nicht gezeigt). Dementsprechend kann nicht ausgeschlossen werden, dass der Anstieg der Schweifintensität nach 24 h in dieser Vineatrol®30-Konzentration durch zytotoxische Effekte hervorgerufen wird und kann daher nicht eindeutig auf eine genotoxische Wirkung der Substanz zurückgeführt werden. Im Konzentrationsbereich von 1-10 µg/mL Vineatrol®30 konnte ebenso wie nach einstündiger Inkubation mit dem Extrakt eine Viabilität von  $\geq 80\%$  verzeichnet werden.

#### 4.3.3. Tabellarischer Überblick über die Ergebnisse

Die Ergebnisse aller Untersuchungen zu dem Pflanzenextrakt Vineatrol®30 und darin enthaltenen Resveratrol-Oligomeren sind in Tabelle 4.3 dargestellt.

**Tabelle 4.3:** Tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse. <sup>a</sup> bis zu einer Konzentration von 250 µg/mL; <sup>b</sup> bis zu einer Konzentration von 100 µM; n.b.: nicht bestimmt; FPG-s. Stellen: FPG-sensitive Stellen.

|                                                  |             | Vineatrol®30                     | r2-Viniferin                   | Hopeaphenol                    | ε-Viniferin  |
|--------------------------------------------------|-------------|----------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------|
| <b>Topo II-Hemmung (zellfrei)</b>                |             | ≥ 5 µg/mL                        | ≥ 8,9 µg/mL                    | ≥ 9,1 µg/mL                    | ≥ 11,4 µg/mL |
| <b>Humane, epidermoide Karzinomzellen (A431)</b> |             |                                  |                                |                                |              |
| <b>Topo II-Giftung</b>                           |             | – <sup>a</sup>                   | – <sup>b</sup>                 | – <sup>b</sup>                 | n. b.        |
| <b>DNA-Integrität</b>                            | <b>1 h</b>  | 25 µg/mL,<br>+<br>FPG-s. Stellen | FPG-s. Stellen<br>(44,5 µg/mL) | FPG-s. Stellen<br>(45,3 µg/mL) | n. b.        |
|                                                  | <b>24 h</b> | ≥ 10 µg/mL                       | ≥ 8,9 µg/mL                    | ≥ 9,1 µg/mL                    | n. b.        |

#### 4.3.4. Diskussion der Ergebnisse zu Vineatrol®30 und den darin enthaltenen Resveratrol-Oligomeren

In der Vergangenheit wurde Resveratrol vielfach im Zusammenhang mit gesundheitsfördernden Eigenschaften diskutiert (Aggarwal et al., 2004; Bishayee, 2009; Kundu und Surh, 2008). Eine Reihe von Studien beschäftigte sich dabei eingehend mit der Aufklärung der zugrundeliegenden zellulären Wirkmechanismen (Baur und Sinclair, 2006; Delmas et al., 2011; Smoliga et al., 2011). In jüngsten Untersuchungen wurden auch potentiell adverse Effekte des Stilbens nachgewiesen. So konnte gezeigt werden, dass Resveratrol in humanen Gliomazellen als Topoisomerase II-Gift wirkt und Topoisomerase-vermittelt DNA-Schäden induziert (Leone et al., 2012). Da der Weinrebensprösslingextrakt Vineatrol®30 einen hohen Anteil an Resveratrol-Derivaten aufweist (siehe Tabelle 2.3), wurde im Rahmen dieser Arbeit der Frage nachgegangen, ob Vineatrol®30 ebenfalls über eine mögliche Topoisomerase-Hemmung DNA-Strangbrüche induziert.

Der Weinrebensprösslingextrakt hemmte bereits ab einer Konzentration von 5 µg/mL die katalytische Aktivität von Topoisomerase IIα vollständig. Dies steht im Einklang mit Ergebnissen von Untersuchungen eines stilbenreichen Traubenextraktes, welcher ebenfalls ab

einer Konzentration von 5 µg/mL zu einer Hemmung der enzymatischen Aktivität von Topoisomerase II führte (Jo et al., 2005). Es könnte angenommen werden, dass die Hemmwirkung des Extraktes auf dem hohen Resveratrol-Gehalt mit 7,7% beruht. Allerdings wurde für das Stilben erst in deutlich höheren Konzentrationen eine Unterdrückung der katalytischen Aktivität des Enzyms beobachtet. So wurde für Resveratrol ein IC<sub>50</sub>-Wert von 15 µg/mL ermittelt, während eine vollständige Hemmung der katalytischen Topoisomerase II-Aktivität ab einer Konzentration von 27,4 µg/mL erreicht wurde (Jo et al., 2006; Leone et al., 2010). Da in der Wirkkonzentration von 5 µg/mL Vineatrol®30 lediglich 0,4 µg/mL Resveratrol enthalten sind, weist der Extrakt eine deutlich stärkere Hemmwirkung gegenüber Topoisomerase II auf als die Einzelsubstanz. Die stärkere Hemmwirkung von Vineatrol®30 gegenüber Topoisomerase II könnte daher in additiven oder synergistischen Effekten der darin enthaltenen Inhaltsstoffe begründet sein. Die Resveratrol-Oligomere ε-Viniferin, r2-Viniferin und Hopeaphenol wurden unlängst als bioaktive Inhaltsstoffe des Extraktes identifiziert, indem gezeigt wurde, dass diese Resveratrol-Derivate neben Resveratrol maßgeblich zur antiproliferativen Wirkung des Extraktes beitragen (Macke et al., 2012). Dementsprechend könnten diese Resveratrol-Oligomere ebenfalls einen Beitrag hinsichtlich der Topoisomerase-hemmenden Wirkung von Vineatrol®30 leisten. Daher wurden diese Derivate in die Untersuchungen zur Hemmung der katalytischen Aktivität von Topoisomerase IIα mit einbezogen. Sowohl das Resveratrol-Dimer ε-Viniferin als auch die Tetramere r2-Viniferin und Hopeaphenol zeigten eine potente Hemmung der Topoisomerase-Aktivität, wobei die Tetramere eine stärkere Hemmwirkung aufwiesen als das Dimer. Diese Ergebnisse stimmen mit früheren Untersuchungen überein, die zeigen, dass ε-Viniferin eine geringere Bioaktivität als Resveratrol aufweist (Colin et al., 2008; Marel et al., 2008). Obwohl r2-Viniferin unter den getesteten Resveratrol-Oligomeren die potenteste Hemmwirkung auf Topoisomerase IIα zeigte, scheint es nicht ausschließlich für die Topoisomerase-Hemmung von Vineatrol®30 verantwortlich zu sein, da lediglich ein Hundertstel der wirksamen Tetramer-Konzentration im Extrakt enthalten ist. Ebenso liegen die Konzentrationen von Resveratrol, ε-Viniferin und Hopeaphenol im Weinrebensprösslingextrakt deutlich unter den Konzentrationen (Faktor 60-250), bei denen sie als Einzelsubstanzen eine Topoisomerase-Hemmung zeigen. Die Topoisomerase II-Hemmung durch Vineatrol®30 könnte möglicherweise eine Folge von additiven oder synergistischen Effekten von Resveratrol und seinen bioaktiven Resveratrol-Oligomeren sein. Zudem ist in Betracht zu ziehen, dass andere, bislang nicht identifizierte Inhaltsstoffe von Vineatrol®30 zu seinen Topoisomerase-hemmenden Effekten beitragen.

Im Folgenden wurde untersucht, ob die potente Hemmung von Topoisomerase II auch im zellulären System Relevanz besitzt. Als geeignetes Modell wurde hierfür die humane, epidermoide Zelllinie A431 ausgewählt, da diese Zellen eine Überexpression humaner Topoisomerasen aufweisen (Meyer et al., 1997). Der ICE-Bioassay ermöglicht dabei die empfindliche, selektive Detektion von Topoisomerase-Giften, was die Unterscheidung zu katalytischen Hemmstoffen ermöglicht und somit Rückschlüsse auf den Wirkmechanismus der Topoisomerase-Hemmung zulässt. Der Weinrebensprösslingextrakt zeigte bis zu einer Konzentration von 250  $\mu$ M keine Stabilisierung der kovalenten Topoisomerase II-DNA-Intermediate, was nahelegt, dass Vineatrol®30 nicht als Topoisomerase II-Gift agiert. Möglicherweise liegt eine rein katalytische Hemmung des Enzyms durch Vineatrol®30 vor, jedoch kann alleine basierend auf den Ergebnissen des ICE-Bioassays nicht ausgeschlossen werden, dass der Extrakt intrazellulär keinen Einfluss auf humane Topoisomerasen ausübt. So wäre auch denkbar, dass bioaktive Komponenten des Extraktes nicht oder nur bedingt in die Zelle aufgenommen werden. Weiterhin könnte die intrazelluläre Wirkkonzentration der Topoisomerase-hemmenden Inhaltsstoffe durch metabolische Prozesse oder aktive Elimination gegenüber dem zellfreien System verringert sein. Daher müsste in weiterführenden Untersuchungen der Frage nachgegangen werden, ob Vineatrol®30 eine rein katalytische Hemmaktivität gegenüber Topoisomerase II im zellulären System besitzt.

Neben dem Gesamtextrakt wurden auch die Tetramere r2-Viniferin und Hopeaphenol hinsichtlich einer potentiellen Topoisomerase-giftenden Wirkung in humanen, epidermoiden Karzinomzellen (A431) untersucht. Keines der beiden Oligomere erhöhte dabei die Anzahl an kovalenten Topoisomerase II-DNA-Komplexen, wodurch eine Wirkung der Resveratrol-Tetramere als Topoisomerase-Gifte ausgeschlossen werden kann. Dies legt den Schluss nahe, dass r2-Viniferin und Hopeaphenol als rein katalytische Topoisomerase-Hemmstoffe wirken, jedoch muss dies analog zum Gesamtextrakt in weiteren Studien belegt werden. Damit scheinen sich die Resveratrol-Oligomere hinsichtlich ihrer Wirkung auf Topoisomerase II von ihrem Monomer zu unterscheiden, da Resveratrol in humanen Gliomazellen als Topoisomerase II-Gift beschrieben ist (Leone et al., 2012). Resveratrol bindet dabei an die Grenzfläche zwischen DNA und Enzym, indem es mehrere Wasserstoffbrückenbindungen zu Aminosäure-Resten des Proteins sowie zu den Basen und Zuckern der DNA ausbildet (Leone et al., 2012). Möglicherweise können die Resveratrol-Tetramere aus sterischen Gründen oder aufgrund ihrer geometrischen Form nicht entsprechend dem Monomer an die Grenzfläche binden, wodurch die Proteineinheit nicht an der DNA stabilisiert wird. Es muss jedoch in Betracht gezogen werden, dass die Tetramere über Wasserstoffbrücken an das Enzym binden

könnten und dadurch die Anlagerung des Enzyms an die DNA verhindern könnten, was einer katalytischen Hemmung des Enzyms entspräche.

Obwohl Vineatrol<sup>®</sup>30 in der höchsten eingesetzten Konzentration von 250 µg/mL eine vergleichbare Menge an Resveratrol enthält (~19 µg/mL), die in Gliomazellen zu einer Topoisomerase II-Giftung führt (~27 µg/mL) (Leone et al., 2012), konnte durch den Extrakt keine Stabilisierung der Topoisomerase II-DNA-Komplexe beobachtet werden. Dies könnte zum einen darauf zurückzuführen sein, dass die effektive zelluläre Wirkkonzentration bei Extrakt-Inkubation möglicherweise gegenüber der Einzelsubstanz erniedrigt ist. Zum anderen könnten sich die verwendeten Zelllinien hinsichtlich ihrer Sensitivität gegenüber dem Stilben unterscheiden. So sind Untersuchungen zur Topoisomerase-Giftung durch Resveratrol in humanen, epidermoiden Karzinomzellen Gegenstand weiterführender Untersuchungen. Weiterhin ist in Betracht zu ziehen, dass der komplexe Extrakt Vineatrol<sup>®</sup>30 neben dem Topoisomerase-Gift Resveratrol auch eine Reihe weiterer Komponenten enthält, die möglicherweise als rein katalytische Hemmstoffe aktiv sind. Katalytische Topoisomerase-Hemmstoffe können an unterschiedlichen Stellen des katalytischen Zyklus eingreifen (Capranico et al., 1997). So können sie unter anderem die Bindung des Enzyms an die DNA verhindern, indem sie sich entweder an die DNA-Erkennungssequenz des Enzyms anlagern oder direkt an die DNA binden (Larsen et al., 2003). Weiterhin können katalytische Hemmstoffe die ATP-Bindung vor Einführen des DNA-Strangbruchs blockieren oder die kovalente Bindung der Topoisomerase an die DNA beeinträchtigen (Fortune und Osheroff, 1998; Larsen et al., 2003). Da all diese Prozesse dem Einführen eines DNA-Strangbruchs durch die Topoisomerase voran gestellt sind, kann die gleichzeitige Anwesenheit katalytischer Topoisomerase-Hemmstoffe die Wirkung von Topoisomerase-Giften reduzieren (Drake et al., 1989; Fortune und Osheroff, 1998). Dementsprechend konnte für das Anthocyan Delphinidin sowie für anthocyanreiche Extrakte die Suppression der Topoisomerase-giftenden Wirkung von Chemotherapeutika gezeigt werden, indem diese Anthocyane als katalytische Hemmstoffe fungieren (Esselen et al., 2012; Esselen et al., 2009). Folglich könnte angenommen werden, dass die Resveratrol-Oligomere r2-Viniferin und Hopeaphenol als mögliche katalytische Hemmstoffe die Topoisomerase-Giftung durch Resveratrol im Weinrebensprosslingextrakt unterdrücken, was die gegensätzliche Wirkung des Extraktes hinsichtlich Resveratrol erklären würde. Um diese Möglichkeiten zu überprüfen, wären jedoch weitere Studien nötig, in deren Rahmen die Resveratrol-Giftung unter den verwendeten Bedingungen bestätigt sowie eine mögliche katalytische Topoisomerase-Hemmung durch die Oligomere untersucht werden könnte. Anschließend könnte durch

kombinierte Inkubation von Monomer und Oligomeren eine Unterdrückung der Resveratrol-induzierten Topoisomerase-Giftung durch die Oligomere bestimmt werden.

Katalytische Topoisomerase-Hemmstoffe sind in der Lage, DNA-Schäden zu induzieren, jedoch ist ihr DNA-strangbrechendes Potential geringer als das von Topoisomerase-Giften (Larsen et al., 2003). So konnte nach Exposition von Tumorzellen gegenüber katalytischen Hemmstoffen wie Aclarubicin, Merbaron und Delphinidin eine signifikante Erhöhung der DNA-Strangbruchrate beobachtet werden (Esselen et al., 2009; Larsen et al., 2003). Die DNA-schädigende Wirkung der katalytischen Topoisomerase-Hemmstoffe tritt dabei vermutlich während der S-Phase auf, da zur Relaxierung der durch die voranschreitende Replikationsgabel auftretende Superspiralisierung katalytisch aktive Topoisomerase notwendig ist (Chen und Beck, 1995; Larsen et al., 2003). Der Weinrebensprösslingextrakt zeigte bereits nach einstündiger Behandlung von A431-Zellen eine schwache DNA-strangbrechende Wirkung, während nach 24-stündiger Inkubation ein konzentrationsabhängiger Anstieg der DNA-Schädigung zu beobachten war. Dies könnte darauf zurückgeführt werden, dass während der Kurzzeitinkubation, im Gegensatz zur 24-stündigen Inkubation, nur wenige Zellen die S-Phase durchlaufen, in der sich die Topoisomerase-Hemmung in DNA-Strangbrüchen manifestiert. Für das Stilben Resveratrol wurde ebenfalls ein Einfluss auf die DNA-Integrität gezeigt, indem es Topoisomerase-vermittelt das Fortschreiten der S-Phase verzögert, was mit der Generierung von DNA-Doppelstrangbrüchen einhergeht (Leone et al., 2010). Jedoch sind die Konzentrationen, bei denen eine DNA-schädigende Wirkung von Resveratrol auftritt, deutlich höher als sie im Extrakt vorliegen. Infolgedessen kann angenommen werden, dass das Polyphenol einen Beitrag zur DNA-strangbrechenden Wirkung von Vineatrol®<sup>30</sup> leistet, aber nicht ausschließlich dafür verantwortlich ist. Die Untersuchung der Resveratrol-Oligomere r2-Viniferin und Hopeaphenol zeigte, dass die Tetramere nach 24-stündiger Inkubation DNA-Strangbrüche induzieren. Mit steigender Konzentration nahm die DNA-schädigende Wirkung allerdings nicht wesentlich zu, sondern resultierte in einem Plateau. Während die beiden Tetramere einen vergleichbaren Einfluss auf die DNA-Integrität ausübten, wies der Extrakt im direkten Vergleich eine deutlich stärkere DNA-strangbrechende Wirkung auf. Dies deutet darauf hin, dass die genotoxische Wirkung von Vineatrol®<sup>30</sup> auf entweder additiven oder synergistischen Effekten seiner Inhaltsstoffe oder weiteren bislang, nicht identifizierten Komponenten beruht. Weiterhin muss in Betracht gezogen werden, dass die nach 24-stündiger Inkubation mit dem Extrakt bzw. den Resveratrol-Tetrameren detektierten DNA-Strangbrüche auf einer beginnenden DNA-Fragmentierung durch apoptotische Prozesse

beruhen können. So konnte in vorangegangenen Studien gezeigt werden, dass Vineatrol®30 nach 48-stündiger Inkubation in A431-Zellen Apoptose induziert (Nevo-Koch, 2010). Da die Aktivierung der Effektorcaspasen 3 und 7 als späte Apoptose-Signale (Porter und Janicke, 1999) erst in einer Konzentration von 23 µg/mL nach 48-stündiger Inkubation mit Vineatrol®30 zu beobachten war (Nevo-Koch, 2010), während die DNA-schädigende Wirkung nach 24 h bereits ab einer Konzentration von 10 µg/mL einsetzte, bestätigt dies die Annahme, dass DNA-Schäden vor der Apoptose-Induktion auftreten. So könnte eine katalytische Hemmung der Topoisomerase II insbesondere während der S-Phase zu Torsionsspannungen und dadurch zu DNA-Strangbrüchen führen. Infolgedessen könnten die Zellen in der S-Phase arretiert werden (Kallio und Lahdetie, 1997), wodurch die Einleitung apoptotischer Prozesse aufgrund einer Akkumulation von DNA-Schäden mit zugleich unzureichender DNA-Reparatur resultieren könnte. Sowohl der Zellzyklus-Arrest als auch die Apoptose-Induktion könnten dabei zur antiproliferativen Wirkung des Extraktes bzw. der Resveratrol-Tetramere beitragen.

Zusätzlich zur DNA-strangbrechenden Wirkung konnten nach einstündiger Vineatrol®30-Behandlung FPG-sensitive Stellen in A431-Zellen detektiert werden. Von dem DNA-Reparaturenzym FPG werden hauptsächlich durch Oxidation entstandene Basenmodifikationen erkannt, aber auch alkylierte Formamidopyrimidine, die sich aus DNA-Addukten ableiten (Boiteux et al., 1992; Collins et al., 1996). Da auch die Behandlung von humanen, epidermoiden Karzinomzellen mit r2-Viniferin und Hopeaphenol eine signifikante Erhöhung der FPG-sensitiven Stellen verursachte, könnte angenommen werden, dass die Resveratrol-Tetramere zu den oxidativen DNA-Basenläsionen von Vineatrol®30 beitragen. Die Detektion FPG-sensitiver Stellen war insofern überraschend, da sowohl Vineatrol®30 als auch r2-Viniferin als Antioxidantien beschrieben sind (Jang et al., 2007; Mueller et al., 2009; Romain et al., 2012). Obwohl auch für Resveratrol eine antioxidative Wirkung nachgewiesen wurde (Kundu und Surh, 2008; Marques et al., 2009), zeigen einige Studien eine pro-oxidative Wirkung des Stilbens (Hadi et al., 2010; Heiss et al., 2007; Zheng et al., 2006). So wurde die Wirkung von Resveratrol auf das intrazelluläre Gleichgewicht zwischen Pro- und Antioxidantien als abhängig vom Zelltyp, der Enzymausstattung der jeweiligen Zelllinie sowie der Gegenwart von Kupfer-Ionen diskutiert (Leone et al., 2012). Daher könnte in Betracht gezogen werden, dass in der verwendeten humanen, epidermoiden Krebszelllinie A431 die Resveratrol-Tetramere neben weiteren Verbindungen im Extrakt pro-oxidativ wirken und dadurch eine Erhöhung FPG-sensitiver Stellen bewirken (Mueller et al., 2009). Die Ergebnisse des Comet Assays legen nahe, dass nach einstündiger Behandlung von

humanen, epidermoiden Karzinomzellen mit Vineatrol®30 bzw. den darin enthaltenen Tetrameren r2-Viniferin und Hopeaphenol oxidative DNA-Basenmodifikationen dominieren. Hingegen zeigt eine 24-stündige Exposition der A431-Zellen gegenüber r2-Viniferin, Hopeaphenol und Vineatrol®30 keine signifikante Erhöhung der FPG-sensitiven Stellen. Demzufolge könnte nach 24 h die Topoisomerase-Hemmung von r2-Viniferin und Hopeaphenol maßgeblich zur DNA-schädigenden Wirkung von Vineatrol®30 beitragen.

Sowohl Resveratrol als auch der Weinrebensprösslingextrakt zeigen eine antiproliferative Wirkung in verschiedenen Krebszelllinien (Macke et al., 2012; Marel et al., 2008; Schmitt et al., 2002), wobei die Ergebnisse hinsichtlich der Hemmeffizienz nicht eindeutig sind. So entsprach in einer Studie die Wirkung des Extraktes der des darin enthaltenen Resveratrols (Marel et al., 2008), während in weiteren Studien von einer deutlich stärkeren Hemmwirkung des Extraktes im Vergleich zu Resveratrol berichtet wurde (Billard et al., 2002; Colin et al., 2008). Die stärkere Wachstumshemmung durch Vineatrol®30 könnte auf die im Extrakt enthaltenen Resveratrol-Oligomere zurückgeführt werden, die ebenfalls antiproliferativ wirksam sind (Nevo-Koch, 2010). Dabei zeigten die Resveratrol-Tetramere r2-Viniferin und Hopeaphenol mit einem IC<sub>50</sub>-Wert von 4,5 µM bzw. 5,3 µM eine deutlich potentere Wachstumshemmung in A431-Zellen als das Dimer ε-Viniferin mit einem IC<sub>50</sub>-Wert von 60 µM (Nevo-Koch, 2010). Diese Beobachtungen korrelieren mit den Ergebnissen der Topoisomerase-Hemmung, da die Tetramere eine deutlich potentere Unterdrückung der katalytischen Aktivität von Topoisomerase IIα bewirkten als das Resveratrol-Dimer. Für Resveratrol konnte gezeigt werden, dass es zur Topoisomerase-vermittelten Arretierung der Zellen in der S-Phase führt (Leone et al., 2010; Marel et al., 2008; Tyagi et al., 2005). Dies lässt den Schluss zu, dass die Topoisomerase-Giftung zu den antiproliferativen Effekten von Resveratrol beiträgt (Cui et al., 2010; Leone et al., 2012; Schmitt et al., 2003; Signorelli und Ghidoni, 2006). Im Falle von Vineatrol®30 könnte die katalytische Hemmung der Topoisomerase II ebenfalls zur Arretierung der Zellen in der S-Phase führen und somit die beobachteten antiproliferativen Wirkung des Extraktes bedingen (Billard et al., 2002; Mueller et al., 2009; Nevo-Koch, 2010; Steinberg, 2011).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass der Weinrebensprösslingextrakt Vineatrol®30 die katalytische Aktivität von Topoisomerase II unterdrückt, wobei es sich vermutlich um eine rein katalytische Hemmung handelt. Die beobachtete Akkumulation von Zellen in der S-Phase könnte ihre Ursache in der Topoisomerase-Hemmung haben, wobei es durch die erhöhten Torsionsspannungen zu DNA-Strangbrüchen kommen könnte. Somit könnte sowohl

die Apoptose-Induktion aufgrund der erhöhten DNA-Strangbruchrate als auch die wachstumshemmende Wirkung von Vineatrol®<sup>30</sup> Topoisomerase-vermittelt sein. Weiterhin wurde die biologische Aktivität der Resveratrol-Tetramere  $\epsilon$ -Viniferin und Hopeaphenol wie auch des Resveratrol-Dimers  $\epsilon$ -Viniferin nachgewiesen. Die Tetramere zeigten dabei eine deutlich potentere Wirkung auf Topoisomerase II als das untersuchte Dimer. Insgesamt ist festzuhalten, dass vermutlich additive oder synergistische Effekte der Resveratrol-Derivate oder weitere, bislang nicht identifizierte Komponenten für die potente Wirkung des Extraktes verantwortlich sind. Weitere Studien sind erforderlich, um die Sicherheit einer Supplementierung mit Vineatrol®<sup>30</sup> in Form von NEM zu belegen und mögliche nachteilige Effekte wie eine DNA-schädigende Wirkung im Menschen auszuschließen.

## 5. Zusammenfassung

Bioaktive Lebensmittelinhaltsstoffe aus den Substanzklassen der Isoflavone und Stilbene werden in der Literatur mit einer Vielfalt an potentiell gesundheitsfördernden Eigenschaften in Verbindung gebracht. Entsprechend steigt die Anzahl isoflavon- bzw. stilbenreicher, diätetischer Lebensmittel und NEM stetig. Bislang ist wenig darüber bekannt, ob eine frühkindliche oder langfristige Exposition gegenüber diesen bioaktiven Verbindungen nachteilige Wirkungen hervorrufen könnte. Im Fokus dieser Arbeit standen daher Untersuchungen zu einer möglichen Beeinflussung von Topoisomerasen und einer damit verbundenen DNA-Schädigung durch einzelne Isoflavone sowie einen stilbenreichen Extrakt.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde der Einfluss des Isoflavons Genistein auf Topoisomerasen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* untersucht. Genistein wirkte in humanen Fibrosarkomzellen (HT1080) in einem vergleichbaren Konzentrationsbereich ( $>25 \mu\text{M}$ ) als Topoisomerase II-Gift, in dem in humanen Kolonkarzinomzellen (HT29) auch DNA-Strangbrüche beobachtet wurden. Das, angesichts der starken Erhöhung der Menge kovalenter Topoisomerase II-DNA-Komplexe, vergleichsweise schwache, genotoxische Potential des Isoflavons könnte dabei eine Folge der kurzen Halbwertszeit der induzierten Intermediate sein. Auch im Darmgewebe männlicher Ratten erhöhte Genistein sowohl nach subkutaner Applikation (10 mg/kg KG) wie auch nach oraler Aufnahme (25-50 mg Genistein-Äquivalente/kg KG) die Menge kovalenter Topoisomerase II-DNA-Intermediate. Trotz des höheren Anteils an Genistein-Äquivalenten im Futter bewirkte die subkutane Behandlung der Tiere eine stärkere Zunahme der kovalenten Intermediate im Darmgewebe als nach oraler Aufnahme des Isoflavons. Da durch subkutane Applikation der ‚First-Pass‘-Metabolismus in Darm und Leber umgangen wird, könnten höhere Konzentrationen des freien Aglykons im Kolon vorliegen, die zu den verstärkten biologischen Effekten führen könnten. Im Kolon sowie im Plasma der Tiere wurden Konzentrationen an Genistein-Äquivalenten im niedrigen mikromolaren Bereich nachgewiesen. Vergleichbare Plasmakonzentrationen können auch in Säuglingen erreicht werden, die eine Soja-basierte Anfangsnahrung erhalten, sodass in diesem Fall Topoisomerase-vermittelte nachteilige Wirkungen nicht ausgeschlossen werden können.

Im Rahmen des oxidativen Stoffwechsels von Daidzein können katecholische Metabolite gebildet werden, deren biologische Wirkungen im Vergleich zur Muttersubstanz im zweiten Teil dieser Arbeit untersucht wurden. Hierbei zeigte sich für 6-HO-DAI und 8-HO-DAI, im Gegensatz zur Muttersubstanz, ein antiproliferatives Potential in den verwendeten humanen Kolonkarzinomzellen (HT29). Dies könnte, zumindest teilweise, auf eine ebenfalls

beobachtete katalytische Hemmung der Topoisomerase II-Aktivität durch die oxidativen Daidzein-Metabolite zurückgeführt werden. Sowohl 6-HO-DAI als auch 8-HO-DAI zeigten nach 24-stündiger Inkubation DNA-strangbrechende Eigenschaften in humanen Kolonkarzinomzellen, sowie eine, vermutlich ebenfalls Topoisomerase-assoziierte, Verzögerung des Zellzyklus in der S-Phase. Zudem deuten sowohl die Erhöhung des Transkriptionsfaktors Nrf2 im Zellkern wie auch die beobachtete oxidative DNA-Basenschädigung auf eine Modulation des intrazellulären Redox-Gleichgewichts durch die oxidativen Daidzein-Metabolite hin, wobei die beobachteten Effekte durch 8-HO-DAI stärker ausgeprägt waren. Weiterhin unterscheiden sich die oxidativen Daidzein-Metabolite hinsichtlich ihrer Eigenschaft Apoptose zu induzieren. Dies legt nahe, dass für 8-HO-DAI die Beeinflussung des zellulären Redoxstatus im Vordergrund steht, während durch 6-HO-DAI weitere zelluläre Mechanismen beeinflusst werden, die zu dessen Apoptose-Induktion beitragen. Daidzein hingegen ließ keinen Einfluss auf Zellwachstum, Topoisomerasen und die DNA-Integrität erkennen und führte nur zu einer geringen Erhöhung des intrazellulären ROS-Levels. Es konnte gezeigt werden, dass sich die biologische Aktivität der Muttersubstanz Daidzein durch den oxidativen Stoffwechsel verändert und dass die oxidativen Metabolite 6-HO-DAI und 8-HO-DAI in äquimolaren Konzentrationen wie Daidzein toxisches Potential besitzen. Dies unterstreicht die Notwendigkeit einer Berücksichtigung der im Organismus gebildeten Metabolite für die Risikobewertung einer biologisch unbedenklichen Ausgangssubstanz.

Eine eindeutige Bewertung möglicher, gesundheitlich unerwünschter Effekte durch Isoflavone ist daher für bestimmte Risikogruppen derzeit nicht möglich. Weitere Untersuchungen, insbesondere hinsichtlich potentiell nachteiliger Effekte durch die Topoisomerase II-Giftung sind dazu erforderlich. Die Abschätzung des physiologisch relevanten Konzentrationsbereichs, insbesondere im Gewebe, nach oraler Exposition sollte dabei einen elementaren Faktor in der Beurteilung einer möglichen Topoisomerase-vermittelten Genotoxizität darstellen. Weiterhin gilt es die Mechanismen aufzuklären, die für die Topoisomerase-vermittelte Induktion frühkindlicher Leukämien nach Genistein-Exposition verantwortlich sind.

Untersuchungen zur potentiellen Hemmung humaner Topoisomerasen durch den stilbenreichen Weinrebensprösslingextrakt Vineatrol®<sup>30</sup> zeigten, dass der Extrakt die katalytische Enzymaktivität von Topoisomerase II im zellfreien System ab einer Konzentration von 5 µg/mL potent unterdrückte. Dabei bewirkte der Extrakt keine Erhöhung

der Menge kovalenter Enzym-DNA-Intermediate in humanen, epidermoiden Karzinomzellen (A431), wodurch eine Topoisomerase II-Giftung ausgeschlossen werden kann. Zudem induzierte Vineatrol®30 bereits nach einstündiger Behandlung DNA-Schäden in humanen, epidermoiden Krebszellen, wobei die DNA-Strangbruchrate nach 24-stündiger Inkubation weiter anstieg. Die katalytische Topoisomerase II-Hemmung könnte infolge von replikationsbedingten Torsionsspannungen zu DNA-Strangbrüchen insbesondere in der S-Phase führen und dadurch einen S-Phasen-Arrest sowie eine Apoptose-Induktion der Zellen auslösen. Allerdings tragen vermutlich auch weitere zelluläre Prozesse zur potenten DNA-schädigenden Wirkung des Extraktes bei. So deutet die nach einstündiger Inkubation beobachtete Erhöhung der Anzahl FPG-sensitiver Stellen auf eine mögliche oxidative Schädigung der DNA-Basen durch Vineatrol®30 hin. Die Resveratrol-Tetramere r2-Viniferin und Hopeaphenol sowie das Resveratrol-Dimer ε-Viniferin konnten als bioaktive Komponenten des Extraktes bestimmt werden, wobei die Tetramere eine potentere Unterdrückung der katalytischen Aktivität von Topoisomerase II-Enzymen bewirkten als das Dimer. Es ist anzunehmen, dass insbesondere die Tetramere, neben vermutlich weiteren, bislang noch nicht identifizierten bioaktiven Komponenten, zur Topoisomerase-Hemmung sowie DNA-schädigenden Wirkung des Extraktes beitragen. Das im Rahmen dieser Arbeit beobachtete genotoxische Potential von Vineatrol®30 wirft die Frage nach der gesundheitlichen Unbedenklichkeit des Extraktes auf. Zur Abschätzung eines möglichen Gesundheitsrisikos durch den Weinrebensprösslingextrakt sind weitere Studien erforderlich, um einerseits den physiologisch relevanten Konzentrationsbereich zu bestimmen und um andererseits weitere mögliche zelluläre Mechanismen aufzuklären, die zur DNA-schädigenden Wirkung des Extraktes beitragen könnten, um die Relevanz des genotoxischen Potentials *in vitro* beurteilen zu können.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde somit gezeigt, dass das Isoflavon Genistein im Darm Konzentrationen erreichen kann, die eine Topoisomerase II-Giftung hervorrufen. Da Säuglinge, die eine Soja-basierte Anfangsnahrung erhalten, vergleichbare Plasma-Konzentrationen an Isoflavonen erreichen können, werfen diese Ergebnisse Fragen nach einer möglichen Topoisomerase-Giftung in dieser Risikogruppe auf. Weiterhin konnte ein, teilweise Topoisomerase-vermitteltes, toxisches Potential oxidativer Daidzein-Metabolite nachgewiesen werden, was die Notwendigkeit einer Berücksichtigung dieser Metabolite in der toxikologischen Bewertung von Daidzein aufzeigt. Schließlich wurden auch Untersuchungen zur Toxizität mit dem Vineatrol®30-Pflanzenextrakt durchgeführt, wobei sowohl eine Topoisomerase-Hemmung als auch ein genotoxisches Potential festgestellt wurden. Daher bedarf es weiterführender, toxikologischer Studien, um eine gesicherte

Abschätzung des Risikos gegenüber dem Nutzen, sowohl von Soja-basierten NEM als auch von Vineatrol<sup>®</sup>30, geben zu können.

## **6. Material und Methoden**

### **6.1. Konzeption der Tierstudie**

#### **6.1.1. Tierhaltung**

Die Tierhaltung, ebenso wie die Behandlung der Tiere, wurde an der Sporthochschule Köln, am Institut für molekulare und zelluläre Sportmedizin, gemäß internationalen Richtlinien zum Tierschutz durchgeführt. Die Wistar Ratten (Janvier, Le Genest St Isle, Frankreich) wurden unter konstanten Bedingungen gehalten ( $20^{\circ}\text{C} \pm 1$ , relative Luftfeuchtigkeit 50 - 80%, 12 h Beleuchtung/ 12 h Dunkelheit). Nach der Paarung erhielten die Muttertiere während der Trächtigkeit und dem Säugen entweder isoflavonarmes oder isoflavonreiches Futter (Kapitel 6.1.3). Die Nachkommen erhielten dieselbe Futterart, die bereits die Muttertiere bekommen hatten. Bis zu Versuchsbeginn hatten die Tiere freien Zugang zu Wasser und Futter.

#### **6.1.2. Behandlung der Tiere**

Die zeitliche Abfolge der Tierstudie ist in Abbildung 4.5 zusammengefasst. Nachdem die männlichen Wistar Ratten 14 h gefastet hatten, wurde jede Futtergruppe in zwei Untergruppen unterteilt. Während den Tieren der einen Untergruppe 10 mg Genistein/kg KG subkutan verabreicht wurde, bekam die zweite Gruppe das Vehikel (20% DMSO in Erdnussöl) appliziert. Die Wistar Ratten wurden 3 h bzw. 24 h nach Applikation durch Dekapitation getötet. Anschließend wurden Kolon und Duodenum entnommen, in 1x PBS eingefroren und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

#### **6.1.3. Futterzusammensetzung**

Während die eine Tiergruppe eine isoflavonarme Diät (IDD, Ssniff R/M-H Ssniff GmbH, Soest, Deutschland) erhielt, bekam die zweite Gruppe isoflavonreiches Futter (IRD, Harlan Teklad 8604, Harlan-Winkelmann, Borcheln, Deutschland). Die Proteinquelle der IDD bilden Cerealien und Kartoffeln, wohingegen die IRD vornehmlich auf Sojamehl, Fischmehl und Hefen basiert. Die Isoflavon-Zusammensetzung der IRD ist in Tabelle 6.1 gezeigt. Aufgrund des geringen Isoflavon-Gehalts der IDD kann von einer täglichen Aufnahme der Tiere von 0,1 mg Daidzein oder Genistein/kg KG ausgegangen werden.

**Tabelle 6.1:** Isoflavon-Zusammensetzung der IRD; nd: nicht detektierbar.  
<sup>1</sup>berechnet als Genistein-Äquivalente

| Isoflavon              | MW,<br>µg/g IRD | MW,<br>µg Äq <sup>1</sup> / g IRD |
|------------------------|-----------------|-----------------------------------|
| Daidzein               | 8,83            | 8,83                              |
| Genistein              | 8,59            | 8,59                              |
| Glycitein              | nd              | -                                 |
| Daidzin                | 191,96          | 117,21                            |
| Genistin               | 210,63          | 131,64                            |
| Glycitin               | 58,82           | 37,46                             |
| 6''-O-Acetyl-Daidzin   | 48,21           | 26,73                             |
| 6''-O-Acetyl-Genistin  | 51,18           | 29,17                             |
| 6''-O-Acetyl-Glycitin  | 12,68           | 7,39                              |
| 6''-O-Malonyl-Daidzin  | 119,25          | 60,32                             |
| 6''-O-Malonyl-Genistin | 150,04          | 78,19                             |
| 6''-O-Malonyl-Glycitin | 26,28           | 14,04                             |

## 6.2. Zellkultur

### 6.2.1. Verwendete Zelllinien

**A431:** Zellen aus dem Epidermoidkarzinom einer 85-jährigen Frau. A431-Zellen wachsen adhärent in Monolayern und weisen eine Vielzahl an EGF-Bindungsstellen auf. Die Verdopplungszeit beträgt etwa 80 - 100 Stunden (DSMZ, Braunschweig).

**CHO (*chinese hamster ovary*):** Die Zelllinie wurde aus den Ovarien eines chinesischen Hamsters (*Cricetulus griseus*) etabliert. Die immortalisierten Zellen wachsen adhärent in Monolayern und besitzen eine Verdopplungszeit von etwa 24 Stunden (DSMZ, Braunschweig).

**HCT116:** Diese Zelllinie wurde aus dem primären Kolonkarzinom eines erwachsenen Mannes etabliert. Die kleinen, adhärenen Zellen wachsen als Monolayer mit einer Verdopplungszeit von etwa 25 - 48 Stunden (DSMZ, Braunschweig).

**HT1080:** Diese Tumorzelllinie entstammt dem Fibrosarkom eines 35-jährigen, kaukasischen Mannes, welcher verstarb ohne eine Chemo- oder Bestrahlungstherapie erhalten zu haben. Vorherrschende Merkmale sind große Nukleoli und zahlreich stattfindende Mitosen. Die Zellen vermehren sich schnell mit wenig Kontaktinhibition. Die Verdopplungszeit beträgt ungefähr 26 Stunden (Rasheed et al., 1974).

**HT29:** Kolorektale Adenokarzinomzellen aus dem Tumor einer 44-jährigen kaukasischen Frau. HT29-Zellen wachsen adhärent als Monolayer oder bilden große Kolonien und besitzen eine Verdopplungszeit von 40 - 60 Stunden (DSMZ, Braunschweig).

### 6.2.2. Kultivierung von Monolayerkulturen

#### Auftauen von Zellstocks

Nach Auftauen der gefrorenen Zellstocks im Wasserbad bei 37°C wurde die Zellsuspension umgehend in 10 mL Medium (20% fetales Kälberserum, FKS) überführt. Anschließend wurde die Zellsuspension zentrifugiert (130 g, 5 min, RT), um das DMSO-haltige Medium zu entfernen. Das Zellpellet wurde in 5 mL Medium (20% FKS) resuspendiert und in eine Kulturflasche (25 cm<sup>2</sup>) gegeben. Die Kultivierung der Zellen erfolgte bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 95% relativer Luftfeuchtigkeit. Bei Erreichen einer ausreichenden Zelldichte wurde Medium mit 10% FKS-Zusatz verwendet. Neben hitzeinaktiviertem FKS wurde das jeweilige Kulturmedium mit 1% Penicillin (10 000 U)/ Streptomycin (10 000 µg/mL) versetzt (Lindl und Gstraunthaler, 2008).

#### Einfrieren von Zellen

Die adhären Zellen wurden abtrysiniert, die Zellsuspension zentrifugiert (130 g, 5 min, RT) und das Zellpellet in serumhaltigem Medium resuspendiert. Ein Milliliter (ca.  $2 \times 10^5$  -  $5 \times 10^6$  Zellen) der Zellsuspension wurde in Kryoröhrchen zu 500 µL eines DMSO/FKS-Gemisches (1 : 2,3) gegeben. Die verschlossenen Kryoröhrchen wurden umgehend für 24 h bei -20°C gekühlt und danach bei -80°C im Biofreezer bzw. in flüssigem Stickstoff gelagert (Lindl und Gstraunthaler, 2008).

#### Passagieren von Monolayerkulturen

Bei Erreichen von etwa 80% Konfluenz wurden die Zellen passagiert (subkultiviert). Hierzu wurde das Medium entfernt und der Zellrasen mit 10 mL 1x PBS gewaschen. Der Boden der Kulturflasche wurde mit 2,5 mL Trypsin-Lösung bedeckt und die Zellen für 30 s (HT1080-Zellen), 2 min (CHO-/ HT29-/ HCT116-Zellen) bzw. 8 min (A431-Zellen) bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Das Ablösen der Zellen wurde durch leichtes Klopfen unterstützt und die Trypsin-Reaktion durch Zugabe von 10 mL serumhaltigem Medium gestoppt. Durch mehrmaliges Resuspendieren wurden die Zellen vereinzelt und ein adäquates Aliquot der Zellsuspension wurde mit 40 mL serumhaltigem Medium in der Flasche belassen. Nach

2 Passagen wurde für die weitere Kultivierung der Zellen eine neue Kulturflasche verwendet (Lindl und Gstraunthaler, 2008). Die Volumenangaben beziehen sich auf Kulturflaschen mit einer Bodenfläche von 175 cm<sup>2</sup>.

### Bestimmung der Zellzahl

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mithilfe einer Neubauer-Zählkammer. Das Deckglas wurde mit leichtem Druck fest auf die beiden Trägerstege aufgebracht, wodurch ein Hohlraum definierten Volumens geschaffen wurde. Ein Aliquot der zu bestimmenden Zellsuspension wurde mit Trypanblau-Lösung versetzt und die Zählkammer mit der Suspension beschickt. Während vitale Zellen den Diazofarbstoff nicht aufnehmen, werden beschädigte oder tote Zellen aufgrund ihrer Membrandurchlässigkeit blau gefärbt. Die Zahl der Zellen, die auf den vier Eckquadraten der Zählkammer lagen, wurde unter dem Lichtmikroskop ermittelt und der Mittelwert der vier Zählfelder bestimmt. Durch Berücksichtigung des entsprechenden Verdünnungsfaktors sowie des Faktors 10<sup>4</sup> wurde die Zellzahl pro Milliliter Suspension berechnet (Lindl und Gstraunthaler, 2008). Die Verdünnung der Zellsuspension mit Trypanblau-Lösung wurde so gewählt, dass pro Eckquadrat ca. 20 Zellen ausgezählt werden konnten.

### Verwendete Zellkulturmedien

|             |                                                          |
|-------------|----------------------------------------------------------|
| A431        | Minimum Essential Medium (MEM), 1% L-Glutamin            |
| CHO         | Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), 1% L-Glutamin |
| HT1080      | DMEM, high glucose, GlutaMAX™                            |
| HT29/HCT116 | DMEM                                                     |

### Verwendete Lösungen

|                |                                                                                                                                                                                                          |
|----------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| PBS (10x)      | 1,71 M NaCl, 100 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 34 mM KCl, 18 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; pH 7,4                                                                                         |
| Trypsin-Lösung | 500 mg Trypsin (Rinderpankreas 3,6 U/mg), 250 mg EDTA, 100 mL 10x PBS, in H <sub>2</sub> O lösen, über Nacht auf Eis rühren, pH-Wert 7 - 7,4, steril filtrieren (Porengröße 0,22 µm), Lagerung bei -20°C |

### 6.2.3. Inkubation der Zellen

#### **Genistein**

Genistein wurde vor Beginn jeder Inkubation neu eingewogen und in DMSO gelöst. Die Inkubationen für den ICE-Assay und die Einzelzellgelelektrophorese wurden in serumfreiem Medium durchgeführt, wohingegen das Medium bei den Untersuchungen zur H2AX-Phosphorylierung 10% FKS enthielt. Die Versuche wurden in Gegenwart von Katalase (100 U/mL) durchgeführt und die DMSO-Konzentration im Endansatz betrug 1% (ICE-Assay, H2AX-Phosphorylierung) bzw. 0,2% (Comet-Assay).

#### **Daidzein, 6-HO-DAI und 8-HO-DAI**

Während Daidzein vor Gebrauch frisch eingewogen wurde, wurden von den oxidativen Daidzein-Metaboliten Stammlösungen in DMSO hergestellt, die bei -80°C gelagert und vor Inkubation entsprechend verdünnt wurden. Die Inkubationen wurden in serumfreiem Medium unter Zusatz von 100 U/mL Katalase durchgeführt. Lediglich bei den Versuchen des DCF-Assays wurde auf den Katalase-Zusatz verzichtet, da orientierende Messungen eine Interferenz des Enzyms mit dem Testsystem zeigten. Bei allen mit Daidzein bzw. den oxidativen Daidzein-Metaboliten durchgeführten Untersuchungen betrug die DMSO-Konzentration im Endansatz 1%.

#### **Vineatrol®30 und Resveratrol-Oligomere**

Von dem Weinrebensprösslingextrakt und den Resveratrol-Oligomeren wurden Stammlösungen hergestellt, die bei -80°C gelagert wurden. Während der Extrakt in DMSO gelöst wurde, wurde für die Resveratrol-Oligomere 70% (v/v) Ethanol als Lösungsmittel verwendet. Daher wurden alle Arbeiten mit den Resveratrol-Oligomeren, bis zur erfolgten Inkubation, auf Eis durchgeführt. Die Inkubationen mit Vineatrol®30 und den Resveratrol-Oligomeren wurden in serumfreiem Medium in Gegenwart von Katalase (100 U/mL) durchgeführt, wobei die Ethanol- bzw. DMSO-Konzentration im Endansatz 1% betrug.

### 6.2.4. Mykoplasmen-Test

Mykoplasmen sind kleine Prokaryoten, die keine rigide Zellwand besitzen. Aufgrund ihrer geringen Größe können sie Sterilfilter passieren und sind gegenüber den in der Zellkultur eingesetzten Antibiotika resistent. Da Mykoplasmen in den Stoffwechsel der befallenen

Zellen eingreifen, können sie die Eigenschaften der verwendeten Zelllinie maßgeblich verändern.

### Durchführung:

Ein steriler Superfrost-Objektträger wurde in eine Petrischale (d=10 cm) gelegt, worauf wenige Tropfen der zu untersuchenden Zellsuspension sowie 10 mL serumhaltiges Medium gegeben wurden. Die Zellen wurden im Brutschrank für etwa 48 h kultiviert, wonach das Medium verworfen wurde und die Zellen in -20°C kaltem Methanol (p.a.) über eine Dauer von mind. 30 min fixiert wurden. Wenige Tropfen 4',6-Diamin-2-phenyl-indol (DAPI)-Lösung wurden auf den Objektträger pipettiert und mit einem Deckglas bedeckt. Die Auswertung erfolgte am Fluoreszenzmikroskop, wobei der Zellkern und die DNA der Zellen blau erschienen. Mykoplasmen hingegen sollten klein, blau und leuchtend sichtbar werden (Lindl und Gstraunthaler, 2008). Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Zelllinien wiesen keine Mykoplasmen-Kontamination auf.

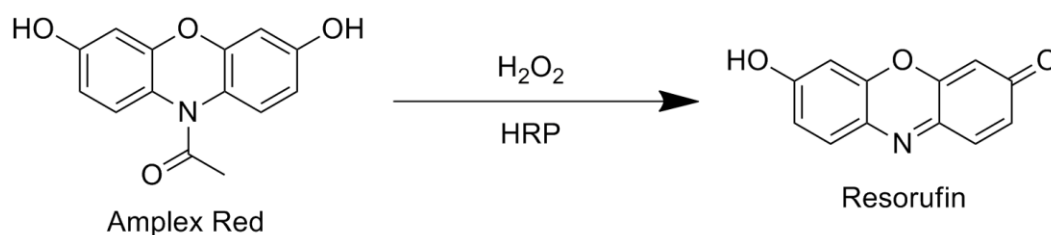
### Verwendete Lösungen

|             |                                                                                        |
|-------------|----------------------------------------------------------------------------------------|
| DAPI-Lösung | 8 µM DAPI, 200 mM Tris, 200 mM NaCl; in H <sub>2</sub> O lösen, pH-Wert 7,6 einstellen |
|-------------|----------------------------------------------------------------------------------------|

## 6.3. Amplex<sup>®</sup> Red Hydrogen Peroxide Assay

### Testprinzip

Das Amplex<sup>®</sup> Red-Reagenz (10-Acetyl-2,7-Dihydroxyphenoxazin) ermöglicht in Kombination mit Meerrettich-Peroxidase (*horseradish peroxidase*, HRP) die Detektion von Wasserstoffperoxid. In Anwesenheit der HRP reagiert das Amplex<sup>®</sup> Red-Reagenz mit Wasserstoffperoxid stöchiometrisch zu rot fluoreszierendem Resorufin (Abbildung 6.1; Invitrogen, Molecular Probes, USA).



**Abb. 6.1:** Schematische Darstellung der Reaktion im Amplex<sup>®</sup> Red Hydrogen Peroxide Assay (Invitrogen, Molecular Probes, USA).

## Durchführung

Bei der Versuchsdurchführung wurde entsprechend dem Handbuch des Kits vorgegangen (Invitrogen, Molecular Probes, USA). Zu Beginn wurde eine Wasserstoffperoxid-Standardreihe für den Konzentrationsbereich 0,25 - 5  $\mu\text{M}$  erstellt, wobei zusätzlich eine Negativkontrolle (Reaktionspuffer ohne Wasserstoffperoxid-Zusatz) mitgeführt wurde. Nach erfolgter Substanzinkubation wurden 50  $\mu\text{L}$  des Mediumüberstandes sowie 50  $\mu\text{L}$  der Standardlösungen in eine 96-Well-Platte pipettiert und 50  $\mu\text{L}$  des Reagenzmix zugegeben, wonach für 30 min im Dunkeln inkubiert wurde. Anschließend wurde die Fluoreszenzintensität ( $\lambda_{\text{em}}$ : 585 nm) gemessen.

## Auswertung

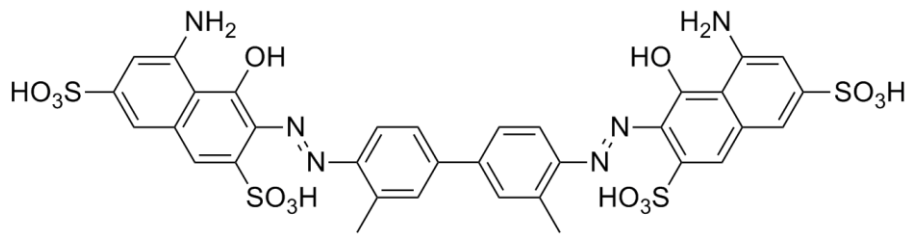
Mithilfe der erhaltenen Fluoreszenzintensitäts-Werte der Standardreihe wurde nach Abzug der Negativkontrolle mittels linearer Regression eine Kalibriergerade erstellt. Anhand der Geradengleichung wurden die Wasserstoffperoxid-Konzentrationen der einzelnen Proben berechnet und anschließend die Werte der Doppelbestimmungen gemittelt.

## 6.4. Bestimmung der Zytotoxizität

### 6.4.1. Zellvitalität mit Trypanblau

#### Testprinzip

Der anionische Diazofarbstoff Trypanblau (Abbildung 6.2) kann intakte Membranen vitaler Zellen nicht passieren, wodurch diese Zellen unter dem Lichtmikroskop leuchtend weiß erscheinen. Hingegen nehmen Zellen mit beschädigter Plasmamembran den Farbstoff auf und sind dementsprechend dunkelblau gefärbt (Lindl und Gstraunthaler, 2008).



**Abb. 6.2:** Struktur des Diazofarbstoffs Trypanblau.

## Durchführung und Auswertung

Analog zur Zellzahlbestimmung (Kapitel 6.2.2) erfolgte die Ermittlung der Zellviabilität unter Zuhilfenahme von Trypanblau-Lösung. Zur Bestimmung der Viabilität wurde die Zahl sowohl der vitalen als auch der toten Zellen ermittelt. Der prozentuale Anteil der lebenden Zellen wurde wie folgt berechnet:

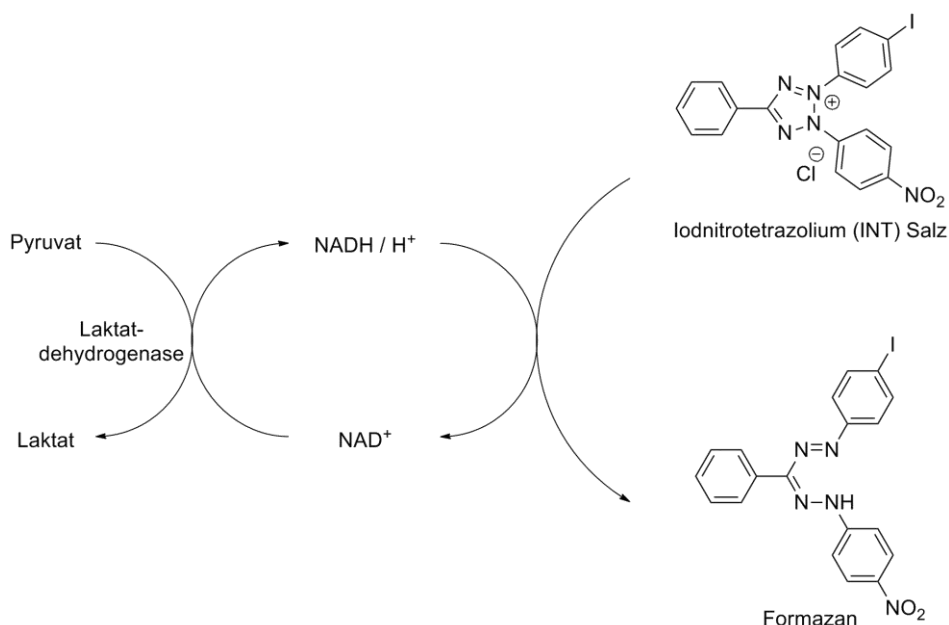
$$\text{Viabilität (\%)} = \frac{\text{Zahl der vitalen Zellen}}{\text{Zahl der toten + vitalen Zellen}} \times 100$$

### 6.4.2. Membranintegrität im LDH-Assay

#### Testprinzip

Im LDH-Assay wird die Enzymaktivität der Laktatdehydrogenase (LDH) im Mediumüberstand der Zellen bestimmt. Durch Schädigung der Zellmembran kann das im Zytoplasma lokalisierte Enzym ins Medium übertreten. Dementsprechend geht eine Erhöhung der Enzymaktivität im Mediumüberstand mit einer Zunahme der Menge an Zellen mit geschädigter Plasmamembran einher.

Die Bestimmung der LDH-Aktivität im Medium basiert auf einem enzymatischen Testsystem (Abbildung 6.3). In einem ersten Schritt wird Laktat in einer LDH-katalysierten Reaktion zu Pyruvat umgesetzt, wobei  $\text{NAD}^+$  reduziert wird. Im zweiten Reaktionsschritt werden durch Diaphorase Protonen des gebildeten  $\text{NADH}/\text{H}^+$  auf ein Tetrazoliumsalz übertragen, wodurch ein rotes Formazan-Salz gebildet wird (Roche Applied Science, Schweiz).



**Abb. 6.3:** Schematische Darstellung des Testprinzips des LDH-Assays (modifiziert nach Roche Applied Science, Schweiz).

## Durchführung

HT29-Zellen (10 000 pro Well) wurden in einer 96-Well-Platte für 48 h anwachsen gelassen und anschließend für 24 h mit den jeweiligen Testsubstanzen inkubiert. In einer zweiten 96-Well-Platte wurden 50 µL 1x PBS pro Well vorgelegt, zu denen 50 µL des Mediumüberstandes pipettiert wurden. Von dem frisch zubereiteten Reagenzmix wurden 100 µL pro Well zugegeben, wonach sich die photometrische Messung (5 min schütteln,  $\lambda$ : 450 nm) anschloss. Gleichzeitig wurde die Absorption bei der Referenzwellenlänge von 633 nm bestimmt (Roche Applied Science, Schweiz).

## Auswertung

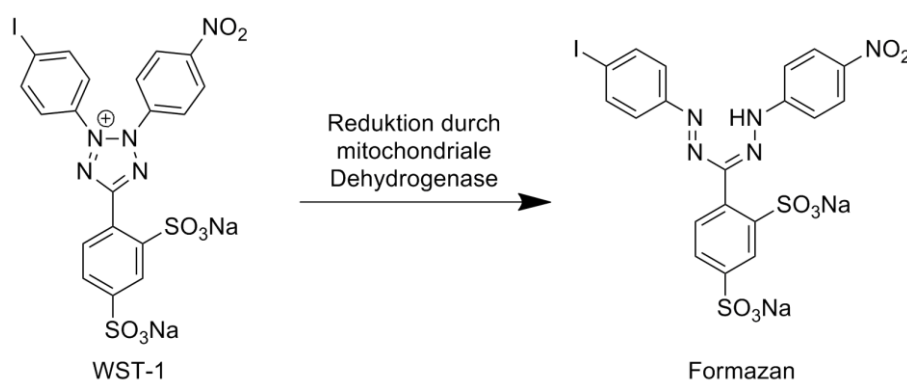
Von den Messwerten ( $\lambda$ : 450 nm) wurden die bei der Referenzwellenlänge erhaltenen Werte abgezogen. Anschließend wurden die Mittelwerte der Vierfachbestimmungen gebildet. Nach Abzug der Werte der Mediumkontrolle wurde die Zytotoxizität wie folgt berechnet (Roche Applied Science, Schweiz):

$$\text{Zytotoxizität [\%]} = \frac{A(\text{Testsubstanz}) - A(\text{Lösungsmittelkontrolle})}{A(\text{Triton X}) - A(\text{Lösungsmittelkontrolle})} \times 100$$

### 6.4.3. Mitochondriale Aktivität im WST-1-Assay

#### Testprinzip

Eine Verringerung der Zellviabilität ist mit einer Aktivitätsabnahme mitochondrialer Dehydrogenasen assoziiert. Da aktive, mitochondriale Dehydrogenasen über Bildung von  $\text{NADH}/\text{H}^+$  das Tetrazoliumsalz WST-1 zu Formazan umsetzen können (Abbildung 6.4), korreliert eine Abnahme der Enzymaktivität mit einer verminderten Farbstoffbildung (Roche Applied Science, Schweiz).



**Abb. 6.4:** Schematische Darstellung der Farbreaktion im WST-1-Assay (modifiziert nach Roche Applied Science, Schweiz)

#### Durchführung

Entsprechend dem LDH-Assay wurden 10 000 HT29-Zellen pro Well in einer 96-Well-Platte ausgesät und für 48 h im Brutschrank kultiviert. Nach Inkubation mit den Testsubstanzen wurde der Mediumüberstand abgesaugt, die Zellen mit 1x PBS gewaschen und 100  $\mu\text{L}$  serumfreies Zellkulturmedium zupipettiert. Anschließend wurden 10  $\mu\text{L}$  WST-1-Reagenz pro Well zugegeben und es wurde für 30 min im Brutschrank inkubiert, wonach sich die photometrische Messung bei einer Wellenlänge von 450 nm (Referenzwellenlänge: 633 nm) anschloss (Roche Applied Science, Schweiz).

#### Auswertung

Die Messwerte ( $\lambda$ : 450 nm) der Vierfachbestimmungen, abzüglich der Referenzwerte ( $\lambda$ : 633 nm) und der Mediumkontrolle, wurden gemittelt und auf die Lösungsmittelkontrolle bezogen (T/C, %).

## 6.5. Einfluss auf Topoisomerasen

### 6.5.1. Dekatenierungsassay

#### Testprinzip

Eine mögliche Beeinflussung der katalytischen Aktivität von Topoisomerase II $\alpha$  wurde im Dekatenierungsassay bestimmt. Die aus *Crithidia fasciculata* isolierte Kinetoplasten-DNA (kDNA) bildet ein hochmolekulares Netzwerk zirkulärer DNA, das aufgrund seines hohen Molekulargewichts nicht in ein Agarosegel migrieren kann. Durch aktive Topoisomerase II werden einzelne DNA-Minizirkel aus der kDNA herausgelöst, die schnell in das Gel wandern können. Topoisomerase-Hemmstoffe verhindern die Dekatenierung der Minizirkel aus dem Netzwerk, was durch das Verbleiben der kDNA in der Geltasche angezeigt wird.

#### Durchführung:

Kinetoplasten-DNA (200 ng) wurde als Substrat eingesetzt und in einem Endvolumen von 30  $\mu$ L (50 mM Tris, pH-Wert 7,9, 120 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM ATP, 0,5 mM DTT, 0,5 mM EDTA und 0,03 mg/mL BSA) mit 40 ng Topoisomerase II $\alpha$  und den jeweiligen Testsubstanzen (in 3,3% DMSO bzw. Ethanol Endkonzentration) für 60 min bei 37°C inkubiert. Durch Zugabe von 3  $\mu$ L Proteinase K-Lösung mit anschließender, 30 minütiger Inkubation bei 37°C wurde die Enzymreaktion gestoppt. Für die Elektrophorese (4,5 V/cm) in einem 1% Agarosegel wurden 5  $\mu$ L 1x Ladepuffer zugesetzt. Das Gel wurde im Anschluss im Ethidiumbromid-Bad für ca. 20 min gefärbt und für 5 min im Wasserbad gewaschen. Die Fluoreszenz bei 560 nm wurde mittels LAS4000 detektiert.

#### Verwendete Lösungen

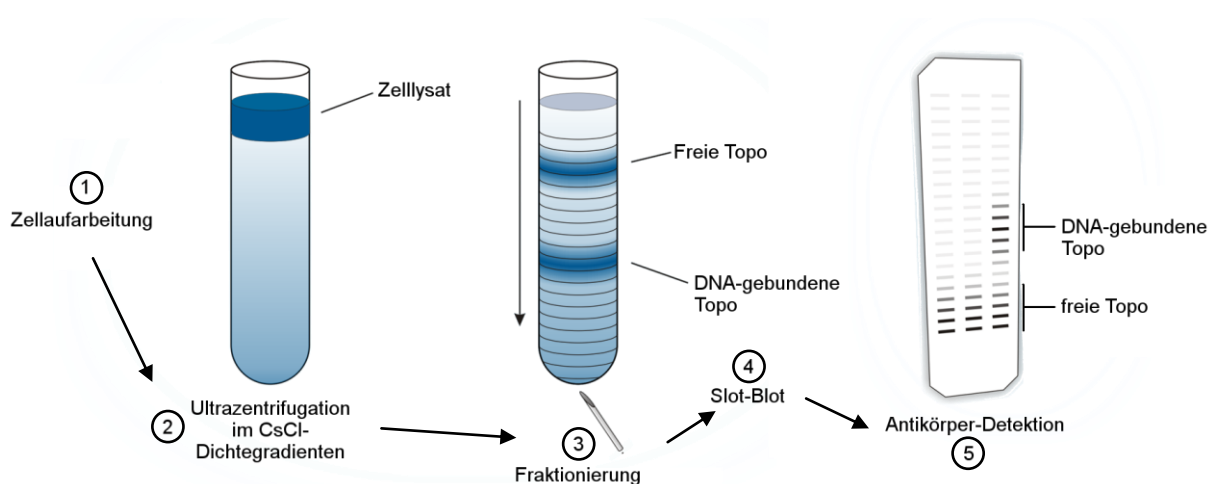
|                    |                                                                            |
|--------------------|----------------------------------------------------------------------------|
| Agarosegel         | 1% (w/v) in 1x TAE-Puffer                                                  |
| Ethidiumbromid-Bad | 1 $\mu$ g/mL in H <sub>2</sub> O                                           |
| KCl-Lösung         | 1 M KCl in H <sub>2</sub> O                                                |
| Ladepuffer (6x)    | 0,25% Bromphenolblau, 30% Glycerol                                         |
| Proteinase K       | 1 mg/mL in 10% SDS-Lösung                                                  |
| Salzmix:           | 50 mM MgCl <sub>2</sub> , 5 mM DTT, 5 mM EDTA, 0,3 mg/mL BSA,<br>10 mM ATP |

|                      |                                                              |
|----------------------|--------------------------------------------------------------|
| SDS-Lösung           | 10% (w/v) SDS in H <sub>2</sub> O                            |
| TAE-Puffer (50x)     | 2 M Tris, 5,7% (v/v) Eisessig, 50 mM EDTA, pH-Wert 8,5       |
| Topoisomerase-Puffer | 50 mM Tris, 400 mM NaCl, 1 mM DTT, 50% Glycerol, pH-Wert 7,5 |
| Tris-Puffer          | 500 mM Tris, pH-Wert 7,9                                     |

### 6.5.2. 'Isolating *in vivo* complexes of enzyme to DNA' (ICE)-Bioassay

#### Testprinzip

Topoisomerase-Hemmstoffe lassen sich in Topoisomerase-Gifte und rein katalytische Hemmstoffe unterteilen. Während Topoisomerase-Gifte die Menge kovalenter Topoisomerase II-DNA-Intermediate erhöhen, unterdrücken katalytische Hemmstoffe die Enzymaktivität, wenn die Topoisomerase nicht kovalent an die DNA gebunden vorliegt (Bailly, 2012). Nach Exposition gegenüber den Testsubstanzen werden die Zellen lysiert. Durch Zentrifugation des Zelllysates im Cäsiumchlorid-Gradienten werden nicht-kovalente Wechselwirkungen zwischen Proteinen und der DNA dissoziiert und freies Enzym wird von kovalent an die DNA gebundener Topoisomerase getrennt. Anschließend erfolgen die Fraktionierung des Gradienten und die Immunodetektion der Topoisomerase (Subramanian et al., 2001). Die Versuchsdurchführung ist in Abbildung 6.5 schematisch dargestellt.



**Abb. 6.5:** Übersicht über die Versuchsdurchführung des ICE-Bioassays.

## Durchführung

### *Zellaufarbeitung*

HT1080- ( $2,5 \times 10^6$ ), HT29- ( $5 \times 10^6$ ) bzw. A431-Zellen ( $3 \times 10^6$ ) wurden in Petrischalen (d: 15 cm) für 48 - 72 h kultiviert. Bei einer Zelldichte von ca. 80% wurden die Zellen für eine Stunde mit den jeweiligen Testsubstanzen serumfrei inkubiert.

Im Falle von Kombinations-Experimenten wurden die Zellen für 30 min mit dem potentiellen katalytischen Hemmstoff vorinkubiert, wonach sich eine einstündige Inkubation des katalytischen Hemmstoffs mit dem Topoisomerase-Gift Doxorubicin (Endkonzentration: 10  $\mu$ M) anschloss. Die DMSO-Konzentration im Endansatz betrug 1%.

Nach erfolgter Substanzinkubation wurden die Zellen mit 1x PBS gewaschen (2x 4 mL) und umgehend mit 6 mL Sarkosylat-Lösung (auf 37°C vorgewärmt) lysiert. Das Zelllysate wurde in Tubes überführt und mit 15 - 20 Hüben durch eine Kanüle (20 G) gezogen.

### *Aufarbeitung der Gewebeproben*

Nach Entleeren des Darmgewebes wurde das Bindegewebe entfernt und die Proben mit dem Skalpell zerkleinert. Nach Zugabe von 10 mL Lysepuffer wurde das Gewebe im Potter homogenisiert, in Tubes überführt und mit 15 - 20 Hüben durch eine Kanüle (20 G) gezogen.

### *Zentrifugation, Fraktionierung und Blot*

Ein Cäsiumchlorid-Gradient, aus vier Layern bestehend (je 2 mL, beginnend mit Lösung A), wurde in Polyallomerröhrchen vorbereitet, mit dem Zelllysate (4 mL der Zellkulturproben, 1 mL der Gewebeproben) und schließlich mit Mineralöl überschichtet. Danach wurden die Proben für 24 h bei 23 000 *g* und 20°C zentrifugiert. Der Gradient wurde, unten beginnend, in 20 Fraktionen zu je 300  $\mu$ L unterteilt. Jede Fraktion (300  $\mu$ L) wurde mit dem gleichen Volumen 25 mM Phosphatpuffer verdünnt und mittels Slot-Blot-Apparatur wurden 100  $\mu$ L jeder Fraktion auf eine Nitrozellulosemembran, die mind. 15 min in 25 mM Phosphatpuffer äquilibriert worden war, geblottet.

### *Antikörper-Inkubation und Detektion*

Die Membran wurde kurz mit 25 mM Phosphatpuffer gespült, danach 15 min in 1x TBST-Puffer und schließlich für 2,5 - 3 h bei RT in Blockierlösung geschwenkt. Nach dem Waschen in 1x TBST-Puffer (3x je 5 min) wurde die Membran in Primärantikörperlösung (1 : 300 in Blockierlösung) über Nacht bei 4°C inkubiert, wonach erneut mit 1x TBST-Puffer (3x je

5 min) gewaschen wurde. Anschließend wurden die Membranen für 2 h bei RT mit Sekundärantikörperlösung inkubiert (1 : 2000 in Blockierlösung), 3x für je 5 min in 1x TBST-Puffer gewaschen und die Lumineszenz nach Zugabe von LumiGLO-Reagenz (1 min) mithilfe der LAS4000 gemessen.

### *Bestimmung des DNA-Gehaltes*

Der DNA-Gehalt der einzelnen Fraktionen wurde am Nanodrop2000-Spektralphotometer durch Absorptionsmessung bei 260 nm bestimmt. Gleichzeitig wurde das Verhältnis der Absorptionswerte bei 260 nm zu 280 nm erfasst, was eine Aussage über die Reinheit der DNA ermöglichte.

### **Auswertung**

Das Lumineszenz-Signal (in *arbitrary units*, AU) der DNA-haltigen Fraktionen wurde integriert und auf den DNA-Gehalt (ng/μL) normiert. Die Ergebnisse der Tierstudie wurden als Box Plots dargestellt, wohingegen für die Ergebnisse der Zellkulturversuche die Werte auf die Negativkontrolle bzw. bei Koinkubations-Versuchen auf das Topoisomerase-Gift bezogen wurden (,Test over Control', T/C, %).

### **Verwendete Lösungen**

|                        |                                                                                                   |
|------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Blockierlösung         | 5% (w/v) Milchpulver in 1x TBST                                                                   |
| Cäsiumchlorid-Lösung   | 10 M CsCl in TE-Puffer                                                                            |
| CsCl-Gradient          | A: 9,3 M CsCl in TE-Puffer                                                                        |
|                        | B: 8,1 M CsCl in TE-Puffer                                                                        |
|                        | C: 5,6 M CsCl in TE-Puffer                                                                        |
|                        | D: 4,6 M CsCl in TE-Puffer                                                                        |
| Detektionslösung       | Luminollösung und Wasserstoffperoxid-Lösung im Verhältnis 1 : 1 (Western Lightning, Perkin Elmer) |
| Lysepuffer             | 1% (w/v) Sarkosylat in TE-Puffer                                                                  |
| Phosphatpuffer         | 1 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 1 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (1 : 1)               |
| Primärantikörperlösung | anti-Topoisomerase I, IIα bzw. IIβ (1 : 300 in Blockierlösung)                                    |

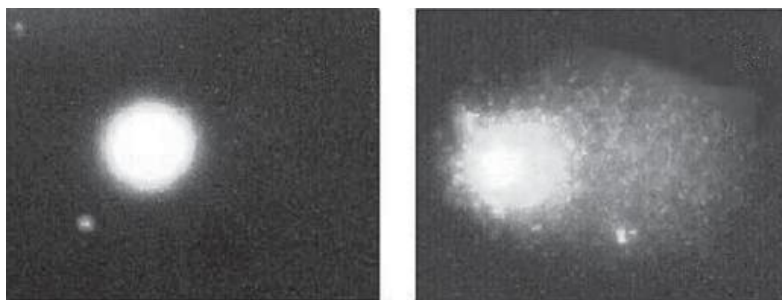
|                          |                                                                          |
|--------------------------|--------------------------------------------------------------------------|
| Sekundärantikörperlösung | anti-mouse bzw. anti-rabbit, HRP-konjugiert (1 : 2000 in Blockierlösung) |
| TBST-Puffer (10 x)       | 200 mM Tris, 1,37 M NaCl, 1% (v/v) Tween-20, pH-Wert 7,5                 |
| TE-Puffer                | 10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH-Wert 8                                     |

## 6.6. Einfluss auf die DNA-Integrität

### 6.6.1. Alkalischer Comet Assay

#### Testprinzip

Die Einzelzellgelelektrophorese (Comet Assay) findet Anwendung zur Detektion von DNA-Schäden einzelner Zellen. Im alkalischen Comet Assay werden durch den Einsatz alkalischer Puffer neben Einzel- und Doppelstrangbrüchen auch apurine und apyrimidine Stellen, DNA-Protein- sowie DNA-DNA-Crosslinks erfasst (Collins, 2004; Tice et al., 2000). Während intakte DNA bei Anlegen eines elektrischen Feldes nicht in das Gel migriert, können einzelne DNA-Bruchstücke Richtung Anode wandern (Abbildung 6.6), wodurch sich ‚Kometen‘ ausbilden. Das Migrieren der DNA aus dem Zellkern korreliert dabei eng mit der vorhandenen Anzahl an DNA-Einzel-oder Doppelstrangbrüchen.



**Abb. 6.6:** Zelle mit ungeschädigter DNA (links) und Lymphozyt mit starker DNA-Schädigung und entsprechender Schweifbildung (rechts); modifiziert nach (Collins, 2004).

#### Durchführung

##### *Vorbereiten der Objektträger*

Die raue Seite der Objektträger wurde mit einem dünnen Film heißer, normalschmelzender Agarose (NMA, 40 µL) beschichtet. Auf die Agarose-Grundierung wurden zur Anfertigung

zweier Gelpads je 60  $\mu$ L NMA nebeneinander aufgetragen und mit einem Deckglas bedeckt. Nach Aushärten der Agarose können die Objektträger bis zu ihrer Verwendung in einer feuchten Kammer gelagert werden. Vor Gebrauch wurden die Objektträger codiert.

### *Zellinkubation und –aufarbeitung*

In kleinen Petrischalen (d: 5 cm) wurden 300 000 HT29- bzw. A431-Zellen für 48 h kultiviert und danach für 1 h oder 24 h mit der jeweiligen Testsubstanz inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 2x mit je 2 mL PBS gewaschen und mit 0,5 mL Trypsin für 2 min (HT29) bzw. 8 min (A431) bei 37°C im Brutschrank behandelt. Die abgelösten Zellen wurden mit 1 mL serumhaltigem Medium in ein Eppendorfreaktionsgefäß überführt und die Zellzahl und -viabilität mittels Trypanblau-Test (Kapitel 6.2.2 und 6.4.1) ermittelt. *Einbetten der Zellen in Agarose und Zelllyse*

Aliquots der Zellsuspensionen mit 30 000 Zellen wurden zentrifugiert (425 g, 10 min, 4°C) und das Pellet in 65  $\mu$ L warmer, niedrigschmelzender Agarose (LMA) resuspendiert. Die Lösung wurde auf eines der vorbereiteten Gelpads gegeben, mit einem Deckglas abgedeckt und zum Aushärten der Agarose auf Eis gelegt. Nach Entfernen der Deckgläser wurden die Zellen in 4°C kaltem Lysepuffer über Nacht lysiert.

### *Enzym-Behandlung*

Für jede Probe wurde ein zusätzlicher Objektträger für die Enzymbehandlung vorbereitet. Nach der Zelllyse wurden die Objektträger dreimal mit 1x FPG-Puffer (je 5 min, 4°C) gewaschen. Auf die nicht zu behandelnden Proben wurden 50  $\mu$ L 1x FPG-Puffer pipettiert, während auf die zweite Hälfte der Objektträger 50  $\mu$ L FPG-Lösung (1 : 3000 in 1x FPG-Puffer) pro Gelpad aufgetragen wurden. Die Inkubation erfolgte für 30 min bei 37°C in einer Feuchtkammer.

### *Elektrophorese und Färbung*

Die Objektträger wurden anschließend in einer Elektrophoresekommer für 20 min bei 4°C mit alkalischem Elektrophoresepuffer äquilibriert, wonach sich die Elektrophorese (4°C, 20 min, 25V, ~300 mA) anschloss. Nach erfolgter Neutralisation (3x 5 min im Neutralisationspuffer, 4°C) wurden auf jedes Gelpad 30  $\mu$ L Ethidiumbromid-Lösung pipettiert und die Pads mit einem Deckglas bedeckt.

## Auswertung

Die Auswertung erfolgte am Fluoreszenzmikroskop (Quecksilberdampfampe, CY-3-Filter,  $\lambda_{\text{ex}}$ : 512 nm,  $\lambda_{\text{em}}$ : 590 nm, CCD-Kamera) mit der Software Comet Asay IV-System (Perceptive Instruments). Pro Gelpad wurde die Schweifintensität von 50 Zellen bestimmt, welche das prozentuale Verhältnis der DNA im Schweif zur DNA im Kopf beschreibt. Nach vollständiger Auswertung aller Objektträger wurden die Proben decodiert.

## Verwendete Lösungen

|                       |                                                                                                  |
|-----------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Elektrophoresepuffer  | 0,6 M NaOH, 2 mM EDTA                                                                            |
| Ethidiumbromid-Lösung | 20 µg/mL                                                                                         |
| FPG-Puffer (10x)      | 400 mM HEPES, 1 M KCl, 5 M EDTA, 2 mg/mL BSA, pH-Wert 8,0 mit KOH einstellen, Lagerung bei -20°C |
| LMA                   | 0,8% (w/v) in Phosphatpuffer                                                                     |
| Lösung für Lyse       | 89% (v/v) Lysepuffer, 10% (v/v) DMSO (p.a.), 1% (v/v) Triton X-100                               |
| Lysepuffer            | 2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, 1% (w/v) Na-Laurylsarkosylat, pH-Wert 7,5                   |
| Neutralisationspuffer | 0,4 M Tris, pH-Wert 7,5                                                                          |
| NMA                   | 0,8% (w/v) in Phosphatpuffer                                                                     |
| Phosphatpuffer        | 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1,5 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 8,1 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4$      |

### 6.6.2. Immunohistochemische Bestimmung von $\gamma\text{H2AX}$ -Foci

#### Testprinzip

Nach Erkennen eines DNA-Doppelstrangbruches werden mehrere hundert Moleküle des Histons H2AX umgehend phosphoryliert, wonach sie sich am naszierenden DNA-Strangbruch anlagern und dadurch  $\gamma\text{H2AX}$ -Foci bilden. Die Detektion von  $\gamma\text{H2AX}$ -Foci

mittels Immunofluoreszenz-Mikroskopie stellt dabei einen sensitiven Biomarker für die Erfassung von DNA-Doppelstrangbrüchen dar (Bonner et al., 2008).

### Durchführung

#### *Vorbereiten der Zellen für die Immunfärbung*

Die Zellen wurden auf Objektträgern mit Kammeraufsatz (50 000 Zellen/ Kammer) ausgestreut und über Nacht im Inkubator anwachsen gelassen. Nach erfolgter Zellinkubation wurden die Zellen mit 1x PBS gewaschen und 20 min mit 2% (v/v, in 1x PBS) Paraformaldehyd fixiert und danach in -20°C kaltem, 70% (v/v) Ethanol für mind. 20 min permeabilisiert (Nakamura et al., 2006).

#### *Färbung für die Immunofluoreszenz-Detektion*

Die Objektträger wurden für 15 min mit 1x PBS gewaschen und danach für 30 min bei RT in Blockierlösung gegeben. Die Proben wurden erneut für 5 min mit 1x PBS gewaschen und danach für 2 h bei RT mit dem Erstantikörper inkubiert (anti- $\gamma$ H2AX, 1 : 500, in PBS-TT mit 1% BSA). Nach Waschen der Proben mit 1x PBS (2x für je 5 min) erfolgte die einstündige Inkubation mit dem Zweitantikörper bei RT (1 : 500, in PBS-TT mit 1% BSA). Ungebundener Antikörper wurde durch zweimaliges Waschen mit 1x PBS (2x, je 5 min) entfernt, woraufhin die Deckgläschen nach Zugabe des „Vectashield Mounting Medium“ zur Färbung der DNA mit Propidiumiodid befestigt wurden.

### Auswertung

Die Detektion der  $\gamma$ H2AX-Foci erfolgte am konfokalen Laserscanningmikroskop (Zeiss LSM510; ausgestattet mit gekühlter CCD-Kamera) unter Verwendung der Zeiss AIM Software (Nakamura et al., 2006).

### Verwendete Lösungen

|                       |                                                                         |
|-----------------------|-------------------------------------------------------------------------|
| Blockierlösung        | 5% (w/v) BSA in PBS-TT                                                  |
| Erstantikörperlösung  | anti- $\gamma$ H2AX; 1 : 500 in PBS-TT mit 1% BSA                       |
| PBS-TT                | 0,5% Tween20; 0,1% Triton X-100; 99,4% PBS                              |
| Zweitantikörperlösung | goat-anti-mouse, konjugiert mit Alexa 488; 1 : 500 in PBS-TT mit 1% BSA |

## 6.7. Untersuchungen zur Zellzyklus-Verteilung

### Testprinzip

Durch Replikation der DNA in der S-Phase besitzen Zellen in der G<sub>2</sub>/M-Phase des Zellzyklus verglichen mit Zellen der G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-Phase den doppelten DNA-Gehalt. Dementsprechend gibt die Fluoreszenzintensität einzelner, fixierter Zellen, deren DNA mit Propidiumiodid gefärbt wurde, Aufschluss über die Zellzyklus-Phase, in der sich die Zellen zum Zeitpunkt der Fixierung befanden.

### Durchführung

#### *Zellaufarbeitung*

HT29-Zellen ( $3 \times 10^5$ ) wurden für 48 h kultiviert und danach für 24 h mit den jeweiligen Testsubstanzen inkubiert. Das Medium sowie das für die Waschschrte (2x 500 µL) verwendete 1x PBS wurde in einem Tube gesammelt, in das auch die Zellsuspension in 1 mL Medium nach Trypsin-Behandlung (500 µL) überführt wurde. Die Zellen wurden 5 min bei 450 rcf und RT mit ausgeschalteter Rotorbremse zentrifugiert und das Pellet in 1 mL 1x PBS resuspendiert. Nach erneutem Zentrifugieren unter analogen Bedingungen wurde das Pellet in 250 µL 1x PBS resuspendiert und 10 µL der Zellsuspension in Reaktionsgefäße pipettiert, in die 190 µL *ViaCount*-Lösung (Millipore) vorgelegt worden waren. Anschließend wurde die Zellzahl am Durchflusszytometer bestimmt. Entsprechende Aliquots für die Bestimmung der Apoptose-Induktion (Kapitel 6.8) wurden entnommen.

#### *Fixieren und Färben der Zellen*

Die verbliebene Zellsuspension wurde unter sanftem Vortexen zu -20°C kaltem 70% (v/v) Ethanol (6-7 mL) zugetropft und die Zellen über Nacht bei -20°C fixiert. Ein Aliquot der fixierten Zellen (2 mL) wurde bei 450 g für 5 min ohne Bremsfunktion bei RT zentrifugiert, das Pellet mit 1 mL 1x PBS gewaschen und danach erneut zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 200 µL *Guava Cell Cycle Reagent* (Millipore) resuspendiert und für 30 min im Dunkeln inkubiert. Nach Überführen der Zellsuspension in Eppendorf-Reaktionsgefäße wurden 5000 Zellen pro Probe am Durchflusszytometer (Guava easy Cyte, Millipore) gemessen.

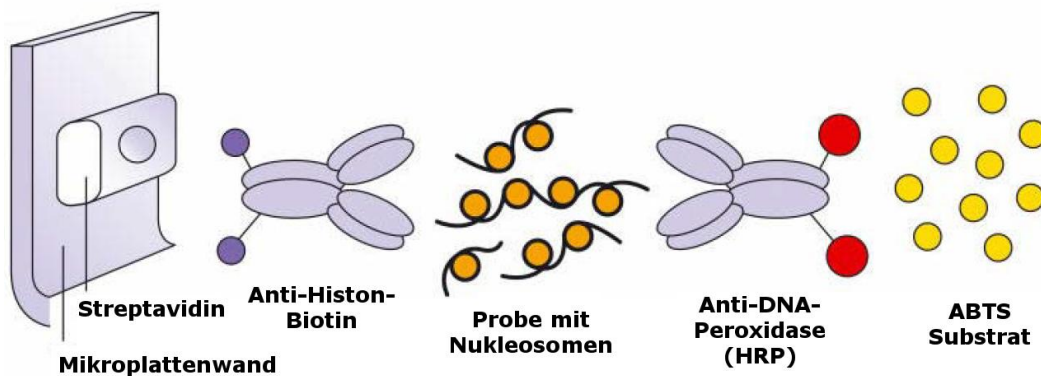
### Auswertung

Die Auswertung erfolgte mithilfe der Software Guava inCyte (Millipore).

## 6.8. Apoptose-Induktion (Cell Death Detection ELISA<sup>PLUS</sup>)

### Testprinzip

Die Bestimmung von Mono- und Oligonukleosomen im Zytoplasma infolge einer Apoptose-Induktion erfolgt photometrisch mithilfe eines Enzym-Immunoassays. Das Zelllysate wird auf eine Streptavidin-beschichtete Mikrotiterplatte aufgebracht, wonach mit einem Antikörpermisch, das gegen Histone und DNA gerichtet ist, inkubiert wird. Der Anti-Histon-Antikörper ist mit Biotin konjugiert, wodurch die Nukleosomen an die Streptavidin-beschichtete Platte gebunden werden. Nach Entfernen des ungebundenen Antikörpers wird durch Zugabe von ABTS (2,2'-Azino-bis-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)) als Substrat für die an den Anti-DNA-Antikörper gekoppelte Meerrettich-Peroxidase die Menge gebundener Nukleosomen photometrisch bestimmt (Abbildung 6.7) (Roche Applied Sciences, Schweiz).



**Abb. 6.7:** Schematische Darstellung des Testprinzips des Cell Death Detection ELISA<sup>PLUS</sup> (modifiziert nach Roche Applied Sciences, Schweiz).

### Durchführung

#### *Zellaufarbeitung und Lyse*

Die Zellaufarbeitung erfolgte wie in Kapitel 6.7 beschrieben. Nachfolgend wurde entsprechend dem Handbuch des Kits vorgegangen (Roche Applied Sciences, Schweiz). Nach Bestimmen der Zellzahl wurden Aliquots (100 000 Zellen) in 200 µL Lyse-Puffer pipettiert und für 30 min im Dunklen bei RT inkubiert. Anschließend wurde für 10 min bei 200 g und RT zentrifugiert.

### *Auftragen der Proben auf die ELISA-Platte und Detektion*

Die Proben (20 µL) wurden mittig in die einzelnen Wells der ELISA-Platte gegeben, die Inkubationslösung (80 µL) hinzugefügt und für 2 h bei 200 rpm im Schüttelinkubator bei RT inkubiert. Nach dem Waschen mit Inkubationspuffer (3x je 250 µL) wurden 100 µL ABTS hinzugefügt und erneut für 15 min bei 250 rpm inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von *ABTS Stop-Solution* beendet und die Platte für 1 min bei 200 g zentrifugiert. Anschließend wurde die Absorption bei den Wellenlängen 405 nm und 490 nm gemessen.

### **Auswertung**

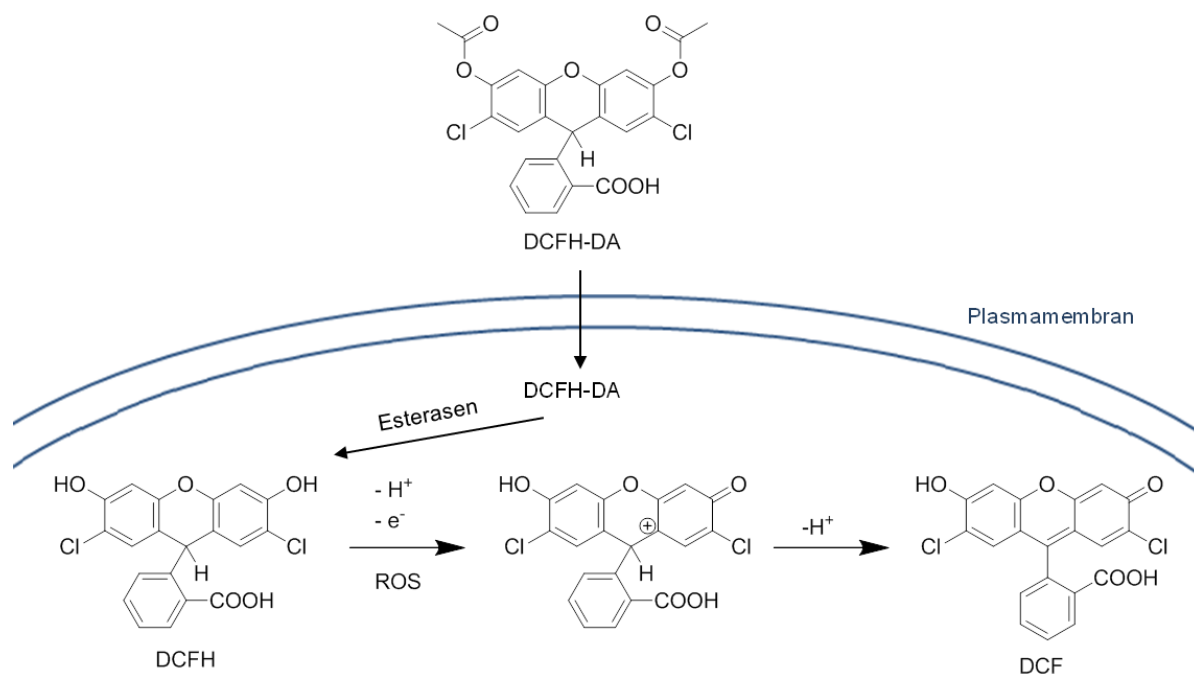
Der Background (Inkubationspuffer + *ABTS Stop-Solution*) wurde von den erhaltenen Messwerten abgezogen, wonach die Differenz der erhaltenen Werte bei 405 nm abzüglich der Werte bei 490 nm gebildet wurde (Roche Applied Sciences, Schweiz).

## **6.9. Modulation des zellulären Redoxstatus**

### **6.9.1. Dichlorofluorescein (DCF)-Assay**

#### **Testprinzip**

Intrazellulär gebildete ROS werden mithilfe einer Fluoreszenzreaktion detektiert. Das Substrat 2',7'-Dichlorofluorescein-Diacetat (DCFH-DA) ist zellpermeabel und wird durch intrazelluläre Esterasen zum nicht-fluoreszierenden 2',7'-Dichlorofluorescein (DCFH) deacetyliert. Durch intrazelluläre ROS wird DCFH zum fluoreszierenden 2',7'-Dichlorofluorescein (DCF) umgesetzt, wobei sich die Fluoreszenzintensität proportional zu dem intrazellulären ROS-Level verhält. Das Testprinzip ist in Abbildung 6.8 schematisch dargestellt.



**Abb. 6.8:** Schematische Darstellung des Testprinzips des DCF-Assays. DCFH-DA: Dichlorofluorescein-Diacetat; DCFH: Dichlorofluorescein; DCF: Dichlorofluorescein.

## Durchführung

HT29-Zellen (40 000 pro Well) wurden in einer 96-Well-Platte für 48 h kultiviert. Die Zellen wurden mit 100  $\mu$ L 1x PBS gewaschen, im Dunkeln mit 100  $\mu$ L DCFH-DA-Lösung (Endkonzentration: 50  $\mu$ M) versetzt und für 30 min im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit 1x PBS gewaschen und danach mit den jeweiligen Testsubstanzen in 100  $\mu$ L farblosem Medium inkubiert. Die Fluoreszenzintensität ( $\lambda_{\text{ex}}$ : 485 nm,  $\lambda_{\text{em}}$ : 535 nm) wurde umgehend zur Erfassung der Grundfluoreszenz gemessen und nachfolgend zu den jeweiligen Zeitpunkten detektiert.

## Auswertung

Die gemessene Fluoreszenzintensität der Triplicate abzüglich der Grundfluoreszenz wurde gemittelt, auf die Lösungsmittelkontrolle bezogen und als relative Fluoreszenzeinheiten (%) dargestellt.

## Verwendete Lösungen

DCFH-DA-Stammlösung    10 mM

### 6.9.2. Nrf2-Translokation mittels Western Blot Analyse

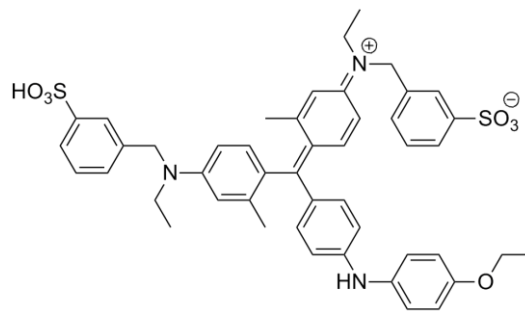
#### Testprinzip

##### *Bestimmung des Nrf2-Gehaltes im Kern*

Durch Verwendung von Lysepuffern aufsteigender Stärke wird der Zellkern vom Zytoplasma getrennt, was die Bestimmung des Nrf2-Gehaltes im Kern ermöglicht.

##### *Proteinbestimmung*

Bei der Proteinbestimmung nach Bradford bildet der Farbstoff Coomassie Brilliant Blau G-250 (Abbildung 6.9) vorwiegend mit basischen oder aromatischen Aminosäuren Komplexe, wodurch der Farbstoff infolge der Deprotonierung eine blaue Farbe ( $A_{\max}$ : 595 nm) annimmt (Bradford, 1976). Durch Anwendung des Lambert-Beer'schen Gesetzes lässt sich über Absorptionsmessung einer Standardreihe die Proteinkonzentration einer Lösung bestimmen (Compton und Jones, 1985).



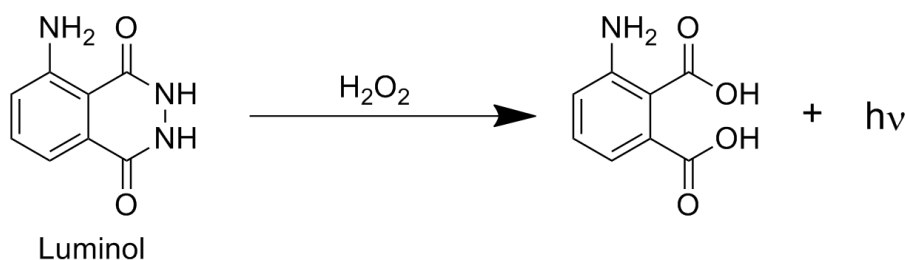
**Abb. 6.9:** Chemische Struktur von Coomassie Brilliant Blau G250.

##### *Gelelektrophorese und Western Blot*

Die Proteine der Kernfraktion werden mittels diskontinuierlicher SDS-(Natriumdodecylsulfat) Polyacrylamidgelelektrophorese entsprechend ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Zuvor erfolgt die Zugabe von Natriumdodecylsulfat (SDS) und  $\beta$ -Mercaptoethanol zur Überlagerung der Eigenladung sowie zur Denaturierung der Proteine. Durch Anlegen eines elektrischen Feldes wandern die Proteine entsprechend ihres hydrodynamischen Radius mit unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeiten. Nach Auftrennung im Polyacrylamidgel werden die Proteine mittels ‚Trans-Blot‘ auf eine Nitrozellulosemembran übertragen.

### Immunodetektion

Mittels Immunodetektion wird der Nrf2-Gehalt im Kern bestimmt. Während der Primärantikörper spezifisch das zu untersuchende Protein erkennt, bindet der Sekundärantikörper an den Erstantikörper und ist gleichzeitig mit HRP konjugiert. Durch Zugabe von Wasserstoffperoxid wird Luminol in Anwesenheit von HRP oxidiert (Abbildung 6.10), wobei die Chemolumineszenz dieser Reaktion gemessen und zur semiquantitativen Auswertung herangezogen wird.



**Abb. 6.10:** Chemolumineszenz-Reaktion von Luminol.

### Durchführung

#### Zellaufarbeitung

HT29-Zellen ( $4,5 \times 10^6$ ) wurden in Petrischalen (d: 15 cm) für 48 - 72 h kultiviert und anschließend für 1 h mit den jeweiligen Testsubstanzen behandelt. Anschließend wurde mit eiskaltem 1x PBS (2x je 5 mL) gewaschen und die Zellen mit 700 µL PBS abgeschabt. Die Zellsuspension wurde 5 min bei 800 rcf und 4°C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 200 µL Puffer A, dem 17 µL Nonidet-Lösung zugegeben worden waren, resuspendiert und für 15 min inkubiert. Anschließend wurde erneut zentrifugiert (800 rcf, 5 min, 4°C) und der Überstand in Eppendorfgefäßen als zytosolische Fraktion gesammelt. Das Pellet wurde in 65 µL Puffer B resuspendiert und für 15 min unter mehrmaligem vortexen bei 4°C inkubiert, wonach erneut zentrifugiert wurde (20 000 g, 10 min, 4°C). Der Überstand wurde als Kernfraktion gesammelt.

#### Proteinbestimmung nach Bradford

Mit Rinderserumalbumin (*bovine serum albumine*, BSA) wurde eine Standardreihe im Konzentrationsbereich von 0,2 - 1,6 mg/mL erstellt. Zu Aliquots der Proben (1 : 10 mit H<sub>2</sub>O

verdünnt) wie auch der Standardreihe von je 10 µL wurde 1 mL Bradford-Reagenz zugegeben und die Absorption von Triplikaten (200 µL) dieser Lösungen wurde bei 595 nm gemessen. Durch Erstellen einer Kalibriergeraden mittels linearer Regression wurde der Proteingehalt der einzelnen Proben bestimmt. Aliquots der Proben (360 µg Protein/mL) wurden mit 6x SDS-Probenpuffer (40 µL) versetzt und die Proteine 5 min bei 95°C und 950 rpm denaturiert.

### *Gelelektrophorese*

Für die Proteintrennung wurden Polyacrylamid-Gele in einer vertikalen, diskontinuierlichen Gelelektrophorese (PerfectBlue Doppelgelsystem Twin ExW S, Peqlab) eingesetzt. Das Trenngel (10%-Acrylamid-Anteil für Nrf2, 12% für  $\alpha$ -Tubulin) wurde mit einem Sammelgel (3,8% Acrylamid-Anteil) überschichtet und zur Ausbildung von Geltaschen Teflonkämme eingebracht. Zusätzlich wurde der Marker SeeBlue® Plus2 (Invitrogen) für die spätere Zuordnung der Molekulargewichte aufgetragen. Nach Aushärten der Gele und Entfernen der Kämme wurden die Proben (60 µg Protein) in die Taschen pipettiert und die Elektrophoresekammer mit 1x Laufpuffer befüllt. Die elektrophoretische Trennung der Proteine erfolgte 30 min bei 120 V und 90 min bei 140 V.

### *Western Blot*

Für den Transfer der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran wurden ‚Whatman Paper‘ wie auch die Membranen in Blottingpuffer äquilibriert. Nach beendeter Elektrophorese wurde das Trenngel in Blottingpuffer gespült und auf die Membran aufgebracht. Entsprechend einem Sandwich-System wurden Gel und Membran von je zwei ‚Whatman Papern‘ umfasst. Der Blot wurde unter Kühlung bei 150 mA für 75 min durchgeführt.

### *Immunodetektion*

Die Membranen wurden für 1 h bei RT in Blockierlösung geschwenkt und anschließend über Nacht mit Primärantikörperlösung bei 4°C inkubiert. Überschüssiger Antikörper wurde durch Waschen mit Waschpuffer (3x je 5 min) entfernt, wonach sich die einstündige Inkubation mit Sekundärantikörperlösung bei RT anschloss. Nach erneutem Waschen (Waschpuffer, 3x je 5 min) wurden die Membranen für 1 min mit Detektionslösung behandelt und die Chemolumineszenz mittels LAS4000 bestimmt.

## Auswertung

Die erhaltenen Chemolumineszenz-Signale wurden mithilfe der Software Multi-Gauge V3.2 integriert und die Probenwerte anschließend auf die Lösungsmittelkontrolle DMSO (T/C, %) bezogen.

## Verwendete Lösungen

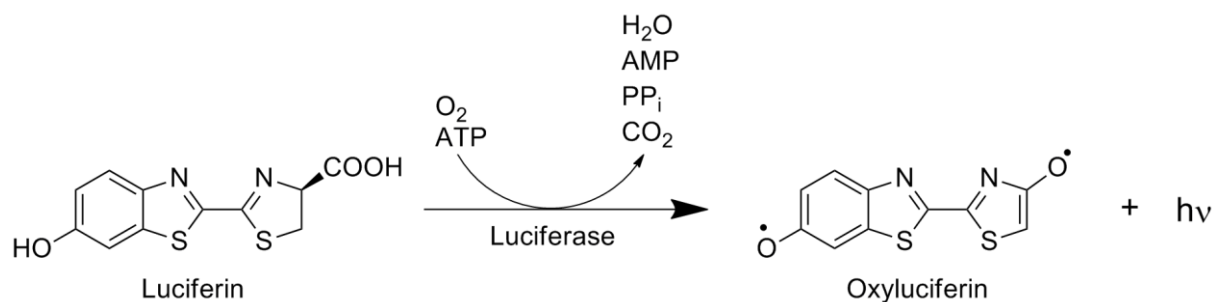
|                       |                                                                                                                                                                                                            |
|-----------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Blockierlösung        | 5% (w/v) Milchpulver, 0,1% (v/v) Tween20, in 1x TBS-Puffer                                                                                                                                                 |
| Blottingpuffer (2x)   | 78 mM Glycin, 96 mM Tris (pH-Wert 8,3), 0,074% (w/v) SDS, 40% (v/v) Methanol                                                                                                                               |
| Bradford-Lösung       | 120 µM Coomassie Brilliant Blau G250, 5% (v/v) Ethanol, 10% (v/v) Phosphorsäure, 4 Wochen vor Verwendung ansetzen, Lagerung im Dunkeln                                                                     |
| Detektionslösung      | Luminollösung und Wasserstoffperoxid-Lösung im Verhältnis 1 : 1 (Western Lightning, Perkin Elmer)                                                                                                          |
| Primärantikörper      | Anti-Nrf2 (H-300), 1 : 200 in Blockierlösung; Anti- $\alpha$ -Tubulin, 1 : 2000 in Blockierlösung                                                                                                          |
| Puffer A              | 10 mM HEPES, 10 mM KCl, 0,1 mM EDTA, 0,1 mM EGTA, pH-Wert 7,9; Zugabe direkt vor Gebrauch: 1% (v/v) DTT, 4% (v/v) Proteaseinhibitor-Mix                                                                    |
| Puffer B              | 20 mM HEPES, 400 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, pH-Wert 7,9; Zugabe direkt vor Gebrauch: 1% (v/v) DTT, 4% (v/v) Proteaseinhibitor-Mix                                                                      |
| Sammelgel (3,8%)      | 1,58 mL H <sub>2</sub> O, 0,66 mL Tris-Puffer (0,5 M, pH-Wert 6,8), 0,33 mL Acrylamidlösung (Rotiphorese Gel 30), 26,4 µL SDS (10%, w/v), 26,4 µL APS (10%, w/v), 2,64 µL TEMED (Tetramethylethylendiamin) |
| SDS-Laufpuffer (10x)  | 2 M Glycin, 250 mM Tris (pH-Wert 8,3), 1% (w/v) SDS                                                                                                                                                        |
| SDS-Probenpuffer (6x) | 0,5 M Tris (pH-Wert 6,8), 40 mL Glycerol, 1,24 g SDS, 0,16 g Bromphenolblau, 5% (v/v) $\beta$ -Mercaptoethanol, auf 100 mL mit                                                                             |

|                    |                                                                                                                                                                                                         |
|--------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                    | H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> auffüllen; direkt vor Gebrauch 52,6 µL pro Milliliter zusetzen                                                                                                       |
| Sekundärantikörper | anti-rabbit (HRP-konjugiert), 1 : 2000 in Blockierlösung; anti-mouse (HRP-konjugiert), 1 : 2500 in Blockierlösung                                                                                       |
| TBS-Puffer (20x)   | 2,6 mM NaCl, 0,4 M Tris, pH-Wert 7,6                                                                                                                                                                    |
| Trenngel (10%)     | 3,2 mL H <sub>2</sub> O, 1,9 mL Tris-Puffer (1,5 M, pH-Wert 8,8), 2,56 mL Acrylamidlösung (Rotiphorese Gel 30), 123,6 µL SDS (10%, w/v), 38,4 µL APS (10%, w/v), 3,84 µL TEMED (Tetramethylethyldiamin) |
| Trenngel (12%)     | 2,69 mL H <sub>2</sub> O, 1,9 mL Tris-Puffer (1,5 M, pH-Wert 8,8), 3,08 mL Acrylamidlösung (Rotiphorese Gel 30), 76,8 µL SDS (10%, w/v), 38,4 µL APS (10%, w/v), 3,84 µL TEMED                          |
| Waschpuffer        | 0,3% (v/v) Tween20 in 1x TBS-Puffer                                                                                                                                                                     |

### 6.9.3. Nrf2-Reportergen-Assay

#### Testprinzip

Mithilfe eines Reportergen-Assays lässt sich die Aktivierung bestimmter, regulatorischer DNA-Abschnitte bestimmen. Dabei wird mittels transienter Transfektion ein Plasmid, das für ein leicht nachweisbares Protein kodiert, in die Promotorregion des zu untersuchenden DNA-Abschnitts eingebracht. Zur Bestimmung der Aktivierung des Nrf2-Signalweges wurde in die murine GSTA1-Promotorregion das für Luciferase (*Photinus pyralis*) kodierende Gen eingebracht und CHO-Zellen mit dem Vektor transfiziert. Zusätzlich sind die CHO-Zellen mit einem Expressionsvektor für das ‚grün fluoreszierende Protein‘ (GFP) ausgestattet. Durch Aktivierung des Nrf2-Signalwegs steigt ebenfalls die Expression der Luciferase, deren Menge durch Reaktion von Luciferin zu Oxyluciferin in einer Chemolumineszenz-Reaktion erfasst wird (Abbildung 6.11). Die transfizierten CHO-Zellen wurden freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. V. Dirsch zur Verfügung gestellt.



**Abb. 6.11:** Schematische Darstellung der durch Luciferase katalysierten Reaktion.

## Durchführung

Transfizierte CHO-Zellen (60 000 pro Well) wurden in einer 96-Well-Platte für 5 h kultiviert und anschließend für 20 h mit den jeweiligen Testsubstanzen inkubiert ohne das Kulturmedium zuvor zu entfernen. Nach Waschen mit 1x PBS (mit 200 bzw. 100 µL, 37°C) wurden die Zellen über Nacht bei -80°C gelagert. Die Zellen wurden aufgetaut, 50 µL Lysepuffer pro Well zugegeben und für 10 min geschüttelt. 40 µL des Zelllysates wurden in eine schwarze 96-Well-Platte pipettiert und erneut für 1 min geschüttelt. Anschließend wurde die Intensität des GFP-Fluoreszenzsignals ( $\lambda_{\text{ex}}$ : 485 nm,  $\lambda_{\text{em}}$ : 520 nm) sowie nach Zugabe von ATP- und Luciferin-Lösung (je 50 µL) die Chemolumineszenz der Proben gemessen.

## Auswertung

Die Fluoreszenz- bzw. Chemolumineszenz-Werte der Vierfachbestimmung wurden gemittelt. Nachfolgend wurden die Lumineszenz-Werte auf die Werte des GFP-Fluoreszenz-Signals normiert und als ‚Test over Control‘ (T/C, %) auf die Lösungsmittelkontrolle DMSO bezogen.

## Verwendete Lösungen

|                  |                                                                                                                       |
|------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Lysepuffer       | 1 mM DTT (Promega), 270 mM Coenzym A-Lösung (Promega), 20% (v/v) 5x Reporter-Lysepuffer (Promega) in H <sub>2</sub> O |
| ATP-Lösung       | 5 mM ATP (Promega), 20 mM Tricin                                                                                      |
| Luciferin-Lösung | 1 mM (Promega), 20 mM Tricin                                                                                          |

## 6.10. Verzeichnis der Materialien

### Chemikalien und Lösungen

|                                        |                                    |
|----------------------------------------|------------------------------------|
| 2',7'-Dichlorofluorescein-Diacetat     | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München |
| Ammoniumperoxosulfat                   | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe |
| <i>Bovine Serum Albumin</i> Fraktion V | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe |
| Bromphenolblau                         | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München |
| Calciumchlorid                         | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe |
| Camptothecin                           | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München |
| Coomassie Brilliant Blue G250          | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe |
| 4',6-Diamin-2-phenylindol              | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe |
| di-Kaliumhydrogenphosphat              | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe |
| Dimethylsulfoxid                       | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe |
| di-Natriumhydrogenphosphat             | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe |
| Dithiothreitol                         | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe |
| Doxorubicin                            | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München |
| Essigsäure (100%)                      | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe |
| Ethanol p.a.                           | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe |
| Ethidiumbromid                         | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe |
| Ethylendiamintetraessigsäure           | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe |
| Ethylenglykoltetraessigsäure           | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München |
| Etoposid                               | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München |
| Glycin                                 | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe |
| HEPES                                  | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe |

|                                     |                                                 |
|-------------------------------------|-------------------------------------------------|
| Kaliumchlorid                       | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe              |
| Kaliumdihydrogenphosphat            | Riedel-de Haën, Honeywell, Seelze, Deutschland  |
| Kinetoplasten-DNA                   | TopoGEN Inc., Port Orange, FL, USA              |
| <i>low melting agarose</i> (LMA)    | Bio-Rad, Wien, Österreich                       |
| Luminol-Lösung 20x (LumiGlo)        | Roche Applied Science, Basel, Schweiz           |
| Magnesiumchlorid-Hexahydrat         | Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland              |
| Menadion                            | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München              |
| $\beta$ -Mercaptoethanol            | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe              |
| Methanol                            | Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland              |
| Milchpulver                         | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe              |
| N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin    | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe              |
| Natriumchlorid                      | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe              |
| Natriumdihydrogenphosphat           | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe              |
| Natriumdodecylsulfat                | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München              |
| Natriumhydrogencarbonat             | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe              |
| Natriumhydroxid                     | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe              |
| Natrium-Lauroylsarkosylat           | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München              |
| Natriumorthovanadat                 | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München              |
| Nonidet <sup>®</sup> P40 (10%)      | EuroClone S.p.A., Pero, Italien                 |
| <i>normal melting agarose</i> (NMA) | Bio-Rad, Wien, Österreich                       |
| Paraformaldehyd                     | Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, USA |
| Phenylmethylsulfonylfluorid         | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe              |

|                                           |                                          |
|-------------------------------------------|------------------------------------------|
| <i>protease inhibitor complete</i>        | Roche Applied Science, Basel, Schweiz    |
| Rotiphorese 30, Acrylamid 30%             | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe       |
| Salzsäure 37%                             | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe       |
| SeeBlue Plus2, <i>prestained standard</i> | Invitrogen, Carlsbad, CA, USA            |
| Tris(hydroxymethyl-)aminomethan           | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe       |
| Triton X-100                              | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe       |
| Tween <sup>®</sup> -20                    | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München       |
| Vectashield Mounting Medium               | Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA |
| Wasserstoffperoxid (suprapurum)           | Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland       |

### Enzyme und Antikörper

|                                        |                                             |
|----------------------------------------|---------------------------------------------|
| anti-mouse (HRP-konjugiert)            | Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland         |
| anti-Nrf2                              | Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland         |
| anti-rabbit (HRP-konjugiert)           | Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland         |
| anti-Topoisomerase I                   | Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland         |
| anti-Topoisomerase II $\alpha$         | Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland         |
| anti-Topoisomerase II $\beta$          | Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland         |
| anti- $\alpha$ -Tubulin                | Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland         |
| anti- $\gamma$ H2AX                    | Abcam, Cambridge, MA, USA                   |
| Formamidopyrimidin-DNA-Glykosylase     | New England BioLabs, Frankfurt, Deutschland |
| goat-anti-mouse (Alexa-488-konjugiert) | Invitrogen, Eugene, OR, USA                 |
| Katalase                               | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München          |

Proteinase K

Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe

### Materialien für die Zellkultur

Dulbecco's Modified Eagle's Medium

Invitrogen, Carlsbad, CA, USA

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (farblos)

Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München

Fetales Kälberserum

Invitrogen, Carlsbad, CA, USA

L-Glutamin

Invitrogen, Carlsbad, CA, USA

Penicillin/Streptomycin

Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München

Trypanblau-Lösung

Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München

Trypsin (Rinderpankreas 3,6 U/mg)

Serva GmbH, Heidelberg, Deutschland

### Zelllinien

A431 (Humane, epidermoide Karzinomzellen)

DSMZ, Braunschweig, Deutschland

CHO (*Chinese Hamster Ovary Cells*)

freundlicherweise von der AG Prof. Dr. Dirsch, Uni Wien, zur Verfügung gestellt

HCT116 (Humane Kolonkarzinomzellen)

freundlicherweise von Y. Pommier, MD., NIH, Bethesda, zur Verfügung gestellt

HT29 (Humane Kolonkarzinomzellen)

DSMZ, Braunschweig, Deutschland

HT1080 (Humane Fibrosarkomzellen)

freundlicherweise von Prof. Dr. Boege, Uni Düsseldorf, zur Verfügung gestellt

### Verwendete Kits

Amplex<sup>®</sup> Red Assay

Invitrogen, Carlsbad, CA, USA

Cell Death Detection ELISA<sup>PLUS</sup>

Roche Applied Science, Basel, Schweiz

|                                  |                                       |
|----------------------------------|---------------------------------------|
| Cytotoxicity Detection (LDH)     | Roche Applied Science, Basel, Schweiz |
| Cell Proliferation Reagent WST-1 | Roche Applied Science, Basel, Schweiz |
| Guava CellCycle Reagent          | Millipore, Hayward, CA, USA           |
| Guava ViaCount Reagent           | Millipore, Hayward, CA, USA           |

## Materialien

|                                       |                                                  |
|---------------------------------------|--------------------------------------------------|
| Coplin-Becher                         | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe               |
| Deckgläser                            | Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland         |
| Eppendorfgefäße (1,5 mL, 2 mL)        | Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland         |
| Insulin-Spritzen                      | VWR, Wien, Österreich                            |
| Kanülen (20 G)                        | VWR, Wien, Österreich                            |
| Kryoröhrchen, steril, NUNC            | VWR, Wien, Österreich                            |
| Kulturflaschen                        | Sarstedt AG & Co, Nümbrecht                      |
| Multipettenaufsätze (1, 5, 10 mL)     | Eppendorf, Wien, Österreich                      |
| Objektträger                          | Menzel-Gläser, Braunschweig                      |
| Petrischalen (d=5, 10, 20 cm)         | Sarstedt AG & Co, Nümbrecht                      |
| Pipettenspitzen (5 – 1000 µL)         | Sarstedt AG & Co, Nümbrecht                      |
| Pipettenspitzen (5000 µL)             | VWR, Wien, Österreich                            |
| Polyallomerröhrchen (14 x 95 mm)      | Beckman Coulter, Wien, Österreich                |
| TC-Platten, steril (24-Well, 96-Well) | Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland |
| TC-Platten, steril, schwarz (96-Well) | Corning, NY, USA                                 |

|                                |                                  |
|--------------------------------|----------------------------------|
| Tubes (15 mL, 50 mL)           | Sarstedt AG & Co, Nümbrecht      |
| Whatman Nitrozellulose Membran | Whatman und Schleicher & Schuell |
| Whatman Paper                  | Whatman und Schleicher & Schuell |
| Zellschaber                    | Sarstedt AG & Co, Nümbrecht      |

### Geräte

|                            |                                                                                  |
|----------------------------|----------------------------------------------------------------------------------|
| Analysenwaagen             | CP124 S, Sartorius AG, Göppingen;<br>New Classic MF, ML204/01, Mettler<br>Toledo |
| Ausschwingrotor (SW40 Ti)  | Beckmann Coulter, Wien, Österreich                                               |
| Brutschränke               | BD115, Binder                                                                    |
| Durchflusszytometer        | Guava EasyCyte, Millipore, Hayward,<br>USA                                       |
| Elektrophorese-Kammer      | Perfect-Blue™, PeqLab                                                            |
| Fluoreszenzmikroskop       | Axio Scope A1, Zeiss                                                             |
| Grobwaage                  | 1774 MP8-2, Sartorius AG, Göppingen                                              |
| Inversmikroskop            | Axiovert 40C, Zeiss                                                              |
| Konfokalmikroskop          | Zeiss LSM510                                                                     |
| Lumineszenzdetektionsgerät | LAS4000, Luminescent Image Analyser,<br>Fujifilm                                 |
| Mikrotiterplattenlesegerät | Victor <sup>3</sup> V 1240 Multilabel Counter, Perkin<br>Elmer                   |
| pH-Meter                   | pH211 Microprocessor pH Meter,<br>HANNA instruments                              |

|                                      |                                                                                                  |
|--------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Power Station für die Elektrophorese | EV231; PeqLab                                                                                    |
| Slot Blot Apparatur                  | Minifold® II Slot Blot System, Schleicher & Schuell                                              |
| Spektralphotometer                   | Nanodrop2000, PeqLab                                                                             |
| Sterilbänke                          | Hera Safe KS18, Thermo Fisher Scientific; Hera Safe KSP; Thermo Fisher Scientific                |
| Tischzentrifugen                     | 5415, 5415C, 5417R; 5804R: Eppendorf AG; Mikro 220R, Mikro 200, Rotina 420R: Hettich Zentrifugen |
| Trans-Blot Cell, 49 BR 3584          | Bio-Rad, Wien, Österreich                                                                        |
| Ultraschallbad                       | Ultrasonic Cleaner, VWR                                                                          |
| Ultrazentrifuge                      | Optima L-100 XP, Beckmann Coulter                                                                |
| UV-B-Bestrahlungskammer              | BLX-312, PeqLab                                                                                  |
| Zentrifuge                           | Zytofuge, Megafuge 1.0R, Heraeus                                                                 |

### III. Literaturverzeichnis

- Abe T. Infantile leukemia and soybeans--a hypothesis. **(1999)**. *Leukemia* 13, 317-320.
- Adlercreutz H. Phytoestrogens and breast cancer. **(2002)**. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 83, 113-118.
- Adlercreutz H, Heinonen S-M, Penalvo-Garcia J. Phytoestrogens, cancer and coronary heart disease. **(2004)**. *BioFactors* 22, 229-236.
- Adlercreutz H, Markkanen H, Watanabe S. Plasma concentrations of phyto-oestrogens in Japanese men. **(1993)**. *Lancet* 342, 1209-1210.
- Aggarwal BB, Bhardwaj A, Aggarwal RS, Seeram NP, Shishodia S, Takada Y. Role of resveratrol in prevention and therapy of cancer: preclinical and clinical studies. **(2004)**. *Anticancer Res* 24, 2783-2840.
- Akiyama T, Ishida J, Nakagawa S, et al. Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. **(1987)**. *J Biol Chem* 262, 5592-5595.
- Allred CD, Allred KF, Ju YH, et al. Dietary genistein results in larger MNU-induced, estrogen-dependent mammary tumors following ovariectomy of Sprague-Dawley rats. **(2004)**. *Carcinogenesis* 25, 211-218.
- Allred CD, Ju YH, Allred KF, Chang J, Helferich WG. Dietary genistin stimulates growth of estrogen-dependent breast cancer tumors similar to that observed with genistein. **(2001)**. *Carcinogenesis* 22, 1667-1673.
- Anderson D, Schmid TE, Baumgartner A, Cemeli-Carratala E, Brinkworth MH, Wood JM. Oestrogenic compounds and oxidative stress (in human sperm and lymphocytes in the Comet assay). **(2003)**. *Mutat Res, Rev Mutat Res* 544, 173-178.
- Andoh T, Ishida R. Catalytic inhibitors of DNA topoisomerase II. **(1998)**. *Bba-Gene Struct Expr* 1400, 155-171.
- Andres S, Abraham K, Appel KE, Lampen A. Risks and benefits of dietary isoflavones for cancer. **(2011)**. *Crit Rev Toxicol* 41, 463-506.
- Artaud-Wild SM, Connor SL, Sexton G, Connor WE. Differences in coronary mortality can be explained by differences in cholesterol and saturated fat intakes in 40 countries but not in France and Finland. A paradox. **(1993)**. *Circulation* 88, 2771-2779.
- Asensi M, Medina I, Ortega A, et al. Inhibition of cancer growth by resveratrol is related to its low bioavailability. **(2002)**. *Free Radical Biol Med* 33, 387-398.
- Ashby J. Mouse uterine carcinogenicity of genistein: the currently most secure example of non-genotoxic rodent carcinogenicity? **(2001)**. *Mutat Res, Fundam Mol Mech Mutagen* 483, 107-108.
- Ashby J, Odum J, Tinwell H. Predictive value of the uterotrophic assay for genistein carcinogenicity in the neonatal mouse: relevance to infants consuming soy-based formula. **(2001)**. *Environ Health Perspect* 109, A568-570.
- Atherton KM, Mutch E, Ford D. Metabolism of the soyabean isoflavone daidzein by CYP1A2 and the extra-hepatic CYPs 1A1 and 1B1 affects biological activity. **(2006)**. *Biochem Pharmacol* 72, 624-631.
- Azarova AM, Lin R-K, Tsai Y-C, Liu LF, Lin C-P, Lyu YL. Genistein induces topoisomerase IIbeta- and proteasome-mediated DNA sequence rearrangements: Implications in infant leukemia. **(2010)**. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 399, 66-71.
- Bailly C. Contemporary Challenges in the Design of Topoisomerase II Inhibitors for Cancer Chemotherapy. **(2012)**. *Chem Rev (Washington, DC, U S)* 112, 3611-3640.

- Bandelet OJ, Osheroff N. Bioflavonoids as Poisons of Human Topoisomerase II $\alpha$  and II $\beta$ . **(2007)**. *Biochemistry* 46, 6097-6108.
- Bandelet OJ, Osheroff N. The Efficacy of Topoisomerase II-Targeted Anticancer Agents Reflects the Persistence of Drug-Induced Cleavage Complexes in Cells. **(2008)**. *Biochemistry* 47, 11900-11908.
- Banerjee S, Li Y, Wang Z, Sarkar FH. Multi-targeted therapy of cancer by genistein. **(2008)**. *Cancer Lett (Shannon, Irel)* 269, 226-242.
- Barnes S. Evolution of the health benefits of soy isoflavones. **(1998)**. *Proc Soc Exp Biol Med* 217, 386-392.
- Bartholomew RM, Ryan DS. Lack of mutagenicity of some phytoestrogens in the salmonella/mammalian microsome assay. **(1980)**. *Mutat Res, Genet Toxicol Test* 78, 317-321.
- Baur JA, Sinclair DA. Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. **(2006)**. *Nat Rev Drug Discovery* 5, 493-506.
- Berger JM, Wang JC. Recent developments in DNA topoisomerase II structure and mechanism. **(1996)**. *Curr Opin Struct Biol* 6, 84-90.
- Billard C, Izard J-C, Roman V, et al. Comparative Antiproliferative and Apoptotic Effects of Resveratrol,  $\epsilon$ -viniferin and Vine-shots Derived Polyphenols (Vineatrols) on Chronic B Lymphocytic Leukemia Cells and Normal Human Lymphocytes. **(2002)**. *Leukemia & Lymphoma* 43, 1991-2002.
- Bishayee A. Cancer prevention and treatment with resveratrol: from rodent studies to clinical trials. **(2009)**. *Cancer Prev Res* 2, 409-418.
- Boiteux S, Gajewski E, Laval J, Dizdaroglu M. Substrate specificity of the Escherichia coli Fpg protein formamidopyrimidine-DNA glycosylase: excision of purine lesions in DNA produced by ionizing radiation or photosensitization. **(1992)**. *Biochemistry* 31, 106-110.
- Bonner WM, Redon CE, Dickey JS, et al.  $\gamma$ H2AX and cancer. **(2008)**. *Nat Rev Cancer* 8, 957-967.
- Botta B, Menedez P, Zappia G, Alves dLR, Torge R, Delle MG. Prenylated isoflavonoids: botanical distribution, structures, biological activities and biotechnological studies. An update (1995-2006). **(2009)**. *Curr Med Chem* 16, 3414-3468.
- Bouker KB, Hilakivi-Clarke L. Genistein: Does it prevent or promote breast cancer? **(2000)**. *Environ Health Perspect* 108, 701-708.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **(1976)**. *Anal Biochem* 72, 248-254.
- Branca F. Dietary phyto-oestrogens and bone health. **(2003)**. *Proc Nutr Soc* 62, 877-887.
- Branzei D, Foiani M. The DNA damage response during DNA replication. **(2005)**. *Curr Opin Cell Biol* 17, 568-575.
- Brizuela L, Dayon A, Doumerc N, et al. The sphingosine kinase-1 survival pathway is a molecular target for the tumor-suppressive tea and wine polyphenols in prostate cancer. **(2010)**. *The FASEB Journal* 24, 3882-3894.
- Bursztyka J, Perdu E, Tulliez J, et al. Comparison of genistein metabolism in rats and humans using liver microsomes and hepatocytes. **(2008)**. *Food Chem Toxicol* 46, 939-948.
- Capranico G, Binaschi M, Borgnetto ME, Zunino F, Palumbo M. A protein-mediated mechanism for the DNA sequence-specific action of topoisomerase II poisons. **(1997)**. *Trends Pharmacol Sci* 18, 323-329.
- Chachay VS, Kirkpatrick CMJ, Hickman IJ, Ferguson M, Prins JB, Martin JH. Resveratrol - pills to replace a healthy diet? **(2011)**. *Br J Clin Pharmacol* 72, 27-38.
- Champoux JJ. DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism. **(2001)**. *Annu Rev Biochem* 70, 369-413.
- Chang T-S, Ding H-Y, Lin H-C. Identifying 6,7,4'-trihydroxyisoflavone as a potent tyrosinase inhibitor. **(2005)**. *Biosci, Biotechnol, Biochem* 69, 1999-2001.

- Chang T-S, Ding H-Y, Tai SS-K, Wu C-Y. Mushroom tyrosinase inhibitory effects of isoflavones isolated from soygerm koji fermented with *Aspergillus oryzae* BCRC 32288. **(2007)**. *Food Chem* 105, 1430-1438.
- Chen J, Lin H, Hu M. Metabolism of flavonoids via enteric recycling: Role of intestinal disposition. **(2003a)**. *J Pharmacol Exp Ther* 304, 1228-1235.
- Chen M, Beck WT. Differences in inhibition of chromosome separation and G2 arrest by DNA topoisomerase II inhibitors merbarone and VM-26. **(1995)**. *Cancer Res* 55, 1509-1516.
- Chen X-m, Chen H-s, Xu M-j, Shen J-g. Targeting reactive nitrogen species: a promising therapeutic strategy for cerebral ischemia-reperfusion injury. **(2013)**. *Acta Pharmacol Sin* 34, 67-77.
- Chen Y-C, Inaba M, Abe N, Hirota A. Antimutagenic activity of 8-hydroxyisoflavones and 6-hydroxydaidzein from soybean miso. **(2003b)**. *Biosci, Biotechnol, Biochem* 67, 903-906.
- Choi EJ. The prooxidant, rather than antioxidant, acts of daidzein in vivo and in vitro: daidzein suppresses glutathione metabolism. **(2006)**. *Eur J Pharmacol* 542, 162-169.
- Choi EJ, Kim G-H. Daidzein causes cell cycle arrest at the G1 and G2/M phases in human breast cancer MCF-7 and MDA-MB-453 cells. **(2008)**. *Phytomedicine* 15, 683-690.
- Choi JS, Song J. Effect of genistein on insulin resistance, renal lipid metabolism, and antioxidative activities in ovariectomized rats. **(2009)**. *Nutrition (N Y, NY, U S)* 25, 676-685.
- Choi YH, Lee WH, Park K-Y, Zhang L. p53-independent induction of p21 (WAF1/CIP1), reduction of cyclin B1 and G2/M arrest by the isoflavone genistein in human prostate carcinoma cells. **(2000)**. *Jpn J Cancer Res* 91, 164-173.
- Clarke DB, Barnes KA, Castle L, et al. Levels of phytoestrogens, inorganic trace-elements, natural toxicants and nitrate in vegetarian duplicate diets. **(2003)**. *Food Chem* 81, 287-300.
- Clarkson TB, Anthony MS, Williams JK, Honore EK, Cline JM. The potential of soybean phytoestrogens for postmenopausal hormone replacement therapy. **(1998)**. *Proc Soc Exp Biol Med* 217, 365-368.
- Coldham NG, Sauer MJ. Pharmacokinetics of [14C]Genistein in the Rat: Gender-Related Differences, Potential Mechanisms of Biological Action, and Implications for Human Health. **(2000)**. *Toxicology and Applied Pharmacology* 164, 206-215.
- Coldham NG, Zhang A-Q, Key P, Sauer MJ. Absolute bioavailability of [14C]genistein in the rat; plasma pharmacokinetics of parent compound, genistein glucuronide and total radioactivity. **(2002)**. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* 27, 249-258.
- Colin D, Gimazane A, Lizard G, et al. Effects of resveratrol analogs on cell cycle progression, cell cycle associated proteins and 5- fluorouracil sensitivity in human derived colon cancer cells. **(2009)**. *Int J Cancer* 124, 2780-2788.
- Colin D, Lancon A, Delmas D, et al. Antiproliferative activities of resveratrol and related compounds in human hepatocyte derived HepG2 cells are associated with biochemical cell disturbance revealed by fluorescence analyses. **(2008)**. *Biochimie* 90, 1674-1684.
- Collins AR. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. **(2004)**. *Mol Biotechnol* 26, 249-261.
- Collins AR, Dobson VL, Dusinska M, Kennedy G, Stetina R. The comet assay: what can it really tell us? **(1997)**. *Mutat Res* 375, 183-193.
- Collins AR, Dusinska M, Gedik CM, Stetina R. Oxidative damage to DNA: do we have a reliable biomarker? **(1996)**. *Environ Health Perspect* 104 Suppl 3, 465-469.
- Compton SJ, Jones CG. Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. **(1985)**. *Anal Biochem* 151, 369-374.
- Constantinou A, Mehta R, Runyan C, Rao K, Vaughan A, Moon R. Flavonoids as DNA topoisomerase antagonists and poisons: structure-activity relationships. **(1995)**. *J Nat Prod* 58, 217-225.
- COT. COT Statement on the Food Standards Agency Phytoestrogens Research Programme. **(2003)**.

- Cui J, Sun R, Yu Y, Gou S, Zhao G, Wang C. Antiproliferative effect of resveratrol in pancreatic cancer cells. **(2010)**. *Phytother Res* 24, 1637-1644.
- Danks MK, Qiu J, Catapano CV, Schmidt CA, Beck WT, Fernandes DJ. Subcellular distribution of the alpha and beta topoisomerase II-DNA complexes stabilized by VM-26. **(1994)**. *Biochem Pharmacol* 48, 1785-1795.
- Darbon J-M, Penary M, Escalas N, et al. Distinct Chk2 activation pathways are triggered by genistein and DNA-damaging agents in human melanoma cells. **(2000)**. *J Biol Chem* 275, 15363-15369.
- Davis JN, Singh B, Bhuiyan M, Sarkar FH. Genistein-induced upregulation of p21WAF1, downregulation of cyclin B, and induction of apoptosis in prostate cancer cells. **(1998)**. *Nutr Cancer* 32, 123-131.
- Day AJ, Canada FJ, Diaz JC, et al. Dietary flavonoid and isoflavone glycosides are hydrolyzed by the lactase site of lactase phlorizin hydrolase. **(2000)**. *FEBS Lett* 468, 166-170.
- De KMJJ, Van dSYT, Wilson PWF, et al. Intake of dietary phytoestrogens is low in postmenopausal women in the United States: the framingham study. **(2001)**. *J Nutr* 131, 1826-1832.
- Delmas D, Aires V, Limagne E, et al. Transport, stability, and biological activity of resveratrol. **(2011)**. *Ann N Y Acad Sci* 1215, 48-59.
- Deweese JE, Osheroff N. The DNA cleavage reaction of topoisomerase II: wolf in sheep's clothing. **(2009)**. *Nucleic Acids Res* 37, 738-748.
- Di VAL, Iwami K, Watjen W, Kahl R, Degen GH. Genotoxicity of the isoflavones genistein, daidzein and equol in V-79 cells. **(2004)**. *Toxicol Lett* 151, 151-162.
- Ding H, Duan W, Zhu W-G, et al. p21 response to DNA damage induced by genistein and etoposide in human lung cancer cells. **(2003)**. *Biochem Biophys Res Commun* 305, 950-956.
- DiPaola RS. To Arrest or Not To G2-M Cell-Cycle Arrest : Commentary re: A. K. Tyagi et al., Silibinin Strongly Synergizes Human Prostate Carcinoma DU145 Cells to Doxorubicin-induced Growth Inhibition, G2-M Arrest, and Apoptosis. Clin. Cancer Res., 8: 3512-3519, 2002. **(2002)**. *Clinical Cancer Research* 8, 3311-3314.
- Dixon RA, Ferreira D. Genistein. **(2002)**. *Phytochemistry* 60, 205-211.
- Dohadwala MM, Vita JA. Grapes and cardiovascular disease. **(2009)**. *J Nutr* 139, 1788S-1793S.
- Downes CS, Mullinger AM, Johnson RT. Inhibitors of DNA topoisomerase II prevent chromatid separation in mammalian cells but do not prevent exit from mitosis. **(1991)**. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 8895-8899.
- Drake FH, Hofmann GA, Mong SM, et al. In vitro and intracellular inhibition of topoisomerase II by the antitumor agent merbarone. **(1989)**. *Cancer Res* 49, 2578-2583.
- Du X-L, Gao Z, Lau C-P, et al. Differential effects of tyrosine kinase inhibitors on volume-sensitive chloride current in human atrial myocytes: Evidence for dual regulation by Src and EGFR kinases. **(2004)**. *J Gen Physiol* 123, 427-439.
- Eisenbrand G. Isoflavones as phytoestrogens in food supplements and dietary foods for special medical purposes: Opinion of the Senate Commission on Food Safety (SKLM) of the German Research Foundation (DFG) - (shortened version). **(2007)**. *Mol Nutr Food Res* 51, 1305-1312.
- Empl MT, Macke S, Winterhalter P, et al. The growth of the canine glioblastoma cell line D-GBM and the canine histiocytic sarcoma cell line DH82 is inhibited by the resveratrol oligomers hopeaphenol and r2-viniferin. **(2012)**. *Veterinary and Comparative Oncology* 9999, n/a-n/a.
- Esaki H, Shirasaki T, Yamashita K, Nakamura Y, Kawakishi S, Osawa T. Absorption and Excretion of the 8-Hydroxydaidzein in Rats after Oral Administration and Its Antioxidant Effect. **(2005)**. *J Nutr Sci Vitaminol* 51, 80-86.
- Esselen M, Barth SW, Winkler S, et al. Anthocyanins suppress the cleavable complex formation by irinotecan and diminish its DNA strand breaking activity in the colon of Wistar rats. **(2012)**. *Carcinogenesis*.

- Esselen M, Fritz J, Hutter M, Marko D. Delphinidin Modulates the DNA-Damaging Properties of Topoisomerase II Poisons. **(2009)**. *Chem Res Toxicol* 22, 554-564.
- Evans BAJ, Griffiths K, Morton MS. Inhibition of 5 $\alpha$ -reductase in genital skin fibroblasts and prostate tissue by dietary lignans and isoflavonoids. **(1995)**. *J Endocrinol* 147, 295-302.
- Fang N, Yu S, Badger TM. Comprehensive phytochemical profile of soy protein isolate. **(2004)**. *J Agric Food Chem* 52, 4012-4020.
- Felix CA. Leukemias related to treatment with DNA topoisomerase II inhibitors. **(2001)**. *Med Pediatr Oncol* 36, 525-535.
- Felix CA, Kolaris CP, Osheroff N. Topoisomerase II and the etiology of chromosomal translocations. **(2006)**. *DNA Repair* 5, 1093-1108.
- Fortune JM, Osheroff N. Merbarone inhibits the catalytic activity of human topoisomerase II $\alpha$  by blocking DNA cleavage. **(1998)**. *J Biol Chem* 273, 17643-17650.
- Fortune JM, Osheroff N. Topoisomerase II as a target for anticancer drugs: when enzymes stop being nice. **(2000)**. *Progress in nucleic acid research and molecular biology* 64, 221-253.
- Foti P, Erba D, Riso P, Spadafranca A, Criscuoli F, Testolin G. Comparison between daidzein and genistein antioxidant activity in primary and cancer lymphocytes. **(2005)**. *Arch Biochem Biophys* 433, 421-427.
- Franke AA, Custer LJ. Daidzein and genistein concentrations in human milk after soy consumption. **(1996)**. *Clinical Chemistry* 42, 955-964.
- Fridrich D, Kern M, Pahlke G, et al. Apple polyphenols diminish the phosphorylation of the epidermal growth factor receptor in HT29 colon carcinoma cells. **(2007)**. *Mol Nutr Food Res* 51, 594-601.
- Fritz J **(2004)** Untersuchungen zur Beeinflussung humaner Topoisomerasen und der DNA-Integrität durch Polyphenole aus Beerenfrüchten. *Diplomarbeit*, TU Kaiserslautern
- Froyen EB, Steinberg FM. Soy isoflavones increase quinone reductase in hepa-1c1c7 cells via estrogen receptor beta and nuclear factor erythroid 2-related factor 2 binding to the antioxidant response element. **(2011)**. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 22, 843-848.
- Fukutake M, Takahashi M, Ishida K, Kawamura H, Sugimura T, Wakabayashi K. Quantification of genistein and genistin in soybeans and soybean products. **(1996)**. *Food Chem Toxicol* 34, 457-461.
- Furuta T, Takemura H, Liao Z-Y, et al. Phosphorylation of Histone H2AX and Activation of Mre11, Rad50, and Nbs1 in Response to Replication-dependent DNA Double-strand Breaks Induced by Mammalian DNA Topoisomerase I Cleavage Complexes. **(2003)**. *J Biol Chem* 278, 20303-20312.
- Gedik CM, Wood SG, Collins AR. Measuring oxidative damage to DNA; HPLC and the Comet assay compared. **(1998)**. *Free Radical Res* 29, 609-615.
- Giri AK, Lu L-JW. Genetic damage and the inhibition of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced genetic damage by the phytoestrogens, genistein and daidzein, in female ICR mice. **(1995)**. *Cancer Lett (Shannon, Ire)* 95, 125-133.
- Goldberg DM, Yan J, Soleas GJ. Absorption of three wine-related polyphenols in three different matrices by healthy subjects. **(2003)**. *Clin Biochem* 36, 79-87.
- Guo JM, Xiao BX, Liu DH, et al. Biphasic effect of daidzein on cell growth of human colon cancer cells. **(2004)**. *Food and Chemical Toxicology* 42, 1641-1646.
- Gupta YK, Briyal S. Protective effect of vineatrol against kainic acid induced seizures, oxidative stress and on the expression of heat shock proteins in rats. **(2006)**. *European Neuropsychopharmacology* 16, 85-91.
- Hadi SM, Ullah MF, Azmi AS, et al. Resveratrol Mobilizes Endogenous Copper in Human Peripheral Lymphocytes Leading to Oxidative DNA Breakage: A Putative Mechanism for Chemoprevention of Cancer. **(2010)**. *Pharm Res* 27, 979-988.

- Harikumar KB, Aggarwal BB. Resveratrol: a multitargeted agent for age-associated chronic diseases. **(2008)**. *Cell Cycle* 7, 1020-1035.
- Harvey JS, Howe JR, Lynch AM, Rees RW. The results of five coded compounds: genistein, metaproterenol, rotenone, p-anisidine and resorcinol tested in the pH 6.7 Syrian hamster embryo cell morphological transformation assay. **(2005)**. *Mutagenesis* 20, 51-56.
- Hawkins AJ, Golding SE, Khalil A, Valerie K. DNA double-strand break - induced pro-survival signaling. **(2011)**. *Radiother Oncol* 101, 13-17.
- Hearnshaw H, Brown JM, Cumming IA, Goding JR, Nairn M. Endocrinological and histopathological aspects of the infertility in the ewe caused by oestrogenic clover. **(1972)**. *J Reprod Fertil* 28, 160-161.
- Hedlund TE, van BA, Johannes WU, Nordeen SK, Ogden LG. Prostatic fluid concentrations of isoflavonoids in soy consumers are sufficient to inhibit growth of benign and malignant prostatic epithelial cells in vitro. **(2006)**. *Prostate (Hoboken, NJ, U S)* 66, 557-566.
- Heinonen S-M, Hoikkala A, Wähälä K, Adlercreutz H. Metabolism of the soy isoflavones daidzein, genistein and glycitein in human subjects.: Identification of new metabolites having an intact isoflavonoid skeleton. **(2003)**. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 87, 285-299.
- Heiss EH, Schilder YDC, Dirsch VM. Chronic Treatment with Resveratrol Induces Redox Stress- and Ataxia Telangiectasia-mutated (ATM)-dependent Senescence in p53-positive Cancer Cells. **(2007)**. *J Biol Chem* 282, 26759-26766.
- Hibasami H, Esaki H, Kataoka T, Takaue S, Kawakishi S. Human stomach cancer cells undergo apoptosis by genistein, but not other genistein- and daidzein-related compounds. **(2003)**. *J Herbs, Spices Med Plants* 10, 39-48.
- Hirota A, Inaba M, Chen Y-C, et al. Isolation of 8-hydroxyglycitein and 6-hydroxydaidzein from soybean miso. **(2004)**. *Biosci, Biotechnol, Biochem* 68, 1372-1374.
- Holden JA. DNA topoisomerases as anticancer drug targets: from the laboratory to the clinic. **(2001)**. *Curr Med Chem: Anti-Cancer Agents* 1, 1-25.
- Howes JB, Howes LG. Content of isoflavone-containing preparations. **(2002)**. *Med J Aust* 176, 135-136.
- Huang J, Nasr M, Kim Y, Matthews HR. Genistein inhibits protein histidine kinase. **(1992)**. *J Biol Chem* 267, 15511-15515.
- Huang KS, Lin M, Cheng GF. Anti-inflammatory tetramers of resveratrol from the roots of *Vitis amurensis* and the conformations of the seven-membered ring in some oligostilbenes. **(2001)**. *Phytochemistry* 58, 357-362.
- Huang R-Q, Fang M-J, Dillon GH. The tyrosine kinase inhibitor genistein directly inhibits GABAA receptors. **(1999)**. *Mol Brain Res* 67, 177-183.
- Hubbard BP, Gomes AP, Dai H, et al. Evidence for a Common Mechanism of SIRT1 Regulation by Allosteric Activators. **(2013)**. *Science* 339, 1216-1219.
- IARC (2008) World Cancer Report 2008.
- Jacobs A, Wegewitz U, Sommerfeld C, Grossklaus R, Lampen A. Efficacy of isoflavones in relieving vasomotor menopausal symptoms - A systematic review. **(2009)**. *Mol Nutr Food Res* 53, 1084-1097.
- Jang M, Cai L, Udeani GO, et al. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. **(1997)**. *Science (Washington, D C)* 275, 218-220.
- Jang MH, Piao XL, Kim HY, et al. Resveratrol oligomers from *Vitis amurensis* attenuate  $\beta$ -amyloid-induced oxidative stress in PC12 cells. **(2007)**. *Biol Pharm Bull* 30, 1130-1134.
- Jefferson WN, Patisaul HB, Williams CJ. Reproductive consequences of developmental phytoestrogen exposure. **(2012)**. *Reproduction (Bristol, U K)* 143, 247-260.

- Jin S, Zhang QY, Kang XM, Wang JX, Zhao WH. Daidzein induces MCF-7 breast cancer cell apoptosis via the mitochondrial pathway. **(2010)**. *Ann Oncol* 21, 263-268.
- Jo J-Y, Gonzalez dME, Lila MA. Effects of grape cell culture extracts on human topoisomerase II catalytic activity and characterization of active fractions. **(2005)**. *J Agric Food Chem* 53, 2489-2498.
- Jo J-Y, Gonzalez dME, Lila MA. Catalytic Inhibition of Human DNA Topoisomerase II by Interactions of Grape Cell Culture Polyphenols. **(2006)**. *J Agric Food Chem* 54, 2083-2087.
- Ju B-G, Lunyak VV, Perissi V, et al. A topoisomerase II $\beta$ -mediated dsDNA break required for regulated transcription. **(2006a)**. *Science (Washington, DC, U S)* 312, 1798-1802.
- Ju YH, Fultz J, Allred KF, Doerge DR, Helferich WG. Effects of dietary daidzein and its metabolite, equol, at physiological concentrations on the growth of estrogen-dependent human breast cancer (MCF-7) tumors implanted in ovariectomized athymic mice. **(2006b)**. *Carcinogenesis* 27, 856-863.
- Kalbe C, Mau M, Rehfeldt C. Developmental changes and the impact of isoflavones on mRNA expression of IGF-I receptor, EGF receptor and related growth factors in porcine skeletal muscle cell cultures. **(2008)**. *Growth Hormone & IGF Research* 18, 424-433.
- Kalfalah FM, Mielke C, Christensen MO, Baechler S, Marko D, Boege F. Genotoxicity of dietary, environmental and therapeutic topoisomerase II poisons is uniformly correlated to prolongation of enzyme DNA residence. **(2011)**. *Mol Nutr Food Res* 55, S127-S142.
- Kallio M, Lahdetie J. Effects of the DNA topoisomerase II inhibitor merbarone in male mouse meiotic divisions in vivo: cell cycle arrest and induction of aneuploidy. **(1997)**. *Environ Mol Mutagen* 29, 16-27.
- Kaludjerovic J, Franke AA, Ward WE. Circulating isoflavonoid levels in CD-1 mice: effect of oral versus subcutaneous delivery and frequency of administration. **(2012)**. *J Nutr Biochem* 23, 437-442.
- Kampkoetter A, Chovolou Y, Kulawik A, et al. Isoflavone daidzein possesses no antioxidant activities in cell-free assays but induces the antioxidant enzyme catalase. **(2008)**. *Nutr Res (N Y, NY, U S)* 28, 620-628.
- Kang JH, Park YH, Choi SW, Yang EK, Lee WJ. Resveratrol derivatives potently induce apoptosis in human promyelocytic leukemia cells. **(2003)**. *Exp Mol Med* 35, 467-474.
- Kansanen E, Kuosmanen SM, Leinonen H, Levonen A-L. The Keap1-Nrf2 pathway: Mechanisms of activation and dysregulation in cancer. **(2013)**. *Redox Biology* 1, 45-49.
- Kaufmann WK. Human topoisomerase II function, tyrosine phosphorylation and cell cycle checkpoints. **(1998)**. *Proc Soc Exp Biol Med* 217, 327-334.
- Kedzierska M, Olas B. Oxidative stress in breast cancer. **(2012)**. *Kosmos (Krakow, Pol)* 61, 547-555.
- Kielbassa C, Roza L, Epe B. Wavelength dependence of oxidative DNA damage induced by UV and visible light. **(1997)**. *Carcinogenesis* 18, 811-816.
- Kikuchi Y, Shimamura Y, Hirokado M, Yasuda K, Nishijima M. Daily intake of isoflavones based on the market basket method. **(2001)**. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi* 42, 122-127.
- Kim EJ, Shin H-K, Park JHY. Genistein Inhibits Insulin-Like Growth Factor-I Receptor Signaling in HT-29 Human Colon Cancer Cells: A Possible Mechanism of the Growth Inhibitory Effect of Genistein. **(2005)**. *J Med Food* 8, 431-438.
- Kim HJ, Chang EJ, Bae SJ, et al. Cytotoxic and antimutagenic stilbenes from seeds of *Paeonia lactiflora*. **(2002)**. *Arch Pharmacol Res* 25, 293-299.
- King RA, Bursill DB. Plasma and urinary kinetics of the isoflavones daidzein and genistein after a single soy meal in humans. **(1998)**. *Am J Clin Nutr* 67, 867-872.
- Klaunig JE, Wang Z, Pu X, Zhou S. Oxidative stress and oxidative damage in chemical carcinogenesis. **(2011)**. *Toxicology and Applied Pharmacology* 254, 86-99.

- Klein CB, King AA. Genistein genotoxicity: Critical considerations of in vitro exposure dose. **(2007)**. *Toxicology and Applied Pharmacology* 224, 1-11.
- Kuiper GGJM, Lemmen JG, Carlsson B, et al. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor  $\beta$ . **(1998)**. *Endocrinology* 139, 4252-4263.
- Kulling SE, Honig DM, Metzler M. Oxidative Metabolism of the Soy Isoflavones Daidzein and Genistein in Humans in Vitro and in Vivo. **(2001)**. *J Agric Food Chem* 49, 3024-3033.
- Kulling SE, Honig DM, Simat TJ, Metzler M. Oxidative in Vitro Metabolism of the Soy Phytoestrogens Daidzein and Genistein. **(2000)**. *J Agric Food Chem* 48, 4963-4972.
- Kulling SE, Lehmann L, Metzler M. Oxidative metabolism and genotoxic potential of major isoflavone phytoestrogens. **(2002)**. *J Chromatogr B* 777, 211-218.
- Kulling SE, Metzler M. Induction of micronuclei, DNA strand breaks and HPRT mutations in cultured Chinese hamster V79 cells by the phytoestrogen coumestrol. **(1997)**. *Food Chem Toxicol* 35, 605-613.
- Kumi-Diaka J, Sanderson N-A, Hall A. The mediating role of caspase-3 protease in the intracellular mechanism of genistein-induced apoptosis in human prostatic carcinoma cell lines, DU145 and LNCaP. **(2000)**. *Biol Cell* 92, 595-604.
- Kundu JK, Surh Y-J. Cancer chemopreventive and therapeutic potential of resveratrol: Mechanistic perspectives. **(2008)**. *Cancer Lett (Shannon, Irel)* 269, 243-261.
- Kurose A, Tanaka T, Huang X, et al. Assessment of ATM phosphorylation on Ser-1981 induced by DNA topoisomerase I and II inhibitors in relation to Ser-139-histone H2AX phosphorylation, cell cycle phase, and apoptosis. **(2005)**. *Cytometry A* 68A, 1-9.
- Kurzer MS. Phytoestrogen supplement use by women. **(2003)**. *J Nutr* 133, 1983S-1986S.
- Kurzer MS, Xu X. Dietary Phytoestrogens. **(1997)**. *Annu Rev Nutr* 17, 353-381.
- Kuzumaki T, Kobayashi T, Ishikawa K. Genistein induces p21Cip1/WAF1 expression and blocks the G1 to S phase transition in mouse fibroblast and melanoma cells. **(1998)**. *Biochem Biophys Res Commun* 251, 291-295.
- Lagouge M, Argmann C, Gerhart-Hines Z, et al. Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1 $\alpha$ . **(2006)**. *Cell (Cambridge, MA, U S)* 127, 1109-1122.
- Lamartiniere CA. Protection against breast cancer with genistein: a component of soy. **(2000)**. *Am J Clin Nutr* 71, 1705S-1707S.
- Lamartiniere CA, Cotroneo MS, Fritz WA, Wang J, Mentor-Marcel R, Elgavish A. Genistein chemoprevention: timing and mechanisms of action in murine mammary and prostate. **(2002)**. *J Nutr* 132, 552S-558S.
- Langcake P, Pryce RJ. The production of resveratrol by *Vitis vinifera* and other members of the Vitaceae as a response to infection or injury. **(1976)**. *Physiol Plant Pathol* 9, 77-86.
- Larkin T, Price WE, Astheimer L. The key importance of soy isoflavone bioavailability to Understanding health benefits. **(2008)**. *Crit Rev Food Sci Nutr* 48, 538-552.
- Larsen AK, Escargueil AE, Skladanowski A. Catalytic topoisomerase II inhibitors in cancer therapy. **(2003)**. *Pharmacol Ther* 99, 167-181.
- LeBlanc MR. Cultivar, Juice Extraction, Ultra Violet Irradiation and Storage Influence the Stilbene Content of Muscadine Grapes (*Vitis Rotundifolia* Michx.). **(2005)**.
- Lee D-E, Lee K-W, Jung S-K, et al. 6,7,4'-Trihydroxyisoflavone inhibits HCT-116 human colon cancer cell proliferation by targeting CDK1 and CDK2. **(2011)**. *Carcinogenesis* 32, 629-635.
- Lehmann L, Esch HL, Wagner J, Rohnstock L, Metzler M. Estrogenic and genotoxic potential of equol and two hydroxylated metabolites of Daidzein in cultured human Ishikawa cells. **(2005)**. *Toxicol Lett* 158, 72-86.
- Leone S, Basso E, Polticelli F, Cozzi R. Resveratrol acts as a topoisomerase II poison in human glioma cells. **(2012)**. *Int J Cancer* 131, E173-E178.

- Leone S, Cornetta T, Basso E, Cozzi R. Resveratrol induces DNA double-strand breaks through human topoisomerase II interaction. **(2010)**. *Cancer Lett (Shannon, Irel)* 295, 167-172.
- Lewis RW, Brooks N, Milburn GM, et al. The Effects of the Phytoestrogen Genistein on the Postnatal Development of the Rat. **(2003)**. *Toxicol Sci* 71, 74-83.
- Li W, Kong A-N. Molecular mechanisms of Nrf2-mediated antioxidant response. **(2009)**. *Mol Carcinog* 48, 91-104.
- Liby K, Hock T, Yore MM, et al. The Synthetic Triterpenoids, CDDO and CDDO-Imidazolidine, Are Potent Inducers of Heme Oxygenase-1 and Nrf2/ARE Signaling. **(2005)**. *Cancer Res* 65, 4789-4798.
- Limer JL, Speirs V. Phyto-oestrogens and breast cancer chemoprevention. **(2004)**. *Breast Cancer Res* 6, 119-127.
- Lindberg MK, Weihua Z, Andersson N, et al. Estrogen receptor specificity for the effects of estrogen in ovariectomized mice. **(2002)**. *J Endocrinol* 174, 167-178.
- Lindl T, Gstraunthaler G (2008) Zell- und Gewebekultur, vol 6. Auflage
- Lippi G, Franchini M, Guidi GC. Red wine and cardiovascular health: the "French Paradox" revisited. **(2010)**. *Int J Wine Res* 2, 1-7.
- Lo Y-L. A potential daidzein derivative enhances cytotoxicity of epirubicin on human colon adenocarcinoma Caco-2 cells. **(2013)**. *Int J Mol Sci* 14, 158-176.
- Lo Y-L, Wang W, Ho C-T. 7,3',4'-Trihydroxyisoflavone modulates multidrug resistance transporters and induces apoptosis via production of reactive oxygen species. **(2012)**. *Toxicology* 302, 221-232.
- Loewe S. LF, Spohr E. Ueber weibliche Sexualhormone (Thelytropine). . **(1927)**. *Biochemische Zeitschrift* 180, 1-26.
- Lopez-Lazaro M, Willmore E, Austin CA. Cells Lacking DNA Topoisomerase II $\beta$  are Resistant to Genistein. **(2007)**. *J Nat Prod* 70, 763-767.
- Lundh TJO, Pettersson H, Kiessling KH. Demethylation and conjugation of formononetin and daidzein in sheep and cow liver microsomes. **(1988)**. *J Agric Food Chem* 36, 22-25.
- Lynch A, Harvey J, Aylott M, et al. Investigations into the concept of a threshold for topoisomerase inhibitor-induced clastogenicity. **(2003)**. *Mutagenesis* 18, 345-353.
- MacDonald RS, Guo J, Copeland J, et al. Environmental influences on isoflavones and saponins in soybeans and their role in colon cancer. **(2005)**. *J Nutr* 135, 1239-1242.
- Macke S, Jerz G, Empl MT, Steinberg P, Winterhalter P. Activity-Guided Isolation of Resveratrol Oligomers from a Grapevine-Shoot Extract Using Countercurrent Chromatography. **(2012)**. *J Agric Food Chem* 60, 11919-11927.
- Malumbres M, Barbacid M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. **(2009)**. *Nature reviews Cancer* 9, 153-166.
- Mann GE, Bonacasa B, Ishii T, Siow RCM. Targeting the redox sensitive Nrf2-Keap1 defense pathway in cardiovascular disease: protection afforded by dietary isoflavones. **(2009)**. *Curr Opin Pharmacol* 9, 139-145.
- Marel A-K, Lizard G, Izard J-C, Latruffe N, Delmas D. Inhibitory effects of trans-resveratrol analogs molecules on the proliferation and the cell cycle progression of human colon tumoral cells. **(2008)**. *Molecular Nutrition & Food Research* 52, 538-548.
- Marques FZ, Markus MA, Morris BJ. Resveratrol: Cellular actions of a potent natural chemical that confers a diversity of health benefits. **(2009)**. *Int J Biochem Cell Biol* 41, 2125-2128.
- Matsukawa Y, Marui N, Sakai T, et al. Genistein arrests cell cycle progression at G2-M. **(1993)**. *Cancer Res* 53, 1328-1331.
- Matsukawa Y, Sato F, Sakai T Effects of flavonoids on cell cycle and differentiation in cancer cells. In, 1997. p 623-626

- Matthies A, Loh G, Blaut M, Braune A. Daidzein and genistein are converted to equol and 5-hydroxy-equol by human intestinal *Slackia isoflavoniconvertens* in gnotobiotic rats. **(2012)**. *J Nutr* 142, 40-46.
- Mattivi F, Vrhovsek U, Malacarne G, et al. Profiling of resveratrol oligomers, important stress metabolites, accumulating in the leaves of hybrid *Vitis vinifera* (Merzling × Teroldego) genotypes infected with *Plasmopara viticola*. **(2011)**. *J Agric Food Chem* 59, 5364-5375.
- Mau M, Kalbe C, Wollenhaupt K, Nuernberg G, Rehfeldt C. IGF-I- and EGF-dependent DNA synthesis of porcine myoblasts is influenced by the dietary isoflavones genistein and daidzein. **(2008)**. *Domest Anim Endocrinol* 35, 281-289.
- Maubach J, Bracke ME, Heyerick A, et al. Quantitation of soy-derived phytoestrogens in human breast tissue and biological fluids by high-performance liquid chromatography. **(2003)**. *J Chromatogr, B: Anal Technol Biomed Life Sci* 784, 137-144.
- Mazur W. Phytoestrogen content in foods. **(1998)**. *Baillieres Clin Endocrinol Metab* 12, 729-742.
- McClain RM, Wolz E, Davidovich A, Bausch J. Genetic toxicity studies with genistein. **(2006)**. *Food Chem Toxicol* 44, 42-55.
- McClendon AK, Osheroff N. DNA topoisomerase II, genotoxicity, and cancer. **(2007)**. *Mutat Res* 623, 83-97.
- McKinnon PJ, Caldecott KW. DNA strand break repair and human genetic disease. **(2007)**. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 8, 37-55.
- McMichael-Phillips DF, Harding C, Morton M, et al. Effects of soy-protein supplementation on epithelial proliferation in the histologically normal human breast. **(1998)**. *Am J Clin Nutr* 68, 1431S-1436S.
- Mense SM, Hei TK, Ganju RK, Bhat HK. Phytoestrogens and breast cancer prevention: Possible mechanisms of action. **(2008)**. *Environ Health Perspect* 116, 426-433.
- Messina M, Bennink M. Soyfoods, isoflavones and risk of colonic cancer: a review of the in vitro and in vivo data. **(1998)**. *Baillieres Clin Endocrinol Metab* 12, 707-728.
- Messina MJ, Persky V, Setchell KDR, Barnes S. soy intake and cancer risk: a review of the in vitro and in vivo data. **(1994)**. *Nutr Cancer* 21, 113-131.
- Messing E, Gee JR, Saltzstein DR, et al. A phase 2 cancer chemoprevention biomarker trial of isoflavone G-2535 (Genistein) in presurgical bladder cancer patients. **(2012)**. *Cancer Prev Res* 5, 621-630.
- Meyer KN, Kjeldsen E, Straub T, et al. Cell cycle-coupled relocation of types I and II topoisomerases and modulation of catalytic enzyme activities. **(1997)**. *J Cell Biol* 136, 775-788.
- Miltyk W, Craciunescu CN, Fischer L, et al. Lack of significant genotoxicity of purified soy isoflavones (genistein, daidzein, and glycitein) in 20 patients with prostate cancer. **(2003)**. *Am J Clin Nutr* 77, 875-882.
- Misra RR, Hursting SD, Perkins SN, et al. Genotoxicity and Carcinogenicity Studies of Soy Isoflavones. **(2002)**. *Int J Toxicol* 21, 277-285.
- Mitsuishi Y, Motohashi H, Yamamoto M. The Keap1-Nrf2 system in cancers: Stress response and anabolic metabolism. **(2012)**. *Frontiers in Oncology* 2.
- Mokni M, Elkahoui S, Limam F, Amri M, Aouani E. Effect of Resveratrol on Antioxidant Enzyme Activities in the Brain of Healthy Rat. **(2007)**. *Neurochem Res* 32, 981-987.
- Moller P. The alkaline comet assay: towards validation in biomonitoring of DNA damaging exposures. **(2006)**. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 98, 336-345.
- Morito K, Aomori T, Hirose T, et al. Interaction of phytoestrogens with estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$  (II). **(2002)**. *Biol Pharm Bull* 25, 48-52.
- Morris SM, Chen JJ, Domon OE, et al. p53, mutations, and apoptosis in genistein-exposed human lymphoblastoid cells. **(1998)**. *Mutat Res, Fundam Mol Mech Mutagen* 405, 41-56.

- Mortensen A, Kulling SE, Schwartz H, et al. Analytical and compositional aspects of isoflavones in food and their biological effects. **(2009)**. *Molecular Nutrition & Food Research* 53, S266-S309.
- Morton MS, Chan PSF, Cheng C, et al. Lignans and isoflavonoids in plasma and prostatic fluid in men: samples from Portugal, Hong Kong, and the United Kingdom. **(1997)**. *Prostate (N Y)* 32, 122-128.
- Mueller C, Ullmann K, Wilkens A, Winterhalter P, Toyokuni S, Steinberg P. Potent antioxidative activity of vineatrol 30 grapevine-shoot extract. **(2009)**. *Biosci, Biotechnol, Biochem* 73, 1831-1836.
- Murata M, Midorikawa K, Koh M, Umezawa K, Kawanishi S. Genistein and Daidzein Induce Cell Proliferation and Their Metabolites Cause Oxidative DNA Damage in Relation to Isoflavone-Induced Cancer of Estrogen-Sensitive Organs. **(2004)**. *Biochemistry* 43, 2569-2577.
- Murphy E. Estrogen Signaling and Cardiovascular Disease. **(2011)**. *Circulation Research* 109, 687-696.
- Nakagawa H, Hasumi K, Woo J-T, Nagai K, Wachi M. Generation of hydrogen peroxide primarily contributes to the induction of Fe(II)-dependent apoptosis in Jurkat cells by (-)-epigallocatechin gallate. **(2004)**. *Carcinogenesis* 25, 1567-1574.
- Nakamura A, Sedelnikova OA, Redon C, et al. Techniques for  $\gamma$ -H2AX detection. **(2006)**. *Methods Enzymol* 409, 236-250.
- Nevo-Koch E **(2010)** Untersuchungen zur antikanzerogenen Wirkung des Weinrebenextraktes Vineatrol®30 und der darin enthaltenen Resveratrol-Oligomeren. Tierärztliche Hochschule Hannover
- Newbold RR, Banks EP, Bullock B, Jefferson WN. Uterine adenocarcinoma in mice treated neonatally with genistein. **(2001)**. *Cancer Res* 61, 4325-4328.
- Nguyen T, Nioi P, Pickett CB. The Nrf2-Antioxidant Response Element Signaling Pathway and Its Activation by Oxidative Stress. **(2009)**. *J Biol Chem* 284, 13291-13295.
- Nguyen T, Sherratt PJ, Pickett CB. Regulatory mechanisms controlling gene expression mediated by the antioxidant response element. **(2003)**. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 43, 233-260.
- Nielsen ILF, Williamson G. Review of the factors affecting bioavailability of soy isoflavones in humans. **(2007)**. *Nutr Cancer* 57, 1-10.
- Nitiss JL. DNA topoisomerase II and its growing repertoire of biological functions. **(2009a)**. *Nat Rev Cancer* 9, 327-337.
- Nitiss JL. Targeting DNA topoisomerase II in cancer chemotherapy. **(2009b)**. *Nat Rev Cancer* 9, 338-350.
- Noguchi E. The DNA Replication Checkpoint and Preserving Genomic Integrity During DNA Synthesis. **(2010)**. *Nature Education* 3, 46.
- Nurmi T, Mazur W, Heinonen S, Kokkonen J, Adlercreutz H. Isoflavone content of the soy based supplements. **(2002)**. *J Pharm Biomed Anal* 28, 1-11.
- Oesterreich S, Zhang P, Guler RL, et al. Re-expression of estrogen receptor  $\alpha$  in estrogen receptor  $\alpha$ -negative MCF-7 cells restores both estrogen and insulin-like growth factor-mediated signaling and growth. **(2001)**. *Cancer Res* 61, 5771-5777.
- Ohyama M, Tanaka T, Ito T, Iinuma M, Bastow KF, Lee K-H. Antitumor agents 200.1 cytotoxicity of naturally occurring resveratrol oligomers and their acetate derivatives. **(1999)**. *Bioorg Med Chem Lett* 9, 3057-3060.
- Opie LH, Lecour S. The red wine hypothesis: from concepts to protective signalling molecules. **(2007)**. *Eur Heart J* 28, 1683-1693.
- Osburn WO, Kensler TW. Nrf2 signaling: An adaptive response pathway for protection against environmental toxic insults. **(2008)**. *Mutat Res, Rev Mutat Res* 659, 31-39.

- Park S-J, Ahmad F, Philp A, et al. Resveratrol Ameliorates Aging-Related Metabolic Phenotypes by Inhibiting cAMP Phosphodiesterases. **(2012)**. *Cell (Cambridge, MA, U S)* 148, 421-433.
- Patel KR, Brown VA, Jones DJL, et al. Clinical Pharmacology of Resveratrol and Its Metabolites in Colorectal Cancer Patients. **(2010)**. *Cancer Res* 70, 7392-7399.
- Perez-Vizcaino F, Duarte J, Andriantsitohaina R. Endothelial function and cardiovascular disease: effects of quercetin and wine polyphenols. **(2006)**. *Free Radical Res* 40, 1054-1065.
- Peterson G. Evaluation of the biochemical targets of genistein in tumor cells. **(1995)**. *J Nutr* 125, 784S-789S.
- Peterson G, Barnes S. Genistein and biochanin A inhibit the growth of human prostate cancer cells but not epidermal growth factor receptor tyrosine autophosphorylation. **(1993)**. *Prostate (N Y)* 22, 335-345.
- Pezzuto JM, Kondratyuk TP, Shalaev E. Cancer chemoprevention by wine polyphenols and resveratrol. In, 2006. p 239-258
- Podhorecka M, Skladanowski A, Bozko P. H2AX Phosphorylation: Its Role in DNA Damage Response and Cancer Therapy. **(2010)**. *Journal of Nucleic Acids* 2010.
- Pommier Y. DNA topoisomerase I and II in cancer chemotherapy: Update and perspectives. **(1993)**. *Cancer Chemother Pharmacol* 32, 103-108.
- Pommier Y. Topoisomerase I inhibitors: camptothecins and beyond. **(2006)**. *Nature reviews Cancer* 6, 789-802.
- Pommier Y. Drugging Topoisomerases: Lessons and Challenges. **(2013)**. *ACS Chem Biol* 8, 82-95.
- Pommier Y, Leo E, Zhang H, Marchand C. DNA Topoisomerases and Their Poisoning by Anticancer and Antibacterial Drugs. **(2010)**. *Chem Biol* 17, 421-433.
- Pommier Y, Pourquier P, Fan Y, Strumberg D. Mechanism of action of eukaryotic DNA topoisomerase I and drugs targeted to the enzyme. **(1998)**. *Biochim Biophys Acta* 1400, 83-105.
- Pool-Zobel BL, Adlercreutz H, Glei M, et al. Isoflavonoids and lignans have different potentials to modulate oxidative genetic damage in human colon cells. **(2000)**. *Carcinogenesis* 21, 1247-1252.
- Poot M, Hiller K-H, Heimpel S, Hoehn H. Distinct Patterns of Cell Cycle Disturbance Elicited by Compounds Interfering with DNA Topoisomerase I and II Activity. **(1995)**. *Experimental Cell Research* 218, 326-330.
- Porter AG, Janicke RU. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. **(1999)**. *Cell Death Differ* 6, 99-104.
- Quideau S, Deffieux D, Pouysegur L. Resveratrol still has something to say about aging! **(2012)**. *Angew Chem, Int Ed* 51, 6824-6826.
- Rao CV, Wang C-X, Simi B, et al. Enhancement of Experimental Colon Cancer by Genistein. **(1997)**. *Cancer Res* 57, 3717-3722.
- Rasheed S, Nelson-Rees WA, Toth EM, Arnstein P, Gardner MB. Characterization of a newly derived human sarcoma cell line (HT-1080). **(1974)**. *Cancer* 33, 1027-1033.
- Record IR, Jannes M, Dreosti IE, King RA. Induction of micronucleus formation in mouse splenocytes by the soy isoflavone genistein in vitro but not in vivo. **(1995)**. *Food Chem Toxicol* 33, 919-922.
- Renaud S, de Lorgeril M. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. **(1992)**. *Lancet* 339, 1523-1526.
- Rolfe BG. Flavones and isoflavones as inducing substances of legume nodulation. **(1988)**. *BioFactors* 1, 3-10.
- Romain C, Gaillet S, Carillon J, et al. Vineatrol and Cardiovascular Disease: Beneficial Effects of a Vine-Shoot Phenolic Extract in a Hamster Atherosclerosis Model. **(2012)**. *J Agric Food Chem* 60, 11029-11036.

- Roser S, Pool-Zobel BL, Rechkemmer G. Contribution of apoptosis to responses in the Comet assay. **(2001)**. *Mutat Res, Genet Toxicol Environ Mutagen* 497, 169-175.
- Ross JA. Dietary flavonoids and the MLL gene: a pathway to infant leukemia? **(2000)**. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 4411-4413.
- Ross JA, Potter JD, Reaman GH, Pendergrass TW, Robison LL. Maternal exposure to potential inhibitors of DNA topoisomerase II and infant leukemia (United States): A report from the Children's Cancer Group. **(1996)**. *Cancer Causes and Control* 7, 581-590.
- Ross JA, Potter JD, Robison LL. Infant leukemia, topoisomerase II inhibitors, and the MLL gene. **(1994)**. *J Natl Cancer Inst* 86, 1678-1680.
- Ruefer CE, Bub A, Moeseneder J, Winterhalter P, Stuetz M, Kulling SE. Pharmacokinetics of the soybean isoflavone daidzein in its aglycone and glucoside form: a randomized, double-blind, crossover study. **(2008)**. *Am J Clin Nutr* 87, 1314-1323.
- Ruefer CE, Maul R, Donauer E, Fabian EJ, Kulling SE. In vitro and in vivo metabolism of the soy isoflavone glycitein. **(2007)**. *Mol Nutr Food Res* 51, 813-823.
- Rüfer CE, Kulling SE. Antioxidant Activity of Isoflavones and Their Major Metabolites Using Different in Vitro Assays. **(2006)**. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54, 2926-2931.
- Rupp H, Zoller O, Zimmerli B. Determination of the isoflavones daidzein and genistein in soy-containing products. **(2000)**. *Mitt Lebensmittelunters Hyg* 91, 199-223.
- Rushworth SA, MacEwan DJ. The role of Nrf2 and cytoprotection in regulating chemotherapy resistance of human leukemia cells. **(2011)**. *Cancers* 3, 1605-1621.
- Saiko P, Szakmary A, Jaeger W, Szekeres T. Resveratrol and its analogs: Defense against cancer, coronary disease and neurodegenerative maladies or just a fad? **(2008)**. *Mutat Res, Rev Mutat Res* 658, 68-94.
- Salti GI, Grewal S, Mehta RR, Das GTK, Boddie AW, Jr., Constantinou AI. Genistein induces apoptosis and topoisomerase II-mediated DNA breakage in colon cancer cells. **(2000)**. *Eur J Cancer* 36, 796-802.
- Salvi M, Brunati AM, Clari G, Toninello A. Interaction of genistein with the mitochondrial electron transport chain results in opening of the membrane transition pore. **(2002)**. *Biochim Biophys Acta, Bioenerg* 1556, 187-196.
- Saw CLL, Kong A-NT. Nuclear factor-erythroid 2-related factor 2 as a chemopreventive target in colorectal cancer. **(2011)**. *Expert Opinion on Therapeutic Targets* 15, 281-295.
- Scalbert A, Manach C, Morand C, Remesy C, Jimenez L. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. **(2005)**. *Crit Rev Food Sci Nutr* 45, 287-306.
- Scalbert A, Williamson G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. **(2000)**. *J Nutr* 130, 2073S-2085S.
- Schmidt F, Knobbe CB, Frank B, Wolburg H, Weller M. The topoisomerase II inhibitor, genistein, induces G2/M arrest and apoptosis in human malignant glioma cell lines. **(2008)**. *Oncol Rep* 19, 1061-1066.
- Schmitt E, Lehmann L, Metzler M, Stopper H. Hormonal and genotoxic activity of resveratrol. **(2002)**. *Toxicol Lett* 136, 133-142.
- Schmitt E, Metzler M, Jonas R, Dekant W, Stopper H. Genotoxic activity of four metabolites of the soy isoflavone daidzein. **(2003)**. *Mutat Res, Genet Toxicol Environ Mutagen* 542, 43-48.
- Sedelnikova OA, Pilch DR, Redon C, Bonner WM. Histone H2AX in DNA damage and repair. **(2003)**. *Cancer Biol Ther* 2, 233-235.
- Seike N, Wanibuchi H, Morimura K, et al. Enhancement of lung carcinogenesis by nonylphenol and genistein in a F344 rat multiorgan carcinogenesis model. **(2003)**. *Cancer Lett (Shannon, Ire)* 192, 25-36.

- Seo H-S, DeNardo DG, Jacquot Y, et al. Stimulatory effect of genistein and apigenin on the growth of breast cancer cells correlates with their ability to activate ER alpha. **(2006)**. *Breast Cancer Res Treat* 99, 121-134.
- Sepehr E, Cooke G, Robertson P, Gilani GS. Bioavailability of soy isoflavones in rats. Part I: Application of accurate methodology for studying the effects of gender and source of isoflavones. **(2007)**. *Mol Nutr Food Res* 51, 799-812.
- Setchell KD, Zimmer-Nechemias L, Cai J, Heubi JE. Isoflavone content of infant formulas and the metabolic fate of these phytoestrogens in early life. **(1998)**. *The American Journal of Clinical Nutrition* 68, 1453S-1461S.
- Setchell KDR, Brown NM, Desai P, et al. Bioavailability of pure isoflavones in healthy humans and analysis of commercial soy isoflavone supplements. **(2001)**. *J Nutr* 131, 1362S-1375S.
- Setchell KDR, Faughnan MS, Avades T, et al. Comparing the pharmacokinetics of daidzein and genistein with the use of <sup>13</sup>C-labeled tracers in premenopausal women. **(2003)**. *Am J Clin Nutr* 77, 411-419.
- Sfakianos J, Coward L, Kirk M, Barnes S. Intestinal and biliary excretion of the isoflavone Genistein in rats. **(1997)**. *J Nutr* 127, 1260-1268.
- Shankar S, Singh G, Srivastava RK. Chemoprevention by resveratrol: molecular mechanisms and therapeutic potential. **(2007)**. *Front Biosci* 12, 4839-4854.
- Shelnutt SR, Cimino CO, Wiggins PA, Ronis MJJ, Badger TM. Pharmacokinetics of the glucuronide and sulfate conjugates of genistein and daidzein in men and women after consumption of a soy beverage. **(2002)**. *Am J Clin Nutr* 76, 588-594.
- Shishodia S, Aggarwal BB. Resveratrol: a polyphenol for all seasons. **(2006)**. *Oxid Stress Dis* 20, 1-15.
- Sies H. Strategies of antioxidant defense. **(1993)**. *Eur J Biochem* 215, 213-219.
- Signorelli P, Ghidoni R. Resveratrol as an antiproliferative agent for cancer. **(2006)**. *Oxid Stress Dis* 20, 57-83.
- Smoliga JM, Baur JA, Hausenblas HA. Resveratrol and health - A comprehensive review of human clinical trials. **(2011)**. *Mol Nutr Food Res* 55, 1129-1141.
- Solier S, Pommier Y. The apoptotic ring: a novel entity with phosphorylated histones H2AX and H2B and activated DNA damage response kinases. **(2009)**. *Cell Cycle* 8, 1853-1859.
- Sordet O, Khan QA, Kohn KW, Pommier Y. Apoptosis induced by topoisomerase inhibitors. **(2003)**. *Curr Med Chem: Anti-Cancer Agents* 3, 271-290.
- Sotheeswaran S, Pasupathy V. Distribution of resveratrol oligomers in plants. **(1993)**. *Phytochemistry* 32, 1083-1092.
- Sporn MB, Liby KT. NRF2 and cancer: the good, the bad and the importance of context. **(2012)**. *Nat Rev Cancer* 12, 564-571.
- Steinberg P. Resveratrol oligomers: a new class of natural anti-carcinogens? **(2011)**. *Ernaehr-Umsch* 58, 366-371.
- Stervbo U, Vang O, Bonnesen C. A review of the content of the putative chemopreventive phytoalexin resveratrol in red wine. **(2006)**. *Food Chem* 101, 449-457.
- Stewart N, Hicks GG, Paraskevas F, Mowat M. Evidence for a second cell cycle block at G2/M by p53. **(1995)**. *Oncogene* 10, 109-115.
- Stopper H, Schmitt E, Kobras K. Genotoxicity of phytoestrogens. **(2005)**. *Mutat Res, Fundam Mol Mech Mutagen* 574, 139-155.
- Strick R, Strissel PL, Borgers S, Smith SL, Rowley JD. Dietary bioflavonoids induce cleavage in the MLL gene and may contribute to infant leukemia. **(2000)**. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97, 4790-4795.

- Su S-J, Chow N-H, Kung M-L, Hung T-C, Chang K-L. Effects of soy isoflavones on apoptosis induction and G2-M arrest in human hepatoma cells involvement of caspase-3 activation, Bcl-2 and Bcl-XL downregulation, and Cdc2 kinase activity. **(2003)**. *Nutr Cancer* 45, 113-123.
- Subramanian D, Furbee CS, Muller MT. ICE bioassay. Isolating in vivo complexes of enzyme to DNA. **(2001)**. *Methods Mol Biol* 95, 137-147.
- Sun NJ, Woo SH, Cassady JM, Snapka RM. DNA polymerase and topoisomerase II inhibitors from *Psoralea corylifolia*. **(1998)**. *J Nat Prod* 61, 362-366.
- Tang L-J, Chen X, Sun Y-N, et al. Synthesis and biological studies of 4',7,8-trihydroxy-isoflavone metal complexes. **(2011)**. *J Inorg Biochem* 105, 1623-1629.
- Tang S, Hu J, Meng Q, et al. Daidzein Induced Apoptosis via Down-Regulation of Bcl-2/Bax and Triggering of the Mitochondrial Pathway in BGC-823 Cells. **(2013)**. *Cell Biochem Biophys* 65, 197-202.
- Taylor CK, Levy RM, Elliott JC, Burnett BP. The effect of genistein aglycone on cancer and cancer risk: a review of in vitro, preclinical, and clinical studies. **(2009)**. *Nutr Rev* 67, 398-415.
- Taylor RC, Cullen SP, Martin SJ. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. **(2008)**. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 231-241.
- Thompson LU, Boucher BA, Liu Z, Cotterchio M, Kreiger N. Phytoestrogen content of foods consumed in Canada, including isoflavones, lignans, and coumestan. **(2006)**. *Nutr Cancer* 54, 184-201.
- Tice RR, Agurell E, Anderson D, et al. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **(2000)**. *Environ Mol Mutagen* 35, 206-221.
- Timmers S, Auwerx J, Schrauwen P. The journey of resveratrol from yeast to human. **(2012)**. *Aging (Albany NY)* 4, 146-158.
- Todaka E, Sakurai K, Fukata H, et al. Fetal exposure to phytoestrogens—The difference in phytoestrogen status between mother and fetus. **(2005)**. *Environmental Research* 99, 195-203.
- Tominaga Y, Wang A, Wang RH, Wang X, Cao L, Deng CX. Genistein inhibits Brca1 mutant tumor growth through activation of DNA damage checkpoints, cell cycle arrest, and mitotic catastrophe. **(2007)**. *Cell Death Differ* 14, 472-479.
- Tsai-Pflugfelder M, Liu LF, Liu AA, et al. Cloning and sequencing of cDNA encoding human DNA topoisomerase II and localization of the gene to chromosome region 17q21-22. **(1988)**. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 7177-7181.
- Tyagi A, Singh RP, Agarwal C, Siriwardana S, Sclafani RA, Agarwal R. Resveratrol causes Cdc2-tyr15 phosphorylation via ATM/ATR-Chk1/2-Cdc25C pathway as a central mechanism for S phase arrest in human ovarian carcinoma Ovar-3 cells. **(2005)**. *Carcinogenesis* 26, 1978-1987.
- Unfer V, Casini ML, Costabile L, Mignosa M, Gerli S, Di RGC. Endometrial effects of long-term treatment with phytoestrogens: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. **(2004)**. *Fertil Steril* 82, 145-148.
- van Waalwijk van Doorn-Khosrovani SB, Janssen J, Maas LM, Godschalk RWL, Nijhuis JG, van Schooten FJ. Dietary flavonoids induce MLL translocations in primary human CD34+ cells. **(2007)**. *Carcinogenesis* 28, 1703-1709.
- Vos SM, Tretter EM, Schmidt BH, Berger JM. All tangled up: how cells direct, manage and exploit topoisomerase function. **(2011)**. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12, 827-841.
- Wakai K, Egami I, Kato K, et al. Dietary intake and sources of isoflavones among Japanese. **(1999)**. *Nutr Cancer* 33, 139-145.
- Walle T. Bioavailability of resveratrol. **(2011)**. *Ann N Y Acad Sci* 1215, 9-15.
- Walle T, Hsieh F, DeLegge MH, Oatis JE, Jr., Walle UK. High absorption but very low bioavailability of oral resveratrol in humans. **(2004)**. *Drug Metab Dispos* 32, 1377-1382.

- Wang H-Z, Zhang Y, Xie L-P, Yu X-Y, Zhang R-Q. Effects of genistein and daidzein on the cell growth, cell cycle, and differentiation of human and murine melanoma cells. **(2002)**. *J Nutr Biochem* 13, 421-426.
- Wang JC. DNA topoisomerases. **(1996)**. *Annu Rev Biochem* 65, 635-692.
- Watanabe K, Yamada N, Takeuchi Y. Oxidative DNA damage in cucumber cotyledons irradiated with ultraviolet light. **(2006)**. *J Plant Res* 119, 239-246.
- Watanabe S, Yamaguchi M, Sobue T, et al. Pharmacokinetics of soybean isoflavones in plasma, urine and feces of men after ingestion of 60 g baked soybean powder (Kinako). **(1998)**. *J Nutr* 128, 1710-1715.
- Wee LM, Long LH, Whiteman M, Halliwell B. Factors affecting the ascorbate- and phenolic-dependent generation of hydrogen peroxide in Dulbecco's Modified Eagles medium. **(2003)**. *Free Radical Res* 37, 1123-1130.
- Willenberg I, Brauer W, Empl MT, Schebb NH. Development of a rapid LC-UV method for the investigation of chemical and metabolic stability of resveratrol oligomers. **(2012)**. *J Agric Food Chem* 60, 7844-7850.
- Wilstermann AM, Osheroff N. Stabilization of eukaryotic topoisomerase II-DNA cleavage complexes. **(2003)**. *Current topics in medicinal chemistry* 3, 321-338.
- Wu Q, Wang M, Simon JE. Determination of isoflavones in red clover and related species by high-performance liquid chromatography combined with ultraviolet and mass spectrometric detection. **(2003)**. *J Chromatogr, A* 1016, 195-209.
- Wuttke W, Jarry H, Seidlova-Wuttke D. Isoflavones-Safe food additives or dangerous drugs? **(2007)**. *Ageing Res Rev* 6, 150-188.
- Xu J, Wang Q, Wang S, Sun J. Study on mutagenicity of genistein. **(2003)**. *Zhongcaoyao* 34, 353-355.
- Yan G-R, Yin X-F, Xiao C-L, Tan Z-L, Xu S-H, He Q-Y. Identification of novel signaling components in genistein-regulated signaling pathways by quantitative phosphoproteomics. **(2011)**. *J Proteomics* 75, 695-707.
- Yang X, Li W, Prescott ED, Burden SJ, Wang JC. DNA topoisomerase II $\beta$  and neural development. **(2000)**. *Science (Washington, D C)* 287, 131-134.
- Ye R, Goodarzi AA, Kurz EU, et al. The isoflavonoids genistein and quercetin activate different stress signaling pathways as shown by analysis of site-specific phosphorylation of ATM, p53 and histone H2AX. **(2004)**. *DNA Repair* 3, 235-244.
- Yen G-C, Lai H-H. Inhibition of reactive nitrogen species effects in vitro and in vivo by isoflavones and soy-based food extracts. **(2003)**. *J Agric Food Chem* 51, 7892-7900.
- Zghonda N, Yoshida S, Araki M, et al. Greater effectiveness of  $\epsilon$ -viniferin in red wine than its monomer resveratrol for inhibiting vascular smooth muscle cell proliferation and migration. **(2011)**. *Biosci, Biotechnol, Biochem* 75, 1259-1267.
- Zhang A, Lyu YL, Lin C-P, et al. A Protease Pathway for the Repair of Topoisomerase II-DNA Covalent Complexes. **(2006)**. *J Biol Chem* 281, 35997-36003.
- Zhang Y, Jayaprakasam B, Seeram NP, Olson LK, DeWitt D, Nair MG. Insulin Secretion and Cyclooxygenase Enzyme Inhibition by Cabernet Sauvignon Grape Skin Compounds. **(2004)**. *J Agric Food Chem* 52, 228-233.
- Zheng L-F, Wei Q-Y, Cai Y-J, et al. DNA damage induced by resveratrol and its synthetic analogues in the presence of Cu (II) ions: Mechanism and structure-activity relationship. **(2006)**. *Free Radical Biol Med* 41, 1807-1816.

#### IV. Abstract Deutsch

Die Zahl kommerziell erhältlicher Nahrungsergänzungsmittel, die hohe Mengen an Isoflavonen oder Stilbenen enthalten, nimmt stetig zu. Allerdings ist bislang wenig über potentiell nachteilige Effekte dieser Präparate bekannt. Im Fokus dieser Arbeit standen daher Untersuchungen zum Einfluss einzelner Isoflavone sowie eines stilbenreichen Extraktes auf Topoisomerasen und die DNA-Integrität.

Genistein führte sowohl in humanen Fibrosarkomzellen (HT1080) als auch im Darmgewebe männlicher Ratten zu einer Stabilisierung des kovalenten Topoisomerase II-DNA-Intermediates und wirkt damit als Topoisomerase-Gift. Nach subkutaner Applikation waren dabei stärkere Effekte zu beobachten als nach oraler Aufnahme des Isoflavons. Sowohl im Kolon als auch im Plasma der Tiere konnten Genistein-Konzentrationen im niedrigen mikromolaren Bereich nachgewiesen werden, die auch in Säuglingen erreicht werden können, wenn diese mit Soja-basierter Anfangsnahrung ernährt werden.

Die im oxidativen Stoffwechsel gebildeten Daidzein-Metabolite, 6-Hydroxydaidzein und 8-Hydroxydaidzein, bewirkten sowohl im zellfreien System als auch in Zellkultur eine katalytische Hemmung der Topoisomerase II-Aktivität, die vermutlich zu ihren antiproliferativen und DNA-strangbrechenden Eigenschaften in humanen Kolonkarzinomzellen (HT29) beiträgt. Im Gegensatz dazu zeigte die Muttersubstanz keinen Einfluss auf Topoisomerasen, die DNA-Integrität, oder das Zellwachstum. Dies unterstreicht die Notwendigkeit, bei der toxikologischen Bewertung von Daidzein dessen Metabolite zu berücksichtigen.

Zudem wurde gezeigt, dass der stilbenreiche Weinrebensprösslingextrakt Vineatrol®30 im zellfreien System eine potente Unterdrückung der katalytischen Topoisomerase II-Aktivität bewirken kann und DNA-schädigendes Potential in humanen, epidermoiden Vulvakarzinomzellen (A431) besitzt. Die Resveratrol-Tetramere r2-Viniferin und Hopeaphenol sowie das Resveratrol-Dimer  $\epsilon$ -Viniferin konnten als bioaktive Komponenten von Vineatrol®30 bestimmt werden.

Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Isoflavone wie auch der Weinrebensprösslingextrakt zeigten eine Hemmung der Topoisomerase II-Aktivität, die, zumindest teilweise, zur beobachteten DNA-schädigenden Wirkung dieser Substanzen beiträgt. Mögliche nachteilige Effekte für den Menschen sind daher nicht auszuschließen, jedoch sind weitere Untersuchungen zur Bioverfügbarkeit und den tatsächlich erreichten

Gewebs- und Plasmakonzentrationen im Menschen erforderlich, um eine Aussage über die physiologische Relevanz der Ergebnisse und ein potentielles Gesundheitsrisiko treffen zu können.

## V. Abstract English

The number of dietary supplements containing high amounts of isoflavones or stilbenes is increasing due to their potential chemopreventive effects. Yet, little is known about possible adverse effects of such substances. Therefore, the present work investigated the influence of certain isoflavones and a grapevine-shoot extract rich in stilbenes on topoisomerases and DNA-integrity.

The isoflavone genistein was found to stabilize covalent topoisomerase II-DNA-intermediates, thus acting as topoisomerase II poison both in fibrosarcoma cells (HT1080) and in the gut of male rats. Here, subcutaneous application of genistein proved to be more potent than oral administration. Genistein concentrations measured in plasma and colon were in the low micromolar range, which is comparable with reported levels in infants receiving soy-based infant formula.

In addition, two oxidative metabolites of daidzein, 6-hydroxydaidzein and 8-hydroxydaidzein, potently inhibited the catalytic activity of topoisomerase II. Further, such oxidative metabolites exhibited antiproliferative and genotoxic properties in human colon carcinoma cells (HT29) which might be topoisomerase II-mediated. Daidzein did not affect topoisomerases, DNA integrity or cell growth. Accordingly, oxidative metabolism may substantially alter the biologic activity of daidzein, highlighting the importance of including the metabolites into risk assessment of the parent compound.

The grapevine-shoot extract vineatrol<sup>®</sup>30 suppressed the catalytic activity of topoisomerase II in a cell-free system and showed DNA-damaging potential in human epidermoid cancer cells (A431). Here, the resveratrol-dimer  $\epsilon$ -viniferin as well as the tetramers r2-viniferin and hopeaphenol were identified as bioactive constituents of vineatrol<sup>®</sup>30.

Thus, the tested isoflavones and vineatrol<sup>®</sup>30 were identified as potential inhibitors of topoisomerase II leading to DNA-damaging effects. As genotoxicity holds a key position in the evaluation of possible hazards to human health, these results provide valuable information for the risk assessment of these compounds. However, further studies are necessary, especially regarding the bioavailability and tissue concentrations to estimate the physiological relevance of such findings.

## VI. Formelverzeichnis

### Arithmetischer Mittelwert

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i$$

$x_i$  Messwert i  
 $n$  Anzahl der Messungen

### Median

$$\tilde{x} = \begin{cases} x_{\frac{n+1}{2}} & n \text{ ungerade} \\ \frac{1}{2} \left( x_{\frac{n}{2}} + x_{\frac{n}{2}+1} \right) & n \text{ gerade} \end{cases}$$

$n$  Anzahl der Messungen

### Standardabweichung

$$s = \pm \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$$

$\bar{x}$  arithmetischer Mittelwert  
 $x_i$  Messwert i  
 $n$  Anzahl der Messungen

### Lineare Regression

$$y = mx + b$$

$m$  Steigung der Regressionsgeraden

$$b = \frac{(\sum_i y_i) \cdot (\sum_i x_i^2) - (\sum_i x_i) \cdot (\sum_i [x_i y_i])}{n(\sum_i x_i^2) - (\sum_i x_i)^2}$$

$b$  y-Achsenabschnitt

### Berechnung des IC<sub>50</sub>-Wertes

$$IC_{50} = \frac{50 - A}{B}$$

$A$  y-Achsenabschnitt  
 $B$  Steigung

### Test over Control

$$\frac{T}{C} [\%] = \frac{T - C_B}{C_N - C_B} \cdot 100 [\%]$$

- $T$  optische Dichte der Testsubstanz  
 $C_N$  Optische Dichte der Lösungsmittelkontrolle  
 $C_B$  optische Dichte des Blindwertes

### Shapiro-Wilk-Test

$$W = \frac{b^2}{(n-1)s^2}$$

$$s^2 = \frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2$$

$$b = a_{(1)}(x_{(n)} - x_{(1)}) + a_{(2)}(x_{(n)} - x_{(2)}) + \dots$$

- $b$  Schätzer der „erwarteten“ Varianz einer Stichprobe aus einer normalverteilten Grundgesamtheit  
 $s$  Schätzer für die Stichprobenvarianz  
 $x_i$  Ordnungsstatistiken aus einer Stichprobe  
 $a$  Koeffizienten (Gewichte)

### Ausreißertest nach Nalimov

$$r^* = \frac{|x^* - \bar{x}|}{\rho_{n-1}} \sqrt{\left(\frac{n}{n-1}\right)}$$

- $x^*$  möglicher Ausreißer  
 $\bar{x}$  arithmetischer Mittelwert  
 $\rho_{n-1}$  Standardabweichung

### Student's $t$ -test

$$t = \frac{|\bar{x} - \mu|}{s} \sqrt{n}$$

- $t$  Prüfgröße  $t$   
 $\bar{x}$  arithmetischer Mittelwert  
 $\mu$  Zahl für die Differenz der Mittelwerte der beiden Grundgesamtheiten  
 $s$  Schätzwert der Standardabweichung

## VII. Lebenslauf

### Persönliche Angaben

Name: Simone A. Baechler

Staatsangehörigkeit: deutsch

### Schul Ausbildung

1990 – 1994 Hohenbergschule, Fridingen

1994 – 2003 Immanuel-Kant-Gymnasium Tuttlingen

Juni 2003 Allgemeine Hochschulreife

### Studium

10/2003 – 10/2008 Studium der Lebensmittelchemie am Karlsruher Institut für Technologie (KIT)

04/2008 – 10/2008 Diplomarbeit am Institut für Angewandte Biowissenschaften, Abteilung Lebensmitteltoxikologie des KIT unter Leitung von Frau Prof. Dr. D. Marko

Oktober 2008 Abschluss des Studienganges Diplom-Lebensmittelchemie

03/2009 – 09/2013 Promotion am Institut für Lebensmittelchemie und Toxikologie der Universität Wien

05/2012 – 07/2012 Forschungsaufenthalt in der Gruppe von Y. Pommier, MD, Laboratory of Molecular Pharmacology, NIH, Bethesda

09/2013 Fertigstellung der Promotionsarbeit unter Frau Prof. Dr. D. Marko am Institut für Lebensmittelchemie und Toxikologie der Universität Wien

## VIII. Publikationsliste

### Veröffentlichungen:

- Baechler S A, Molzberger A, Kulling S, Diel P, Marko D. Topoisomerase poisoning by genistein in the intestine of rats. *In preparation*.
- Baechler S A, Walker J, Marko D. Oxidative metabolism alters the biological activity of the soy isoflavone daidzein. *Submitted*.
- Baechler S A, Dicker M, Steinberg P, Marko D. Topoisomerase II-targeting properties of a grapevine-shoot extract and respective resveratrol oligomers. *Submitted*.
- Tiessen C, Gehrke H, Kropat C, Schwarz C, Baechler S, Fehr M, Pahlke G, Marko D. Role of topoisomerase inhibition and DNA repair mechanisms for the genotoxicity of alternariol and altertoxin II. *Submitted*.
- Baechler S A; Fehr M, Habermeyer M, Hofmann A, Merz KH, Fiebig HH, Marko D, Eisenbrand G. Synthesis, topoisomerase-targeting activity and growth inhibition of lycobetaine analogs. *Bioorg & Med Chem*. **2013**, 21(3), 814-823.
- Esselen M, Barth SW, Winkler S, Baechler S, Briviba K, Watzl B, Skrbek S, Marko D. Anthocyanins suppress the cleavable complex formation by irinotecan and diminish its DNA-strand-breaking activity in the colon of Wistar rats. *Carcinogenesis*. **2013**.
- Tiessen C, Fehr M, Schwarz C, Baechler S, Domnanich K, Boettler U, Pahlke G, Marko D. Modulation of the cellular redoxstatus by the Alternaria toxins alternariol and alternariol monomethyl ether. *Toxicol Letters*. **2013**, 216(1), 23-30.
- Kurzwernhart A, Kandioller W, Bartel C, Baechler S, Trondl R, Mühlgassner G, Jakupec MA, Arion VB, Marko D, Keppler BK, Hartinger C. Targeting the DNA-topoisomerase complex in a double-strike approach with a topoisomerase inhibiting moiety and covalent DNA binder. *Chem Commun*. **2012**, 48(40), 4839-4841.
- Kurzwernhart A, Kandioller W, Baechler S, Bartel C, Martić S, Buczkowska M, Muehlgassner G, Jakupec MA, Kraatz HB, Bednarski PJ, Arion VB, Marko D, Keppler BK, Hartinger C. Structure-Activity Relationships of Targeted RuII( $\eta^6$ -p-Cymene) Anticancer Complexes with Flavonol-Derived Ligands. *J Med Chem*. **2012**, 55(23), 10512-10522.

- Kalfalah FM, Mielke C, Christensen MO, Baechler S, Marko D, Boege F. Genotoxicity of dietary, environmental and therapeutic topoisomerase II poisons is uniformly correlated to prolongation of enzyme DNA residence. *Mol Nutr Food Res.* **2011**, 55 Suppl 1, 127-42.
- Esselen M, Boettler U, Teller N, Baechler S, Hutter M, Rufer CE, Skrbek S, Marko D. Anthocyanin-Rich Blackberry Extract Suppresses the DNA-Damaging Properties of Topoisomerase I and II Poisons in Colon Carcinoma Cells. *J Agr Food Chem.* **2011**, 59(13), 6966-6973.
- Esselen M, Fritz J, Hutter M, Teller N, Baechler S, Boettler U, Marczylo TH, Gescher AJ, Marko D. Anthocyanin-rich extracts suppress the DNA-damaging effects of topoisomerase poisons in human colon cancer cells. *Mol Nutr Food Res.* **2011**, 55 Suppl 1, 143-53.
- Fehr M, Baechler S, Kropat C, Mielke C, Boege F, Pahlke G, Marko D. Repair of DNA damage induced by the mycotoxin alternariol involves tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1. *Mycotoxin Research.* **2010**, 26, 247-256.

### Posterbeiträge:

- 03/2013 Kurzweinhart A, Kandioller W, Bartel C, Novak M, Baechler S, Jakupec MA, Arion VB, Marko D, Keppler BK, Hartinger CG. Structure-activity relationship studies and biological activity of flavonol-derived Ru<sup>II</sup>(arene) anticancer complexes. Metallodrugs I: Design and Mechanism of Action in Olomouc, Tschechische Republik.
- 07/2012 Schroeter A, Baechler S, Marko D. Effect of oxidative metabolism on the bioactivity profile of the isoflavones genistein and daidzein. XXVth International Conference on Polyphenols. Florenz, Italien.
- 06/2012 Kurzweinhart A, Kandioller W, Bartel C, Mühlgassner G, Novak M, Baechler S, Jakupec MA, Arion VB, Marko D, Keppler BK, Hartinger CG. Structure-activity relationship studies for flavonol-derived Ru<sup>II</sup>(arene) anticancer complexes. International Symposia on Metal Complexes – ISMEC Acta Volume 2, Lisbon, Portugal.

- 11/2011 Schroeter A, Baechler S, Marko D. Effect of daidzein and its oxidative metabolites on topoisomerase II and DNA integrity. Scientific Symposium of the Austrian Society of Toxicology. Wien, Österreich.
- 09/2011 Baechler S, Marko D. Einfluss des oxidativen Metabolismus auf die Bioaktivität des Isoflavons Daidzein. 40. Deutscher Lebensmittelchemikertag in Halle (Saale), Deutschland.
- 08/2011 Baechler S, Molzberger A, Teller N, Diel P, Marko D. Genistein acts as topoisomerase poison in vivo. 47th Congress of the European Societies of Toxicology (Eurotox) in Paris, Frankreich.
- 09/2010 Baechler S, Winkler S, Fehr M, Marko D. Modulation des zellulären Redoxstatus durch die Mykotoxine Alternariol und Alternariolmonomethylether. 39. Deutscher Lebensmittelchemikertag in Stuttgart-Hohenheim, Deutschland.
- 05/2010 Baechler S, Fehr M, Marko D. Modulation des intrazellulären Redox-Status durch die Mykotoxine Alternariol und Alternariolmonomethylether in humanen Karzinomzellen. Österreichische Lebensmittelchemiker Tage im Schloss Seggau, Leibnitz, Österreich.
- 03/2010 Baechler S, Walker J, Marko D. Impact of oxidative metabolites of daidzein on topoisomerase II inhibition. 77. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie (DGPT) in Frankfurt am Main, Deutschland.
- 02/2010 Baechler S, Fehr M, Boettler U, Marko D. Impact of oxidative stress on alternariol- and alternariol monomethyl ether induced toxicity in human colon carcinoma cells. 6. Wissenschaftliches Symposium der Österreichischen Gesellschaft für Toxikologie (ASTOX) in Wien, Österreich.
- 09/2009 Baechler S, Fehr M, Burkart J, Marko D. Toxisches Potential der Mykotoxine Alternariol und Alternariolmonomethylether in humanen Karzinomzellen. 38. Deutscher Lebensmittelchemikertag in Berlin, Deutschland.
- 06/2009 Baechler S, Fehr M, Pahlke G, Marko D. Impact of alternariol and alternariol monomethyl ether on Nrf2 translocation in human tumor cells. 31. Mycotoxin Workshop, Muenster, Deutschland.

- 06/2009 Marko D, Baechler S, Pahlke G, Fehr M. Tdp1 modulates the DNA damaging properties of the topoisomerase poison alternariol. 31. Mycotoxin Workshop, Muenster, Deutschland.
- 03/2009 Fehr M, Burkart J, Baechler S, Pahlke G, Marko D. Induction of oxidative stress by Alternaria toxins. 50. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie (DGPT) in Mainz, Deutschland. Veröffentlicht in Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology. 379(1), 84-85.
- 09/2008 Fehr M, Baechler S, Pahlke G, Marko D. Alternariol wirkt nicht nur im zellfreien System sondern auch in intakten Zellen als Topoisomerasegift. 37. Deutscher Lebensmittelchemikertag, Kaiserslautern, Deutschland.

## IX. Dank

Mein Dank gilt:

- Frau Prof. Dr. Doris Marko für die Überlassung des interessanten Themas und die Ermöglichung dieser Arbeit.
- Y. Pommier, MD, und dem gesamten LMP-Team für die lehrreiche Zeit, die Unterstützung sowie die warmherzige Aufnahme.
- der Marshall Plan Foundation für die finanzielle Unterstützung und die damit verbundene Ermöglichung meines USA-Aufenthaltes.
- Prof. Widhalm und Prof. Krois für das in mich gesetzte Vertrauen und die Möglichkeit der Weiterfinanzierung.
- allen ehemaligen und derzeitigen Doktoranden und Diplomanden des AK Marko, insbesondere Joanna, Swantje, Markus, Helge und Christoph.
- Christian, Christoph, Markus und Christoph für das aufmerksame Lesen vieler Seiten dieser Arbeit, eure konstruktive Kritik und die wertvollen Anregungen!

***‘Music is the literature of the heart; it commences where the speech ends.’***

(Alphonse de Lamartine)

Thus, thanks to:

- all my friends *‘who keep me warm at night and help in need’*
- Christoph for your mental support and always being understanding, just like *‘at home’*
- Swantje for always listening and the many epic nights *‘by your side’*
- Anne for your healing hands, *‘if I sold my hands for food’*, you’d feed me!
- Christian for your irrefutable patience and generous support, for *‘always being right there’* for me and making me *‘fall asleep in your branches’*! Thanks!
- my parents for giving me the trust to *‘look around and find what is yet to be found’*