



universität
wien

MASTERARBEIT

Titel der Masterarbeit

„Einfluss des oxidativen Metabolismus von Genistein auf die Toxizität und Apoptoseinduktion in humanen Kolonkarzinomzellen“

verfasst von

Karin Stornig, Bakk.rer.nat.

angestrebter akademischer Grad

Master of Science (MSc)

Wien, 2014

Studienkennzahl lt. Studienblatt: A 066 838

Studienrichtung lt. Studienblatt: Masterstudium Ernährungswissenschaften

Betreut von: Prof. Dr. Doris Marko

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich eidesstattlich, dass ich diese Arbeit selbstständig angefertigt und jegliche Literatur gemäß den wissenschaftlichen Richtlinien zitiert und durch genaue Quellenangaben kenntlich gemacht habe. Die Arbeit wurde bisher in gleicher oder ähnlicher Form keiner Prüfungskommission vorgelegt oder veröffentlicht.

Wien, 25.02.2014

Unterschrift

Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

- ein Dankeschön an Frau Prof. Marko für die Bereitstellung dieses interessanten Themas,
- meiner Betreuerin Anika Schröter für die geduldige Zusammenarbeit, tatkräftige Unterstützung und konstruktiven Gedankenanstöße sowie
- der Arbeitsgruppe für die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Ein Dankeschön auch an meine lieben Freunde Teresa und Claudia für die vielen schönen Stunden während der letzten Studienjahre und für das Korrekturlesen meiner Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt vor allem den Menschen, die mich während meines Studiums immer unterstützt haben: meiner Familie für die mentale Unterstützung während der Studienzeit sowie Stefan, der mich stets ermutigt hat.

Inhaltsverzeichnis

1	Abbildungsverzeichnis	III
2	Tabellenverzeichnis	VI
3	Abkürzungsverzeichnis	VIII
4	Einleitung	1
5	Theoretische Grundlagen	2
5.1	Isoflavone	2
5.1.1	Verbreitung in Lebensmitteln und tägliche Aufnahme.....	3
5.1.2	Absorption und Bioverfügbarkeit.....	5
5.1.3	Metabolismus	6
5.1.3.1	Phase I	6
5.1.3.2	Phase II.....	7
5.1.3.3	Reduktive Metabolisierung durch intestinale Bakterien.....	8
5.1.4	Verteilung.....	9
5.1.5	Ausscheidung	9
5.1.6	Potentieller Nutzen und mögliche Risiken	9
5.1.6.1	in vitro	10
5.1.6.2	in vivo.....	12
5.2	DNA-Integrität	14
5.2.1	p53 - „Wächter des Genoms“	14
5.2.1.1	Aktivierung und Regulation von p53.....	15
5.2.1.2	Funktionen und Auswirkungen.....	15
5.2.2	Zellzyklus	16
5.2.2.1	Kontrollpunkte.....	17
5.2.3	Apoptose.....	18
5.2.3.1	Intrinsischer Signalweg	19
5.2.3.2	Extrinsischer Signalweg über Todesrezeptoren.....	20
6	Problemstellung	22
7	Material und Methoden	24
7.1	Materialverzeichnis	24
7.2	Geräteverzeichnis	26
7.3	Zellkultur	28
7.3.1	Zelllinie	28
7.3.2	Kultivierung der Zellen	28
7.3.3	Mediumwechsel	28
7.3.4	Passagieren	29
7.3.5	Einfrieren und Lagerung von Zellstocks	30
7.3.6	Auftauen von Zellen.....	30
7.3.7	Zellzahlbestimmung mittels Neubauerzählkammer	31
7.3.8	Zellzahlbestimmung mittels Durchflusszytometrie	32
7.3.8	Mykoplasmentest	33
7.4	Inkubationsbedingungen	34

7.5	WST-1 Assay	34
7.6	Laktatdehydrogenase (LDH) Assay	37
7.7	Western Blot	38
7.7.1	Gewinnung der Proteine	39
7.7.2	Proteinbestimmung nach Bradford	39
7.7.3	Gießen der Trenn- und Sammelgele	40
7.7.4	Auftrennung der Proteine mittels SDS-Page.....	41
7.7.5	Proteintransfer.....	42
7.7.6	AK - Inkubation und Detektion	43
7.8	Zellzyklusuntersuchungen mittels Durchflusszytometrie	46
7.9	Bestimmung der Apoptoseinduktion mittels Guava Nexin Assay	48
7.10	Bestimmung der Apoptoseinduktion mittels Cell Death Detection ELISA^{PLUS} ...	50
8	<i>Ergebnisse und Diskussion</i>	53
8.1	Zytotoxizität	54
8.1.1	Einfluss auf die Integrität der Zellmembran	54
8.1.2	Einfluss auf die mitochondriale Aktivität	58
8.2	Aktivierung des Tumorsuppressorproteins p53	60
8.3	Untersuchungen zur Zellzyklusverteilung	62
8.4	Untersuchungen zur Apoptoseinduktion	66
8.4.1	Apoptosemessung mittels Durchflusszytometrie	66
8.4.2	Cell Death Detection ELISA ^{PLUS}	69
8.5	Gesamtdiskussion	73
9	<i>Zusammenfassung</i>	80
10	<i>Summary</i>	82
11	<i>Literaturverzeichnis</i>	84
12	<i>Lebenslauf</i>	103
13	<i>Anhang</i>	104

1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Grundstruktur der Isoflavone; modifiziert nach [Kulling und Watzl, 2003]	2
Abbildung 2: Chemische Strukturen, der in Soja und Rotklee vorkommenden Isoflavon-Konjugate und die Entstehung von Aglykonen durch Abspaltung des Zuckerrestes; modifiziert nach [Eisenbrand, 2006]	3
Abbildung 3: Schematische Darstellung der Hydroxylierung von Genistein zu den oxidativen Hauptmetaboliten	7
Abbildung 4: Schematische Darstellung der Metabolisierung von Genistein durch intestinale Bakterien; modifiziert nach [Mortensen et al., 2009]	8
Abbildung 5: Schematische Darstellung der Domänen des Proteins p53; modifiziert nach [Yakovleva et al., 2002].....	14
Abbildung 6: Schematische Abbildung des Zellzyklus einer eukaryotischen Zelle sowie dessen Regulation durch CDK/Zyklin-Komplexe; [Alberts et al., 1994]	17
Abbildung 7: Morphologische Veränderungen bei Nekrose und Apoptose; modifiziert nach [Hiddemann und Bartram, 2010]	19
Abbildung 8: Darstellung des extrinsischen und intrinsischen Signalweges; modifiziert nach [Thorburn, 2004].....	21
Abbildung 9: Chemische Struktur von Genistein und seinen oxidativen Metaboliten.....	22
Abbildung 10: Neubauer-Zählkammer [http://www.zaehlkammer.de/deutsch/neubauer.improved.html]	31
Abbildung 11: Auszählschema eines Eckquadrates; [Schmitz, 2011].....	31
Abbildung 12: Mykoplasmenfreie HT-29 Zellen-100-fache Vergrößerung.....	33
Abbildung 13: Mykoplasmenfreie HT-29 Zellen-1000-fache Vergrößerung	33
Abbildung 14: Testprinzip des WST-1 Assay; modifiziert nach [Roche, 2005].....	35
Abbildung 15: Testprinzip des LDH-Assay; modifiziert nach [Roche, 2011]	37
Abbildung 16: Schematische Darstellung einer Elektrophoresekammer; modifiziert nach [http://www.imb-jena.de/~rake/Bioinformatics_WEB/proteins_purification.html]	42
Abbildung 17: Testprinzips des Cell Death Detection ELISA ^{PLUS} ; modifiziert nach [Roche, 2010]	50
Abbildung 18: Darstellung der DNA-strangbrechenden Wirkung von Genistein und dessen oxidativen Metaboliten in HT-29 Zellen nach 24-stündiger Inkubation in serumfreiem Medium unter Zusatz von Katalase (100 U/ml)	53

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 19: Einfluss von Genistein und dessen oxidativen Metaboliten auf die Integrität der Zellmembran von HT-29 Zellen nach einstündiger Inkubationszeit in serumfreiem Medium unter Zusatz von Katalase (100 U/ml).....	55
Abbildung 20: Absorption der Testsubstanzen in Abwesenheit von Zellen.....	56
Abbildung 21: Einfluss von Genistein und dessen oxidativen Metaboliten auf die Integrität der Zellmembran von HT-29 Zellen nach 24-stündiger Inkubation in serumfreiem Medium unter Zusatz von Katalase (100 U/ml).....	57
Abbildung 22: Einfluss von Genistein und dessen oxidativen Metaboliten auf die Viabilität von HT-29 Zellen nach einstündiger Inkubationszeit in serumfreiem Medium unter Zusatz von Katalase (100 U/ml).....	58
Abbildung 23: Einfluss von Genistein und dessen oxidativen Metaboliten auf die Viabilität von HT-29 Zellen nach 24-stündiger Inkubationszeit in serumfreiem Medium unter Zusatz von Katalase (100 /ml).....	59
Abbildung 24: Einfluss von Genistein und dessen oxidativen Metaboliten auf den Phosphorylierungsstatus des Proteins p53 nach einstündiger Inkubationszeit in serumfreiem Medium unter Zusatz von Katalase (100 U/ml).....	61
Abbildung 25: Einfluss von Genistein auf die Zellzyklusverteilung von HT-29 Zellen	64
Abbildung 26: Zellzyklusverteilung der HT-29 Zellen nach 48-stündiger Inkubation mit 100 µM Genistein in 10 % FKS-haltigem Medium	65
Abbildung 27: Einteilung der Zellen in vier Subpopulationen nach Färbung mit dem „Guava Nexin Reagent“ und durchflusszytometrischer Messung Annexin V und 7-AAD gefärbter Zellen.....	66
Abbildung 28: Einfluss von Genistein auf die Apoptoseinduktion in HT-29 Zellen nach 24-stündiger Inkubation in serumfreiem Medium unter Zusatz von Katalase (100 U/ml)	67
Abbildung 30: Graphische Darstellung Annexin V-positiver Zellen nach 24-, 48- und 72-stündiger Inkubation mit Genistein in 10 % FKS-haltigem Medium unter Zusatz von Katalase (100 U/ml).....	69
Abbildung 31: Durchflusszytometrische Bestimmung der Zellviabilität in Prozent [%] nach Färbung der Zellen mittels „Guava ViaCount Reagent“ (Millipore)	70
Abbildung 32: Einfluss von Genistein und dessen oxidativen Metaboliten auf die Apoptoseinduktion in HT-29 Zellen nach 24-stündiger Inkubation in serumfreiem Medium unter Zusatz von Katalase (100 U/ml).....	71
Abbildung 33: Zellzyklusverteilung von HT-29 Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit Genistein in serumfreiem Medium unter Zusatz von Katalase (100 U/ml).....	107

- Abbildung 34: Zellzyklusverteilung von HT-29 Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit Genistein in 1 % FKS-haltigem Medium unter Zusatz von Katalase (100 U/ml)..... 107
- Abbildung 35: Zellzyklusverteilung von HT-29 Zellen nach 24-stündiger Synchronisation der Zellen in serumfreiem Medium und anschließender 48-stündiger Inkubation mit Genistein in 10 % FKS-haltigem Medium unter Zusatz von Katalase (100 U/ml)..... 108
- Abbildung 36: Zellzyklusverteilung von HT-29 Zellen nach 24-stündiger Synchronisation der Zellen in serumfreiem Medium und anschließender 72-stündiger Inkubation mit Genistein in 10 % FKS-haltigem Medium unter Zusatz von Katalase (100 U/ml)..... 108
- Abbildung 37: Zellzyklusverteilung von HT-29 Zellen nach 18-stündiger Synchronisation der Zellen in nocodazolhaltigem Medium (40 μ M) und anschließender 72-stündiger Inkubation mit Genistein in 10 % FKS-haltigem Medium unter Zusatz von Katalase (100 U/ml). 108
- Abbildung 38: Zellzyklusverteilung von HT-29 Zellen nach 24-stündiger Synchronisation der Zellen in serumfreiem Medium und anschließender 72-stündiger Inkubation mit 3`-OH-Genistein in 10 % FKS-haltigem Medium unter Zusatz von Katalase (100 U/ml). 109

2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Genistein- und Gesamtisoflavongehalte in Lebensmitteln; modifiziert nach [Bhagwat et al., 2008].....	4
Tabelle 2: Tabelle zur Bestimmung der kritischen Grenze im Nalimov-Ausreißertest [Lohninger, 2012]	37
Tabelle 3: Pipettierschema der Trenn- und Sammelgele	40
Tabelle 4: Molekulargewichte der zu untersuchenden Proteine	42
Tabelle 5: Einteilung der Zellen in vier Subpopulationen mittels Guava Nexin Assay; modifiziert nach [Millipore, 2008].....	49
Tabelle 6: Tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse zur Untersuchung des Einfluss des oxidativen Metabolismus von Genistein auf die Toxizität und Apoptoseinduktion in humanen Kolonkarzinomzellen (HT-29)	78
Tabelle 7: Mittelwerte der Absorptionen im WST-1 Assay nach einstündiger Inkubation mit Genistein in serumfreiem Medium unter Zusatz von Katalase (100 U/ml).....	104
Tabelle 8: Mittelwerte der Absorptionen im WST-1 Assay nach einstündiger Inkubation mit 3`-OH-Genistein in serumfreiem Medium unter Zusatz von Katalase (100 U/ml).....	104
Tabelle 9: Mittelwerte der Absorptionen im WST-1 Assay nach einstündiger Inkubation mit 6-OH-Genistein in serumfreiem Medium unter Zusatz von Katalase (100 U/ml).....	104
Tabelle 10: Mittelwerte der Absorptionen im WST-1 Assay nach 24-stündiger Inkubation mit Genistein in serumfreiem Medium unter Zusatz von Katalase (100 U/ml).....	104
Tabelle 11: Mittelwerte der Absorptionen im WST-1 Assay nach 24-stündiger Inkubation mit 3`-OH-Genistein in serumfreiem Medium unter Zusatz von Katalase (100 U/ml).....	105
Tabelle 12: Mittelwerte der Absorptionen im WST-1 Assay nach 24-stündiger Inkubation mit 6-OH-Genistein in serumfreiem Medium unter Zusatz von Katalase (100 U/ml).....	105
Tabelle 13: Mittelwerte der Absorptionen im LDH-Assay nach einstündiger Inkubation mit Genistein in serumfreiem Medium unter Zusatz von Katalase (100 U/ml).....	105
Tabelle 14: Mittelwerte der Absorptionen im LDH-Assay nach einstündiger Inkubation mit 3`-OH-Genistein in serumfreiem Medium unter Zusatz von Katalase (100 U/ml).....	105
Tabelle 15: Mittelwerte der Absorptionen im LDH-Assay nach einstündiger Inkubation mit 6-OH-Genistein in serumfreiem Medium unter Zusatz von Katalase (100 U/ml).....	105
Tabelle 16: Mittelwerte der Absorptionen im LDH-Assay nach 24-stündiger Inkubation mit Genistein in serumfreiem Medium unter Zusatz von Katalase (100 U/ml).....	106

Tabelle 17: Mittelwerte der Absorptionen im LDH-Assay nach 24-stündiger Inkubation mit 3`-OH-Genistein in serumfreiem Medium unter Zusatz von Katalase (100 U/ml).....	106
Tabelle 18: Mittelwerte der Absorptionen im LDH-Assay nach 24-stündiger Inkubation mit 6-OH-Genistein in serumfreiem Medium unter Zusatz von Katalase (100 U/ml).	106
Tabelle 19: Phosphorylierungsstatus des Proteins p53 nach einstündiger Inkubation mit Genistein in serumfreiem Medium unter Zusatz von Katalase (100 U/ml).....	106
Tabelle 20: Phosphorylierungsstatus des Proteins p53 nach einstündiger Inkubation mit 3`-OH-Genistein in serumfreiem Medium unter Zusatz von Katalase (100 U/ml).....	107
Tabelle 21: Phosphorylierungsstatus des Proteins p53 nach einstündiger Inkubation mit 6-OH-Genistein in serumfreiem Medium unter Zusatz von Katalase (100 U/ml)..	107
Tabelle 22: Mittelwerte der Absorptionen im Cell Death Detection ELISA ^{PLUS} nach 24-stündiger Inkubation der Testsubstanzen in serumfreiem Medium unter Zusatz von Katalase (100 U/ml).....	109

3 Abkürzungsverzeichnis

3`-OH-GEN	3`-Hydroxy-Genistein
6-OH-GEN	6-Hydroxy-Genistein
7-AAD	7-Aminoactinomycin
ABTS	2,2'-Azino-bis-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)
ANOVA	<i>analysis of variance</i> (Varianzanalyse)
Apaf-1	<i>apoptotic protease activating factor-1</i> (Apoptose-Protease-aktivierender Faktor 1)
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
ATM	<i>ataxia telangiectasia mutated</i>
ATP	Adenosintriphosphat
ATR	<i>ataxia telangiectasia and Rad3-related protein</i>
Bax	<i>Bcl-2-associated X protein</i>
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma-2</i>
BfR	Bundesinstitut für Risikobewertung
Bid	<i>BH3 interacting domain death agonist</i>
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
CAK	<i>cyclin dependent activating kinase</i> (Zyclin-abhängige-aktivierende Kinase)
CARD	<i>caspase recruitment domain</i> (Caspase-Rekrutierungs-Domäne)
Caspase	<i>cysteine-aspartatic proteases</i> (Cystein Aspartate Proteasen)
CDK	<i>cyclin-dependent protein kinase</i> (Zyclin-abhängige Kinase)
Chk 1/2	Checkpoint-Kinase 1/2
CYP450	Cytochrom P450
d	Tag
DAPI	4'6'-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid
DISC	<i>death inducing signalling complex</i>
DMEM	Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
EC	elektronengekoppeltes Reagenz
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>

Abkürzungsverzeichnis

EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EFSA	<i>European Food Safety Authority</i> (Europäische Lebensmittelsicherheitsbehörde)
EGFR	Epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ER	Estrogenrezeptor
ERK	<i>extracellular-signal regulated kinase</i>
ETO	Etoposid
FADD	<i>Fas-associated protein with death domain</i>
FKS	fetales Kälberserum
FPG	Formamidopyrimidin-DNA-glykosylase
GADD45	<i>growth arrest and DNA damage inducible gene-45</i>
GEN	Genistein
h	Stunde
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
H ₂ O _{bidest}	doppelt destilliertes Wasser
HT-29	humane Kolonadenokarzinomzelllinie
HU	Hydroxyurea
IGF1R	Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor-1 Rezeptor
INT	2-[4-iodophenyl]-3-[4-nitrophenyl]-5-phenyl- tetrazoliumchlorid
kDa	Kilodalton
KG	Körpergewicht
LDH	Laktatdehydrogenase
MDM2	<i>murine double minute chromosome-2</i>
MLL	<i>mixed linkage leukemia</i>
M-Phase	Mitose-Phase
MW	Mittelwert
n	Anzahl
NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (reduzierte Form)
NAD	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (oxidierte Form)
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotidphosphat
n.d.	nicht detektiert
NF- κ B	<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells</i>
NEM	Nahrungsergänzungsmittel

Abkürzungsverzeichnis

nm	nanometer
Nrf2	<i>nuclear factor erythroid 2-related factor 2</i>
O ₂	Sauerstoff
OT	Objektträger
PBS	<i>phosphate bufferd saline</i> (phospatgepufferte Salzlösung)
PK	Positivkontrolle
PI	Propidiumiodid
pmol	Pikomol
PMSF	Phenylmehtylsulonylfluorid
POD	Peroxidase
ppm	<i>parts per million</i> (Teile von einer Million)
P/S	Penicillin/Streptomycin
PS	Phosphatidylserin
PUMA	<i>p53 upregulated modulator of apoptosis</i>
R	Rest
RH	Substrat
rpm	<i>revolutions per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RS	mitochondriale Succinat-Tetrazolium-Reduktase System
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SGLT1	<i>sodium-glucose cotransporter 2</i> (Natrium/Glukose-Cotransporter)
SHBG	<i>sex hormone binding globulin</i> (Sexualhormon-bindendes Globulin)
S-Phase	Synthese-Phase
spp	<i>species pluralis</i>
SULT	Sulfotransferase
tBid	<i>truncated Bid</i>
T/C	Test-over-Control (Prozent der Kontrolle)
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TNF-R 1/2	Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor 1/2
TRAIL	<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit
UGT	UDP-Glucuronosyltransferase

Abkürzungsverzeichnis

UV	Ultraviolett
V	Volt
VEGFR	vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktorrezeptor
v/v	<i>volume per volume</i>
WST	<i>water soluble tetrazolium</i> (wasserlösliches Tetrazolium)
w/v	<i>weight per volume</i> (Gewichtsprozent)

4 Einleitung

Eine hohe Aufnahme an Isoflavonen wird aufgrund von epidemiologischen Studien mit zahlreichen positiven Gesundheitswirkungen in Verbindung gebracht. So ist in asiatischen Ländern, in denen Soja Teil einer traditionellen Ernährung ist, das Risiko an Brust-, Prostata- und Darmkrebs zu erkranken nachweisbar geringer [Wu et al., 2008; Yan und Spitznagel, 2009; Yan et al., 2010]. In weiteren epidemiologischen Untersuchungen konnte eine Korrelation zwischen Sojaaufnahme und einem verringerten Risiko für Osteoporose, koronare Herzerkrankungen sowie ein geringeres Auftreten von menopausalen Beschwerden innerhalb der asiatischen Bevölkerung festgestellt werden [Brzezinski und Debi, 1999]. Dies hat dazu geführt, dass hochkonzentrierte Isoflavon-Extrakte in Form von Supplementen als natürliche und risikofreie Wirkmittel vermarktet werden. Insbesondere Frauen in der Menopause werden diese isoflavonhaltigen Supplemente als natürliche Alternative zur Hormonersatztherapie angeboten [BfR, 2007]. Das erfolgt ungeachtet der Tatsache, dass eine Verbesserung von menopausalen Symptomen durch Einnahme von Sojaextrakten bis dato noch nicht ausreichend nachgewiesen werden konnte [Jacobs et al., 2009; Krebs et al., 2004]. Vielmehr belegen diverse Studien, dass das Isoflavon Genistein *in vitro* auch genotoxisches Potential besitzt [Kulling und Metzler, 1997; Kulling et al., 1999; Salti et al., 2000]. Dies wirft die Frage nach der Unbedenklichkeit einer Einnahme von hochdosierten Isoflavon-Supplementen auf. Noch unzureichend geklärt sind zusätzlich die physiologischen Wirkungen der entstehenden Metabolite, die sich aufgrund geringer struktureller Unterschiede in ihrer biologischen Wirkung von der Muttersubstanz unterscheiden können [Schmitt et al., 2003]. Im Zuge des Phase I-Stoffwechsels werden Isoflavone durch Cytochrom P450-abhängige Monooxygenasen zu katecholischen Metaboliten verstoffwechselt. Im Urin konnten nach sojahaltiger Kost die oxidativen Metabolite von Genistein als 3'-OH-Genistein, 6-OH-Genistein und 8-OH-Genistein identifiziert werden, die sich von der Muttersubstanz nur durch die Stellung einer zusätzlichen Hydroxylgruppe unterscheiden [Kulling et al., 2001]. Da bereits geringfügige strukturelle Veränderungen zu einer Modulation in der biologischen Wirkung führen können [Kulling und Metzler, 1997; Kulling et al., 1999], soll in dieser Arbeit untersucht werden, ob die Bioaktivität von Genistein durch den oxidativen Metabolismus verändert wird, um eine zukünftige Risikobewertung unter Berücksichtigung der im Organismus gebildeten Metaboliten zu erleichtern.

5 Theoretische Grundlagen

5.1 Isoflavone

Isoflavone sind diphenolische Verbindungen, die zur Gruppe der Polyphenole gezählt werden [Mortensen et al., 2009]. Aufgrund struktureller und funktioneller Ähnlichkeit mit dem im Menschen vorkommenden Hormon 17β -Estradiol werden Isoflavone zusammen mit Lignanen und Coumestanen der Klasse der Phytoestrogene zugeordnet [Munro et al., 2003].

Isoflavone besitzen als Grundstruktur ein 3-Phenylchromongerüst und unterscheiden sich von den in der Pflanzenwelt weit verbreiteten Flavonen nur durch die Verknüpfung und Position des B-Ringes [Kulling und Watzl, 2003]. Abbildung 1 zeigt die Grundstruktur der Isoflavone und dessen strukturelle Ähnlichkeit zu den Flavonen.

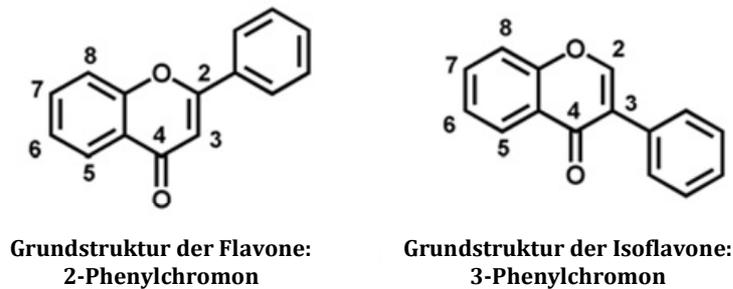


Abbildung 1: Grundstruktur der Isoflavone; modifiziert nach [Kulling und Watzl, 2003]

Isoflavone kommen hauptsächlich in Pflanzen der Familie der Leguminosen vor. So findet man hohe Konzentrationen an Isoflavonen vor allem in Sojabohnen und Rotklee [Mortensen et al., 2009]. Während Sojaprodukte vorrangig Daidzein, Genistein und in geringen Mengen Glycitein enthalten, sind die Hauptisoflavone im Rotklee Formononetin und Biochanin A [Mortensen et al., 2009]. Sie dienen der Pflanze als sogenannte Phytoalexine zur Abwehr von Pathogenen. Zusätzlich können sie, als Signalmoleküle verwendet, die Anlockung von Stickstoff fixierenden Knöllchenbakterien, sogenannten *Rhizobien*, auslösen [Preedy, 2013].

5.1.1 Verbreitung in Lebensmitteln und tägliche Aufnahme

Innerhalb der Ernährung erfolgt die Aufnahme von Isoflavonen hauptsächlich über Soja und den daraus hergestellten Produkten. Die drei Isoflavone Genistein, Daidzein und Glycitein liegen in der Sojabohne in einem Verhältnis von 10:8:1 vor [Kulling und Watzl, 2003]. Dabei handelt es sich um die veresterten Formen 6"-O-Malonyl-7-O- β -Glukoside, 7-O- β -Glukoside und in geringerem Ausmaß 6"-O-Acetyl-7-O- β -Glukoside. In fermentierten Produkten, wie Miso oder Sojasauce, liegen Isoflavone vorrangig als Aglykone vor, da der Zuckerrest durch die bei der Fermentation eingesetzten Mikroorganismen abgespalten wird [Coward et al., 1993]. Abbildung 2 zeigt die chemischen Strukturen der Isoflavon-Konjugate und die nach Abspaltung des Zuckerrestes entstehenden Aglykone.

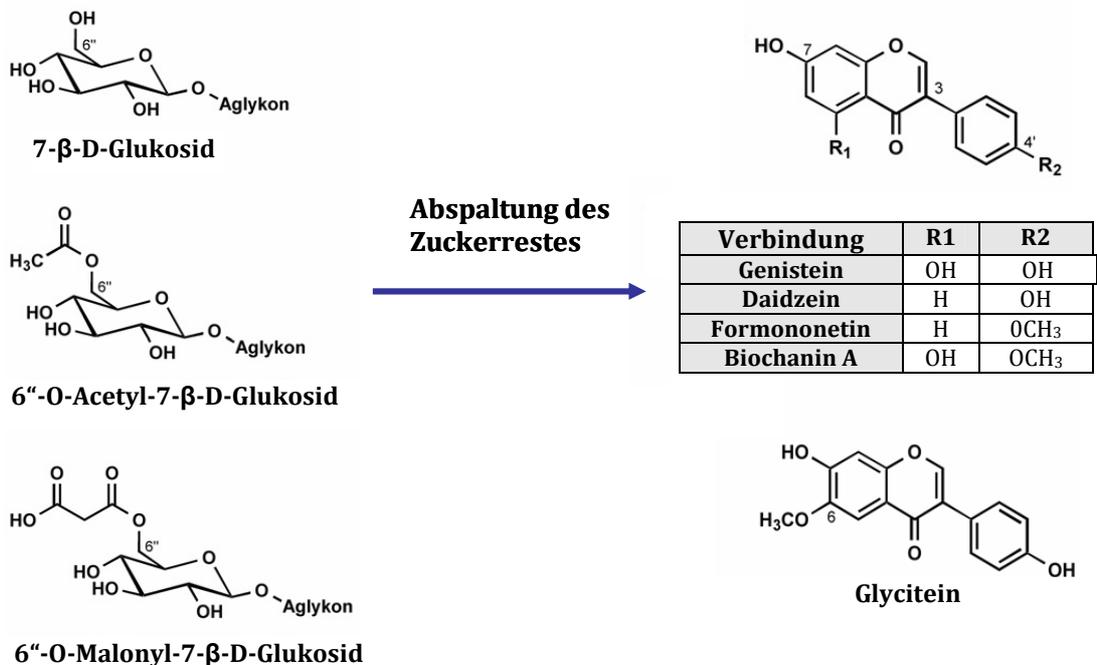


Abbildung 2: Chemische Strukturen, der in Soja und Rotklee vorkommenden Isoflavon-Konjugate und die Entstehung von Aglykonen durch Abspaltung des Zuckerrestes; modifiziert nach [Eisenbrand, 2007]

Die Gehalte an Isoflavonen in den Lebensmitteln können stark schwanken und sind abhängig von Erntejahr, Sorte und Anbaugesbiet [Wang und Murphy, 1994]. Tabelle 1 gibt einen Überblick über Genistein- und Gesamtisoflavongehalte in Lebensmitteln.

Tabelle 1: Genistein- und Gesamtisoflavongehalte in Lebensmitteln - angegeben in mg/100g Frischgewicht; modifiziert nach [Bhagwat et al., 2008]

Lebensmittel	Genisteingehalt [mg/100 g]	Isoflavongehalt [mg/100 g]
Sojamehl	87,31 – 98,77	150,94 – 178,10
Sojabohnen (roh)	80,99	154,53
Sojabohnen (gekocht)	31,26	65,11
Tempeh	36,15	60,61
Miso	23,24	41,45
Tofu (gebraten)	18,43	34,78
Sojamilch	6,07	10,73
Soja-Formula-Produkte	1,37 – 14,75	2,21 - 28,01

Die tägliche Aufnahme an Isoflavonen ist somit abhängig von der Art und Menge der aufgenommenen Lebensmittel. In asiatischen Ländern wird die tägliche Isoflavonaufnahme aufgrund der auf Sojaprodukten basierenden Ernährung auf 25-50 mg geschätzt [Messina et al., 2006]. Die tägliche Aufnahme an Genistein beträgt etwa 15-20 mg, wobei Plasmakonzentrationen von durchschnittlich 500 nM erreicht werden können [Morton et al., 2002; Wakai et al., 1999]. In der westlichen Ernährung, in der Sojakonsum eine eher untergeordnete Rolle spielt, liegt die Isoflavonaufnahme bei weniger als 1 mg/d. Die durchschnittliche Aufnahme an Genistein beträgt 0,3-0,5 mg/d und ist somit etwa 40-fach geringer als in asiatischen Ländern [van Erp-Baart et al., 2003]. Die durchschnittliche Plasmakonzentration an Genistein liegt im Bereich von circa 10 nM [Frankenfeld et al., 2003]. Neugeborene, die mit Formulaprodukten auf Sojabasis ernährt werden, nehmen täglich 28-47 mg Isoflavone auf, wobei Plasmagehalte an Genistein von durchschnittlich 2,5 µM erreicht werden [Setchell et al., 1997].

Bei dem Konsum von Nahrungsergänzungsmittel (NEM) auf Sojabasis kann die tägliche Isoflavonaufnahme variieren, da die Zusammensetzung der Supplemente und somit die Verhältnisse an Isoflavonen stark schwanken können. Die durchschnittliche Isoflavonaufnahme wird auf 20-50 mg pro Tag geschätzt, wobei auch eine tägliche Isoflavonaufnahme über 200 mg möglich ist. [Nurmi et al., 2002; Stürtz et al., 2008].

5.1.2 Absorption und Bioverfügbarkeit

Werden Isoflavone in Form von Aglykonen aufgenommen, erfolgt deren Absorption aufgrund ihrer Lipophilie durch passive Diffusion im oberen Dünndarm [Barnes, 2010]. Für die Absorption der Isoflavon-Glykoside kommen unterschiedliche Resorptionswege in Frage. Diskutiert wird eine aktive Aufnahme der Glukoside über den Na⁺-abhängigen Glukosetransporter SGLT1, wie bisher am Beispiel von Quercetin-Glukosiden gezeigt werden konnte [Wolffram et al., 2002]. Diese Annahme konnte jedoch für Isoflavone bisher noch nicht belegt werden. So konnten in einer Studie von *Setchell et al.* nach Gabe von Genistein- und Daidzein-Glykosiden, keine glykosidischen Formen im Plasma nachgewiesen werden [Setchell et al., 2002]. Somit scheint eine Spaltung der Glykoside vor der Absorption zu erfolgen. Die Hydrolyse der Glykoside kann zum Beispiel im Dickdarm durch intestinale Bakterien wie *Bacteroides spp.*, *Lactobacillus spp.* oder *Bifidobacterium spp.* erfolgen, da diese Bakterienstämme β -Glykosidase-Aktivität besitzen [Steer et al., 2003]. Eine weitere Möglichkeit ist die Spaltung durch die Laktase-Phlorizin-Hydrolase welche sich auf der luminalen Seite des Bürstensaum im Dünndarm befindet [Day et al., 2000]. Auch in der Mundhöhle konnte eine Spaltung der Glukoside zu Aglykonen durch Bakterien und Epithelzellen nachgewiesen werden [Walle et al., 2005].

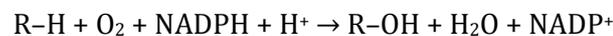
Die Bioverfügbarkeit von Isoflavonen scheint besser zu sein als die anderer Flavonoide, da die Isoflavone möglicherweise effizienter resorbiert werden [Manach et al., 2005]. Jedoch konnten einige Studien einen nicht-linearen Anstieg der Plasmakonzentration feststellen, was darauf hindeutet, dass es ab einer bestimmten Aufnahmemenge zu einem Sättigungseffekt kommt [Morton et al., 1997; Setchell et al., 2001; Setchell et al., 2003]. Die Plasmakonzentrationen weisen in den meisten Studien einen biphasischen Verlauf auf, wobei der erste Anstieg nach 1-2 Stunden und maximale Isoflavonkonzentrationen nach 4-8 Stunden erreicht wurden [Setchell et al., 2001; Watanabe et al., 1998; Zubik und Meydani, 2003]. Der biphasische Verlauf der Plasmakurven kann dadurch erklärt werden, dass zuerst im Dünndarmbereich eine geringe Aglykonfraktion resorbiert wird und anschließend eine vermehrte Resorption im Dickdarm erfolgt. Eine weitere Erklärung ist, dass die Isoflavone dem enterohepatischen Kreislauf unterliegen. So gelangen Isoflavon-Konjugate durch biliäre Ausscheidung über die Galle in den Darm, wo sie anschließend erneut resorbiert werden können [Kulling und Watzl, 2003].

5.1.3 Metabolismus

Die Metabolisierung der Isoflavone erfolgt durch Biotransformation in Phase I und Phase II. In der Phase I, die als Funktionalisierungsreaktion bezeichnet wird, kommt es zur Einführung oder Veränderung von funktionellen Gruppen, um in Phase II, der Konjugationsreaktion, eine Kopplung zu wasserlöslichen Konjugate zu ermöglichen. Diese Konjugation steigert die Wasserlöslichkeit und Molekülmasse der lipophilen Stoffe und ermöglicht somit eine verbesserte Ausscheidung über den Urin [Karlson und Doenecke, 2005].

5.1.3.1 Phase I

Isoflavone werden im Zuge des Phase I-Stoffwechsels oxidativ durch Cytochrom P450- (CYP450)-abhängige Monooxygenasen verstoffwechselt [Kulling et al., 2001]. CYP450 sind hauptsächlich in der Leber sowie Darm, Niere, Lunge und anderen Geweben lokalisiert [Frey und Löscher, 2010]. Sie besitzen als prosthetische Gruppe ein Häm-Molekül mit einem zentralen Eisenatom mit dem sie in der Lage sind molekularen Sauerstoff zu binden. Dabei wird ein Sauerstoffmolekül auf das Substrat übertragen und das zweite unter Verbrauch von NADPH zu H₂O reduziert [Ernst und Vögtli, 2010]. Die folgende Reaktion zeigt die Hydroxylierung durch CYP's, wobei RH für das Substrat steht.



In vitro wurde Genistein durch humane Lebermikrosomen zu verschiedenen mono- und dihydroxylierten Metaboliten umgesetzt, wobei als Hauptmetabolite 3'-OH-Genistein (5,7,3',4'-Tetrahydroxyisoflavon), 6-OH-Genistein (5,6,7,4'-Tetrahydroxyisoflavon) und 8-OH-Genistein (5,7,8,4'-Tetrahydroxyisoflavon) identifiziert wurden. In geringeren Mengen fand man auch die dihydroxylierten Metabolite 8,3'-OH-Genistein (5,7,8,3',4'-Pentahydroxyisoflavon) und 6,3'-OH-Genistein (5,6,7,3',4'-Pentahydroxyisoflavon). Auch im Urin konnten die oxidativen Metabolite nach sojahaltiger Kost detektiert werden [Kulling et al., 2001; Kulling et al., 2000]. Abbildung 3 zeigt schematisch die Hydroxylierung von Genistein zu den oxidativen Hauptmetaboliten.

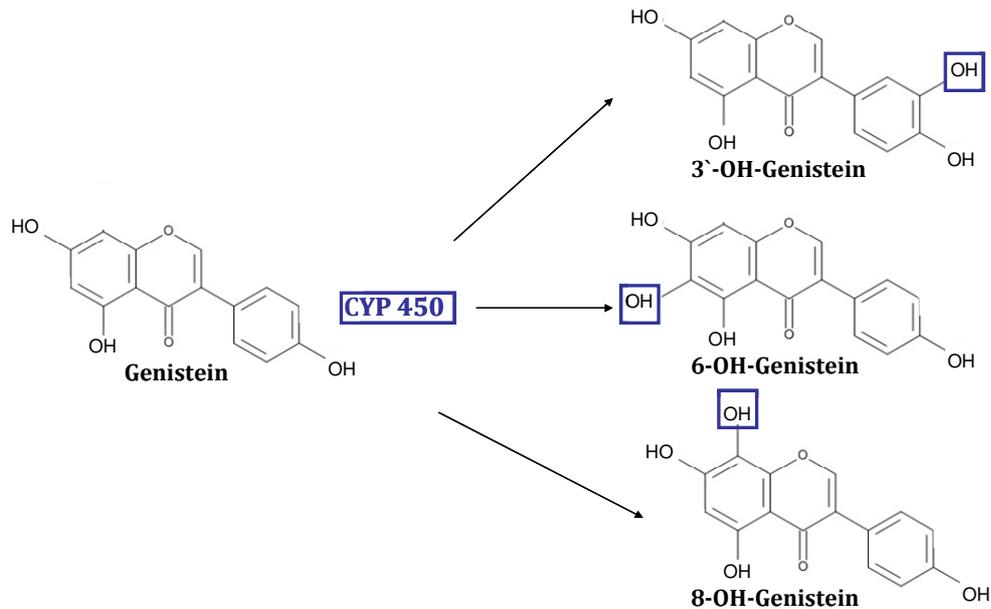


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Hydroxylierung von Genistein zu den oxidativen Hauptmetaboliten

Die Hydroxylierung von Genistein zu 3'-OH-Genistein wurde in humanen Lebermikrosomen hauptsächlich durch CYP1A2 und in geringerem Ausmaß durch CYP2E1 induziert [Hu et al., 2003]. Hydroxylierte Metabolite können auch in einigen Lebensmitteln entstehen, wenn bei der Fermentation spezifische Bakterienstämme eingesetzt werden. So konnte bei der Fermentation von Sojabohnen mit *Aspergillus oryzae* 8-OH-Genistein detektiert werden [Esaki et al., 1999]. Auch durch die zwei in Tempeh vorkommenden Bakterienstämme *Microoccus* und *Arthrobacter* konnte eine Hydroxylierung von Genistein zu 6-OH-Genistein und 8-OH-Genistein nachgewiesen werden [Klus und Barz, 1998].

5.1.3.2 Phase II

Im Zuge des Phase II-Metabolismus erfolgt eine Konjugation der Isoflavone hauptsächlich in der Leber und im Intestinaltrakt durch UDP-Glukuronyltransferasen (UGT) und Sulfotransferasen (SULT). Isoenzyme, die für die Glukuronidierung und Sulfatierung von Genistein verantwortlich sind, wurden *in vitro* als UGT 1A1, 1A4, 1A6, 1A7, 1A9 und 1A10 sowie SULT 1A1, 1A2, 1E und 2A1 identifiziert [Doerge et al., 2000]. Im Urin wurde Genistein zu 53-76 % als Monoglukuronid, 12-26 % als Diglukuronid, zu 2-15 % als Sulfoglukuronid und 1-4 % als Disulfat nachgewiesen [Adlercreutz et al., 1995]. Eine Glukuronidierung und Sulfatierung geschieht vorrangig an der Hydroxylgruppe an der C-4'- und C-7- Position [Doerge et al., 2000; Nakano et al., 2004].

5.1.3.3 Reduktive Metabolisierung durch intestinale Bakterien

Die reduktive Metabolisierung durch intestinale Bakterien spielt eine wichtige Rolle im Isoflavon-Metabolismus. Durch die Darmflora erfolgt eine Reduktion von Daidzein zu Dihydrodaidzein, welches zu Equol und *O*-Desmethylangolensin verstoffwechselt wird [Mortensen et al., 2009]. Die Bildung von Equol aus Daidzein unterliegt jedoch starken interindividuellen Schwankungen. So sind nur 25-30 % der Menschen in westlichen Ländern und 50-60 % der Menschen in asiatischen Ländern in der Lage aus Daidzein den Metaboliten Equol zu bilden [Setchell und Clerici, 2010].

Genistein wird analog zu Daidzein zu Dihydrogenistein reduziert. Es erfolgt eine Spaltung des C-Ringes, wodurch 6'-Hydroxy-*O*-desmethylangolensin gebildet wird [Kelly et al., 1993]. In weiterer Folge kann dieses zu 4-Hydroxyphenyl-2-Propionsäure hydrolysiert und weiter zu 4-Ethylphenol abgebaut werden. Das korrespondierende Equol-Derivat 5-Hydroxyequol konnte bislang noch nicht nachgewiesen werden. Auch der Metabolit 4-Hydroxyphenyl-2-Propionsäure konnte bis dato nur in Rattenurin und *in vitro*-Inkubationen mit humaner Mikroflora nachgewiesen werden [Coldham et al., 2002; Coldham et al., 1999]. Abbildung 4 zeigt die Metabolisierung von Genistein durch intestinale Bakterien.

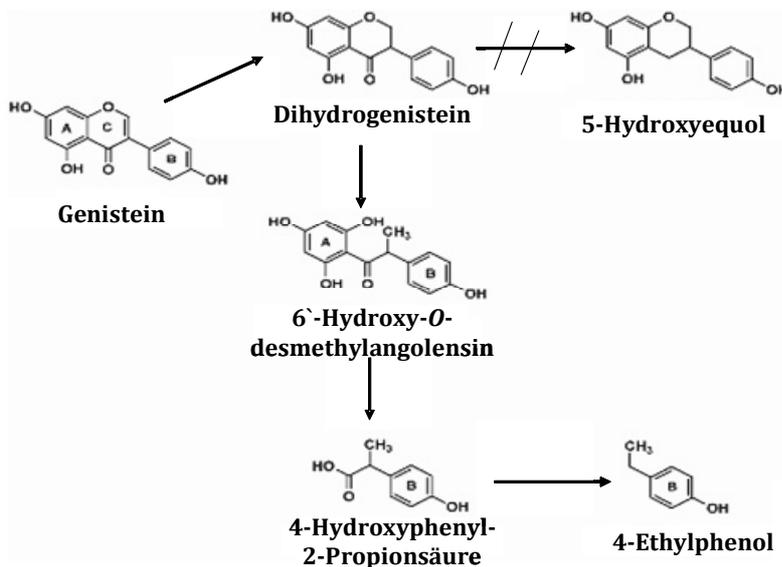


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Metabolisierung von Genistein durch intestinale Bakterien; modifiziert nach [Mortensen et al., 2009]

5.1.4 Verteilung

Nach der Resorption, Transport via Pfortader in die Leber sowie Metabolisierung treten Isoflavone in Form von Konjugaten in die systemische Zirkulation ein [Kulling und Watzl, 2003]. So konnte das Isoflavon Genistein bereits in zahlreichen Körperflüssigkeiten, wie Plasma, Urin und Fäzes, vorrangig in seiner konjugierten Form nachgewiesen werden [Adlercreutz et al., 1995; Doerge et al., 2000; Franke et al., 1998; Watanabe et al., 1998]. Ebenso ist eine Anreicherung von Genistein im Gewebe möglich, wie im Tierversuch mit Ratten gezeigt werden konnte. Endokrin-abhängiges Gewebe wie Gehirn, Leber, Schilddrüse, Prostata, Hoden, Gebärmutter, Brustdrüse und Eierstöcke zeigten einen dosis-abhängigen Anstieg der Genisteinkonzentration im Gewebe. Die Leber weiblicher Ratten enthielt den höchsten Anteil an Genistein mit 7,3 pmol pro mg Gewebe. Während Genistein im Plasma vorrangig in seiner konjugierter Form vorliegt, ist Genistein im Gewebe bis zu 100 % in Form von Aglykonen nachweisbar [Chang et al., 2000]. Auch im menschlichen Gewebe konnte eine Anreicherung von Isoflavonen festgestellt werden. Im Brustdrüsensekret prämenopausaler Frauen wurden nach 14-tägiger Isoflavon-Supplementation höhere Konzentrationen an Genistein als im Plasma gemessen [Hargreaves et al., 1999]. Auch in der Prostataflüssigkeit und im Prostatagewebe konnte eine Anreicherung von Genistein festgestellt werden, die jedoch geringer war als die Konzentration die im Plasma erreicht wurde [Hedlund et al., 2005; Hong et al., 2002].

5.1.5 Ausscheidung

Die Ausscheidung von Isoflavonen erfolgt überwiegend renal und zum geringen Teil biliär [Mortensen et al., 2009]. Die durchschnittliche Ausscheidung über den Urin beträgt zwischen 5-35 % und über den Fäzes 1-8 % der aufgenommenen Menge, wobei der überwiegende Teil innerhalb von 24 Stunden ausgeschieden wird [Faughnan et al., 2004; Xu et al., 1995].

5.1.6 Potentieller Nutzen und mögliche Risiken

Epidemiologische Studien weisen auf einen Zusammenhang zwischen einer hohen Aufnahme an Isoflavonen und einem geringeren Risiko für Brust-, Prostata-, und Darmkrebs in der asiatischen Bevölkerung hin [Wu et al., 2008; Yan und Spitznagel, 2009; Yan et al., 2010]. Ebenso konnte in epidemiologischen Beobachtungen eine Korrelation zwischen Sojaaufnahme und einem verringerten Risiko für Osteoporose, koronare Herzerkrankungen sowie ein geringeres Auftreten von menopausalen Beschwerden innerhalb der asiatischen Bevölkerung festgestellt werden [Brzezinski und Debi, 1999]. Dies hat dazu geführt, dass Isoflavone und ihre potentielle chemoprotektive Wirkung auf

den Organismus in den Mittelpunkt des wissenschaftlichen Interesses gerückt sind. Besonders für das Isoflavon Genistein konnten *in vitro* unterschiedliche Wirkungen nachgewiesen werden. So werden neben hormonellen, auch hormonunabhängige Mechanismen diskutiert, die einen Einfluss auf intrazelluläre Signalwege haben könnten [Mortensen et al., 2009].

5.1.6.1 *in vitro*

Bereits umfangreich untersucht ist die durch Estrogenrezeptoren (ER) vermittelte Wirkung der Isoflavone. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit mit dem im Menschen vorkommenden Hormon 17 β -Estradiol sind Isoflavone in der Lage an ER zu binden. [Kuiper et al., 1998; Setchell, 2001]. ER kommen in den zwei Isoformen ER- α und - β vor und sind im Körper unterschiedlich verteilt. Während man im Uterus, Hoden und Leber vor allem ER- α findet, kommt ER- β vorrangig in Lunge, Prostata, Brustdrüse und im Gastrointestinaltrakt vor [Gustafsson, 2000; Kuiper et al., 1997]. Für Genistein konnte eine 20-fach höhere Bindungsaffinität für ER- β als für ER- α beobachtet werden, die vergleichbar ist mit der Affinität von Estradiol [Kuiper et al., 1998]. Trotz hoher Bindungsaffinität wird eine 10⁴-fach höhere Konzentration benötigt um eine Transkription von Genen auszulösen [Morito et al., 2001]. Abhängig von der Konzentration, Verteilung der ER-Rezeptoren sowie der endogenen Estrogenkonzentration kann Genistein somit estrogen oder antiestrogen wirken [Hwang et al., 2006; Wang et al., 1996].

Genistein kann das Hormonsystem allerdings auch durch ER-unabhängige Mechanismen beeinflussen, indem es mit hormonmetabolisierenden Enzymen wie Aromatasen und 17- β Hydroxysteroid-Dehydrogenasen interagiert, was bisher *in vitro* gezeigt werden konnte [Brooks und Thompson, 2005; van Duursen et al., 2011]. In der Estrogen-abhängigen Brustkrebszelllinie MCF-7 zeigte sich nach Inkubation mit Genistein in niedrigen Konzentrationen (0,1-10 μ M) eine Steigerung der Proliferation. Hingegen führten hohe Konzentrationen an Genistein (20-90 μ M) zu einer Wachstumshemmung sowohl in der Estrogen-abhängigen als auch in der Estrogen-unabhängigen Brustkrebszelllinie MDA-MB-231 [Wang und Kurzer, 1997]. Somit scheint Genistein eine proliferationsstimulierende Wirkung über Estrogen-abhängige Mechanismen zu vermitteln, während in höheren Konzentrationen scheinbar hormonunabhängige Wirkungen an Bedeutung gewinnen. Einige hormonunabhängige Wirkungen werden im Folgenden näher erläutert.

Genistein wirkt *in vitro* als Inhibitor von Topoisomerase II-Enzymen, die verantwortlich sind für Kontrolle, Aufrechterhaltung und Veränderung der Topologie der DNA während der Replikation und Translation von genetischem Material. Die Enzyme führen einen transienten Doppelstrangbruch ein, wodurch ein Doppelstrang durch den Bruch hindurchgeführt werden kann. Anschließend wird der Strang wieder verschlossen. Während dieses katalytischen Kreislaufes kommt es zu einer kovalenten Bindung zwischen Topoisomerase und DNA, der auch als „cleavage complex“ bezeichnet wird [Markovits et al., 1989; Sinha, 1995]. Genistein ist in der Lage den „cleavage complex“ zu stabilisieren, wodurch es wie ein klassisches „Topoisomerase-Gift“ wirkt. In weiterer Folge kann es durch den Zusammenstoß der Replikationsgabel oder dem Transkriptionsapparat mit dem „cleavage complex“ zu DNA-Strangbrüchen kommen [Boos und Stopper, 2000].

Ebenso konnte für Genistein *in vitro* die Inhibierung von Protein-Tyrosinkinasen (PTK) belegt werden [Akiyama et al., 1987]. Dazu zählen sowohl der epidermale Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR) als auch der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktorrezeptor (VEGFR) und der Insulin-ähnliche Wachstumsfaktor-1 Rezeptor (IGF-1R) [Kim et al., 2005; Wang et al., 2004; Yu et al., 2012]. Durch dessen Inhibierung ist Genistein in der Lage zahlreiche intrazelluläre Signalwege zu modulieren, die eine wichtige Rolle in der Regulation von Wachstum, Proliferation und Differenzierung spielen [Hubbard und Till, 2000].

In vitro konnte in zahlreichen Zelllinien nach Inkubation mit Genistein in hohen Konzentrationen eine wachstumshemmende Wirkung festgestellt werden. Diskutiert wird in diesem Zusammenhang ein durch Genistein induzierter Zellzyklusarrest, welcher *in vitro* bereits mehrfach beobachtet wurde [Cappelletti et al., 2000; Chen und Donovan, 2004; Kobayashi et al., 2002; Kuzumaki et al., 1998; Matsukawa et al., 1993; Ouyang et al., 2009; Shen et al., 2000]. Darüber hinaus konnte *in vitro* nach Inkubation mit Genistein die Induktion von Apoptose beobachtet werden, die ebenfalls für dessen wachstumshemmende Wirkung verantwortlich sein könnte [Ouyang et al., 2009; Salti et al., 2000; Yu et al., 2004]. Hierbei scheint vor allem die Inhibierung des Akt-Signalweges und „nuclear factor kappa-B“ (NF- κ B) für dessen pro-apoptotische Wirkung eine entscheidende Rolle zu spielen [Davis et al., 1999; Park et al., 2005]. Ob Genistein antioxidativ oder pro-oxidativ wirkt, wird in der Literatur kontrovers diskutiert. In vielen Studien zeigte Genistein *in vitro* antioxidative Wirkungen, die möglicherweise auf den Transfer von Elektronen und Wasserstoffatomen sowie dessen Fähigkeit Metallionen zu komplexieren, beruhen [Mira et al., 2002; Mitchell et al., 1998; Win et al., 2002]. Ebenso konnte *in vitro* nach Inkubation

mit Genistein die Induktion von Phase II-Enzymen durch Aktivierung des Transkriptionsfaktors „*nuclear factor erythroid 2-related factor 2*“ (Nrf2) über den „*extracellular-signal regulated kinase*“ (ERK)- und Proteinkinase C-Signalweg festgestellt werden [Zhai et al., 2013]. Einige Studien hingegen konnten ein pro-oxidatives Potential für Genistein feststellen, das auf der Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies und Mobilisierung von endogenen Kupferionen zurückzuführen war [Salvi et al., 2002; Ullah et al., 2011].

5.1.6.2 *in vivo*

Die auf epidemiologischen Studien basierende Annahme, dass eine hohe Aufnahme an Isoflavonen zu einer Verringerung von menopausalen Beschwerden beiträgt, konnte *in vivo* nicht ausreichend belegt werden. In den meisten Studien konnte keine oder keine signifikante Verringerung von menopausalen Symptomen im Vergleich zur Placebo-Gruppe festgestellt werden [Jacobs et al., 2009]. Auch ein Einfluss der Isoflavone auf das Risiko für Osteoporose scheint nicht gesichert. Während sich in Tierversuchen eine Erhöhung der Knochenbildungsrate nach Fütterung mit Genistein zeigte, konnte in Humanstudien keine signifikante Korrelation zwischen Isoflavonaufnahme und Knochendichte festgestellt werden [Fanti et al., 1998; Liu et al., 2009].

Wie durch *in vitro* Versuche bereits belegt wurde, zeigte sich auch *in vivo* eine estrogenvermittelte, proliferationsstimulierende Wirkung von Genistein. Mäuse denen MCF-7 Brustkrebszellen implantiert wurden, zeigten nach Fütterung mit Genistein eine Vergrößerung der Tumore im Vergleich zu den Tieren in der Negativkontrolle [Hsieh et al., 1998; Wu et al., 2012]. Möglichen Einfluss könnte auch die Darreichungsform haben. Mäuse wurden nach Implantation von MCF-7 Brustkrebszellen mit Sojamehl, Sojaextrakt oder Genistin, die jeweils auf einen Genisteingehalt von 750 ppm eingestellt waren, gefüttert. Während Sojamehl keinen Einfluss auf das Wachstum der MCF-7-Zellen hatte, konnte nach Verfütterung von Sojaextrakt und Genistin eine Erhöhung der Proliferation festgestellt werden [Allred et al., 2004]. Somit kann die Wirkung von isolierten Isoflavonen nicht mit der Wirkung in komplexen Lebensmitteln gleichgesetzt werden.

Auch zytotoxische Effekte sowie Apoptose im Rattenhirn konnten nach chronischer Verabreichung von Genistein in hohen Konzentrationen festgestellt werden [Choi und Lee, 2004]. Zusätzlich zeigte sich im Tierversuch mit Mäusen eine kanzerogene Wirkung. Eine neonatale Verabreichung von Genistein (50 mg/kg KG/d) für fünf Tage führte bei 35 % der Versuchstiere zu Adenokarzinomen im Uterus [Newbold et al., 2001].

In Humanstudien konnten bisher keine genotoxischen Effekte nachgewiesen werden. Selbst bei hohen Genistein-Gaben über einen Zeitraum von 2-3 Monaten konnten in Humanstudien keine negativen Wirkungen im Vergleich zur Placebogruppe festgestellt werden [Miltyk et al., 2003; Pop et al., 2008]. Jedoch gibt es Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen einer isoflavonreichen Ernährung während der Schwangerschaft und der Entwicklung von sekundären Leukämien bei Neugeborenen. 80 % der Neugeborenen mit einer akuten myelogenen oder lymphoblastischen Leukämie zeigen eine Chromosomen-Translokation am „*mixed linkage leukemia*“ (MLL)-Gen auf, die identisch ist mit der Chromosomen-Aberration die nach einer Chemotherapie mit dem Topoisomerase II-Gift Etoposid entstehen kann [Hengstler, 2002]. Da Genistein, wie oben beschrieben, als Topoisomerase II- Gift wirkt könnten ähnliche Mechanismen eine Rolle spielen.

Die in epidemiologischen Studien beobachteten positiven Gesundheitswirkungen konnten *in vivo* bisher noch nicht ausreichend bestätigt werden. Zusätzlich konnte für das Isoflavon Genistein in höheren Konzentrationen auch zytotoxisches und genotoxisches Potential *in vitro* beobachtet werden [Klein und King, 2007]. Das Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) stuft die Einnahme von isolierten Isoflavonen als nicht risikofrei ein [BfR, 2007]. Auch die Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit (EFSA) sieht keine ausreichenden Anhaltspunkte für den Konsum von isoflavonhaltigen NEM [EFSA, 2012]. Noch unzureichend geklärt sind die potentiellen Wirkungen der entstehenden Metabolite, die aufgrund struktureller Unterschiede zu Modulationen in der biologischen Wirkung sowie im genotoxischen Potential führen könnten.

5.2 DNA-Integrität

Die genetische Stabilität wird mithilfe verschiedenster Kontrollsysteme der Zellen aufrechterhalten. So können mögliche DNA-schädigende Auswirkungen auf die Zelle verhindert und die DNA-Integrität gewährleistet werden. Die nächsten Kapitel geben einen Überblick über die Funktion des Proteins p53 nach DNA-Schädigung sowie über Zellzyklusmechanismen und Apoptose.

5.2.1 p53 - „Wächter des Genoms“

Durch unterschiedliche Kontrollsysteme sind Zellen in der Lage bei Schädigung der DNA rasch zu reagieren um die Weitergabe einer fehlerhaften genetischen Information zu verhindern. Ein wichtiges Schlüsselement ist der nach DNA-Schäden aktivierte Transkriptionsfaktor p53. Er induziert die Transkription unterschiedlicher Gene die an Zellzyklus, Reparaturmechanismen und Apoptose beteiligt sind [Kum Kum und Stephen, 2001].

Das *TP53*-Gen ist am kurzen Arm des Chromosoms 17 (17p13) lokalisiert [Miller et al., 1986]. Es kodiert das aus 393 Aminosäuren (AS) bestehende Protein p53, das in drei Domänen unterteilt werden kann [Yakovleva et al., 2002]. Die schematische Darstellung der Domänen des Proteins p53 ist in Abbildung 5 ersichtlich.

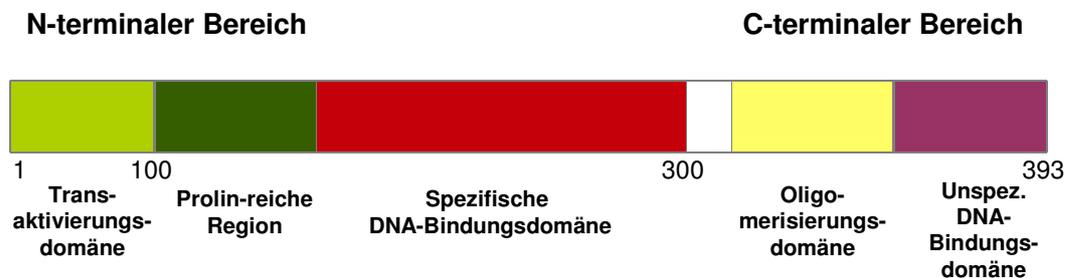


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Domänen des Proteins p53; modifiziert nach [Yakovleva et al., 2002]

Die drei Domänen sind folgendermaßen charakterisiert:

1. der N-terminale Bereich, bestehend aus einer Transaktivierungsdomäne, die eine Bindungsstelle für die E3 Ligase „*murine double minute chromosome-2*“ (Mdm2) enthält sowie einer Prolin-reichen Region, dessen Funktion noch nicht ausreichend geklärt ist
2. die sequenzspezifische DNA-Bindungsdomäne im Zentrum

3. und der C-terminale Bereich mit einer Oligomerisierungsdomäne und einer nicht-spezifischen DNA-Bindungsdomäne, die ebenfalls eine Protein-DNA-Interaktion ermöglicht [Yakovleva et al., 2002].

Das Tumorsuppressorgen *TP53* ist das in menschlichen Tumoren am häufigsten mutierte Gen. Mutationen treten hauptsächlich innerhalb der sequenzspezifischen DNA-Bindungsdomäne des Proteins auf. Dies führt häufig dazu, dass mutierte Formen von p53 in ihrer Funktion als Transkriptionsfaktor beeinträchtigt werden [Weisz et al., 2007].

5.2.1.1 Aktivierung und Regulation von p53

Unter physiologischen Bedingungen wird der Gehalt an p53 in der Zelle durch die E3-Ligase Mdm2 kontrolliert, welches p53 vom Zellkern in das Zytoplasma befördert, wo es ubiquitiniert und durch Proteasomen abgebaut werden kann [Michael und Oren, 2003]. P53 bindet spezifisch an das MDM2-Gen und stimuliert dessen Transkription, wodurch eine autoregulatorische Rückkopplungsschleife gebildet wird, um den Gehalt an p53 in der Zelle niedrig zu halten [Oren, 1999]. Zusätzlich bindet Mdm2 an die Transaktivierungsdomäne von p53 und verhindert somit die Aktivierung der Transkription [Vassilev et al., 2004]. Zellulärer Stress wie DNA-Schädigung durch UV-Strahlung, ionisierende Strahlung, genotoxische Substanzen oder Infektion mit Viren führen zu einer Stabilisierung von p53 [Bai und Zhu, 2006]. Verantwortlich dafür sind posttranslationale Modifikationen wie Phosphorylierung oder Acetylierung die zu einer Aktivierung von p53 führen [Brooks und Gu, 2003]. Nach DNA-Schädigung phosphorylieren die Serin/Threonin-Kinasen „*ataxia telangiectasia mutated*“ (ATM) und „*ataxia telangiectasia and Rad3-related protein*“ (ATR) das Protein p53 direkt am Serin 15 oder indirekt über die Checkpoint-Kinasen Chk2 und Chk1 am Serin 20 [Caspari, 2000]. Durch diese Phosphorylierung kommt es zu einer Abnahme der Affinität von p53 zu Mdm2, was dessen verringerten Abbau zufolge hat. Auch eine Phosphorylierung von Mdm2 ist möglich, was den Transport von p53 aus dem Zellkern stoppt und so auch den p53-Abbau verhindert [Moll und Petrenko, 2003]. Alle genannten Prozesse führen schließlich zu einem Anstieg von p53 im Zellkern, wo es durch sequenzspezifische DNA-Bindung die Transkription verschiedener Zielgene modulieren kann [Enoch und Norbury, 1995].

5.2.1.2 Funktionen und Auswirkungen

Je nach Ausmaß der DNA-Schädigung stimuliert p53 die Expression verschiedener Gene, die an Zellzyklus, DNA-Reparatur und Apoptose beteiligt sind. Nach DNA-Schädigung

induziert p53 in erster Folge zellzyklussteuernde Gene, die zu einem Stopp des Zellzyklus sowohl in der G₁/S-Phase als auch der G₂/M-Phase führen können [Hermeking et al., 1997; Vogelstein et al., 2000]. Der durch p53 induzierte Zellzyklusstopp dient der Zelle zur Reparatur von entstandenen DNA-Schäden. Es erfolgt eine p53-abhängige transkriptionelle Aktivierung des „*growth-arrest-DNA-damage-inducible*“ (GADD45)-Gens, dessen Genprodukt an der DNA-Reparatur beteiligt ist. Zusätzlich ist p53 auch durch Interaktion mit Proteinen wie Xeroderma-pigmentosum-B-DNA-Helikase, Xeroderma-pigmentosum-D-DNA-Helikase und p62 an der DNA-Reparatur beteiligt [Doerr und Gerlich, 2002]. Bei einer größeren Anzahl an Doppelstrangbrüchen oder unzureichender DNA-Reparatur induziert p53 vermehrt pro-apoptotische Gene der „*B-cell lymphoma-2*“ (Bcl-2) Familie wie „*Bcl-2-associated X protein*“ (BAX), „*p53 upregulated modulator of apoptosis*“ (PUMA) und NOXA (*lat.*: Schaden), die in weiterer Folge zur Induktion von Apoptose führen können [Roos und Kaina, 2006].

Somit nimmt p53, durch seine Funktion Prozesse wie DNA-Reparatur, Zellzyklus und Apoptose zu regulieren, eine zentrale Rolle in der Aufrechterhaltung der genetischen Stabilität ein [Schwartz und Rotter, 1998].

5.2.2 Zellzyklus

Jede sich teilende Zelle durchläuft einen Zellzyklus, der in die vier Phasen G₁, S, G₂ und M unterteilt werden kann. In der G₁-Phase (*G: engl. gap*) bereitet sich die Zelle auf die DNA-Synthese vor. Darauf folgt die Synthese-(S)-Phase, in der die Replikation der DNA stattfindet. In der anschließenden G₂-Phase werden Strukturproteine und Enzyme, die für die Mitose-(M)-Phase benötigt werden, gebildet. In der M-Phase, bestehend aus Pro-, Meta-, Ana-, und Telophase und anschließender Zytokinese wird der Spindelapparat ausgebildet und die verdoppelten Chromosomen auf zwei Tochterzellen verteilt. Ebenso können Zellen, die sich in der G₁-Phase befinden in die G₀-Phase, einer sogenannten Ruhephase übertreten. [Estler und Schmidt, 2007].

Der Ablauf des Zellzyklus wird durch Zyklin-abhängige Kinasen (CDK's) reguliert, die eine Bindung an Zyklin Untereinheiten benötigen, um aktiviert zu werden [Johnson und Walker, 1999]. In jeder Zellzyklusphase werden spezifische Zykline exprimiert, wobei das Level an Zyklinen durch Transkription und dem Ubiquitin-vermittelten Abbau streng reguliert wird [Pavletich, 1999].

In der G₁-Phase erfolgt eine Interaktion von Zyklin D mit CDK4 und CDK6, gefolgt von Zyklin E mit CDK2 in der späten G₁-Phase. In der S-Phase erfolgt eine Assoziation von

Zyklin A mit CDK2, in der späten S-Phase von Zyklin A mit CDK1 und in der G₂-Phase von Zyklin B mit CDK1 [Alberts et al., 2004]. Während Zyklin E, A und B phasenabhängig exprimiert werden, wird Zyklin D solange es durch Wachstumsfaktoren stimuliert wird, während des gesamten Zellzyklus exprimiert [Vermeulen et al., 2003]. Zusätzlich müssen die CDK's nach Bindung an Zykline durch die CDK-aktivierende Kinase (CAK) am Threonin 161 phosphoryliert werden, um die CDK-Kinaseaktivität und das Fortschreiten des Zellzyklus zu gewährleisten [Schafer, 1998].

5.2.2.1 Kontrollpunkte

Bei DNA-Schädigung, unvollständiger oder fehlerhafter Replikation kann der Zellzyklus an Kontrollpunkten, sogenannten Checkpoints gestoppt werden, um die Weitergabe einer potentiell fehlerhaften Erbsubstanz auf die Tochterzellen zu verhindern. Zusätzlich können Reparaturmechanismen aktiviert oder Apoptose induziert werden [Karlson und Doenecke, 2005]. Wichtige Kontrollpunkte befinden sich beim Übergang von der G₁ in die S-Phase (G₁/S-Checkpoint) und am Übergang von der G₂-Phase in die M-Phase (G₂/M-Checkpoint). Weitere Checkpoints befinden sich in der S-Phase und in der M-Phase [Vermeulen et al., 2003]. Abbildung 6 zeigt den Zellzyklus einer eukaryotischen Zelle und dessen Regulation durch CDK/Zyklin-Komplexe sowie wichtige Kontrollpunkte, die als rote Balken gekennzeichnet sind.

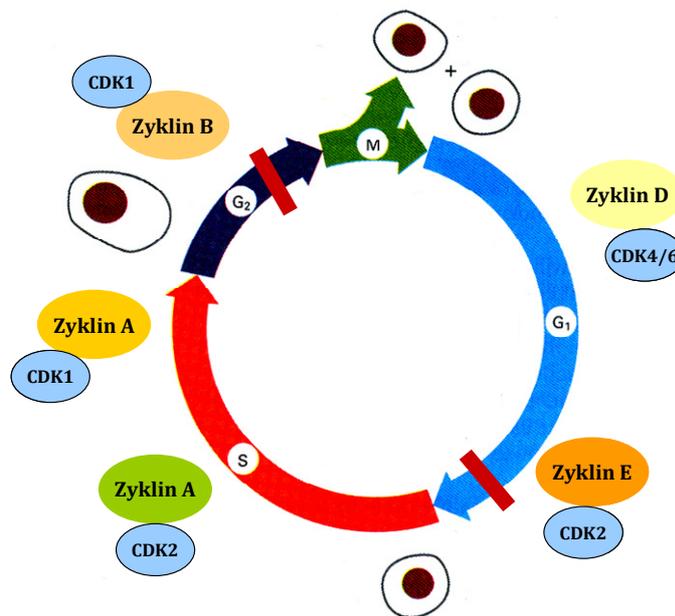


Abbildung 6: Schematische Abbildung des Zellzyklus einer eukaryotischen Zelle sowie dessen Regulation durch CDK/Zyklin-Komplexe. Kontrollpunkte sind als rote Balken gekennzeichnet; modifiziert nach [Alberts et al., 1994]

Eine wichtige Rolle am G₁/S-Phasen-Kontrollpunkt übernimmt der CDK-Inhibitor p21, der p53-abhängig exprimiert wird. P21 bindet an CDK4,6/Zyklin D- und CDK2/Zyklin E-Komplexe und inaktiviert diese [Pietenpol und Stewart, 2002]. Dadurch wird die Phosphorylierung des Retinoblastoma-Proteins und somit die Freisetzung des Transkriptionsfaktors E2F, der für den Eintritt in die S-Phase benötigt wird, verhindert [Amundson et al., 1998].

Der Übergang von der G₂-Phase in die M-Phase wird durch den CDK1/Zyklin B – Komplex, der auch als Mitose-Promoting-Faktor bezeichnet wird, reguliert. Durch Phosphorylierung am Tyrosin 15 und Threonin 14 des CDK1 durch die Kinasen Wee1 und Myt1, wird der Komplex während der G₂-Phase inaktiv gehalten. Zu Beginn der Mitose erfolgt die Dephosphorylierung von CDK1 durch die Phosphatase Cdc25c. CDK1 ist somit aktiv und die Zelle ist in der Lage in die M-Phase einzutreten [Taylor et al., 1999]. Entstehen DNA-Schäden während der G₂-Phase ist ein Zellzyklusarrest p53-abhängig sowie -unabhängig möglich. Der durch p53-induzierte CDK-Inhibitor p21 ist auch am G₂/M-Checkpoint beteiligt, indem er an CDK1/Zyklin B-Komplexe bindet und somit den Übergang von der G₂-Phase in die M-Phase verhindert. Weitere Zielgene von p53 sind GADD45 und 14-3-3-sigma (14-3-3 σ) [Taylor und Stark, 2001]. Das Genprodukt Gadd45 agiert als Inhibitor des Zellzyklus, indem es an CDK1 bindet und somit zu einer Dissoziation des CDK1/Zyklin B-Komplexes führt [Zhan et al., 1999]. Ebenso verhindert 14-3-3- σ den Übergang von der G₂-Phase in die M-Phase, indem es an Cdc25c bindet und dadurch die Dephosphorylierung von CDK1 verhindert [Hermeking et al., 1997]. Ein p53-unabhängiger Zellzyklusarrest erfolgt durch die beiden Checkpointkinasen Chk1 und Chk2, die zur Phosphorylierung von Cdc25c führen. Dadurch wird die Dephosphorylierung von CDK1 und somit der Eintritt in die M-Phase verhindert [Vermeulen et al., 2003].

Durch den Zellzyklusarrest können Reparaturprozesse aktiviert werden um den DNA-Schaden zu beheben. Nach erfolgreicher Reparatur kann der Zellzyklus wieder aufgenommen werden. Kann der Schaden nicht ausreichend repariert werden oder ist der Schaden an der DNA zu groß, kann die Zelle alternativ die Apoptose, den sogenannten „programmierten Zelltod“ einleiten [Pietenpol und Stewart, 2002].

5.2.3 Apoptose

Das Wort Apoptose, das 1972 erstmals von *Kerr et al.* geprägt wurde leitet sich von dem griechischen Wort *apo* (= weg) und *ptosis* (= fallen) ab und beschreibt das Fallen der Blätter im Herbst [Kerr et al., 1972]. Als Apoptose bezeichnet man den sogenannten „programmierten Zelltod“, der im Gegensatz zur Nekrose von der Zelle selbst aktiv durch-

geführt wird [Kanduc et al., 2002]. Die Apoptose spielt sowohl eine entscheidende Rolle bei der Eliminierung von geschädigten Zellen als auch bei verschiedenen physiologischen Prozessen wie bei der Entwicklung, Proliferation, Aufrechterhaltung der Gewebs-homöostase und Zelldifferenzierung [Ola et al., 2011].

Die Apoptose wird durch spezifisch morphologische Veränderungen charakterisiert. In der frühen Phase kommt es zur Schrumpfung der Zelle und Kondensation von Chromatin im Zellkern. In weiterer Folge kann es zu einem sogenannten „blebbing“, einer bläschenförmigen Ausstülpung der Plasmamembran sowie Kernfragmentierung und Abschnürung von Apoptosekörperchen kommen [Elmore, 2007]. Zusätzlich wird im Frühstadium der Apoptose Phosphatidylserin auf die äußere Lipidschicht exponiert, wodurch *in vivo* apoptotische Zellen von den Rezeptoren der Phagozyten erkannt und abgebaut werden können [Fadok et al., 1998]. Im Gegensatz kommt es im Zuge der Nekrose zum Anschwellen der Zelle und zur Zerstörung der Plasmamembran. Dadurch kommt es zur Freisetzung des zytoplasmatischen Inhaltes, wodurch *in vivo* eine Entzündungsreaktion ausgelöst wird [Han et al., 2008]. Abbildung 7 zeigt typische morphologische Veränderungen während der Nekrose und Apoptose.

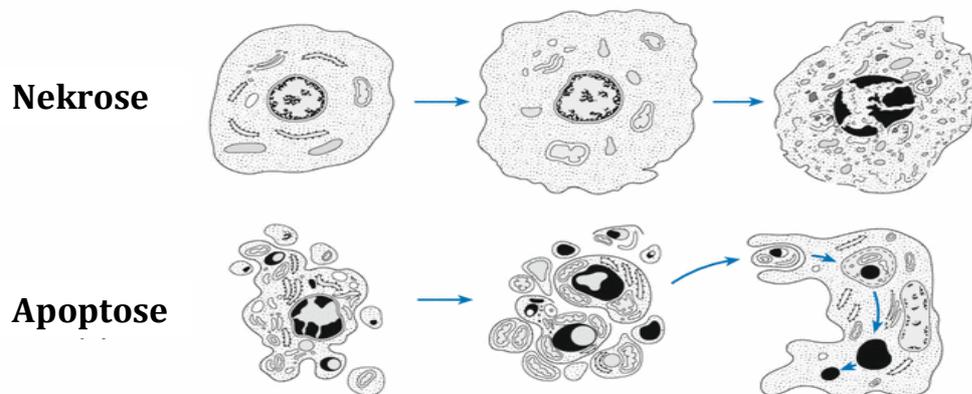


Abbildung 7: Morphologische Veränderungen bei Nekrose und Apoptose; modifiziert nach [Hiddemann und Bartram, 2010]

Die Induktion von Apoptose kann durch zwei verschiedene Signalwege erfolgen. Man unterscheidet zwischen dem intrinsischen mitochondrialen Signalweg und dem extrinsischen Signalweg, induziert durch sogenannte „Todesrezeptoren“ [Lawen, 2003].

5.2.3.1 Intrinsischer Signalweg

Der intrinsische Signalweg wird über DNA-Schäden aktiviert und ist assoziiert mit mitochondrialer Depolarisation und Freisetzung von Cytochrom c vom mitochondrialen Inter-membranraum in das Zytoplasma [Haupt et al., 2003]. Nach DNA-Schädigung erfolgt durch

den Tumorsuppressor p53 die Expression von pro-apoptotisch wirkenden Proteinen wie Bax, Puma und Noxa. [Pietenpol und Stewart, 2002]. Diese führen zur Freisetzung von Cytochrom c und zur Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran, was den initiierenden Schritt des intrinsischen Signalweges darstellt und auch als „point of no return“ bezeichnet wird [Chipuk et al., 2006].

Freigesetztes Cytochrom c bindet im Zytosol an spezifische Monomere, die „Apoptose-Protease-aktivierender Faktor 1“ (Apaf-1) genannt werden. Es erfolgt eine Konformationsänderung, die eine stabile Assoziation mit ATP verhindert. Apaf-1 rekrutiert durch Interaktion mit seiner Caspase-Rekrutierungs-Domäne (CARD) Procaspase-9, wodurch ein Komplex entsteht, der als Apoptosom bezeichnet wird. Dieser Komplex ist nun in der Lage durch eine proteolytische Spaltung Procaspase 9 in seine aktive Form zu überführen. Das aktivierte Enzym kann in weiterer Folge die Effektor-Caspasen -3, -6 und -7 aktivieren [Boatright und Salvesen, 2003; Nicholson und Thornberry, 2003]. Die Caspasen (cysteinyln aspartate proteases) führen in weiterer Folge zur Induktion von Apoptose. Sie beinhalten ein Cystein im aktiven Zentrum und sind in der Lage Zielproteine spezifisch nach Aspartatresten zu spalten [Alenzi et al., 2010]. Dadurch sind sie in der Lage intrazelluläre Polypeptide wie Strukturelemente des Zytoplasmas und Zellkerns zu spalten, die zu den typischen morphologischen und biochemischen Veränderungen während der Apoptose führen [Earnshaw et al., 1999].

5.2.3.2 Extrinsischer Signalweg über Todesrezeptoren

Der extrinsische Signalweg erfolgt über sogenannte „Todesrezeptoren“, die zur Tumornekrose-Faktor (TNF)-Familie gehören. Zu den am besten untersuchten Todesrezeptoren zählen der Fas-Rezeptor, der TNF-Rezeptor-1 (TNF-R1) und der „*TNF-related apoptosis-inducing ligand*“ (TRAIL)-Rezeptor 1 und 2. Die Rezeptoren sind charakterisiert durch eine zytoplasmatische Todesdomäne, die aus 80 Aminosäuren besteht [Guicciardi und Gores, 2009]. Nach Bindung des Fas-Liganden an den Fas-Rezeptor kommt es zur Oligomerisierung des Rezeptors und zur Aktivierung der Todesdomäne. Das Adapterprotein „*Fas associated death domain*“ (FADD) besteht aus einer Todesdomäne und einer Todesrezeptordomäne. FADD bindet an den Todesrezeptor durch Interaktion der Todesdomänen und gleichzeitig an Procaspase-8 durch Interaktion mit der Todeseffektordomäne, wodurch ein Komplex entsteht, der als „*Death Inducing Signalling Complex*“ (DISC) bezeichnet wird. In weiterer Folge kommt es zur Autoaktivierung der Procaspase-8, wodurch die Effektorcaspasen -3, -6 und -7 aktiviert und der programmierte Zelltod ausgelöst wird [Thorburn, 2004]. Der extrinsische Signalweg verläuft im Gegensatz zum

intrinsischen Signalweg weitgehend unabhängig von den Mitgliedern der Bcl-2 Familie. Jedoch erfolgt eine Verbindung des extrinsischen mit dem intrinsischen Signalweg über das Protein „*BH3-interacting domain death agonist*“ (Bid). Bid kann nach Stimulierung der Todesrezeptoren durch Caspase-8 gespalten werden, wodurch die aktive Form „*truncated Bid*“ (tBid) gebildet wird. Die aktivierte pro-apoptotisch wirkende Form führt zur Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran und stellt somit eine Verbindung zwischen extrinsischen und intrinsischen Signalweg dar [Kantari und Walczak, 2011]. Abbildung 8 zeigt eine Darstellung des extrinsischen und intrinsischen Signalweges.

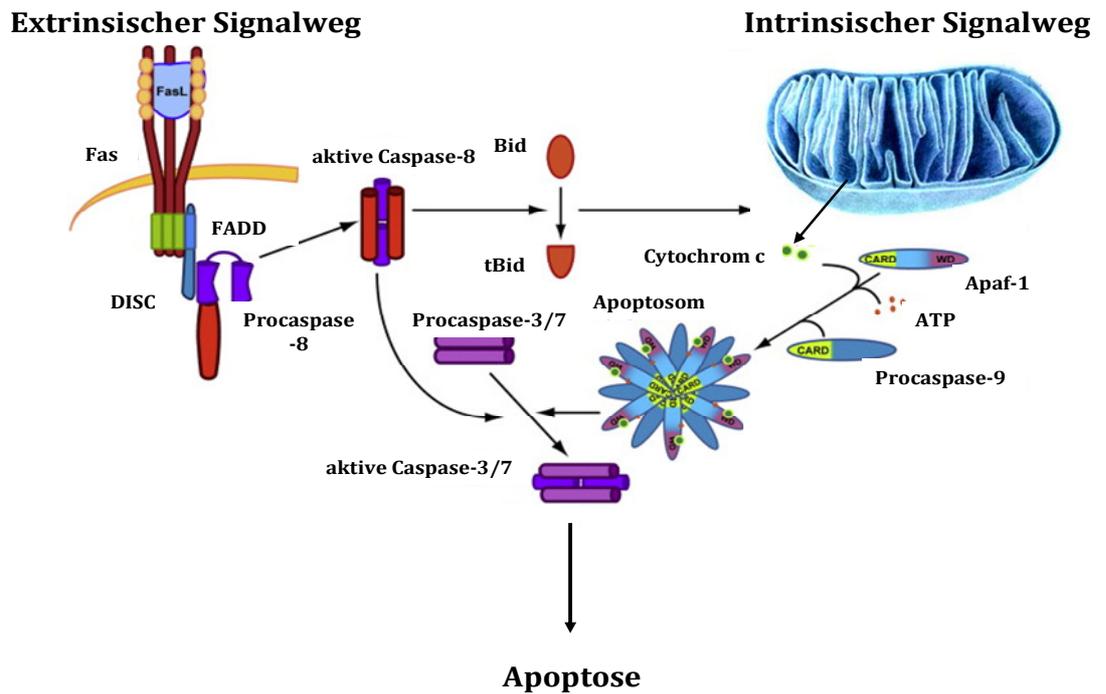


Abbildung 8: Darstellung des extrinsischen und intrinsischen Signalweges; modifiziert nach [Thorburn, 2004]

6 Problemstellung

Aufgrund des steigenden Gesundheitsbewusstseins der Bevölkerung nimmt der Absatz an verschiedenen NEM stetig zu. Vor allem isoflavonreiche Supplemente werden vermehrt als „natürliche“ Alternative zur Hormonersatztherapie angeboten und sind in Apotheken und Reformhäusern rezeptfrei erhältlich [BfR, 2007]. Ob und inwieweit eine hohe Aufnahme an Isoflavonen zu einer Verringerung an menopausalen Beschwerden beiträgt, wird in der Literatur kontrovers diskutiert [Jacobs et al., 2009; Krebs et al., 2004]. Auch die Frage nach potentiell negativen Effekten durch eine erhöhte Aufnahme an Isoflavonen ist bisher noch unzureichend untersucht. Vor allem für das Isoflavon Genistein konnte *in vitro* genotoxisches Potential nachgewiesen werden, das unter anderem vermutlich auf dessen Wirkung als Topoisomerase II-Gift zurückzuführen ist [Kulling und Metzler, 1997; Salti et al., 2000]. Auch über die potentiellen Wirkungen der im Organismus gebildeten Metabolite ist bisher noch wenig bekannt. Im oxidativen Metabolismus von Genistein können Metabolite mit katecholischen Strukturelementen entstehen (Abbildung 9), die sich dadurch möglicherweise in ihrem toxikologischen Potential von der Muttersubstanz unterscheiden können [Kulling et al., 2001].

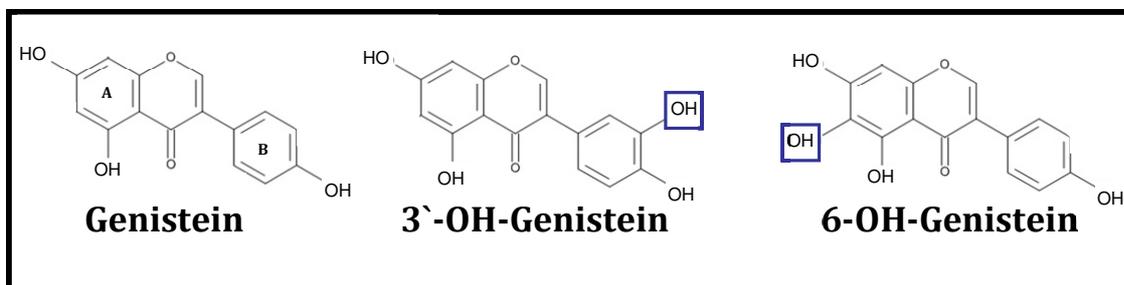


Abbildung 9: Chemische Struktur von Genistein und seinen oxidativen Metaboliten. Die zusätzliche Hydroxylgruppe der Metabolite ist durch ein blaues Quadrat markiert.

Anika Schröter konnte im Rahmen ihrer Dissertation mittels Comet-Assay nach 24-stündiger Inkubation unterschiedliche DNA-strangbrechende Potentiale der Testsubstanzen feststellen. Die Aufklärung der Ursache der unterschiedlichen Potentiale der Substanzen DNA-Strangbrüche zu induzieren, sollte deshalb in der vorliegenden Arbeit näher untersucht werden.

Um das genotoxische Potential der Testsubstanzen zu bestätigen und Unterschiede in der DNA-schädigenden Wirkung zu erfassen, sollte der Einfluss der Substanzen auf den Phosphorylierungsstatus des Proteins p53 ermittelt werden. Das Protein p53 wird bei DNA-Schädigung rasch phosphoryliert, wobei der Phosphorylierungsgrad ein Maß für die

DNA-Schädigung darstellt und mittels Western Blot bestimmt werden kann. Der Transkriptionsfaktor p53 stellt ein wichtiges Schlüsselement in der Regulation des Zellzyklus dar und transaktiviert bei Schäden an der DNA spezifische Zielgene, die zu einem Stopp im Zellzyklus führen. Hierbei sollte als nächsten Punkt dieser Arbeit, die Untersuchung der Zellzyklusverteilung mittels Durchflusszytometrie, Aufschluss über eine mögliche DNA-Schädigung durch die Substanzen liefern.

Da eine Erhöhung der DNA-Strangbruchrate im Comet-Assay erst nach 24-stündiger Inkubation beobachtet werden konnte, könnten hierbei auch sekundäre Effekte wie das Auftreten von Zytotoxizität oder Apoptose eine Rolle spielen. Deshalb sollten die Substanzen auf dessen zytotoxisches Potential sowie dessen Fähigkeit Apoptose zu induzieren untersucht werden, um auf mögliche falsch-positive Ergebnisse im Comet-Assay rückschließen zu können.

Da vor allem der Kolon höheren Isoflavonkonzentrationen ausgesetzt ist, wurden alle Untersuchungen am Modell der Kolonkarzinomzelllinie HT-29 durchgeführt. Um eine mögliche Interaktion der Polyphenole mit dem Zellkulturmedium zu verhindern und somit verfälschte Ergebnisse durch H₂O₂-vermittelte Artefakte zu vermeiden, erfolgen alle Versuche dieser Arbeit unter dem Zusatz von Katalase (100 U/ml).

7 Material und Methoden

7.1 Materialverzeichnis

Verwendete Chemikalien:

4',6-diamidino-2-phenylindol (DAPI)
 β-Mercaptoethanol
 Ammoniumperoxosulfat (APS)
 Bovine Serum Albumin-Standard
 Camptothecin
 Coomassie-Brilliant-Blue® G-250
 Bromphenolblau
 Dimethylsulfoxid (DMSO)
 Dinatriumhydrogensulfat (Na₂HPO₄)
 Ethanol
 Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)
 Glycerol
 Glycin (C₂H₅NO₂)
 Hydroxyurea
 Igepal CA-300
 Kaliumchlorid (KCl)
 Kaliumdihydrogenphosphat (KH₂PO₄)
 Katalase
 Methanol
 Natriumchlorid (NaCl)
 Natrium-Dodecylsulfat (SDS)
 Natriumfluorid (NaF)
 Natriumorthovanadat (Na₃VO₄)
 Natronlauge (NaOH)
 n-Butanol
 N,N,N',N'- Tetramethylethylendiamin (TEMED)
 Nocodazol
 Milchpulver
 Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)
 Phosphorsäure (H₃PO₄)
 Protease inhibitor cocktail tablets (PIM)
 Rotiphorese 30(37,5:1); Acrylamid 30 %ige wässrige Lösung

Hersteller:

Partec GmbH, Münster
 Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
 Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
 Thermo Scientific Inc., Wien
 Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
 Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
 Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
 Carl Roth GmbH +Co. KG, Karlsruhe
 Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
 Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
 Carl Roth GmbH +Co. KG, Karlsruhe
 Carl Roth GmbH +Co. KG, Karlsruhe
 Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
 Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
 Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
 Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
 Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
 Carl Roth GmbH +Co. KG, Karlsruhe
 Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
 Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
 Roche Applied Science, Basel
 Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe

Salzsäure rauchend (HCl)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
SeeBlue® Plus 2 Prestained Standard	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Tris(hydroxymethyl-)aminomethan (TRIS)	Carl Roth GmbH +Co. KG, Karlsruhe
Triton® X-100	Carl Roth GmbH +Co. KG, Karlsruhe
Tween 20	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Western Lightning – ECL – Oxidizing Reagent	Roche Applied Science, Basel, Schweiz
Western Lightning – ECL – Enhanced Luminol Reagent	Roche Applied Science, Basel, Schweiz

Testkits:

Cytotoxicity Detection Kit
Cell Death Detection Elisa ^{PLUS} Kit
Cell Proliferation Kit (WST-1)
Guava® Cell Cycle Reagent
Guava Nexin® Reagent
Guava ViaCount®

Testsubstanzen:

Genistein
3`-OH-Genistein
6-OH-Genistein

Antikörper:

pp53 (rabbit)
α-Tubulin (mouse)
Anti-rabbit (donkey) HRP-conj.
Anti-mouse (rabbit) HRP-conj.

Reagenzien für Zellkultur:

Dulbecco`s Modified Eagle Medium (DMEM)
Fetales Kälberserum (FKS)
Penicillin/Streptomycin (P/S)
Trypanblaulösung

Hersteller:

Roche Applied Science, Basel, Schweiz
Roche Applied Science, Basel, Schweiz
Roche Applied Science, Basel, Schweiz
Millipore Corporation, Hayward, CA, USA
Millipore Corporation, Hayward, CA, USA
Millipore Corporation, Hayward, CA, USA

Hersteller:

Extrasynthese
Plantech UK
Plantech UK

Hersteller:

Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland

Hersteller:

Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München

Tyrpsin

Serva GmbH, Heidelberg

Gebrauchs- und Bedarfsgegenstände:

Hersteller

24-Wellplatten

VWR, Wien, Österreich

96-Wellplatten

Sarstedt AG & Co, Nümbrecht

Deckgläser

VWR, Wien, Österreich

Glaspipetten

VWR, Wien, Österreich

Kanülen

VWR, Wien, Österreich

Latexhandschuhe

Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe

Nitrozellulosemembran

Pall Life Science

Pasteurpipetten

Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe

Petrischalen (d = 10 cm)

Sarstedt AG & Co, Nümbrecht

Pipettenspitzen (gelb, blau, klar)

Sarstedt AG & Co, Nümbrecht

Superfrost® Objektträger

Menzel-Gläser

Tubes

Sarstedt AG & Co, Nümbrecht

Whatmanpaper

Whatman und Schleicher & Schuell

Zellkulturflaschen

Sarstedt AG & Co, Nümbrecht

Zellschaber

Sarstedt AG & Co, Nümbrecht

7.2 Geräteverzeichnis

Gerät:	Modell:	Firma:
Autoklav	Systec DX-150	Systec GmbH
Blottingapparatur	Trans-Blot® Cell, 49 BR 3584	Bio Rad Laboratories
Bunsenbrenner	Fuego Basic	WLD-TEC
Brutschrank	Heracell 240 i, CO2 Incubator	Thermo Scientific Inc.
Durchflussszytometer	Guava EasyCyte	Millipore, Hayward, USA
Eismaschine	MF 46	Scortsman Frimont
Elektrophoresekammer	Perfect-Blue, PeqLab	Biorad Laboratories
Elektrophoresespannungs- umwandler	peQLAB Power Supplies	PEQLAB Biotechnologie GmbH
Einschweißgerät		Severin Elektrogeräte GmbH
Fluoreszenzmikroskop	Axio Scope A1	Zeiss
Handhomogenisator		Wheaton
Kühl-/Gefrierschränke	Liebherr Comfort	Liebherr
Magnetplattform	Roto-Shake Genie	Scientific Industries, Inc.
Mikrotiterplattenleser	Victor ³ V 1240 Multitable Counter	Perkin Elmer

Material und Methoden

Mikroskop	Axiovert 40C	Zeiss
Neubauerzählkammer		Marienfeld
pH-Meter	Mettler Toledo Seven Easy	Mettler Toledo
Pipetten		Eppendorf GmbH
Pipettus	pipetus®	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG
Pumpe		IBS
Schüttler	Mini-Rocker Shaker MR-1	PEQLAB Biotechnologie GmbH
Sterilbank	Hera Safe KS 18	Thermo Scientific
Thermo-Magnetrührer	IKA® RCT basic control	IKA-Werke GmbH Co. KG
Ultraschallbad	Ultraconic Cleaner	VWR, Wien, Österreich
UV-B-Bestrahlungskammer	BLX-312	Vilber
Vortexer	Vortex-Genie® 2	Scientific Industries , Inc.
Waage (Analysenwaage)	New Classic MF ML 204	Mettler – Toledo AG
Waage (Grobwaage)	New Classic MF ML 6001/01	Mettler – Toledo AG
Wärmebad	SW-2004	VWR, Wien, Österreich
Zentrifuge	Tischzentrifuge Mikro 220R	Andreas Hettich GmbH & Co.KG

7.3 Zellkultur

7.3.1 Zelllinie

Die Zelllinie HT-29 wurde 1964 von einem primären Kolonadenokarzinom einer 44-jährigen Frau kaukasischer Abstammung etabliert. Die adhärenenten und epithelialen Zellen bilden gut differenzierbare Tumore ersten Grades und wachsen sowohl als Monolayer als auch in großen Kolonien. Die Verdopplungszeit beträgt 40-60 Stunden [DSMZ, Braunschweig].

7.3.2 Kultivierung der Zellen

Die Kultivierung der HT-29 Zellen erfolgt in „Dulbecco's Modified Eagle's Medium“ (DMEM mit 4,5 g/l Glukose, L-Glutamin und ohne Na-Pyruvat) mit 10 % hitzeinaktiviertem fetalen Kälberserum (FKS) und 1 % Penicillin/Streptomycin (P/S 10 000 Einheiten/10 000 µg/ml). FKS enthält eine Vielzahl an Komponenten wie Wachstumsfaktoren, Hormone, Vitamine und Spurenelemente. Penicillin/Streptomycin findet Einsatz als Breitbandantibiotika gegen grampositive und gramnegative Bakterien [Boxberger, 2007]. Die Zellen werden im Brutschrank bei 37°C, 5 % CO₂ und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit kultiviert.

7.3.3 Mediumwechsel

Das Medium beinhaltet essentielle Nährstoffe, die für das Wachstum und die Vitalität der Zellen benötigt werden. Da die Inhaltsstoffe von den Zellen

verbraucht werden bzw. alle Stoffe nicht bei 37°C unbegrenzt stabil sind, ist es notwendig in bestimmten Abständen (3-4 Tagen) einen Mediumwechsel durchzuführen. Weiters kommt es durch den Zellstoffwechsel zu einer Anhäufung von Stoffwechselprodukten wie Laktat und Ammoniak, die zu einem Anstieg des pH-Wertes führen. Die Verschiebung des pH-Wertes in den sauren Bereich wird durch den verwendeten Farbindikator Phenolrot durch einen Farbumschlag von rot zu gelb angezeigt [Schmitz, 2011].

Bei einem Mediumwechsel wird das Medium mit einer sterilen Pasteurpipette, ohne den Zellrasen zu beschädigen, abgesaugt und durch frisches, 37°C warmes Medium (10 % FKS) ersetzt. Die Menge des zu ersetzenden Mediums beträgt je nach Größe der Flasche 20 ml (80 cm² Wachstumsfläche) oder 40 ml (175 cm² Wachstumsfläche).

7.3.4 Passagieren

Ist die gesamte Wachstumsfläche von Zellen bedeckt, bezeichnet man die Kultur als konfluent. Bei einer weiteren Kultivierung kann es zu einem Absinken der Proliferationsrate und zu einem Absterben von Zellen kommen. Um ein gleichmäßiges Wachsen der Zellen zu ermöglichen, ist es notwendig die Zellen zu passagieren [Boxberger, 2007].

Durchführung

- PBS, Medium (10 % FKS) und Trypsin/EDTA-Lösung auf 37°C im Wasserbad erwärmen
- das Medium mit einer sterilen Pipette absaugen
- die Zellen mit 10 ml PBS waschen
- den Zellrasen mit 2,5 ml Trypsin/EDTA - Lösung benetzen und für zwei Minuten bei 37°C inkubieren
- die Kulturflasche gegen die Handinnenfläche schlagen um die Zellen von der Flascheninnenwand zu lösen
- die Trypsinierungsreaktion mit 10 ml serumhaltigem Medium abstoppen und noch haftende Zellen mit dem Medium von der Flascheninnenwand spülen
- die Zellsuspension ausreichend resuspendieren und in ein „Tube“ überführen
- 1-2 ml der Zellsuspension in der Kulturflasche belassen und mit 20 ml (80 cm² Wachstumsfläche) oder 40 ml (175 cm² Wachstumsfläche) Medium (10 % FKS) versetzen
- bei 37°C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit kultivieren

Reagenzien

DMEM	+4,5 g/l Glukose	
	+L(-)-Glutamin	
	-Pyruvat	
	+Phenolrot	

10x PBS	NaCl	1,71 M
	Na ₂ HPO ₄	100 mM
	KCl	34 mM
	KH ₂ PO ₄	18 mM

in H₂O_{bidest.} lösen, pH 7,4 einstellen, vor Verwendung auf 1x PBS verdünnen und autoklavieren

Trypsin/EDTA-Lösung	Trypsin	500 mg
	EDTA	250 mg
	10x PBS	100 ml

pH 7,4 einstellen, auf 1 L mit H₂O_{bidest.} auffüllen, über Nacht auf Eis rühren, steril filtrieren, zu 5 ml aliquotieren und bei -20°C lagern

7.3.5 Einfrieren und Lagerung von Zellstocks

Zur längerfristigen Aufbewahrung von Zellen ist es möglich diese bei -196°C in flüssigem Stickstoff zu lagern. Als Schutzsubstanzen können DMSO oder Glycerin eingesetzt werden, die eine Kristallbildung sowie partielle Dehydratation des Zytoplasmas verhindern, indem sie das Zellwasser ersetzen und binden [Lindl, 2008].

Durchführung

- in ein Kryoröhrchen eine Mischung aus DMSO und FKS in einem Verhältnis von 1:2,3 vorlegen
- die Zellsuspension mit einer Zellzahl von mindestens 5×10^6 hinzugeben
- die Lösung durch leichtes Schwenken miteinander vermischen
- die Zellstocks bei -20°C für 24 h einfrieren, bei -80°C im Biofreezer zwischenlagern und anschließend für die Langzeitlagerung bei -196°C in flüssigem Stickstoff überführen

7.3.6 Auftauen von Zellen

Durchführung

- die gefrorenen Zellstocks im Wasserbad (37°C) unter leichtem Schwenken auftauen
- zur Verringerung der DMSO-Konzentration den Zellstock zügig mit 10 ml Medium (20 % FKS) vereinen
- die Zellsuspension 5 Minuten bei 130g zentrifugieren und den Überstand verwerfen
- das Pellet in 5 ml Medium (20 % FKS) resuspendieren
- in einer kleinen Zellkulturflasche (25 cm² Wachstumsfläche) 5 ml Medium (20 % FKS) vorlegen und die Zellsuspension überführen
- nach drei Tagen bei erfolgreichem Anwachsen der Zellen einen Mediumwechsel mit 20 % FKS durchführen

- nach Erreichen einer gewissen Zelldichte die Zellen in Zellkulturflaschen mit größerer Wachstumsfläche (80 bzw. 175 cm²) kultivieren
- nach ein bis zwei Wochen den FKS-Gehalt im Medium auf 10 % reduzieren

7.3.7 Zellzahlbestimmung mittels Neubauerzählkammer

Die Zellzahlbestimmung erfolgt mithilfe eines Häemocytometers nach Neubauer, wobei die Zellen mit Trypanblau gefärbt werden. Trypanblau kann aufgrund seiner Größe (M= 960,8 g/mol) die Membran intakter Zellen nicht passieren. Lebende Zellen erscheinen unter dem Mikroskop leuchtend hell. Bei toten Zellen, deren Plasmamembran durchlässig geworden ist, kann der Azofarbstoff in das Zytoplasma gelangen. Somit werden tote Zellen tiefblau gefärbt [Schmitz, 2011].

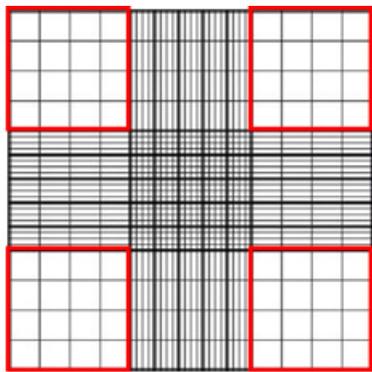


Abbildung 10: Neubauer-Zählkammer - Auszählung der vier großen Eckquadrate; [http://www.zaehlkammer.de/deutsch/neubauer.improved.html]

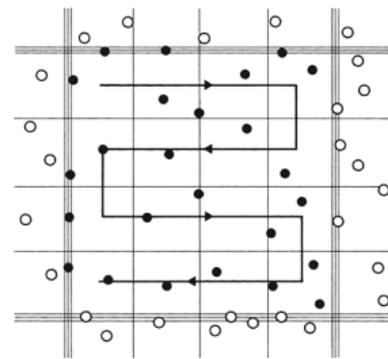


Abbildung 11: Auszählschema eines Eckquadrates; [Schmitz, 2011]

Die Zellzahl wird nach folgender Formel berechnet:

$$Z \times VF \times 10^4 = \text{Zellzahl/ml}$$

Z = Mittelwert der gezählten Zellen aus den 4 Eckquadraten der Zählkammer

VF = Verdünnungsfaktor - beruht auf der Verdünnung der Zellsuspension mit Trypanblau

10⁴ = Kammerfaktor - dieser Faktor wird eingesetzt, um die Zellzahl auf einen Milliliter zu beziehen. Der Kammerfaktor ergibt sich aus einer Fläche von 1 mm² und einer Tiefe von 0,1 mm eines großen Quadrates. Daraus ergibt sich ein Volumen von 0,1 µl [Schmitz, 2011].

Durchführung

- die passagierten Zellen gut resuspendieren und mit Trypanblau (1:10 Verdünnung) färben

- das Deckglas durch Anhauchen befeuchten und auf die Zählkammer aufbringen – bei Erscheinen der Newtonschen Ringe sitzt das Deckglas korrekt
- nach sorgfältigem Resuspendieren der gefärbten Zellen die Zählkammer, durch Ansetzen der Pipette an den Rand des Deckglases, mit der Suspension füllen
- die Neubauer-Zählkammer unter dem Mikroskop positionieren und die vier großen Eckquadrate auszählen

7.3.8 Zellzahlbestimmung mittels Durchflusszytometrie

Bei der Zellzahlbestimmung von größeren Probenansätzen empfiehlt sich die durchflusszytometrische Auszählung der Zellen mit dem Guava EasyCyte Durchflusszytometer von Millipore und dem Programm ViaCount. Die Zellen werden mit dem kommerziell erhältlichen „Guava ViaCount Reagent“ (Millipore), das aus zwei DNA-bindenden Farbstoffen besteht, gefärbt. Die beiden DNA-bindenden Farbstoffe besitzen unterschiedliche Membranpermeabilität und fluoreszieren bei unterschiedlicher Wellenlänge. Der Membran-durchlässige Farbstoff färbt alle Zellen mit Zellkern und somit alle lebenden und toten Zellen. Der Membran-undurchlässige Farbstoff kann die Membran lebender Zellen nicht durchdringen und färbt somit nur die DNA toter Zellen, dessen Plasmamembran durchlässig ist. Neben der Bestimmung der Zellzahl wird auch die Viabilität in Prozent berechnet, die sich aus dem Verhältnis lebender Zellen zur Gesamtzellzahl ergibt [Millipore, 2008].

Durchführung (gemäß Anleitung zum Kit/Farbstoff „Guava ViaCount Reagent“ von Millipore)

- die passagierten Zellen gut resuspendieren
- 20 µl der Zellsuspension mit 380 µl „Guava ViaCount Reagent“ (1:20 Verdünnung) vermischen
- die Zellen für 5 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubieren
- nach der Inkubationszeit die Zellen nochmals vortexen und die Zellzahl durchflusszytometrisch mit dem Programm ViaCount bestimmen (pro Sample 10^3 Zellen messen)

Reagenzien

„Guava ViaCount Reagent“ (Millipore)

7.3.8 Mykoplasmentest

Mykoplasmen sind die kleinsten, sich selbst vermehrenden Prokaryonten und gehören zur Gruppe der Bakterien. Aufgrund ihres Durchmessers von 0,1-2 μm können sie die Sterilfilter der Zellkulturflaschen ungehindert passieren. Mykoplasmen können auf unterschiedliche Weise in den Stoffwechsel der Zellen eingreifen und somit zu verfälschten Versuchsergebnissen führen. Deshalb ist es wichtig, bei jeder Inkulturnahme neuer Zellstocks, die Zellen auf Mykoplasmen zu testen [Schmitz, 2011].

Durchführung

- einige Tropfen der Zellsuspension auf einen „super frost“ Objektträger (OT) pipettieren, der sich in einer Petrischale mit 10 ml Medium (10 % FKS) befindet
- nach einer Kultivierung von 48 h bei 37°C im Brutschrank den OT mit -20°C kaltem Methanol spülen und für mindestens 15 Minuten zur Fixierung der Zellen in -20°C kaltem Methanol belassen
- die Zellen nach Trocknung des OT mit einigen Tropfen 4'6'-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid (DAPI) anfärben (1:1000 Verdünnung) und das Deckglas luftblasenfrei aufsetzen
- mithilfe eines Fluoreszenzmikroskops die Zellen auf Mykoplasmen prüfen

Das Fluorochrom DAPI bindet an die DNA. Dadurch würden Mykoplasmen als kleine blaue Punkte in der Nähe des Zellkerns erscheinen. Abbildung 12+13 zeigen mykoplasmenfreie HT-29 Zellen in 100-facher und 1000-facher Vergrößerung.

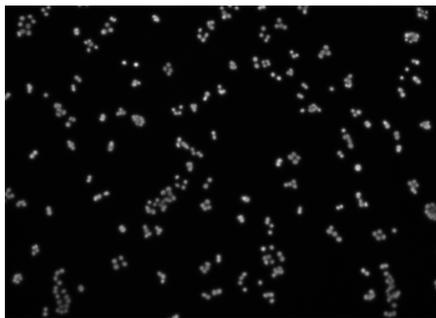


Abbildung 12: Mykoplasmenfreie HT-29 Zellen-100-fache Vergrößerung

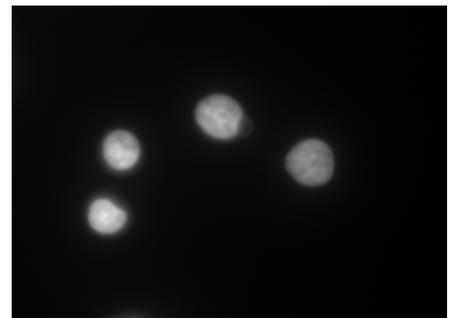


Abbildung 13: Mykoplasmenfreie HT-29 Zellen-1000-fache Vergrößerung

Alle in dieser Arbeit durchgeführten Experimente wurden mit mykoplasmenfreien Zellen durchgeführt.

7.4 Inkubationsbedingungen

Studien haben gezeigt, dass Polyphenole durch Interaktionen mit Metallionen im Zellkulturmedium zur Bildung von Wasserstoffperoxid (H_2O_2) führen können [Halliwell, 2003; Long et al., 2010]. Da dies zu verfälschten Ergebnissen führen könnte, wurden alle Experimente unter Zusatz von Katalase (100 U/ml) durchgeführt, um mögliche H_2O_2 -vermittelte Artefakte auszuschließen. Durch den Zusatz von Katalase in einer Konzentration von 100 U/ml kann das durch Polyphenole entstandene H_2O_2 vollständig umgesetzt werden [Bellion et al., 2009].

Isoflavone sind in der Lage an Proteine im Zellkulturmedium zu binden, wobei sich die Bindungsaffinität durch Hydroxylierungen erhöhen kann [Zhao und Ren, 2009]. Um eine Anlagerung der Testsubstanzen auszuschließen, wurden alle Inkubationen in serumfreiem Medium durchgeführt. Bei Versuchen zur Bestimmung der Zellzyklusverteilung wurde jedoch mit 10 % FKS-haltigem Medium inkubiert, da die Zellen bei einem Entzug von Wachstumsfaktoren in die G_0 -Phase treten würden [Löffler, 2008].

Alle Experimente wurden in der Kolonkarzinomzelllinie HT-29 durchgeführt, bei einer maximalen Passagenanzahl von 35.

7.5 WST-1 Assay

Mittels WST-1 Assay kann man die Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenasen bestimmen und somit erste Aussagen in Bezug auf die Zellviabilität treffen. Der Assay beruht auf der reduktiven Umsetzung des dunkelroten Tetrazoliumsalzes WST-1 (4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolium]-1,3-benzen disulfonat) zum gelblich gefärbten Formazan durch mitochondriale Dehydrogenasen unter Verbrauch von NADH. Die Menge an gebildeten Formazan korreliert direkt mit der Menge an metabolisch aktiven Zellen in der Kultur (Abbildung 14) [Roche, 2005].

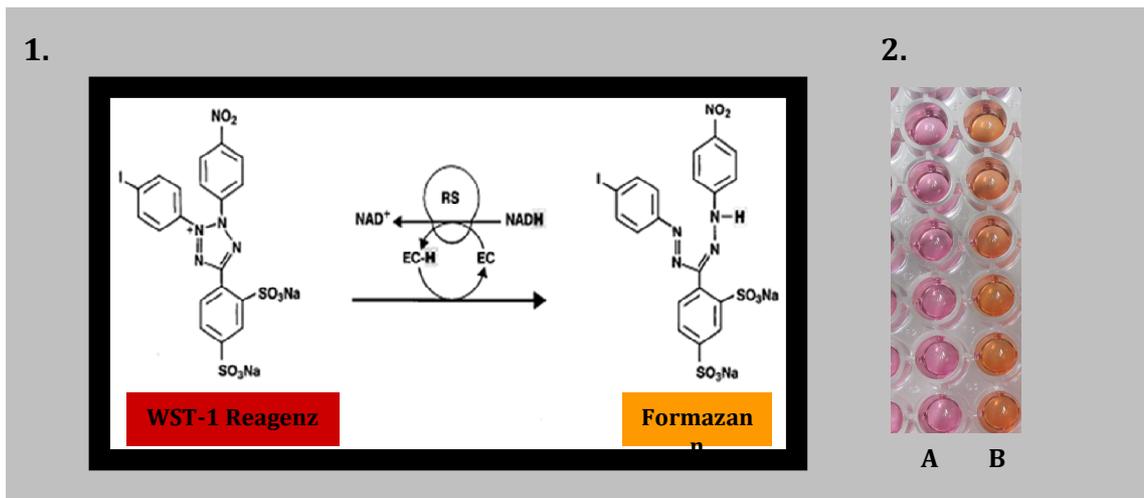


Abbildung 14: Testprinzip des WST-1 Assay; 1. Reduktive Umsetzung des dunkelroten WST-1 Reagenz zum gelb gefärbten Formazan durch Dehydrogenasen der Mitochondrien unter Verbrauch von NADH. (EC = elektronengekoppeltes Reagenz, RS = mitochondriale Succinat-Tetrazolium-Reduktase System); modifiziert nach [Roche, 2005]. 2. Die Umsetzung des WST-1-Reagenz korreliert mit der Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenasen; 2A. Positivkontrolle Triton X (1 %): die Zellen werden lysiert und können dadurch das WST-1 Reagenz nicht umsetzen. Die Lösung bleibt schwach rötlich. 2B. DMSO-Negativkontrolle (1 %): Umsetzung des WST-1-Reagenz zum gelb gefärbten Formazan durch mitochondriale Dehydrogenasen.

Kultivierung der Zellen und Substanzinkubation

1,5x10⁴ HT-29 Zellen werden pro Loch einer 96-Wellplatte in 10 % FKS-haltigem Medium ausgestreut und für 48 h im Brutschrank anwachsen gelassen. Da die Zellen in den äußeren Wells anderer Umgebungsbedingungen ausgesetzt wären, werden die äußersten Reihen der Platte nicht mit Zellen belegt, aber mit Medium befüllt. Die Zellen werden mit den Testsubstanzen für 1 h und 24 h in serumfreiem Medium unter Zusatz von Katalase (100 U/ml) in Konzentrationen von 0,1 µM – 500 µM (gelöst in 1 % DMSO-Endkonzentration) inkubiert. Als Negativkontrolle wird DMSO (1 %) und als Positivkontrolle Triton X (1 %) eingesetzt. Die Messungen werden jeweils in Sechsfach-Bestimmung durchgeführt. Die Anzahl an Messungen variiert, da nur eine begrenzte Menge an Metaboliten für die Versuche zur Verfügung steht und so nur die für eine Aussage minimal benötigte Anzahl an Wiederholungen, mindestens jedoch drei unabhängige Experimente, durchgeführt werden.

Durchführung (gemäß Anleitung zum Kit/ Farbstoff WST-1 Reagenz von Roche)

- nach Ablauf der Inkubationszeit je 50 µl des Zellüberstandes auf eine zweite 96-Wellplatte übertragen – Weiterverwendung im Laktatdehydrogenase Assay (siehe Abschnitt 7.6)
- das restliche Medium mit einer sterilen Kanüle absaugen

- die Zellen 2x mit jeweils 100 µl angewärmten PBS waschen und 100 µl serumfreies Medium mit einer Multikanalpipette hinzu pipettieren
- pro Well 10 µl WST-1 Reagenz (1:10 Verdünnung) hinzufügen und die Platte für 25 Minuten im Brutschrank inkubieren
- die Platte vor der Messung für 2,5 Minuten im Mikrotiterplattenleser schütteln
- photometrische Messung der Proben bei einer Messwellenlänge von 450 nm und einer Referenzwellenlänge von 650 nm

Reagenzien

WST-1 Reagenz (Roche)

Auswertung

Die Absorptionen der Referenzwellenlänge (650 nm) werden von den Absorptionen der Messwellenlänge (450 nm) subtrahiert. Der Nalimov-Test wird maximal zweimal pro Versuchreihe (Sechsfach-Bestimmung) durchgeführt und anschließend der Mittelwert des Blankwertes (Medium ohne Zellen) subtrahiert. Es erfolgt die Berechnung des Mittelwertes, von dem die Fluoreszenzzunahme in Prozent bezogen auf die Negativkontrolle DMSO (=100 %) berechnet wird. Daraus ergibt sich der „Test-over-Control-Wert“ [T/C] in Prozent, der das Verhältnis der Probe zur Negativkontrolle darstellt. Nach mindestens n=4 kann erneut ein Nalimov-Ausreißertest durchgeführt werden. Anschließend erfolgt eine Überprüfung der Daten auf Normalverteilung mittels Kolmogorov-Smirnov-Test. Die Signifikanzen werden mittels ANOVA-ONE-WAY berechnet.

Nalimov-Ausreißertest

Der Nalimov-Ausreißertest ermöglicht eine Aussage, ob es sich bei einem Wert der Messreihe um einen sogenannten Ausreißer handelt oder nicht. Er wird nach folgender Formel berechnet:

$$q = \left| \frac{x_1 - \bar{x}}{s} \right| \sqrt{\frac{n}{n-1}}$$

\bar{x} ...Mittelwert aller Werte

s...Standardabweichung

n...Anzahl der Werte

Bei dem Wert x_1 liegt ein Ausreißer vor, wenn die Testgröße q die kritische Grenze für das 95 % Signifikanzniveau überschreitet. Die Zahl der Freiheitsgrade (f) berechnet sich aus $n-2$ [Lohninger, 2012].

Tabelle 2: Tabelle zur Bestimmung der kritischen Grenze im Nalimov-Ausreißertest [Lohninger, 2012]

f	qcrit $\alpha=0.05$	f	qcrit $\alpha=0.05$
1	1,409	4	1,814
2	1,645	5	1,848
3	1,757	6	1,870

7.6 Laktatdehydrogenase (LDH) Assay

Der LDH Assay beruht auf der Messung des Enzyms Laktatdehydrogenase im Zellüberstand. Bei einer Zellmembranschädigung kommt es zu einer raschen Freisetzung von Enzymen, u.a. der Laktatdehydrogenase, die auch außerhalb der Zelle stabil ist. Mit dem Cytotoxicity Detection Kit (Roche) wird die Aktivität des Enzyms durch die Umsetzung eines Formazansalzes nachgewiesen. Ein Anstieg an Plasmamembran-geschädigten Zellen resultiert in einem Anstieg der LDH-Enzymaktivität im Zellüberstand. Die LDH-Enzymaktivität korreliert direkt mit der Menge an gebildeten Formazan. Das Testkit besteht aus einem Katalysator (Diaphorase/NAD⁺ Mix) und einer Farbstofflösung (Iodotetrazoliumchlorid (INT) und Natriumlaktat). Der Reagenzmix setzt sich aus beiden Lösungen zusammen und wird erst kurz vor dem Gebrauch zusammengeführt. Im ersten Schritt reduziert die Laktatdehydrogenase NAD⁺ zu NADH/H⁺ durch die Oxidation von Laktat zu Pyruvat. Im zweiten Schritt werden durch die Diaphorase, 2H von NADH/H⁺ auf das gelb gefärbte Tetrazoliumsals INT (2-[4-Iodophenyl]-3-[4-nitrophenyl]-5-phenyltetrazoliumchlorid) übertragen, welches zum rötlich gefärbten Formazan reduziert wird (Abbildung 15) [Roche, 2011].

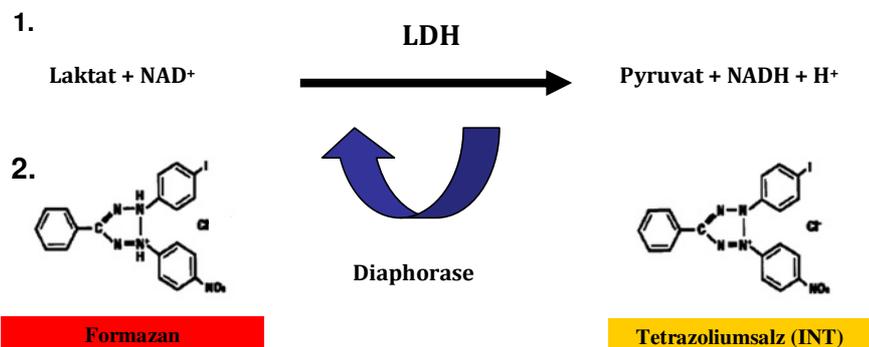


Abbildung 15: Testprinzip des LDH-Assay; 1. die Laktatdehydrogenase oxidiert Laktat zu Pyruvat, wobei NAD⁺ zu NADH/H⁺ reduziert wird. 2. 2H werden von NADH/H⁺ durch die Diaphorase auf das gelblich gefärbte Tetrazoliumsals INT (2-[4-iodophenyl]-3-[4-nitrophenyl]-5-phenyltetrazoliumchlorid) übertragen. Somit erfolgt die reduktive Umsetzung zum rötlich gefärbten Formazan; modifiziert nach [Roche, 2011]

Die Kultivierung und Substanzinkubation wird gemäß WST-1 Assay durchgeführt (siehe Abschnitt 7.5).

Durchführung (gemäß Anleitung zum Cytotoxicity Detection Kit - LDH von Roche)

- nach Ablauf der Inkubationszeit je 50 µl des Zellüberstandes abnehmen und auf eine zweite 96-Wellplatte übertragen – die 96-Wellplatte mit den inkubierten Zellen im WST-1 Assay weiter verwenden (siehe Abschnitt 7.5)
- 100 µl des frisch hergestelltes LDH-Reagenzmix zügig zum Zellüberstand hinzu pipettieren
- im Mikrotiterplattenleser die Platte für 2,5 min schütteln und die Proben bei einer Wellenlänge von 495 nm und einer Referenzwellenlänge von 650 nm messen

Reagenzien

Cytotoxicity Detection Kit (Roche):

Der LDH-Reagenzmix setzt sich aus Lösung 1+2 in einem Verhältnis von 1:45 zusammen

Lösung 1: Katalysator Diaphorase/NAD⁺ Mix in 1 ml H₂O_{bidest.} lösen

Lösung 2: Färbelösung Iodotetrazoliumchlorid (INT) „ready-to-use“ - Lösung
und Natriumlaktat

Auswertung

Die Auswertung erfolgt gemäß WST-1 Assay (siehe Abschnitt 7.5), wobei die Positivkontrolle Triton X (1 %) auf 100 % gesetzt wird und die LDH-Freisetzung der Proben prozentuell dazu berechnet wird. Die Daten werden mittels Kolmogorov-Smirnov-Test auf Normalverteilung überprüft und die Signifikanzen mittels ANOVA-ONE-WAY berechnet.

7.7 Western Blot

Beim Western Blot werden die Proteine elektrophoretisch mithilfe einer Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) der Größe nach aufgetrennt. Die Übertragung der Proteine erfolgt auf eine Nitrozellulosemembran, die eine positive Ladung aufweist und auf dessen Oberfläche die negativ geladenen Proteine haften bleiben. Die Übertragung erfolgt unter elektrischem Strom in einer Blottingapparatur [Clark und Pazdernik, 2009].

Nach der Bindung der Proteine an die Nitrozellulosemembran kann das Zielprotein p-p53 (Serin 20) mit einem spezifischen Antikörper detektiert werden. Zur Kontrolle der Beladungsmenge wird das Protein α-Tubulin mitgeführt.

Kultivierung der Zellen und Substanzinkubation

1,5-2,2x10⁶ HT-29 Zellen werden in mittleren Petrischalen (d=10 cm) in 10 % FKS-haltigem Medium ausgestreut und für 72-96 h anwachsen gelassen. Die Inkubation mit den Testsubstanzen erfolgt für 1 h in serumfreiem Medium unter Zusatz von Katalase (100 U/ml). Die Testsubstanzen sowie die Positivkontrolle Hydroxyurea (1,5 mM) werden in 1 % DMSO-Endkonzentration gelöst. Als Negativkontrolle dient DMSO (1 %). Als zweite Positivkontrolle wird eine Petrischale, die wie die Negativkontrolle behandelt wird, für zwei Minuten mit UV-Licht bestrahlt und anschließend ebenfalls für 1 h inkubiert.

7.7.1 Gewinnung der Proteine

Während der gesamten Aufarbeitungszeit bis zur Denaturierung der Proteine müssen die Proben auf Eis gelagert werden, um einen Abbau der Proteine durch zelluläre Proteasen zu verhindern.

Durchführung

- nach der Inkubationszeit die Petrischalen auf Eis stellen
- das Medium abgießen und den Zellrasen 2x mit 5 ml eiskaltem PBS waschen
- die Reste von PBS vollständig mit einer Pipette abnehmen
- pro Petrischale 200 µl Ripa-Puffer (+ Zusätze) pipettieren
- die Zellen sorgfältig mit einem Zellschaber abschaben und das Zellysate in einen Handhomogenisator überführen
- die Zellen mit 40-50 Hüben aufschließen - die Zellsuspension anschließend in ein Eppi überführen – alternativ erfolgt der Aufschluss des Zellysates für 15 Sekunden mittels Ultraschall
- die Proben bei 4°C und 20.000g für 10 Minuten zentrifugieren
- den Überstand in ein neues Eppi überführen und das Pellet verwerfen

7.7.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Proteinbestimmung nach Bradford gehört zu den häufigsten Verfahren zur quantitativen Bestimmung des Gesamtproteins. Das Verfahren beruht auf der Bindung des Farbstoffes Coomassie Brilliant-Blue an Proteine im sauren Milieu. Durch die Bindung an Proteine kommt es zu einem Farbumschlag von braun nach blau und das Absorptionsmaximum verschiebt sich von 465 nm nach 595 nm [Richter, 2003]. Durch die Erstellung einer Standardgeraden mit „*bovine serum albumin*“ (BSA) kann auf die Proteingehalte der

Proben geschlossen werden. Die Konzentrationen der Standardgerade liegen zwischen 0,2 und 1,6 mg/ml.

Durchführung

- den Probenüberstand sowie den Ripa-Puffer 1:10 mit H₂O_{dest.} verdünnen
- 10 µl der Verdünnungen, Standardgerade und H₂O_{dest.} mit 1 ml gefilterten Bradfordreagenz versetzen und vortexen
- jeweils 200 µl in Dreifach-Bestimmung in eine 96-Wellplatte pipettieren und in einem Mikroplattenleser bei 595 nm messen

Auswertung

Die Auswertung erfolgt mithilfe von Excel, wobei vom Mittelwert der einzelnen Werte der Standardgerade der Mittelwert des Blankwertes (H₂O_{dest.}) und von den Mittelwerten der einzelnen Proben der Mittelwert des Ripa-Puffers abgezogen wird.

Die Proteingehalte der einzelnen Proben werden mittels linearer Regression ermittelt.

7.7.3 Gießen der Trenn- und Sammelgele

Durchführung

- die Glasplatten und Kämme sorgfältig mit Ethanol entfetten und die Kammern zusammenbauen
- das Trenngel nach folgendem Pipettierschema zusammenpipettieren:

Tabelle 3: Pipettierschema der Trenn- und Sammelgele (Angaben pro Gel)

	10 %iges Trenngel	12 %iges Trenngel	4 %iges Sammelgel
H ₂ O _{dest.}	2,12 ml	1,78 ml	0,86 ml
1,5 M Tris	1,27 ml	1,27 ml	-
0,5 M Tris	-	-	0,36 ml
Acrylamid-Lösung (30 %)	1,70 ml	2,04 ml	0,18 ml
SDS (10 %)	50,9 µl	50,9 µl	14,4 µl
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	2,5 µl	2,5 µl	1,4 µl
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	25,4 µl	25,4 µl	14,4 µl

- kurz vor Befüllen der Gelkammern TEMED als Radikalstabilisator und APS (10 %) als Radikalstarter hinzu pipettieren

- pro Gel 4600 μl in die Gelkammer pipettieren
- die Gele mit n-Butanol überschichten und für mindestens 1 h stehen lassen bis das Gel vollständig auspolymerisiert ist
- das n-Butanol abgießen und das Gel mehrere Male mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ spülen (überschüssiges Wasser mit einem Papierfilter aufsaugen)
- anschließend ein 4 %iges Acrylamidgel (Sammelgel) gemäß der Tabelle 3 zusammenpipettieren
- das Sammelgel in die Glaskammer pipettieren und einen entfetteten Kamm, ohne das sich Luftblasen bilden, dazwischen stecken
- nach der Auspolymerisierung des Sammelgels den Kamm vorsichtig entfernen und die Geltaschen mit einer Kanüle von Luftblasen befreien
- die Proben entsprechend mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ verdünnen, um pro Probe einen Proteingehalt von mindestens 20 μg zu erhalten
- 40 μl SDS-Probenpuffer hinzu pipettieren, die Proben vortexen und bei 95°C und 300 rpm für 8 Minuten denaturieren

7.7.4 Auftrennung der Proteine mittels SDS-Page

Bei der SDS-PAGE werden die Proteine aufgrund ihres Molekulargewichtes aufgetrennt. Bei Natriumdodecylsulfat (SDS) handelt es sich um ein anionisches Detergenz, das dazu führt, dass hydrophobe Bereiche innerhalb des Proteins aufgelöst werden und das Protein in einer linearen Form vorliegt. Durch das negativ geladene SDS werden die natürlichen Eigenladungen der Proteine maskiert. Durch die Zugabe von β -Mercaptoethanol kommt es zu einer Reduktion von Disulfidbrücken und somit zu einer vollständigen Denaturierung der Proteine [Luttmann et al., 2006].

Die SDS-Protein-Komplexe sind negativ geladen und wandern in Richtung Anode durch das Gel. Da größere Proteine durch die netzartige Struktur des Polyacrylamidgels langsamer wandern als kleine, können Proteine aufgrund ihres Molekulargewichtes aufgetrennt werden (Abbildung 16) [Karp, 2005].

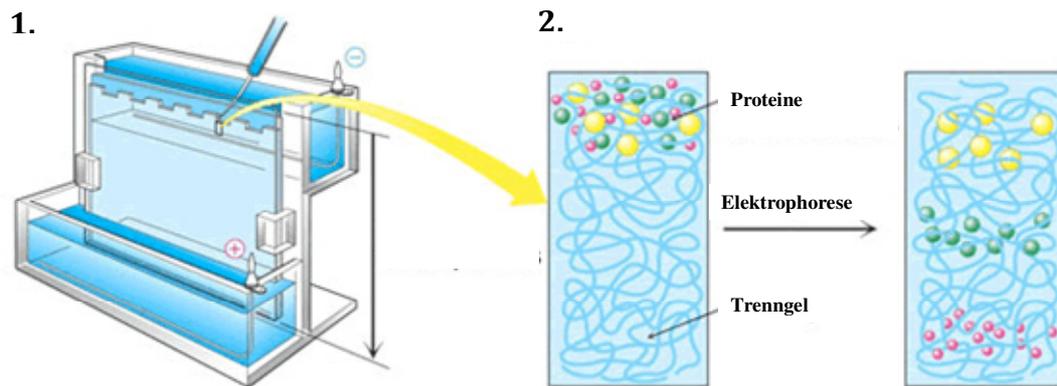


Abbildung 16: 1. Schematische Darstellung einer Elektrophoresekammer 2. Auftrennung der Proteine anhand ihrer Molekulargröße; modifiziert nach [http://www.imb-jena.de/~rake/Bioinformatics_WEB/proteins_purification.html]

Tabelle 4: Molekulargewichte der zu untersuchenden Proteine

Zielprotein	Molekulargewicht (kDa)	% Acrylamid im Trenngel
p-p53 (Serin 20)	53	10/12
α -Tubulin	54	10/12

Durchführung

- pro Geltasche werden 20 μ l der jeweiligen Probe aufgetragen
- Geltaschen vorsichtig mit SDS-Laufpuffer überschichten und die Elektrophoresekammer mit SDS-Laufpuffer befüllen
- Proteinauftrennung nach folgender Elektrophoreseeinstellung: 100 V-30 Minuten, 120 V-30 Minuten, 140 V-1,5 Stunden

7.7.5 Proteintransfer

Der Proteintransfer von der SDS-PAGE auf eine Nitrozellulosemembran erfolgt durch das sogenannte „wet-Verfahren“, bei dem mithilfe eines Transferpuffers in einer gekühlten Apparatur geblottet wird [Hermeijer et al., 2010]. Die Proteine im Gel werden mittels elektrischen Stroms auf eine Nitrozellulosemembran übertragen, da sie im elektrischen Feld Richtung Anode wandern. Da die Membran eine positive Ladung aufweist, bleiben die negativ geladenen Proteine an dessen Oberfläche haften [Clark und Pazdernik, 2009]. Nach dem Blotting ist es erforderlich die Membran mit Milchlösung zu inkubieren, um unspezifische Proteinbindungsstellen abzublocken [Luttmann et al., 2006].

Durchführung

- pro Gel je zwei Whatmanpaper und eine Nitrozellulosemembran zuschneiden (5,8x8,5 cm) und in Blottingpuffer für eine halbe Stunde äquilibrieren
- den Tisch mit Blottingpuffer benetzen und pro Gel ein Whatmanpaper auflegen
- nach Beendigung der Gelelektrophorese die Gele mit einem Spacer aus der Gelkammer nehmen und pro Whatmanpaper eine Nitrozellulosemembran auflegen
- die Gele kurz im Blottingpuffer waschen und vorsichtig auf der Nitrozellulosemembran platzieren
- ein weiteres Whatmanpaper darauf platzieren und durch sorgfältiges Walzen mit einer Pipette mögliche Luftblasen entfernen
- das Gel-Membran-Sandwich in die Blottingapparatur einspannen und diese in die Blottingkammer stecken, wobei die Membran Richtung Pluspol schauen muss
- die Blottingkammer mit Blottingpuffer befüllen und einen Kühlstab einhängen um eine Erwärmung während des Blottens zu vermeiden
- für 1,15 h bei 150 V blotten
- nach Beendigung des Blots die Membranen für 1 h in 5 %iger Milchlösung blockieren

7.7.6 AK - Inkubation und Detektion

Nach dem Blockieren erfolgt die Inkubation mit dem Primärantikörper, der spezifisch an das zu detektierende Protein bindet. Nach mehreren Waschschrinen folgt die Inkubation mit dem Sekundärantikörper, der speziesspezifisch ist und den konstanten Teil der verwendeten Primärantikörper bindet. An den Sekundärantikörper ist das Enzym Meerrettichperoxidase gekoppelt, die eine Oxidation von Luminol in Gegenwart von H₂O₂ katalysiert. Dies löst eine Chemilumineszenz aus, die mithilfe des CCD-Imager (LAS-4000, Fujifilm) sichtbar gemacht werden kann [Hermey et al., 2010].

Durchführung

- nach der einstündigen Blockierung, die Membranen mit dem entsprechenden Primärantikörper bei 4°C über Nacht inkubieren

Primärantikörper-Inkubation

p-p53 (rabbit)	1:400 in Milchpulver
α -Tubulin (mouse)	1:1000 in Milchpulver

- nach der Inkubation mit dem Primärantikörper, die Membranen 3x für jeweils 5 Minuten mit der Waschlösung waschen
- anschließend die Membran für mindestens 1,15 h bei Raumtemperatur mit dem Sekundärantikörper inkubieren

Sekundärantikörper-Inkubation

Anti-rabbit (donkey)	1:1 000 in Milchpulver
Anti-mouse (rabbit)	1:1 000 in Milchpulver

- nach der Sekundärantikörper-Inkubation, die Membranen nochmals 3x5 Minuten mit der Waschlösung waschen
- die Membranen mit 5 ml Western Lightning™ ECL-Lösung für eine Minute inkubieren
- Detektion erfolgt mittels CCD-Imager (LAS-4000, Fujifilm) und Quantifizierung mit dem Programm Multi Gauge V3.2.

Reagenzien

RIPA-Puffer	TRIS	50 mM
	NaCl	250 mM
	EDTA	1 mM
	NaF	1 mM
	Igepal	1 % (v/v)

in H₂O_{dest.} lösen – pH-Wert auf 7,4 einstellen und auf 100 ml auffüllen; Lagerung bei 4°C

kurz vor der Probenaufbereitung werden folgende Zusätze hinzugefügt (bezogen auf die Endkonzentration im Ripa-Puffer):

Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	1 mM
Natriumorthovanadat (Na ₃ VO ₄)	1 mM
Protease Inhibitor Mix (PIM)	1 μ M

Material und Methoden

Bradfordreagenz	Coomassie Brilliant Blue G250	100 mg
	Ethanol	50 ml

mit H₂O_{dest.} auf 1 L auffüllen – vier Wochen stehen lassen und abfiltrieren.

TRIS-Puffer (1,5M)	TRIS	36,4 g
---------------------------	------	--------

in H₂O_{dest.} lösen, auf pH-Wert 8,8 einstellen und in einem 200 ml Kolben mit H₂O_{dest.} auffüllen

TRIS-Puffer (0,5M)	TRIS	12,1 g
---------------------------	------	--------

in H₂O_{dest.} lösen, auf pH-Wert 6,8 einstellen und in einem 200 ml Kolben mit H₂O_{dest.} auffüllen

SDS-Lösung	Natrium-Dodecylsulfat	10 % (w/v)
-------------------	-----------------------	------------

in H₂O_{dest.} lösen

Ammoniumperoxodisulfat (APS)-Lösung

Eppi bis zur Hälfte mit APS füllen und in 1 ml H₂O_{dest.} lösen

N,N,N',N'-Tetramethylethyldiam (TEMED)-Lösung

6x SDS-Probenpuffer	0,5 M TRIS-Puffer (pH 6,8)	25 ml
	Glycerin	20 ml
	SDS	620 mg
	Bromphenolblau	80 mg

auf 100 ml mit H₂O_{dest.} auffüllen und zu 1 ml aliquotieren; vor dem Gebrauch mit 52,6 µl β-Mercaptoethanol versetzen

10x Laufpuffer	Glycin	2 M
	TRIS	250 mM
	SDS	1 % (w/v)

pH-Wert auf 8,3 einstellen und mit H₂O_{dest.} auffüllen

2x Blottingpuffer	Glycin	78 mM
	TRIS	96 mM

Material und Methoden

	SDS	0,074 % (w/v)
	Methanol	40 % (v/v)
mit H ₂ O _{dest.} auf 5 L auffüllen		
20x TBS	NaCl	2,6 M
	Tris/HCl (pH 7,6)	0,4 M
5 %ige Milchpulverlösung	Milchpulver	5 % (w/v)
	1x TBS	
	Tween-20	0,1 % (v/v)
Waschlösung	1x TBS	
	Tween	0,1 %
Western Lightning™	H ₂ O ₂ - Lösung	2,5 ml
ECL-Lösung	Luminol - Lösung	2,5 ml

Auswertung

Die Auswertung erfolgt semiquantitativ mithilfe der Software Multi Gauge V3.2., wobei die Negativkontrolle DMSO (1 %) auf 100 % gesetzt wird und die Proben prozentuell dazu berechnet werden. Anschließend erfolgt eine Überprüfung der Daten auf Normalverteilung mittels Kolmogorov-Smirnov-Test. Die Signifikanzen werden mittels ANOVA-ONE-WAY berechnet.

7.8 Zellzyklusuntersuchungen mittels Durchflusszytometrie

Die Zellzyklusverteilung wird mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Nach Fixierung der Zellen werden diese mit dem „Cell Cycle Reagent“ (Millipore) gefärbt, welches Propidiumiodid (PI) zur Färbung der DNA enthält. Da PI an die DNA bindet, kann die Fluoreszenzintensität als Maß für den DNA-Gehalt der Zelle genutzt werden und somit zwischen den unterschiedlichen Phasen des Zellzyklus unterschieden werden. Während der Synthesephase kommt es zu einem Anstieg des DNA-Gehaltes, wodurch Zellen in der G₂-Phase die doppelte Menge an DNA besitzen als Zellen die sich in der G₀/G₁-Phase befinden. [Millipore, 2005].

Kultivierung der Zellen und Substanzinkubation

Es werden $2-5 \times 10^4$ HT-29 Zellen in einer 24-Wellplatte ausgestreut und für 48-72 h anwachsen gelassen. Die Inkubation erfolgt in 10 % FKS-haltigem Medium unter Zusatz von Katalase (100 U/ml) für 24, 48 und 72 h. Als Positivkontrolle, zur Arretierung der Zellen in der G₂/M-Phase, werden die Zellen für 18 h mit Nocodazol in einer Konzentration von 40 μ M inkubiert.

Durchführung (gemäß Anleitung zum Kit/Farbstoff „Guava Cell Cycle Reagent“ von Millipore)

- nach Ablauf der Inkubationszeit das Inkubationsmedium in ein 15 ml „Tube“ überführen, den Zellrasen mit 1 ml PBS spülen und ebenfalls in das „Tube“ überführen
- die Zellen mit 200 μ l Trypsin für zwei Minuten abtrypsinieren und die Reaktion mit 1 ml FKS-haltigem Medium abstoppen
- die Zellen gut resuspendieren und die Zellsuspension im 15 ml „Tube“ mit dem Inkubationsmedium und PBS vereinigen
- die Wells nochmals mit PBS waschen und anschließend ebenfalls in das „Tube“ überführen
- die 15 ml „Tubes“ bei 300g für 5 Minuten zentrifugieren
- den Überstand abnehmen und das Zellpellet in 1 ml PBS resuspendieren
- die Zellzahl mittels Neubauerzählkammer bestimmen und je 60 000 Zellen pro Probe auf eine 96-Wellplatte („round bottom“) übertragen
- die 96-Wellplatte für 5 Minuten bei 450g zentrifugieren und den Überstand verwerfen
- mit einer Multikanalpipette pro Well 200 μ l warmes PBS hinzu pipettieren und die Zellen resuspendieren
- die Platte nochmals 5 Minuten bei 450g zentrifugieren und den Überstand abnehmen
- die Zellen resuspendieren und 200 μ l 70 %iges Ethanol am „Labshaker“ tröpfchenweise hinzu pipettieren
- die Platte mit einer Folie luftdicht verschließen und für mindestens 1 h bei -80°C fixieren
- nach der Fixierung die Platte für 5 Minuten bei 450g zentrifugieren und den Überstand abnehmen

- die Zellen mit 200 µl PBS waschen, nochmals für 5 Minuten bei 450g zentrifugieren und den Überstand abnehmen
- pro Well 200 µl „Guava Cell Cycle Reagent“ hinzu pipettieren, die Zellen resuspendieren und für 30 Minuten im Dunkeln inkubieren
- die Zellen in ein 1,5 ml Eppi überführen, vortexen und mit dem Guava EasyCyte Durchflusszytometer pro Probe 5×10^3 Zellen messen

Reagenzien

70 %iges Ethanol

„Guava Cell Cycle Reagent“ (Millipore)

Auswertung

Die Auswertung der Zellzyklusverteilung erfolgt mit dem Programm InCyte. Da die von dem Programm berechneten prozentuellen Werte der einzelnen Phasen zusammen nicht exakt 100 % ergeben, werden diese addiert und auf 100 % gesetzt. Die einzelnen Phasen werden prozentuell dazu berechnet.

7.9 Bestimmung der Apoptoseinduktion mittels Guava Nexin

Assay

Die Apoptoseinduktion wird mittels Durchflusszytometrie mit dem Programm Guava Nexin ermittelt. Während der Apoptose wird Phosphatidylserin (PS) von der Zelle an die Zelloberfläche abgegeben und es kommt zur Degradierung von zellulären Proteinen, Fragmentierung von Chromatin sowie zu einem Verlust der Membranintegrität in späten Phasen der Apoptose [Elmore, 2007]. Mittels „Guava Nexin Reagent“ (Millipore), das aus den Färbelösungen Annexin V und 7-Aminoactinomycin (7-AAD) besteht, ist es möglich zwischen nicht-apoptotischen/lebenden, früh-apoptotischen, spät-apoptotischen/nekrotischen Zellen und Debris zu unterscheiden. Annexin V ist ein Calcium-abhängiges Protein mit einer hohen Bindungsaffinität zu PS, welches in der frühen Phase der Apoptoseinduktion von der Zelle an die Zelloberfläche abgegeben wird. In der späten Phase der Apoptose zeigen die Zellen einen Verlust der Membranintegrität auf und 7-AAD kann in die Zelle eindringen. Damit ist es möglich, die Zellen in die vier genannten Populationen zu unterteilen [Millipore, 2008]:

Tabelle 5: Einteilung der Zellen in vier Subpopulationen mittels Guava Nexin Assay; modifiziert nach [Millipore, 2008]

nicht-apoptotische/lebende Zellen:	Annexin V (-) und 7-AAD (-)
früh-apoptotische Zellen:	Annexin V (+) und 7-AAD (-)
spät-apoptotische/nekrotische Zellen:	Annexin V (+) und 7-AAD (+)
Debris:	Annexin V (-) und 7-AAD (+)

Kultivierung der Zellen und Substanzinkubation

Es werden 5×10^3 HT-29 Zellen pro Well einer 96-Wellplatte in 10 % FKS-haltigem Medium ausgestreut und für 48 h anwachsen gelassen. Die Inkubation mit den Testsubstanzen erfolgt in 10 % FKS-haltigem Medium unter Zusatz von Katalase (100 U/ml) für 24, 48 und 72 h sowie für 24 h in serumfreiem Medium

Durchführung (gemäß Anleitung zum Kit/Farbstoff „Guava Nexin Reagent“ von Millipore)

- nach Ablauf der Inkubationszeit die Platte bei 300g für 6 Minuten zentrifugieren und den Überstand mit einer Pipette abnehmen
- pro Well 50 µl PBS hinzu pipettieren, den Zellrasen waschen und anschließend auf eine zweite 96-Wellplatte übertragen
- die Dispersal-Lösung (Millipore) 1:3 mit PBS verdünnen und die Zellen mit je 50 µl der verdünnten Dispersal-Lösung für 5-7 Minuten abtrypsinieren
- die Reaktion mit 100 µl Medium abstoppen und die Zellen gut resuspendieren
- die 50 µl PBS von der zweiten 96-Wellplatte wieder übertragen
- die 96-Wellplatte für 6 Minuten bei 300g zentrifugieren und den Überstand mit einer Pipette abnehmen
- 100 µl frisches Medium hinzu pipettieren, die Zellen resuspendieren und mit 100 µl „Guava Nexin Reagent“ für 20 Minuten im Dunkeln färben
- am Guava Easy Cyte Durchflusszytometer mit dem Programm Guava Nexin pro Probe 2×10^3 Zellen messen

Reagenzien

Dispersal-Lösung (Millipore) - 1:3 mit PBS verdünnt

„Guava Nexin Reagent“ (Millipore)

7.10 Bestimmung der Apoptoseinduktion mittels Cell Death Detection ELISA^{PLUS}

Dieser Assay beruht auf dem Prinzip eines quantitativen Sandwich-Enzym-Immunoassays. Der Einsatz von monoklonalen Antikörpern der Maus, die gegen DNA und Histone gerichtet sind, erlaubt die Bestimmung von Mono- und Oligonukleosomen in der zytoplasmatischen Fraktion der Zelllysate. Der Zellüberstand wird mit einem Antikörper-Mix von Anti-Histon-Biotin und Anti-DNA-POD inkubiert. Während der Inkubationszeit bindet der Anti-Histon-Antikörper an den Histon-Teil der Nukleosome und gleichzeitig an die Streptavidin-beschichtete Platte durch Biotinylation. Der Anti-DNA-POD-Antikörper bindet an den DNA-Teil der Nukleosome. Nachdem ungebundene Antikörper durch einen Waschschrift entfernt werden, erfolgt eine quantitative Bestimmung der gebundenen Nukleosomen, durch Messung der Peroxidaseaktivität mit ABTS (2,2'-Azino-di[3-ethyl-benz-thiazolin-sulfonat]) als Substrat (Abbildung 17) [Roche, 2010].

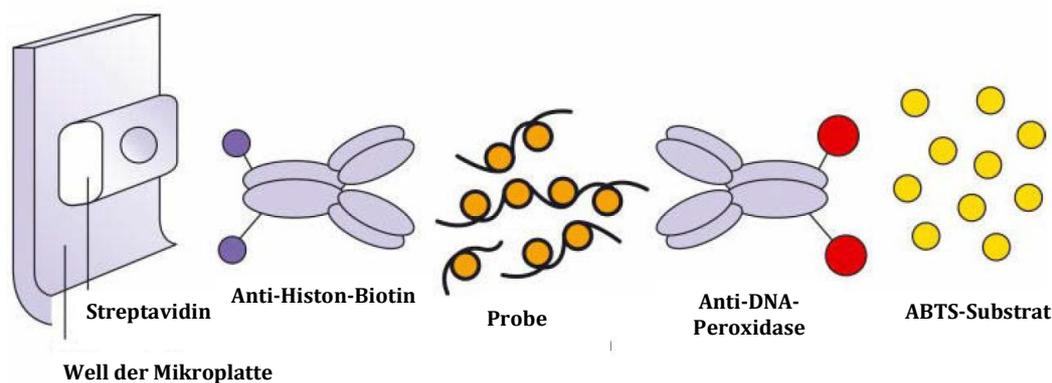


Abbildung 17: Testprinzips des Cell Death Detection ELISA^{PLUS}; modifiziert nach [Roche, 2010]

Kultivierung der Zellen und Substanzinkubation

Es werden 10^5 HT-29 Zellen pro Well einer 24-Wellplatte in FKS-haltigem Medium ausgestreut und für 48 h anwachsen gelassen. Die Inkubation mit den Testsubstanzen erfolgt für 24 h in serumfreiem Medium unter Zusatz von Katalase (100 U/ml).

Durchführung (gemäß Anleitung zum Kit Cell Death Detection ELISA^{PLUS} von Roche)

- nach Ablauf der Inkubationszeit das Inkubationsmedium in 15 ml „Tubes“ überführen, den Zellrasen mit 1 ml PBS waschen und ebenfalls in die „Tubes“ überführen
- die Zellen mit 200 µl Trypsin für 2 Minuten im Brutschrank abtrypsinieren und die Reaktion mit 1 ml FKS-haltigem Medium stoppen

- die Zellen gut resuspendieren, die Zellsuspension in die „Tubes“ überführen und die Wells nochmals mit PBS spülen und anschließend ebenfalls in die „Tubes“ überführen
- die „Tubes“ bei 200g für 5 Minuten zentrifugieren und den Überstand abnehmen
- die Zellen in 250 µl kaltem PBS resuspendieren und auf Eis lagern
- durchflusszytometrische Auszählung der Zellen mit dem Programm ViaCount, wobei die Zellen 1:20 mit dem „ViaCount Reagent“ (Millipore) verdünnt und für 5 Minuten gefärbt werden (siehe Abschnitt 7.3.8)
- 200 µl Lysepuffer in Eppis vorlegen und ein Aliquot von $1,5 \times 10^4$ Zellen hinzu pipettieren
- die Zellen für 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln, mit zwischenzeitlichen vortexen, lysieren
- anschließend die Eppis bei 200g für 10 Minuten abzentrifugieren
- 20 µl des Probenüberstandes sowie den Inkubationspuffer und die mitgelieferte Positivkontrolle je als Doppelbestimmung in die Wells der Streptavidinplatte pipettieren
- 80 µl Immunoreagenz hinzu pipettieren, die Platte mit einer Klebefolie luftdicht verschließen und für 2 h auf einem Schüttelinkubator (350 rpm) inkubieren
- anschließend die Lösung mit einer Kanüle absaugen und die Wells 3x mit 250 µl Inkubationspuffer waschen
- pro Well 100 µl ABTS-Lösung hinzu pipettieren und die Platte auf einem Schüttelinkubator (350 rpm) für 10 Minuten inkubieren
- 100 µl ABTS-Stopplösung hinzu pipettieren und die Proben im Mikrotiterplattenleser bei einer Wellenlänge von 405 nm und einer Referenzwellenlänge von 490 nm messen

Reagenzien

„Guava ViaCount Reagent“ (Millipore)

Cell Death Detection ELISA^{PLUS} (Roche):

Das Testkit besteht aus einer Streptavidin-beschichteten 96-Wellplatte und Lösungen wie Inkubationspuffer, Lysepuffer, Substratpuffer und ABTS-Stopplösung, die als „ready-to-use“-Lösungen“ mitgeliefert werden. Die zwei Antikörper Anti-Histon-Biotin und Anti-DNA-POD sowie die Positivkontrolle, die aus einem DNA-Histon-Komplex besteht, werden in Pulverform geliefert und müssen vor dem Gebrauch in 450 µl H₂O_{bidest.} gelöst werden.

Das ABTS-Substrat liegt in Tablettenform vor und wird pro Tablette in 5 ml Substratpuffer gelöst. Kurz vor dem Gebrauch wird das Immunoreagenz hergestellt, das 1/20 aus Anti-DNA-POD, 1/20 aus Anti-Histon-Biotin und 18/20 aus Inkubationspuffer besteht.

Auswertung

Die Absorptionswerte der Referenzwellenlänge (490 nm) werden von dem Absorptionswerten der Messwellenlänge (405 nm) subtrahiert. Zusätzlich werden jeweils als Blindwert der Absorptionswert von reinem Inkubationspuffer und ABTS-Substrat abgezogen und die Werte gemittelt. Die Negativkontrolle DMSO (1 %) wird auf 100 % gesetzt und die einzelnen Messungen prozentuell dazu berechnet. Anschließend erfolgt eine Überprüfung der Daten auf Normalverteilung mittels Kolmogorov-Smirnov-Test. Die Signifikanzen werden mittels ANOVA-ONE-WAY berechnet.

8 Ergebnisse und Diskussion

Genistein wirkt durch Stabilisierung des sogenannten „cleavage complex“ als Topoisomerasegift, wobei es durch Kollision mit der Replikationsgabel oder dem Transkriptionsapparat zu permanenten DNA-Strangbrüchen kommen kann [Constantinou et al., 1995; Fortune und Osheroff, 2000]. *In vitro* konnte für Genistein bereits genotoxisches Potential nachgewiesen werden [Klein und King, 2007; Kulling und Metzler, 1997; Kulling et al., 1999]. Inwiefern sich die oxidativen Metabolite hinsichtlich ihrer DNA-strangbrechenden Wirkung von der Muttersubstanz unterscheiden wurde im Rahmen der Doktorarbeit von Anika Schröter mittels Comet-Assay untersucht, wobei zur Erfassung oxidativer DNA-Schäden eine zusätzliche Behandlung der Zellen mit Formamido-pyrimidin-DNA-Glykosylase (fpg) erfolgte (Abbildung 18).

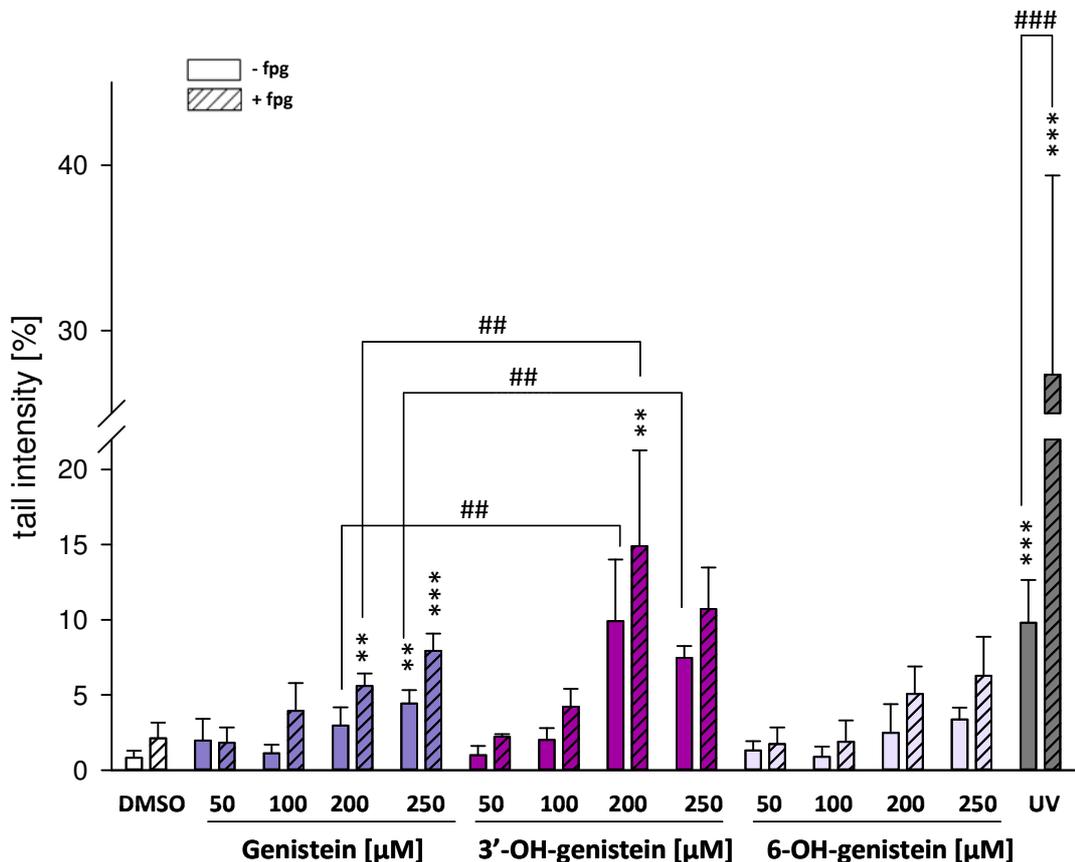


Abbildung 18: Darstellung der DNA-strangbrechenden Wirkung von Genistein und dessen oxidativen Metaboliten in HT-29 Zellen nach 24-stündiger Inkubation in serumfreiem Medium unter Zusatz von Katalase (100 U/ml). Durch zusätzliche Behandlung der Zellen mit fpg wurden oxidativ modifizierte Basen bestimmt (schraffierte Balken). Als Lösungsmittelkontrolle wurde DMSO (1 %) eingesetzt. Die Bestrahlung der Zellen für zwei Minuten mit UV-Licht diente als Positivkontrolle. Dargestellt sind Mittelwert \pm Standardabweichung von mindestens drei unabhängigen Versuchen. Signifikante Unterschiede zur Negativkontrolle wurden mittels ANOVA-ONE-WAY berechnet: * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$. Signifikante Unterschiede zwischen den Testsubstanzen wurden mittels T-Test ermittelt: # = $p < 0,05$, ## = $p < 0,01$, ### = $p < 0,01$. Alle Werte sind normalverteilt. („Ergebnisse zur Dissertation von Anika Schröter“)

Nach einstündiger Inkubationsdauer mit den Testsubstanzen konnten keine DNA-schädigenden Effekte festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Jedoch zeigte sich nach 24-stündiger Inkubation eine Erhöhung der DNA-Strangbruchrate nach Inkubation mit Genistein und 3'-OH-Genistein bei einer Konzentration von 200 μM . Während nach Inkubation mit 6-OH-Genistein keine DNA-strangbrechenden Effekte festgestellt werden konnten, führte der 3'-OH-Metabolit bei den Konzentrationen von 200 μM und 250 μM zu signifikant höheren DNA-Strangbruchraten als die Muttersubstanz Genistein bei gleichen Konzentrationen.

Somit scheint eine zusätzliche Hydroxylgruppe am B-Ring die DNA-strangbrechende Wirkung von Genistein zu erhöhen und durch eine zusätzliche Hydroxylierung am A-Ring zu verringern. Die Ursache der unterschiedlichen Potentiale der Testsubstanzen Strangbrüche zu induzieren war Fragestellung dieser Arbeit. In folgenden Experimenten wurde daher die Wirkung in Hinblick auf Zytotoxizität, den Phosphorylierungsstatus des Proteins p53 sowie Zellzyklusverteilung und Apoptoseinduktion eingehend untersucht.

8.1 Zytotoxizität

Um die im Comet-Assay beobachteten DNA-Strangbrüche zu verifizieren und Konzentrationsbereiche für weitere Untersuchungen zu wählen, wurden die Testsubstanzen hinsichtlich ihres zytotoxischen Potentials untersucht. Hierzu wurden als Testsysteme der LDH-Assay sowie WST-1 Assay eingesetzt, um dessen Einfluss auf die Membranintegrität und mitochondriale Aktivität zu bestimmen. Um Kurz- und Langzeiteffekte zu erfassen, erfolgte die Inkubation für 1 h und 24 h.

8.1.1 Einfluss auf die Integrität der Zellmembran

Im LDH-Assay wird der Einfluss der Testsubstanzen auf die Integrität der Zellmembran untersucht, dessen Zerstörung ein morphologisches Charakteristikum der Zellnekrose darstellt. Das intrazelluläre Enzym LDH kommt nahezu in allen Geweben vor und befindet sich bei vitalen Zellen im Zytoplasma. Bei einer Schädigung der Zellmembran wird das Enzym LDH extrazellulär freigesetzt, wodurch die Aktivität des Enzyms mittels kommerziell erhältlichen „Cytotoxicity Detection Kit“ (Roche) im Zellkulturüberstand durch Umsetzung eines Formazansalzes nachgewiesen werden kann. Die Freisetzung der LDH korreliert direkt mit der Menge an umgesetzten Formazan und kann photometrisch bei einer Wellenlänge von 495 nm und einer Referenzwellenlänge von 650 nm bestimmt werden. Als Positivkontrolle wurde Triton X (1 %) eingesetzt, das zur Lysierung der Zellen

und somit zur vollständigen Freisetzung von LDH in den Zellkulturüberstand führt [Roche, 2011]. Als Negativkontrolle diente DMSO (1 %).

Zur Auswertung wurde die Positivkontrolle Triton X (1 % = vollständige LDH-Freisetzung) auf 100 % gesetzt und die Werte der Testsubstanzen prozentuell dazu berechnet, woraus sich der „Test-Over-Control-Wert“ [T/C] in Prozent [%] ergibt.

Abbildung 19 zeigt den Einfluss der Testsubstanzen auf die Membranintegrität nach ein-stündiger Inkubationszeit. Dargestellt sind Mittelwert \pm Standardabweichung von mindestens drei unabhängigen Versuchen in Sechsfach-Bestimmung.

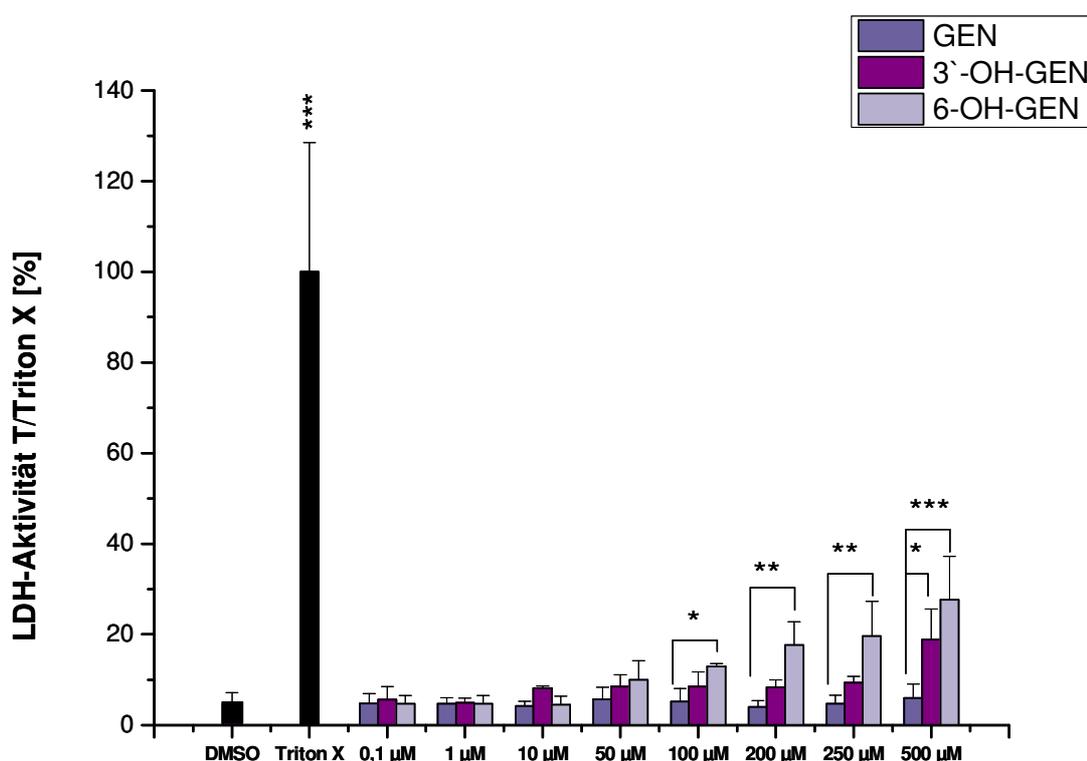


Abbildung 19: Einfluss von Genistein und dessen oxidativen Metaboliten auf die Integrität der Zellmembran von HT-29 Zellen nach einstündiger Inkubationszeit in serumfreiem Medium unter Zusatz von Katalase (100 U/ml). Triton X (1 %) wurde als Positivkontrolle und DMSO (1 %) als Lösungsmittelkontrolle eingesetzt. Dargestellt sind Mittelwert \pm Standardabweichung von mindestens drei unabhängigen Versuchen. Die Signifikanzen wurden mittels ANOVA-ONE-WAY berechnet: * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$. Alle Werte sind normalverteilt. Anzahl der Versuche: GEN: $n=5-6$, 3'-OH-GEN: $n=3-4$, 6-OH-GEN: $n=3-4$.

Nach einstündiger Inkubationszeit ist im Bezug auf die LDH-Freisetzung im Zellkulturüberstand ersichtlich, dass sich der 6-OH-Metabolit ab einer Konzentration von 100 μM und der 3'-OH-Metabolit bei einer Konzentration von 500 μM signifikant von der Muttersubstanz Genistein unterscheiden. Jedoch wurde bei keiner der Substanzen ein signifikanter Unterschied zur Lösungsmittelkontrolle festgestellt. Da im LDH-Assay der Zellkulturüberstand verwendet wurde und die Metabolite eine stärkere Eigenfärbung besitzen, besteht die Möglichkeit einer Interferenz der Testsubstanzen mit der Mess-

wellenlänge. Deshalb wurden die Testsubstanzen in Abwesenheit von Zellen mit dem LDH-Reagenzmix versetzt und die Absorption bei 495 nm und der Referenzwellenlänge von 650 nm bestimmt. Es erfolgte je eine Doppelbestimmung in den Konzentrationen, die nach einstündiger Inkubation zu einem signifikanten Ergebnis geführt haben (3`-OH-GEN: 200 μ M – 500 μ M; 6-OH-GEN: 250 μ M und 500 μ M). Zusätzlich wurde 0,1 μ M – 500 μ M Genistein sowie DMSO (1 %) mitgeführt. Abbildung 20 zeigt die Absorption der Testsubstanzen in Abwesenheit von Zellen. Dargestellt sind Mittelwert \pm Standardabweichung von je einer Doppelbestimmung.

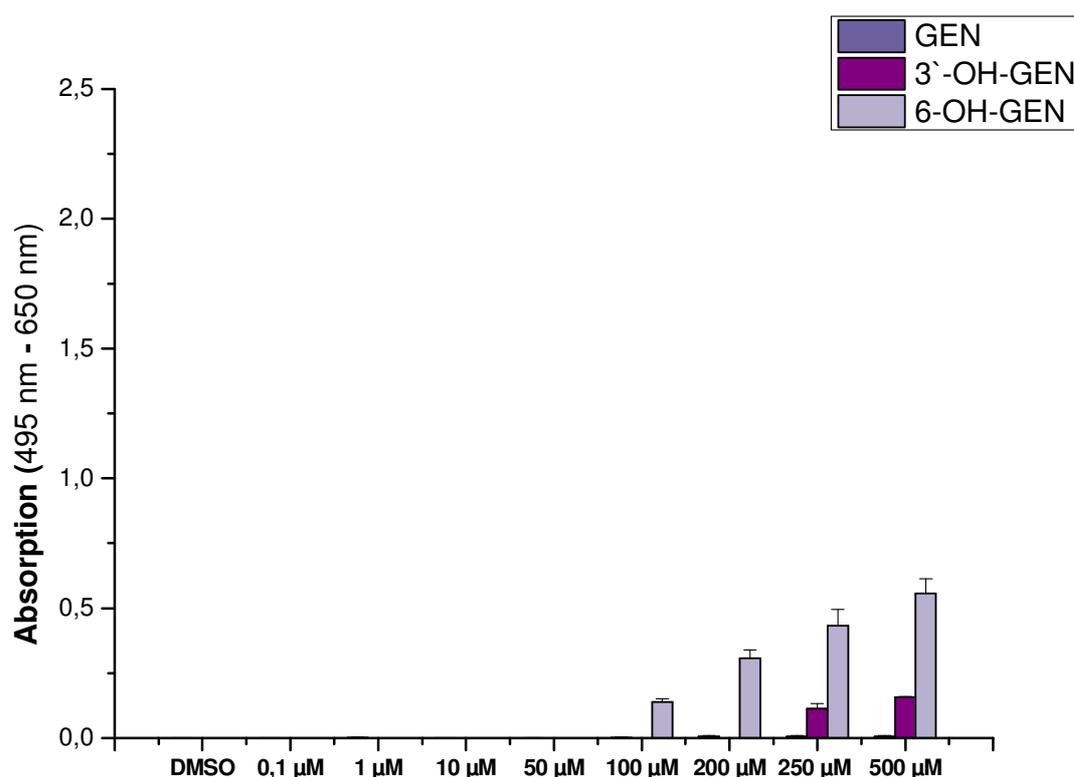


Abbildung 20: Absorption der Testsubstanzen in Abwesenheit von Zellen. Dargestellt sind Mittelwert \pm Standardabweichung von je einer Doppelbestimmung.

Aus der Abbildung ist ersichtlich, dass die Metabolite zu einer konzentrationsabhängigen Erhöhung der Absorption in Abwesenheit von Zellen führen. Die beobachtete Erhöhung der Absorption nach einstündiger Inkubation scheint somit durch die Eigenfärbung der Metabolite, die zu einer Interferenz in der Messwellenlänge führt, bedingt zu sein. Somit scheint keine der Testsubstanzen nach einstündiger Inkubationszeit zu einer Freisetzung von LDH in den Zellkulturüberstand zu führen. Um mögliche Langzeiteffekte zu erfassen, erfolgte ebenfalls eine 24-stündige Inkubation mit den Testsubstanzen (Abbildung 21).

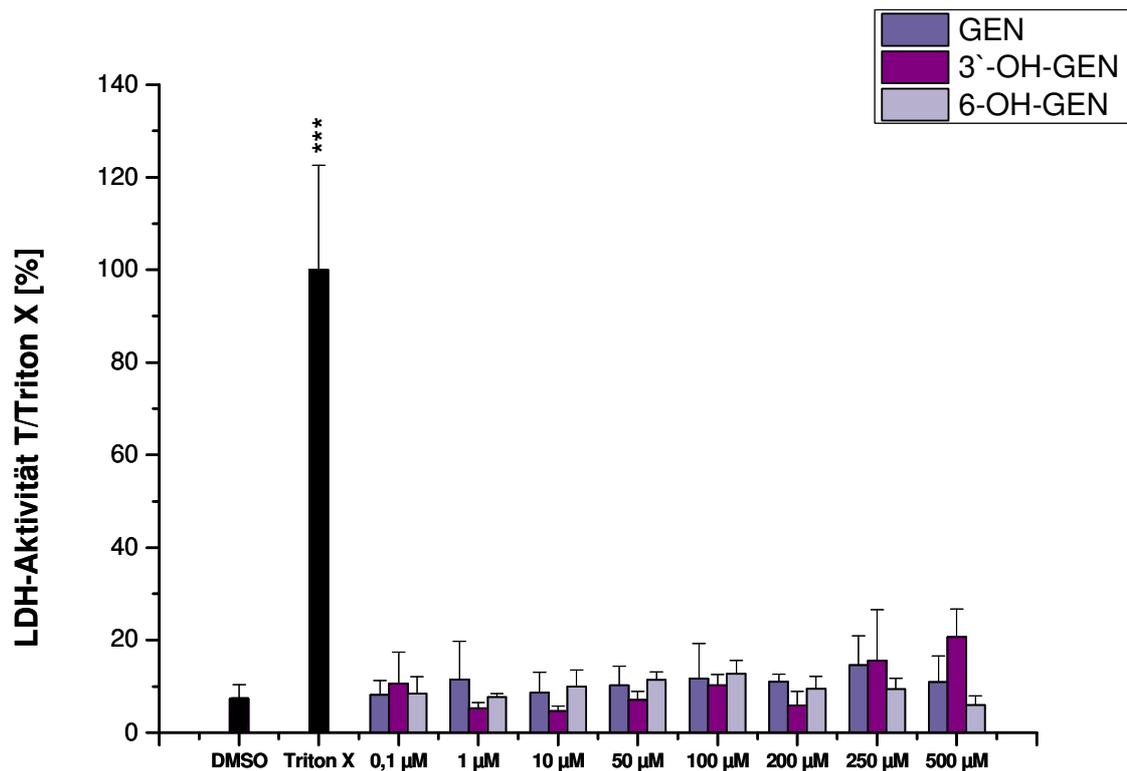


Abbildung 21: Einfluss von Genistein und dessen oxidativen Metaboliten auf die Integrität der Zellmembran von HT-29 Zellen nach 24-stündiger Inkubation in serumfreiem Medium unter Zusatz von Katalase (100 U/ml). Triton X (1 %) wurde als Positivkontrolle und DMSO (1 %) als Lösungsmittelkontrolle eingesetzt. Dargestellt sind Mittelwert \pm Standardabweichung von mindestens drei unabhängigen Versuchen. Die Signifikanz wurde mittels ANOVA-ONE-WAY berechnet: * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$. Alle Werte sind normalverteilt. Anzahl der Versuche: GEN: $n=6$, 3'-OH-GEN: $n=5$, 6-OH-GEN: $n=3$.

Nach einer Inkubationszeit von 24 h führte keine der Testsubstanzen zu einer Erhöhung der LDH-Aktivität im Zellüberstand. Die Metabolite, die bei einer Wellenlänge von 490 nm absorbieren, scheinen nach 24 h Inkubation abgebaut worden zu sein. Somit scheint weder Genistein noch die oxidativen Metabolite selbst nach 24-stündiger Inkubation einen signifikanten Einfluss auf die Integrität der Zellmembran von HT-29 Zellen auszuüben.

Im Gegensatz zu den in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnissen konnte in anderen Zelllinien eine Freisetzung an LDH nach Inkubation mit Genistein beobachtet werden. In den Prostatakrebszelllinien DU145 und LNCaP führte Genistein nach 24-stündiger Inkubation bereits in geringen Konzentrationen ($>10 \mu\text{M}$) zu einer konzentrationsabhängigen LDH-Freisetzung in den Zellkulturüberstand [Kumi-Diaka et al., 2000]. Da in dieser Studie eine andere Zelllinie eingesetzt wurde und die Inkubation ohne Katalasezusatz erfolgte, könnte es sich hierbei um zelllinienspezifische Unterschiede handeln oder die Störung der zellulären Integrität durch die Entstehung von H_2O_2 im Zellkulturmedium bedingt sein.

8.1.2 Einfluss auf die mitochondriale Aktivität

Die Zellviabilität wurde mittels WST-1 Assay untersucht. Dieser Assay misst die Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenasen und beruht auf der reduktiven Umsetzung des dunkelrot gefärbten Tetrazoliumsalzes WST 4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzen disulfonat) zum gelblich gefärbten Formazan unter Verbrauch von NADH. Die Menge an gebildetem Formazan korreliert direkt mit der Menge an metabolisch aktiven Zellen und ist somit ein erster Hinweis für eine Verringerung der Zellviabilität [WST, 2005]. Da im WST-1 Assay die Weiterverwendung der 96-Wellplatte vom LDH-Assay erfolgt, ist die Positivkontrolle ebenso wie im LDH-Assay Triton X (1 %). Zur Auswertung wurden die Werte der Lösungsmittelkontrolle DMSO (1 %) auf 100 % gesetzt und die Proben prozentuell dazu berechnet. Abbildung 22 zeigt den Einfluss der Testsubstanzen auf die Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenasen nach einstündiger Inkubationszeit. Dargestellt sind Mittelwert \pm Standardabweichung von mindestens drei unabhängigen Versuchen in Sechsfach-Bestimmung.

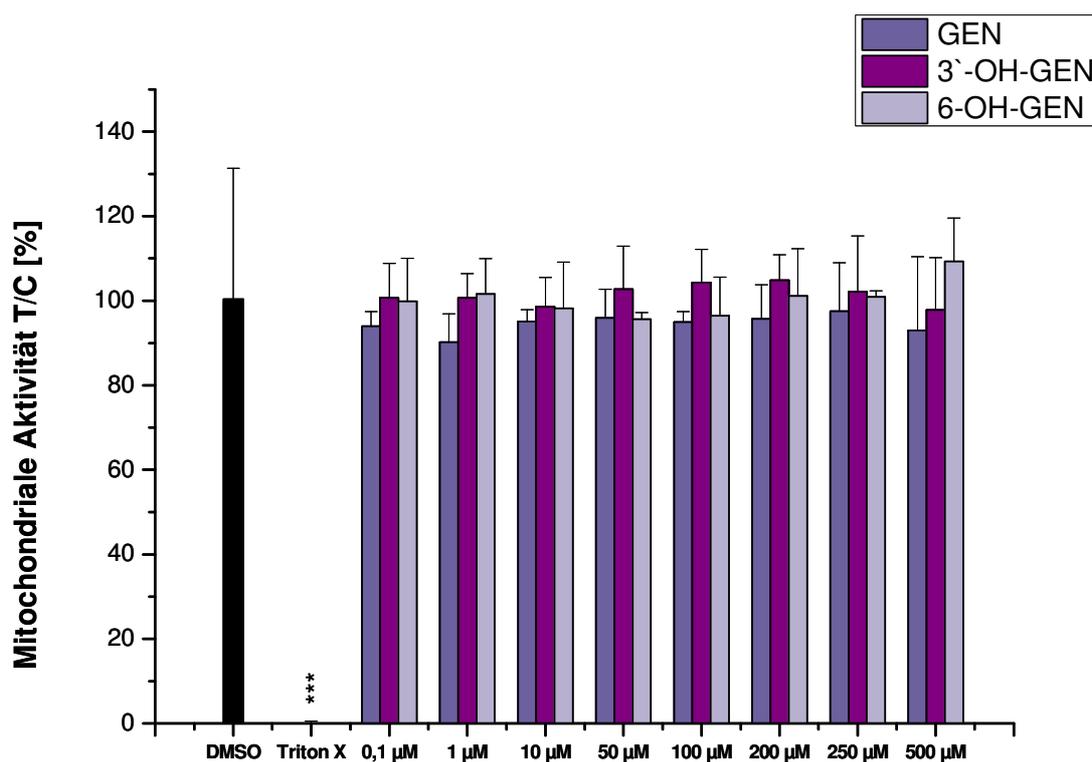


Abbildung 22: Einfluss von Genistein und dessen oxidativen Metaboliten auf die Viabilität von HT-29 Zellen nach einstündiger Inkubationszeit in serumfreiem Medium unter Zusatz von Katalase (100 U/ml). Triton X (1 %) wurde als Positivkontrolle und DMSO (1 %) als Lösungsmittelkontrolle eingesetzt. Dargestellt sind Mittelwert \pm Standardabweichung von mindestens drei unabhängigen Versuchen. Die Signifikanzen wurden mittels ANOVA-ONE-WAY berechnet: * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$. Alle Werte sind normalverteilt. Anzahl der Versuche: GEN: $n=5$, 3'-OH-GEN: $n=5$, 6-OH-Gen: $n=4$.

Aus der Abbildung geht hervor, dass eine einstündige Exposition von HT-29 Zellen mit den Testsubstanzen zu keiner signifikanten Verringerung der mitochondrialen Aktivität und somit zu keiner Abnahme der Zellviabilität führt. Um Aussagen über mögliche Langzeiteffekte der Testsubstanzen auf die Zellviabilität von HT-29 Zellen treffen zu können, erfolgte ebenfalls eine 24-stündige Inkubation unter gleichen Inkubationsbedingungen (Abbildung 23).

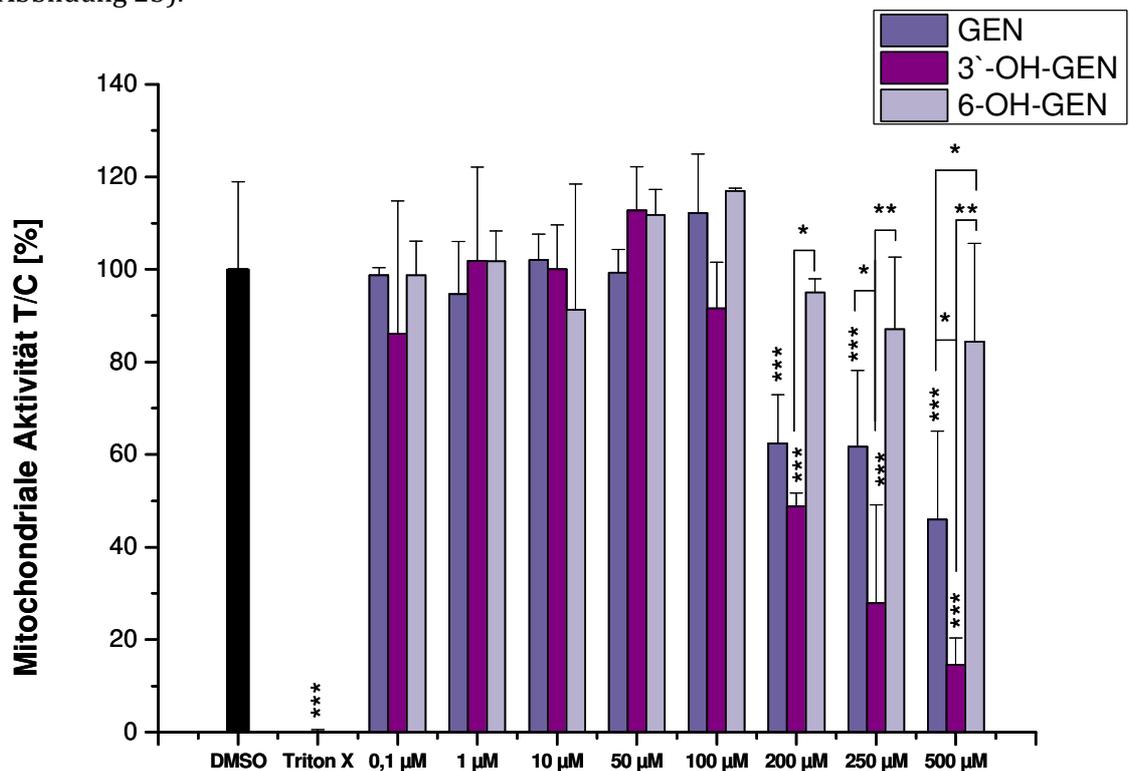


Abbildung 23: Einfluss von Genistein und dessen oxidativen Metaboliten auf die Viabilität von HT-29 Zellen nach 24-stündiger Inkubationszeit in serumfreiem Medium unter Zusatz von Katalase (100 /ml). Triton X (1 %) wurde als Positivkontrolle und DMSO (1 %) als Lösungsmittelkontrolle eingesetzt. Dargestellt sind Mittelwert \pm Standardabweichung von mindestens drei unabhängigen Versuchen. Die Signifikanzen wurden mittels ANOVA-ONE-WAY berechnet: * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$. Alle Werte sind normalverteilt. Anzahl der Versuche: GEN: $n=5$, 3'-OH-GEN: $n=4$, 6-OH-GEN: $n=3$.

Bis zu einer Konzentration von 200 μM führte die Inkubation der Zellen mit den Isoflavonen zu keiner signifikanten Verringerung der mitochondrialen Aktivität. Ab einer Konzentration von 200 μM kam es nach Inkubation mit Genistein zu einer signifikanten Reduktion der mitochondrialen Dehydrogenasenaktivität auf $62,4 \pm 10,55$ % [T/C]. Eine weitere konzentrationsabhängige Abnahme der Zellviabilität erfolgte bei einer Konzentration von 250 μM auf $61,7 \pm 16,55$ % [T/C] und bei 500 μM auf $45,9 \pm 19,13$ % [T/C]. Ebenso führte der 3'-OH-Metabolit konzentrationsabhängig zu einer Abnahme der mitochondrialen Dehydrogenasenaktivität bei einer Konzentration von 200 μM auf $48,8 \pm 2,90$ % [T/C], bei 250 μM auf $27,9 \pm 21,23$ % [T/C] und bei 500 μM auf $14,6 \pm 5,77$ % [T/C].

[T/C]. Keine signifikante Verringerung der mitochondrialen Aktivität zeigte sich bei 6-OH-Genistein auch nach Inkubation mit der höchsten eingesetzten Konzentration von 500 μM . Ab einer Konzentration von 250 μM führte 3'-OH-Genistein zu einer signifikant stärkeren Abnahme der Dehydrogenasenaktivität als die Muttersubstanz bei gleichen Konzentrationen. Ebenso unterscheiden sich die Metabolite bei einer Konzentration von 200 μM signifikant voneinander.

Während die oxidativen Metabolite bisher noch nicht auf ihr zytotoxisches Potential untersucht worden sind, konnte eine Verringerung der Zellviabilität nach Inkubation mit Genistein bereits in mehreren Zelllinien beobachtet werden [Onozawa et al., 1998; Wang et al., 2012; Yu et al., 2004]. Auch in HT-29 Zellen wurde bereits in früheren Studien eine Abnahme der Zellviabilität nach Inkubation mit Genistein festgestellt, wobei in den meisten Studien ohne den Zusatz von Katalase inkubiert wurde [Kim et al., 2005; Yu et al., 2004]. Lediglich *Agullu et al.* inkubierte mit Katalasezusatz und konnte in HT-29 Zellen nach 48-stündiger Inkubation mit 60 μM Genistein eine Reduktion der Zellviabilität auf 60 % beobachten [Agullo et al., 1996]. Trotz längerer Inkubationsdauer in dieser Studie konnte ebenfalls erst bei einer recht hohen Konzentration an Genistein eine Verringerung der Zellviabilität beobachtet werden, wodurch die Ergebnisse in dieser Arbeit bestätigt werden. Die erhaltenen Ergebnisse im WST-1 Assay und LDH-Assay lassen darauf schließen, dass es nach einstündiger Inkubationszeit mit den Testsubstanzen zu keinen zytotoxischen Effekten kommt. Jedoch zeigte sich nach 24-stündiger Inkubation mit Genistein und 3'-OH-Genistein eine konzentrationsabhängige Abnahme der mitochondrialen Aktivität. Ebenso wie hinsichtlich der DNA-strangbrechenden Wirkung der Testsubstanzen im Comet-Assay beobachtet wurde, scheint sich das zyotoxische Potential von Genistein durch die zusätzliche Hydroxylgruppe am B-Ring zu erhöhen und durch die Hydroxylierung am A-Ring zu verringern.

8.2 Aktivierung des Tumorsuppressorproteins p53

Um mögliche DNA-schädigende Wirkungen der Testsubstanzen zu ermitteln, wurde dessen Einfluss auf die Aktivierung des Tumorsuppressorproteins p53 untersucht. Das Protein p53 wird bei Schäden an der DNA phosphoryliert, wodurch er als Transkriptionsfaktor spezifische Zielgene transaktiviert die an Zellzyklusregulation, Reparaturmechanismen und Apoptoseinduktion beteiligt sind [Kum Kum und Stephen, 2001]. Der Phosphorylierungsgrad des Proteins stellt ein Maß für die DNA-Schädigung dar und wurde mittels Western Blot bestimmt, wobei die Menge an phosphoryliertem p53 (p-p53) nach Inkubation mit einem Primär- und Sekundärantikörper mittels Chemilumineszenz

detektiert wurde. Zusätzlich wurde das Protein α -Tubulin als Beladungskontrolle mitgeführt. Die Inkubation mit den Testsubstanzen erfolgte für 1 h in serumfreiem Medium unter Zusatz von Katalase (100 U/ml). Als Positivkontrolle wurde Hydroxyurea (HU), ein Inhibitor der Ribonukleotidreduktase, der die DNA-Synthese verhindert und somit zu einer Aktivierung von p53 führt, eingesetzt [Gottifredi et al., 2001]. Als zweite Positivkontrolle dienten mit UV-Licht behandelte Zellen und als Lösungsmittelkontrolle DMSO (1 %). Die Membran wurde zusätzlich semiquantitativ mithilfe des Programms Multi Gauge V3.2. ausgewertet. Die DMSO-Kontrolle wurde auf 100 % normiert und die Werte der Testsubstanzen prozentuell dazu berechnet (Abbildung 24).

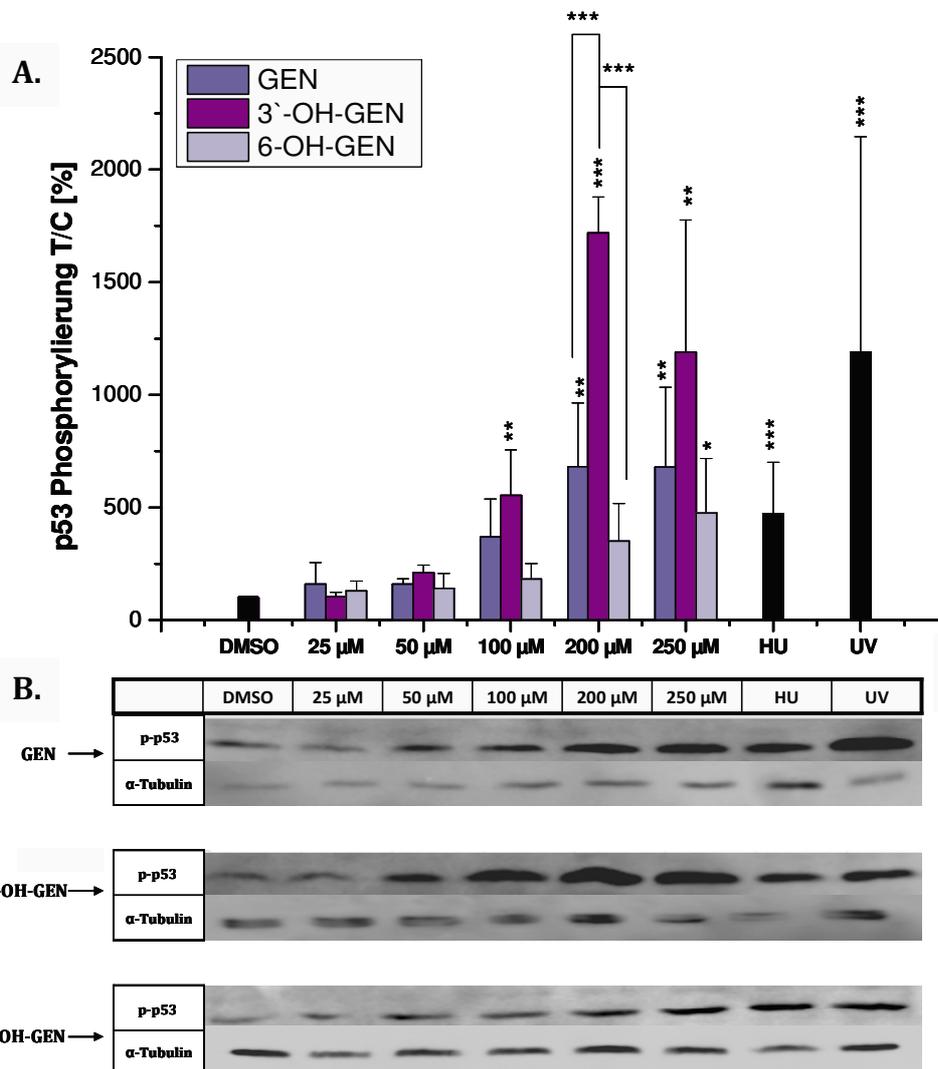


Abbildung 24: Einfluss von Genistein und dessen oxidativen Metaboliten auf den Phosphorylierungsstatus des Proteins p53 nach einstündiger Inkubationszeit in serumfreiem Medium unter Zusatz von Katalase (100 U/ml). A. Dargestellt sind Mittelwert \pm Standardabweichung von mindestens drei unabhängigen Versuchen. Signifikanzen wurden mittels ANOVA-ONE-WAY berechnet (* = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$). Alle Werte sind normalverteilt. B. Darstellung von repräsentativen Blottingmembranen. Zur Kontrolle der Beladung wurde α -Tubulin mitgeführt. Anzahl der Versuche: GEN: $n=5-6$, 3'-OH-GEN: $n=4-5$, 6-OH-GEN: $n=3$

Nach einstündiger Inkubation führte Genistein bei einer Konzentration von 200 μM zu einem signifikanten Anstieg an phosphoryliertem p53 auf 680 ± 284 % [T/C] und bei 250 μM auf 679 ± 354 % [T/C]. Nach Inkubation mit 3'-OH-Genistein konnte bereits bei einer Konzentration von 100 μM eine signifikante Erhöhung an phosphoryliertem p53 auf 553 ± 201 % [T/C] verzeichnet werden. Ein weiterer konzentrationsabhängiger Anstieg der Phosphorylierung erfolgte bei 200 μM auf $1718,9 \pm 159,9$ % [T/C]. Bei einer Konzentration von 250 μM kam es jedoch zu einer leichten Abnahme der Phosphorylierung auf $1190,5 \pm 586$ % [T/C], die möglicherweise aufgrund der hohen Konzentration auf zytotoxische Effekte zurückzuführen ist und wodurch es zu keiner weiteren Phosphorylierung kommt. Auch nach Inkubation mit 6-OH-Genistein konnte bei einer Konzentration von 250 μM ein signifikanter Phosphorylierungsanstieg auf $475 \pm 243,3$ % [T/C] beobachtet werden. 3'-OH-Genistein führte bei einer Konzentration von 200 μM zu signifikant höheren Phosphorylierungsgehalten als die Muttersubstanz bei gleicher Konzentration. Signifikante Unterschiede zwischen den Metaboliten zeigten sich ebenso bei 200 μM .

Somit kann bereits nach einstündiger Inkubation sowohl für Genistein als auch für beide oxidativen Metabolite eine signifikante Phosphorylierungszunahme an p53 im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle festgestellt werden, die auf eine DNA-schädigende Wirkung rückschließen lässt. Ebenso scheint sich durch die Hydroxylierung am B-Ring die DNA-schädigende Wirkung von Genistein zu erhöhen und durch die Hydroxylgruppe am A-Ring zu verringern. Im Comet-Assay hingegen zeigte sich erst nach 24-stündiger Inkubation mit Genistein und 3'-OH-Genistein eine Erhöhung der DNA-Strangbruchrate. Somit scheint die Bestimmung des Phosphorylierungsstatus des Proteins p53 möglicherweise ein sensitiverer Marker zur ersten Erfassung von DNA-schädigenden Wirkungen zu sein, während DNA-Strangbrüche im Comet-Assay erst nach längerer Inkubationszeit detektierbar sind.

8.3 Untersuchungen zur Zellzyklusverteilung

Das Anhalten des Zellzyklus stellt eine wichtige Möglichkeit der Zelle dar, um auf DNA-Schäden zu reagieren und der Zelle Zeit zur Reparatur des entstandenen Schadens zu verschaffen. Da bereits nach einstündiger Inkubationszeit mit den Testsubstanzen eine Aktivierung des Tumorsuppressorproteins p53 beobachtet werden konnte, sollte im nächsten Punkt dieser Arbeit der Einfluss der Testsubstanzen auf die Zellzyklusverteilung untersucht werden, um einen möglichen Zellzyklusarrest zu ermitteln.

Die Untersuchung der Zellzyklusverteilung erfolgte mittels Durchflusszytometrie, wobei die Zellen nach Substanzinkubation mit dem kommerziell erhältlichen „Cell Cycle Reagent“ (Millipore), welches Propidiumiodid (PI) zur Färbung der DNA enthält, versetzt wurden. Da PI an die DNA bindet, kann die Fluoreszenzintensität als Maß für den DNA-Gehalt genutzt werden und somit zwischen den unterschiedlichen Phasen des Zellzyklus unterschieden werden. Während der Interphase kommt es in der S-Phase zu einem Anstieg des DNA-Gehaltes, wodurch sich Zellen in der G₂-Phase, von denen in der G₀/G₁-Phase durch einen doppelten DNA-Gehalt unterscheiden [Millipore, 2005]. Mittels Durchflusszytometrie wird auch die sogenannte „subG₁-Phase“ miteinbezogen. In dieser Phase befinden sich Debris oder apoptotische Zellen, die aufgrund des geringeren DNA-Gehaltes schwächer fluoreszieren und somit in der subG₁-Phase erfasst werden [Darzynkiewicz et al., 2004].

Als Positivkontrolle wurde Nocodazol in einer Konzentration von 40 µM eingesetzt, welche durch Depolymerisation der Mikrotubuli zu einem Arrest in der M-Phase führt [Blajeski et al., 2002]. Als Lösungsmittelkontrolle diente DMSO (1 %). Zusätzlich wurde eine Mediumkontrolle mitgeführt, um einen möglichen Einfluss von DMSO auf die Zellzyklusverteilung auszuschließen. Zur Etablierung des Testsystems und zur Bestimmung des Zeitpunktes bei der eine Arretierung der Zellen beobachtet wird, erfolgten orientierende Messungen nach Inkubation mit Genistein für 24, 48 und 72 Stunden in 10 % FKS-haltigem Medium unter Zusatz von Katalase (100 U/ml). Abbildung 25 zeigt repräsentative Histogramme der Zellzyklusverteilung sowie eine graphische Darstellung der prozentuellen Verteilung der Zellen in den einzelnen Phasen.

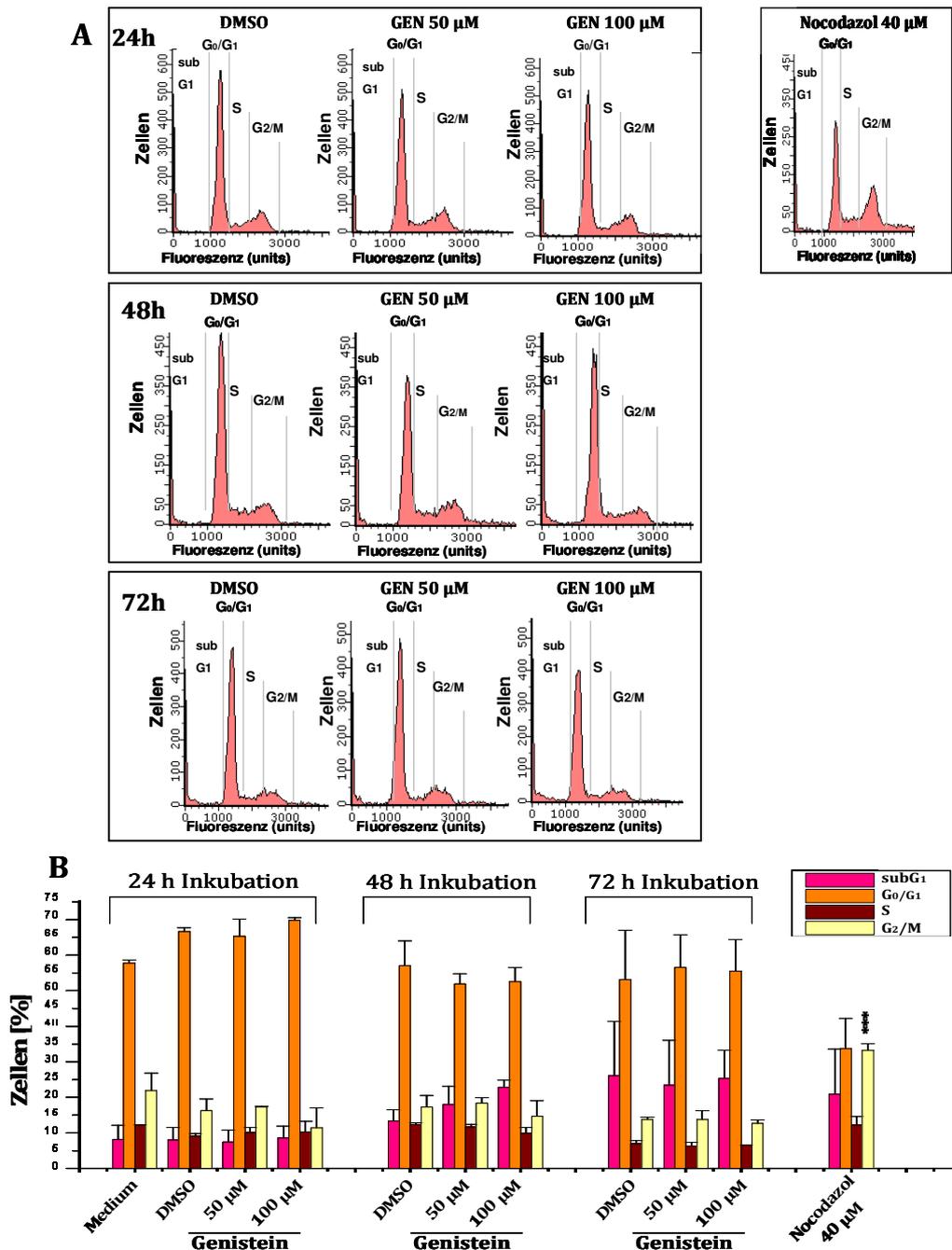


Abbildung 25: Einfluss von Genistein auf die Zellzyklusverteilung von HT-29 Zellen. A. Repräsentative Histogramme der Zellzyklusverteilung nach 24-, 48- und 72-stündiger Inkubation mit 50 µM und 100 µM Genistein in serumhaltigem Medium unter Zusatz von Katalase (100 U/ml). Als Lösungsmittelkontrolle wurde DMSO (1 %) und als Positivkontrolle Nocodazol (40 µM) eingesetzt. B. Graphische Darstellung der prozentuellen Verteilung der einzelnen Phasen. Dargestellt sind Mittelwert \pm Standardabweichung von jeweils 2 unabhängigen Versuchen. Signifikanzen wurden mittels T-Test berechnet (* = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$).

Nach 24-, 48- und 72-stündiger Inkubation mit Genistein konnten keine Unterschiede in der Zellzyklusverteilung im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle festgestellt werden. Auch eine 72-stündige Behandlung der Zellen mit Genistein in einer Konzentration von 100 µM führte somit zu keiner Arretierung der Zellen. So zeigte sich die Verteilung der

einzelnen Phasen des Zellzyklus nach 72-stündiger Inkubation mit 100 μM Genistein wie folgt: Zellen in der subG₁-Phase 25 \pm 8 %, in der G₀/G₁-Phase 55 \pm 9 %, in der S-Phase 6,5 \pm 0,14 % und in der G₂/M-Phase 11,4 \pm 5,6 %. Die DMSO-Kontrolle führte zu einer ähnlichen Verteilung: 26,1 \pm 15,3 % der Zellen in der subG₁-Phase, 53 \pm 13 % in der G₀/G₁-Phase, 6,3 \pm 0,86 % in der S-Phase und 13,8 \pm 0,57 % in der G₂/M-Phase. Die eingesetzte Positivkontrolle Nocodazol führte zu einem signifikanten Anstieg der G₂/M-Phase: 20,9 \pm 12,7 % der Zellen in der subG₁-Phase, 33,7 \pm 8,5 % in der G₀/G₁-Phase, 12,1 \pm 2,44 % in der S-Phase und 33 \pm 1,8 % in der G₂/M-Phase.

Um einen möglichen Einfluss der Katalase auf den Zellzyklus auszuschließen, erfolgte eine orientierende Messung nach 48-stündiger Inkubation der Zellen mit 100 μM Genistein ohne Katalasezusatz (Abbildung 26).

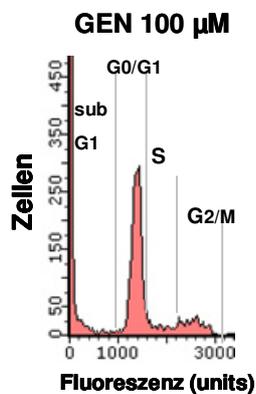


Abbildung 26: Zellzyklusverteilung der HT-29 Zellen nach 48-stündiger Inkubation mit 100 μM Genistein in 10 % FKS-haltigem Medium (n=1)

Auch eine 48-stündige Inkubation mit Genistein ohne Katalasezusatz führte zu keiner Arretierung der Zellen. Jedoch zeigte sich ein starker Anstieg der subG₁-Phase, die somit möglicherweise auf Debris oder apoptotische Zellen hinweist. Die Zellzyklusverteilung zeigte sich wie folgt: 47 % der Zellen in der subG₁-Phase, 38,7 % in der G₀/G₁-Phase, 5,5 % in der S-Phase und 8,8 % in der G₂/M-Phase.

Somit konnte trotz unterschiedlicher Inkubationsbedingungen kein Zellzyklusarrest nach Exposition der Zellen mit Genistein festgestellt werden. Dies steht im Gegensatz zu früheren Studien, in denen ein Genistein-induzierter G₂/M-Arrest bereits mehrfach in unterschiedlichen Zelllinien beobachtet worden ist [Cappelletti et al., 2000; Chen und Donovan, 2004; Kobayashi et al., 2002; Matsukawa et al., 1993; Ouyang et al., 2009]. Auch in HT-29 Zellen konnte bereits ein G₂/M-Arrest nach Inkubation mit Genistein nachgewiesen werden. So konnte *Ye et al.* nach 72-stündiger Inkubation mit Genistein einen konzentrationsabhängigen Anstieg der G₂/M-Phase in einem Konzentrationsbereich

von 15 μM –120 μM feststellen. [Yu et al., 2004]. Ebenso konnte *Salti et al.* einen G₂/M-Arrest in HT-29 Zellen nach 72-stündiger Inkubation mit 100 μM Genistein belegen [Salti et al., 2000]. In dieser Arbeit konnte hingegen trotz beobachteter DNA-Strangbrüche im Comet-Assay und Aktivierung des Tumorsuppressors p53 kein Zellzyklusarrest beobachtet werden.

8.4 Untersuchungen zur Apoptoseinduktion

Hinsichtlich der Ergebnisse im Comet-Assay stellt sich die Frage, ob die beobachteten DNA-Strangbrüche zum Teil auch auf DNA-Fragmentierung, die im Zuge der Apoptoseinduktion entstanden ist, zurückzuführen sind. Da eine apoptotische Fragmentierung zu falsch-positiven Ergebnissen im Comet-Assay führen kann, sollten deshalb die Testsubstanzen auf ihre apoptoseinduzierende Wirkung untersucht werden.

8.4.1 Apoptosemessung mittels Durchflusszytometrie

Dafür wurden die behandelten Zellen mit dem kommerziell erhältlichen „Guava Nexin Reagent“ (Millipore) gefärbt, das aus den zwei DNA-bindenden Farbstoffen Annexin V und 7-Aminoactinomycin (7-AAD) besteht. Annexin V ist ein Calcium-abhängiges Protein mit einer hohen Bindungsaffinität zu Phosphatidylserin, welches in der frühen Phase der Apoptoseinduktion von der Zelle an die Zelloberfläche abgegeben wird. In der späten Phase der Apoptose zeigen die Zellen einen Verlust der Membranintegrität und 7-AAD kann in die Zelle eindringen [Millipore, 2008]. Nach Färbung der Zellen erfolgt am Durchflusszytometer die Bestimmung von Annexin V am Forward Scatter und 7-AAD am Side Scatter. Dadurch ist es möglich die Zellen in vier Subpopulationen einzuteilen (Abbildung 27).

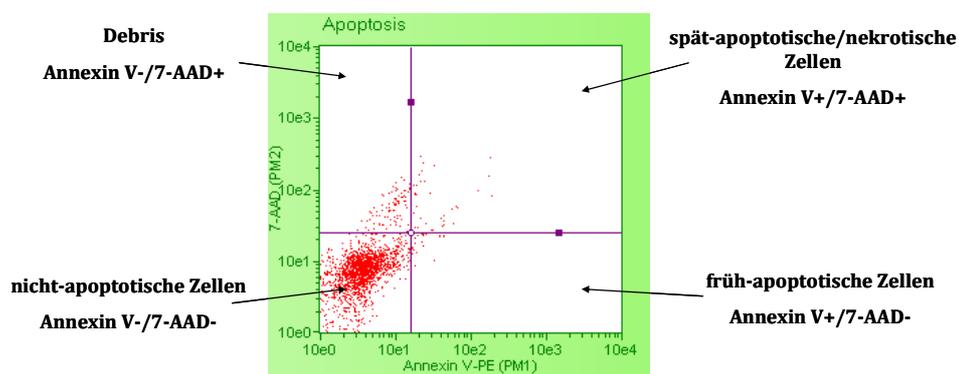


Abbildung 27: Einteilung der Zellen in vier Subpopulationen nach Färbung mit dem „Guava Nexin Reagent“ und durchflusszytometrischer Messung Annexin V und 7-AAD gefärbter Zellen.

Zur Etablierung des Testsystems erfolgten orientierende Messungen nach Inkubation mit Genistein zu unterschiedlichen Inkubationszeiten. Als Positivkontrolle wurde Etoposid

(ETO) in einer Konzentration von 50 μM und als Lösungsmittelkontrolle DMSO (1 %) eingesetzt.

Abbildung 28 zeigt repräsentative Plots und eine graphische Darstellung Annexin V-positiver Zellen (apoptotische Zellen) nach 24-stündiger Inkubation mit Genistein in serumfreiem Medium unter Zusatz von Katalase (100 U/ml).

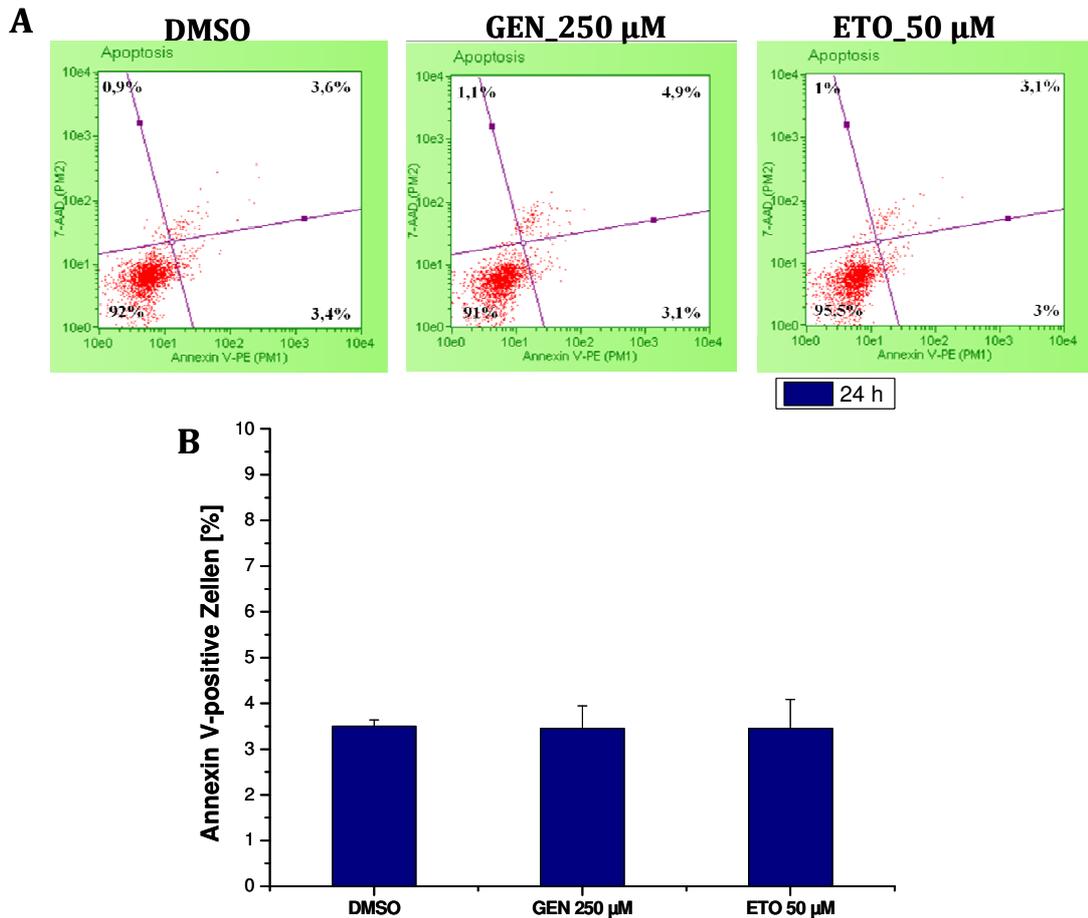


Abbildung 28: Einfluss von Genistein auf die Apoptoseinduktion in HT-29 Zellen nach 24-stündiger Inkubation in serumfreiem Medium unter Zusatz von Katalase (100 U/ml). A. Repräsentative Plots zur durchflusszytometrischen Messung Annexin V und 7-AAD gefärbter Zellen. B. Graphische Darstellung Annexin V-positiver Zellen.

Aus der Abbildung ist ersichtlich, dass weder Genistein noch die Positivkontrolle Etoposid nach 24-stündiger Inkubation in serumfreiem Medium zu einer Erhöhung an Annexin V-positiven Zellen im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle führen. Um weitere Zeiträume für eine mögliche Apoptoseinduktion abzudecken, erfolgten Messungen nach 24-, 48- und 72-stündiger Inkubation mit Genistein in FKS-haltigem Medium (Abbildung 29+30).

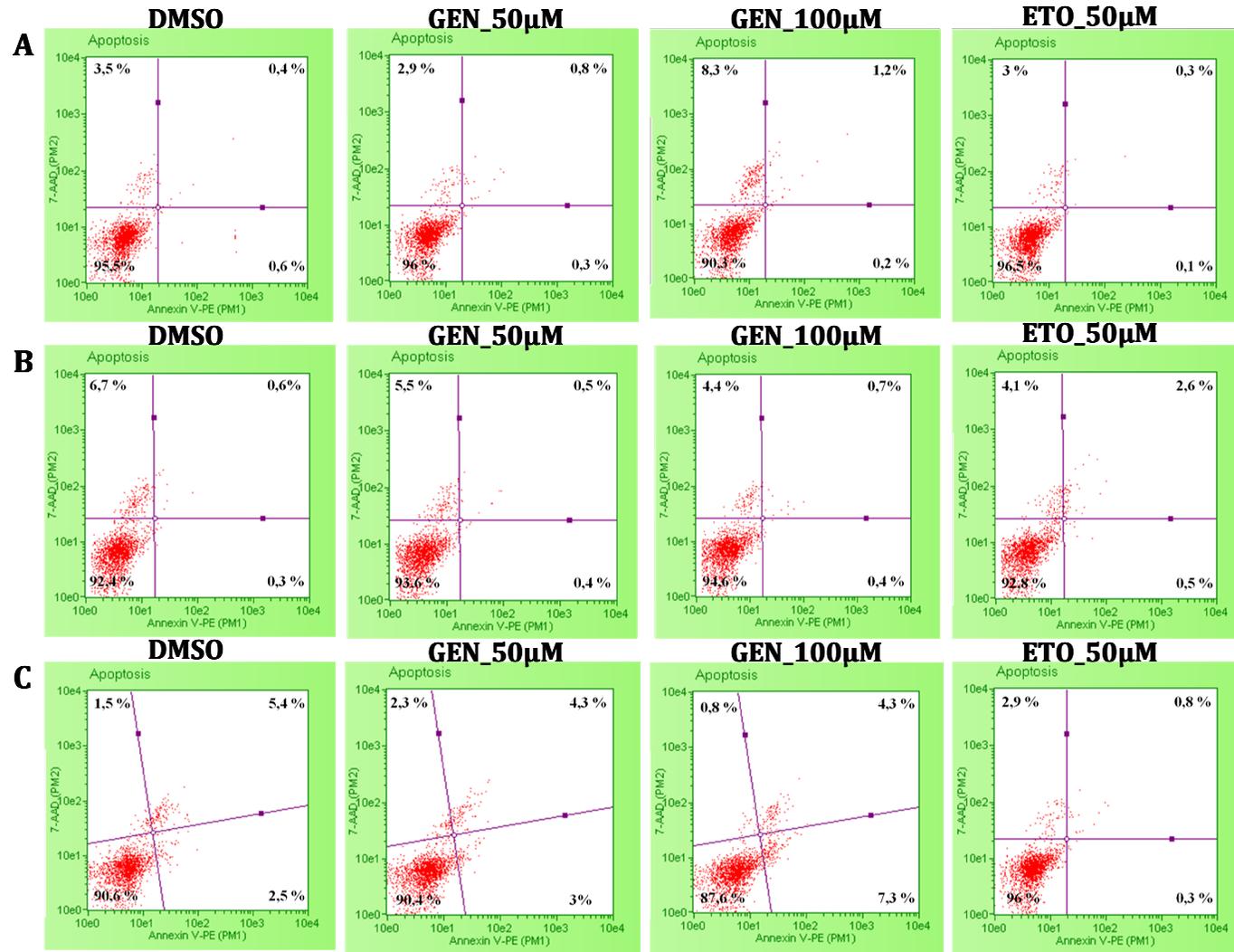


Abbildung 29: Repräsentative Plots zur durchflusszytometrischen Messung Annexin V und 7-AAD gefärbter Zellen nach Inkubation mit Genistein in 10 % FKS-haltigem Medium unter Zusatz von Katalase (100 U/ml) A. 24-stündige Inkubation; B. 48-stündige Inkubation; C. 72-stündige Inkubation

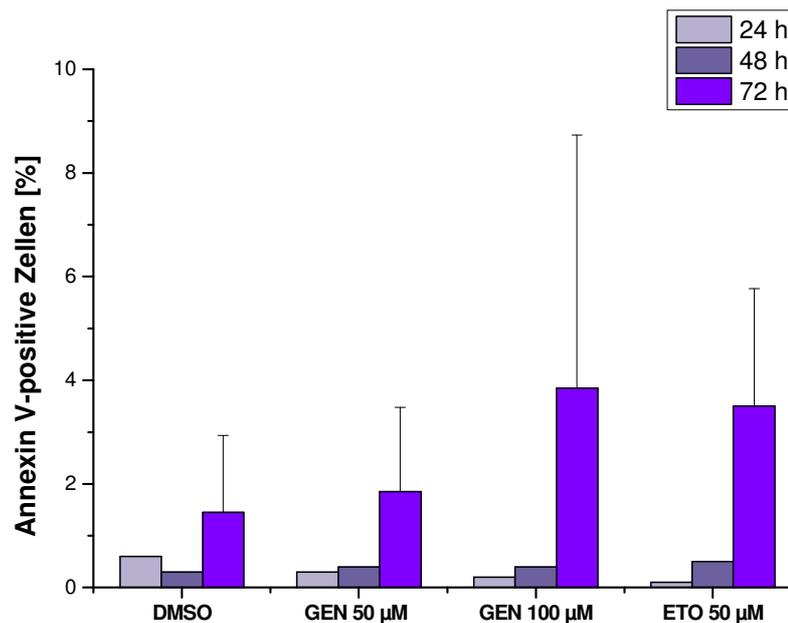


Abbildung 30: Graphische Darstellung Annexin V-positiver Zellen nach 24-, 48- und 72-stündiger Inkubation mit Genistein in 10 % FKS-haltigem Medium unter Zusatz von Katalase (100 U/ml). Als Lösungsmittelkontrolle wurde DMSO (1 %) und als Positivkontrolle Etoposid (50 µM) mitgeführt. 24 h, 48 h: n=1, 72 h: n=2.

Ebenso zeigten sich nach 24- und 48-stündiger Inkubationszeit mit Genistein in serumhaltigem Medium keine Unterschiede zur Negativkontrolle. Auch die Positivkontrolle führte zu keiner Erhöhung an Annexin V-positiven Zellen.

Nach 72-stündiger Inkubation mit 100 µM Genistein zeigte sich nach der ersten Messung eine moderate Erhöhung an Annexin V-positiven Zellen. Bei der Wiederholung der Messung konnte dieses Ergebnis jedoch nicht reproduziert werden. Trotz beobachteter morphologischer Veränderungen unter dem Lichtmikroskop konnte auch für die Positivkontrolle im Guava Nexin Assay kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Zellpopulationen im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle beobachtet werden. Möglicher Grund dafür könnte die Zelllinie sein, in der apoptotische Zellen mittels Guava Nexin Assay nicht erfassbar sind.

8.4.2 Cell Death Detection ELISA^{PLUS}

Da bei der Bestimmung der Apoptoserate mittels Guava Nexin Assay Ergebnisse erzielt wurden, die denen der Literatur widersprechen [Constantinou et al., 1998; Park et al., 2005], wurde ein weiteres Testsystem herangezogen. Dabei handelt es sich um das kommerziell erhältliche Cell Death Detection ELISA^{PLUS}. Dieser Assay beruht auf dem Prinzip eines quantitativen „Sandwich-Enzym-Immunoassays“. Der Einsatz von monoklonalen Antikörpern, die gegen DNA und Histone gerichtet sind, erlaubt die

photometrische Bestimmung von Mono- und Oligonukleosomen, die im Zuge der Apoptose entstehen [Roche, 2010]. Um die Apoptoserate im Cell Death Detection ELISA^{PLUS} aus einem Aliquot von $1,5 \times 10^4$ Zellen zu bestimmen, wurden die Zellen zuvor mittels „Guava ViaCount Reagent“ (Millipore) gefärbt und die Zellzahl durchflusszytometrisch bestimmt. Zusätzlich wurde die Viabilität in Prozent berechnet, die sich aus dem Verhältnis lebender Zellen zur Gesamtzellzahl ergibt (Abbildung 31).

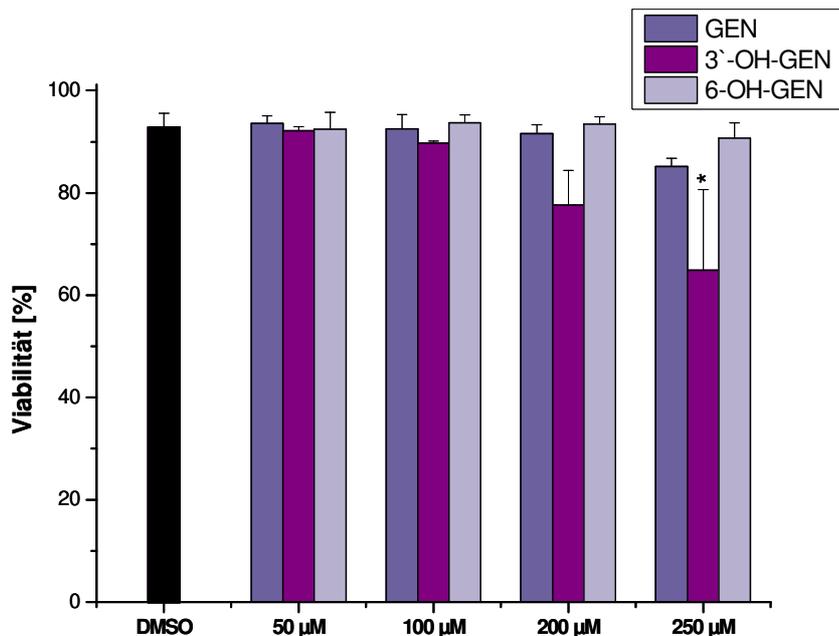


Abbildung 31: Durchflusszytometrische Bestimmung der Zellviabilität in Prozent [%] nach Färbung der Zellen mittels „Guava ViaCount Reagent“ (Millipore). Dargestellt sind Mittelwert \pm Standardabweichung von drei unabhängigen Versuchen. Die Signifikanzen wurden mittels ANOVA-ONE-WAY berechnet (* = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$). Alle Werte sind normalverteilt.

Aus der Abbildung ist ersichtlich, dass nach 24-stündiger Inkubationszeit 3'-OH-Genistein bei einer Konzentration von 250 μM zu einer signifikanten Verringerung der Zellviabilität auf 59 ± 14 % führt.

Anschließend erfolgte die Bestimmung der Apoptoserate mittels Cell Death Detection ELISA^{PLUS}. Als Positivkontrolle diente der mitgelieferte DNA-Histon-Komplex. Zur graphischen Darstellung wurden die Absorptionen der Lösungsmittelkontrolle auf 100 % normiert und die Werte der Testsubstanzen prozentuell dazu berechnet (Abbildung 32).

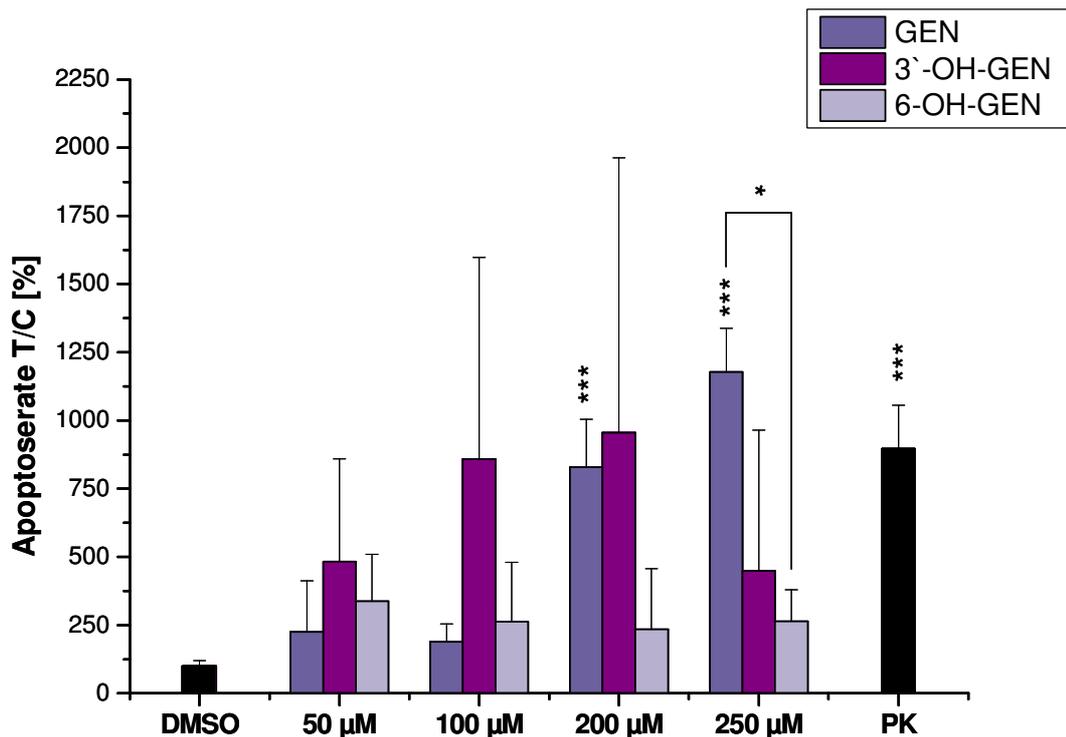


Abbildung 32: Einfluss von Genistein und dessen oxidativen Metaboliten auf die Apoptoseinduktion in HT-29 Zellen nach 24-stündiger Inkubation in serumfreiem Medium unter Zusatz von Katalase (100 U/ml). Als Positivkontrolle diente der mitgelieferte DNA-Histon-Komplex. Als Lösungsmittelkontrolle wurde DMSO (1%) eingesetzt. Dargestellt sind Mittelwert \pm Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten in Doppelbestimmung. Die Signifikanzen wurden mittels ANOVA-ONE-WAY berechnet. Alle Werte sind normalverteilt. * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$. (PK= Positivkontrolle)

Nach 24-stündiger Inkubation der Zellen mit Genistein ist ab einer Konzentration von 200 μM eine signifikante Erhöhung der Apoptoserate im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle zu erkennen. Bei einer Konzentration von 200 μM kam es nach Inkubation mit Genistein zu einem Anstieg der Apoptoserate auf 830 ± 175 % [T/C]. Eine weitere konzentrationsabhängige Zunahme der Apoptoserate erfolgte bei einer Konzentration von 250 μM auf 1177 ± 159 % [T/C]. Nach Inkubation mit 6-OH-Genistein konnte keine signifikante Erhöhung der Apoptoserate im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle festgestellt werden. Ein deutlicher Farbumschlag war auch bei 3'-OH-Genistein bei einer Konzentration von 100 μM und 200 μM sichtbar. Jedoch kam es aufgrund der hohen Standardabweichung zu keiner Signifikanz zur Negativkontrolle. Die Verwendung einer neuen Charge des Metaboliten führte zu höheren Schwankungen zwischen den einzelnen Messungen. Trotz hoher Schwankungen scheint jedoch der 3'-OH-Metabolit bei den Konzentrationen von 100 μM und 200 μM potenter hinsichtlich Apoptoseinduktion zu sein, als die Muttersubstanz bei gleichen Konzentrationen. Eine

Steigerung der Konzentration auf 250 μM führte zu einer Abnahme der Apoptoserate, die möglicherweise auf die zuvor beobachtete Verringerung der Zellviabilität zurückzuführen ist. Somit könnte die im Comet-Assay beobachtete Erhöhung der DNA-Strangbruchrate nach Inkubation mit Genistein und 3'-OH-Genistein zum Teil auch auf apoptotische Fragmentierung zurückzuführen sein.

8.5 Gesamtdiskussion

Aufgrund des steigenden Gesundheitsbewusstseins unter der Bevölkerung nimmt der Absatz von verschiedensten NEM stetig zu. So werden auch häufig isoflavonhaltige NEM als „natürliche“ und „risikofreie“ Alternative zur Hormonersatztherapie vermarktet, wobei diese Isoflavonaufnahme, die über die Ernährung erreichte Aufnahme um ein Vielfaches übersteigen kann [BfR, 2007]. Neben potentiell gesundheitsfördernden Wirkungen der Isoflavone sind jedoch auch mögliche Risiken nicht auszuschließen. So konnten *in vitro* auch genotoxische Effekte für das Isoflavon Genistein beobachtet werden, die unter anderem vermutlich auf dessen Wirkung als Inhibitor von Topoisomerase II-Enzymen zurückzuführen sind [Kulling und Metzler, 1997; Kulling et al., 1999; Misra et al., 2002; Salti et al., 2000]. Hierbei wirkt Genistein durch Stabilisierung des sogenannten „cleavage complex“ als Topoisomerase-Gift, wobei es durch Kollision mit der Replikationsgabel oder dem Transkriptionsapparat zu permanenten DNA-Strangbrüchen kommen kann [Constantinou et al., 1995].

Ebenso unzureichend geklärt sind die potentiellen Wirkungen der im Säugerorganismus gebildeten Metabolite. [BfR, 2007]. Genistein kann im Phase I-Metabolismus durch CYP-450-abhängige Monooxygenasen zu den oxidativen Metaboliten 3'-OH-Genistein und 6-OH-Genistein verstoffwechselt werden, die sich von der Muttersubstanz nur durch die Stellung einer zusätzlichen Hydroxylgruppe unterscheiden [Kulling et al., 2001].

Da vor allem der Kolon höheren Konzentrationen an Metaboliten ausgesetzt ist, wurden alle Untersuchungen in der humanen Kolonkarzinomzelllinie HT-29 durchgeführt. Zudem erfolgten alle Inkubationen dieser Arbeit unter dem Zusatz von Katalase (100 U/ml). Bisherige Studien konnten eine Interaktion von Polyphenolen mit noch teilweise unbekanntem Komponenten im Zellkulturmedium, die zur Bildung von H₂O₂ führen können, feststellen [Halliwell, 2003; Long et al., 2010]. Somit könnten Studien, in denen ohne Zusatz von Katalase inkubiert wurde, durch die artifizielle Erzeugung von oxidativem Stress durch H₂O₂ verfälscht sein. Da H₂O₂ in Anwesenheit von Katalase in Sauerstoff und Wasser umgesetzt wird, können durch den Zusatz von Katalase H₂O₂-vermittelte Artefakte nahezu ausgeschlossen werden [Lapidot et al., 2002].

Genotoxisches Potential konnte für Genistein bereits in mehreren Studien *in vitro* belegt werden [Mitchell et al., 2000; Ouyang et al., 2009; Salti et al., 2000]. Auch im Rahmen der Doktorarbeit von Anika Schröter zeigte sich im Comet-Assay nach 24-stündiger Inkubation eine Erhöhung der DNA-Strangbruchrate nach Inkubation mit Genistein.

Darüber hinaus konnte festgestellt werden, dass durch eine zusätzliche Hydroxylierung am B-Ring (3'-OH-Genistein) das genotoxische Potential von Genistein erhöht wird. Im Gegensatz dazu schien eine zusätzliche Hydroxylierung am A-Ring (6-OH-Genistein) das genotoxische Potential von Genistein zu vermindern. Allerdings zeigten sich jedoch DNA-strangbrechende Wirkungen erst nach längeren Inkubationszeiten (24 h) in höheren Konzentrationen ($\geq 200 \mu\text{M}$). Dies steht im Gegensatz zu bisherigen Studien in denen die Induktion von DNA-Strangbrüchen in HT-29 Zellen bereits nach kürzerer Inkubationsdauer und in geringeren Konzentrationen festgestellt werden konnte [Pool-Zobel et al., 2000; Salti et al., 2000]. Da jedoch bei diesen Studien ohne den Zusatz von Katalase inkubiert wurde, können mögliche DNA-Strangbrüche, die durch die Entstehung von H_2O_2 im Zellkulturmedium bedingt sind, nicht ausgeschlossen werden.

Aufgrund der beobachteten Unterschiede im genotoxischen Potential der Metabolite wurde in weiterführenden Versuchen dieser Arbeit der Einfluss des oxidativen Metabolismus auf die Zytotoxizität, Integrität der DNA sowie Zellzyklus und Apoptoseinduktion untersucht.

Um die im Comet-Assay beobachteten DNA-Strangbrüche zu verifizieren erfolgte die Bestimmung des zytotoxischen Potentials der Testsubstanzen. Hierbei führten weder Genistein noch die oxidativen Metabolite zu einer Freisetzung des Enzyms LDH, was auf eine mögliche Zellmembranschädigung hinweisen würde. Jedoch zeigte sich nach Langzeitinkubation (24 h) mit Genistein und 3'-OH-Genistein in hohen Konzentrationen ($\geq 200 \mu\text{M}$) eine konzentrationsabhängige Abnahme der mitochondrialen Dehydrogenasenaktivität, die somit auf eine Verringerung der Zellviabilität hindeutet. Ebenso schien durch die zusätzliche Hydroxylgruppe am B-Ring das zytotoxische Potential von Genistein verstärkt, während eine zusätzliche Hydroxylierung am A-Ring dessen Wirkung verminderte. Während die oxidativen Metabolite bisher noch nicht auf ihr zytotoxisches Potential untersucht worden sind, konnte eine Verringerung der Zellviabilität nach Inkubation mit Genistein bereits in mehreren Zelllinien nachgewiesen werden [Matsukawa et al., 1993; Matsumura et al., 2008; Onozawa et al., 1998; Wang et al., 2012]. Auch in HT-29-Zellen konnte bereits in früheren Studien eine Abnahme der Zellviabilität nach Inkubation mit Genistein beobachtet werden, wobei die Inkubationen jedoch ohne den Zusatz von Katalase erfolgten und somit eine direkte Vergleichbarkeit mit den Ergebnissen dieser Arbeit erschwert wird [Kim et al., 2005; Yu et al., 2004]. Lediglich Agullo et al. inkubierte mit Katalase und konnte in HT-29 Zellen nach 48-stündiger Inkubation mit $60 \mu\text{M}$ Genistein eine Verringerung der Zellviabilität auf 60 % beobachten

[Agullo et al., 1996]. Trotz längerer Inkubationszeit konnte hier ebenfalls erst in höheren Konzentrationen eine Verringerung der Zellviabilität festgestellt werden, wodurch die erhaltenen Ergebnisse in dieser Arbeit bestätigt werden.

Um mögliche DNA-schädigende Wirkungen der Testsubstanzen zu erfassen wurde dessen Einfluss auf den Phosphorylierungsstatus des Proteins p53 mittels Western Blot untersucht. Das Tumorsuppressorprotein p53 wird bei DNA-Strangbrüchen rasch phosphoryliert, wobei der Phosphorylierungsgrad des Proteins ein Maß für die DNA-Schädigung durch die Testsubstanzen darstellt. *Ye et al.* konnte bereits nach Inkubation mit Genistein eine ATM-abhängige Phosphorylierung des p53 durch Topoisomerase II-vermittelte DNA-Schäden nachweisen [Ye et al., 2001]. Auch im Rahmen dieser Arbeit führten Genistein sowie beide oxidativen Metabolite bereits nach Kurzzeitinkubation (1 h) zu einer signifikanten Erhöhung an phosphoryliertem p53. Hierbei zeigte sich wieder, dass durch die Hydroxylierung am B-Ring die DNA-schädigende Wirkung von Genistein verstärkt wird, während eine Hydroxylierung am A-Ring dessen Wirkung verminderte. Die stärkere Phosphorylierung des p53 durch 3'-OH-Genistein könnte somit auf eine stärkere Topoisomerase II-Giftung zurückzuführen sein. Während im Comet-Assay erst nach längerer Inkubationszeit eine DNA-strangbrechende Wirkung für Genistein und 3'-OH-Genistein beobachtet werden konnte, zeigten sich hier bereits nach einstündiger Inkubationsdauer DNA-schädigende Wirkungen. Somit scheint möglicherweise die Bestimmung des Phosphorylierungsstatus des Tumorsuppressorproteins p53 in HT-29 Zellen ein sensitiverer Marker zu ersten Erfassung von DNA-Schäden zu sein, während DNA-Strangbrüche im Comet-Assay erst nach längerer Inkubationsdauer detektierbar sind.

Nach Aktivierung des Tumorsuppressors p53 induziert dieser die Transkription zellzyklussteuernder Gene, die zu einem Stopp des Zellzyklus führen, um der Zelle Zeit zur Reparatur des entstandenen Schadens zu verschaffen. Infolge der Topoisomerase II-Giftung resultieren DNA-Strangbrüche, wodurch p53 die Expression des CDK-Inhibitors p21 induziert, welcher an CDK1/Zyklus B-Komplexe bindet und so den Übergang von der G₂-Phase in die M-Phase verhindert [Vogelstein et al., 2000]. In bisherigen Studien konnte bereits mehrfach ein G₂/M-Arrest sowie eine Erhöhung der Expression an p21 nach Inkubation mit Genistein nachgewiesen werden [Chang et al., 2004; Choi et al., 2000; Lian et al., 1998]. Um den Zeitpunkt eines möglichen Zellzyklusarrests zu bestimmen, erfolgte eine durchflusszytometrische Bestimmung der Zellzyklusverteilung nach Inkubation mit Genistein zu verschiedenen Inkubationszeiten (24, 48 und 72 h). Hierbei konnte jedoch

trotz unterschiedlicher Inkubationsdauer keine Veränderung in der Zellzyklusverteilung festgestellt werden. Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu bereits veröffentlichte Studien, in denen nach Inkubation mit Genistein ein G₂/M-Arrest beobachtet werden konnte [Cappelletti et al., 2000; Chen und Donovan, 2004; Matsukawa et al., 1993]. Auch in HT-29 Zellen konnte bereits in früheren Studien ein Genistein vermittelter G₂/M-Arrest nachgewiesen werden. So konnte *Salti et al.* nach 72-stündiger Exposition der HT-29 Zellen mit 100 µM Genistein eine Arretierung der Zellen in der G₂/M-Phase nachweisen [Salti et al., 2000]. Ebenso konnte *Yu et al.* einen G₂/M-Arrest nach 72-stündiger Inkubation mit Genistein in einem Konzentrationsbereich von 12,5 µM - 150 µM feststellen [Yu et al., 2004]. Hierbei erfolgten die Inkubationen jedoch ohne den Zusatz von Katalase. Jedoch konnte auch in einer orientierenden Messung dieser Arbeit, ohne vorhergehenden Katalasezusatz, keine Erhöhung der G₂/M-Phase beobachtet werden. Dadurch kann auch ein möglicher Einfluss der Katalase auf den Zellzyklus ausgeschlossen werden. Möglich wäre jedoch auch ein durch Genistein-vermittelter G₁-Arrest, der auch bereits in der Literatur beschrieben worden ist [Kuzumaki et al., 1998; Shen et al., 2000]. Da ein möglicher G₁-Arrest durch die bereits hohe G₁-Phase in HT-29 Zellen möglicherweise nicht detektierbar ist, wurden die Zellen durch Nocodazolinkubation in der G₂/M-Phase des Zellzyklus synchronisiert und anschließend mit Genistein inkubiert. Jedoch konnte auch dadurch ein G₁-Arrest durch Genistein ausgeschlossen werden. Ebenso zeigte sich nach Langzeitinkubation (72 h) mit 3'-OH-Genistein keine Arretierung der Zellen (Daten siehe Anhang). Da Nocodazol bei den Untersuchungen auch als Positivkontrolle verwendet wurde und zu einem signifikanten G₂/M-Arrest führte, scheint ein Fehler in der Methodik als unwahrscheinlich. Trotz beobachteter DNA-Strangbrüche im Comet-Assay und Aktivierung des Tumorsuppressors p53 führte Genistein somit zu keiner signifikanten Veränderung in der Zellzyklusverteilung. In weiterführenden Untersuchungen könnte jedoch eine andere Zelllinie verwendet werden, um einen möglichen Einfluss der Testsubstanzen auf die Zellzyklusverteilung zu untersuchen.

Nach Inkubation mit Genistein konnte bereits in mehreren Studien die Induktion von Apoptose beobachtet werden, die assoziiert war mit Erhöhung der pro-apoptotisch wirkenden Proteine Bax, Puma und Noxa, Verringerung des anti-apoptotisch wirkenden Proteins Bcl-2 sowie der Aktivierung von Caspase 3 [Ismail et al., 2007; Tategu et al., 2008]. Neben der p53-abhängig induzierten Apoptose scheint auch vor allem die Inhibierung des Akt-Signalweges und NF-κ-B für dessen pro-apoptotische Wirkung eine wichtige Rolle zu spielen [Davis et al., 1999; Park et al., 2005]. Da es im Zuge der Apoptose

zur Fragmentierung der DNA kommt, könnte dies zu falsch-positiven Ergebnissen im Comet-Assay führen. Deshalb sollte als letzter Punkt dieser Arbeit geklärt werden, ob die im Comet-Assay beobachteten DNA-Strangbrüche zum Teil auch auf apoptotische DNA-Fragmentierung zurückzuführen sind. Eine mögliche apoptoseinduzierende Wirkung von Genistein wurde durchflusszytometrisch mittels Guava Nexin Assay untersucht. Jedoch konnte trotz unterschiedlicher Inkubationsbedingungen weder für Genistein noch für die mitgeführte Positivkontrolle Etoposid eine Erhöhung der Apoptoserate festgestellt werden. Da auch die Positivkontrolle zu keiner Erhöhung der Apoptoserate führte, könnten möglicherweise mit diesem Assay apoptotische Zellen in dieser Zelllinie nicht messbar sein. Deshalb wurde als weiteres Testsystem der kommerziell erhältliche Cell Death Detection ELISA^{PLUS} (Roche) gewählt der die photometrische Bestimmung von Mono- und Oligonukleosomen, die im Zuge der Apoptoseinduktion entstehen, erlaubt. Hierbei konnte unter gleichen Inkubationsbedingungen in denen im Comet-Assay DNA-Strangbrüche sichtbar waren auch für Genistein und 3'-OH-Genistein eine Erhöhung der Apoptoserate festgestellt werden. Ebenfalls schien hier der 3'-OH-Metabolit zu einer potenteren Induktion von Apoptose zu führen, die sich jedoch aufgrund von Schwankungen zwischen den einzelnen Messungen als nicht signifikant erwies. Im Gegensatz dazu führte 6-OH-Genistein wie erwartet zu keiner Erhöhung der Apoptoserate im Vergleich zur Negativkontrolle. In welchem Anteil apoptotische Zellen im Comet-Assay detektiert werden ist jedoch noch unklar. Einige Studien liefern Hinweise, dass DNA-Fragmentierungen die während der Apoptose auftreten zu falsch-positiven Ergebnissen im Comet-Assay führen [Choucroun et al., 2001; Florent et al., 1999; Godard et al., 1999]. Hingegen konnte Roser *et al.* in HT-29 Zellen keine DNA-Strangbrüche im Comet-Assay, nach Behandlung der Zellen mit dem apoptoseinduzierenden Agens Staurosporin, detektieren [Roser et al., 2001]. Trotzdem kann die Detektion von möglichen apoptotischen Zellen im Comet-Assay nicht ausgeschlossen werden und sollte bei der Interpretation des genotoxischen Potentials der Testsubstanzen berücksichtigt werden.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass das toxische Potential sowie das biologische Wirkprofil von Genistein durch den oxidativen Metabolismus verändert wird. So scheint je nach Stellung der zusätzlichen Hydroxylgruppe die Wirkung von Genistein verstärkt oder vermindert zu werden. Tabelle 6 gibt einen Überblick über die erhaltenen Ergebnisse dieser Arbeit.

Tabelle 6: Tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse zur Untersuchung des Einfluss des oxidativen Metabolismus von Genistein auf die Toxizität und Apoptoseinduktion in humanen Kolonkarzinomzellen (HT-29) [h = Inkubationsdauer; ≥ = Effekte sichtbar ab; n.b. = nicht bestimmt; --- = keine Wirkung nachgewiesen; ↓ = schwächere Wirkung als Muttersubstanz; ↑ = stärkere Wirkung als Muttersubstanz]

	Methoden/Parameter	h	GEN	3'-OH-GEN	6-OH-GEN
Zytotoxizität		1	---	---	---
	LDH-Assay/ Membranintegrität	24	---	---	---
		1	---	---	---
	WST-1 Assay/ mitochondriale Aktivität	24	≥200 µM	≥200 µM ↑	---
DNA-Schädigung	Western-Blot/(p-p53)	1	≥200 µM	≥100 µM ↑	≥250 µM
Zellzyklus	Durchflusszytometrie/ G₂/M-Arrest	24	---	n.b.	n.b.
		48	---	n.b.	n.b.
		72	---	---	n.b.
Apoptoseinduktion	Guava Nexin Assay/Apoptoserate	24	---	n.b.	n.b.
		48	---	n.b.	n.b.
		72	---	n.b.	n.b.
	Cell Death Detection ELISA^{PLUS}/Apoptoserate	24	≥200 µM	~100/200 µM ↑	---

Da Effekte erst im hohen Konzentrationsbereich sichtbar waren, stellt sich hierbei die Frage nach der Übertragbarkeit und Relevanz *in vivo*. Während die Isoflavonaufnahme durch westliche Ernährungsweise relativ gering ist (<1mg/d), kann es jedoch in verschiedenen Personengruppen zu einer erhöhten Aufnahme an Isoflavonen kommen. Besonders Ungeborene könnten hohen Konzentrationen ausgesetzt sein, da Isoflavone in der Lage sind die Plazentaschranke zu überwinden und sich dadurch möglicherweise im kindlichen Organismus anreichern können [Todaka et al., 2005]. Hierzu gibt es darüber hinaus auch Hinweise auf einen möglichen Zusammenhang zwischen einer isoflavonreichen Ernährung während der Schwangerschaft und der Entwicklung von sekundärer und möglicherweise akuter Leukämie im Kindesalter. Diskutiert wird hierbei eine Beteiligung von Genistein, welches *in vitro* als Topoisomerase II-Gift wirkt und somit möglicherweise zu einer Chromosomen-Translokation am MLL-Gen führt [Hengstler et al., 2002]. Eine weitere Risikogruppe bei der mit einer hohen Aufnahme an Isoflavonen zu rechnen ist, sind Neugeborene die mit Formulierprodukten auf Sojabasis gefüttert werden. Hierbei beträgt die tägliche Aufnahme an Isoflavonen bis zu 4-8 mg pro Kilogramm Körpergewicht und liegt somit um ein Vielfaches höher als bei Erwachsenen, die sich mit

traditionellen Sojaprodukten ernähren [Setchell et al., 1997]. Ebenso zu berücksichtigen ist, dass die erreichten Isoflavonkonzentrationen im Plasma um 13 000 – 20 000 mal höher sein können als die Konzentration an endogenen 17 β -Estradiol im Säugling [Setchell et al., 1997]. Da bis dato noch nicht abschließend geklärt ist, wie sich eine erhöhte Aufnahme an Isoflavonen bei Säuglingen auswirkt, empfiehlt das BfR die Verwendung von Formulaprodukten auf Sojabasis nur bei entsprechender Indikation, wie z.B. im Falle eines angeborenen Laktasemangels oder Galaktosämie [BfR, 2007]. Auch Personen die Supplemente auf Sojabasis einnehmen, könnten sehr hohen Konzentrationen an Isoflavonen ausgesetzt sein. Hierbei ist die tägliche Aufnahme an Isoflavonen jedoch nur schwer abzuschätzen, da die Zusammensetzung der Supplemente und somit die Gehalte an Isoflavonen stark schwanken können. Laut Studien ist hier eine Aufnahme von bis zu 200 mg Isoflavonen pro Tag möglich, wobei bei Überdosierung auch mit einer höheren Aufnahme zu rechnen ist [Nurmi et al., 2002; Stürtz et al., 2008]. Somit könnte der Kolon nach Einnahme von hochdosierten Isoflavonsupplementen Boluskonzentrationen ausgesetzt sein. Darüber hinaus kommen einige Studien zu dem Schluss, dass eine Akkumulation von Isoflavonen im intestinalen Gewebe nicht auszuschließen ist [Andlauer et al., 2000; Setchell et al., 2001; Sfakianos et al., 1997].

Wie hoch jedoch die erreichten Plasma- und Gewebkonzentrationen an oxidativen Metaboliten sind, ist bisher noch unklar. Im Urin betrug die Konzentration der oxidativen Metabolite nach sojareicher Kost etwa 10 % der Gesamtisoflavonkonzentration [Kulling et al., 2001]. Somit scheint es unwahrscheinlich, dass Konzentrationen an oxidativen Metaboliten, in der *in vitro* Effekte sichtbar waren, auch *in vivo* erreicht werden. Die Arbeit liefert einen ersten Hinweis, dass die Bioaktivität von Genistein durch den Metabolismus verändert wird. Es bedarf jedoch weiterer Untersuchungen, um diesen Hinweis zu bestätigen und eine spätere Risikobewertung unter Berücksichtigung der im Organismus gebildeten Metabolite zu ermöglichen.

9 Zusammenfassung

Eine hohe Aufnahme an Isoflavonen wird aufgrund epidemiologischer Studien mit zahlreichen gesundheitsfördernden und chemopräventiven Wirkungen in Verbindung gebracht [Brzezinski und Debi, 1999; Wu et al., 2008; Yan und Spitznagel, 2009; Yan et al., 2010]. Dies hat dazu geführt, dass isoflavonreiche NEM als „natürliche“ und „risikofreie“ Wirkmittel vermarktet werden, wobei diese Isoflavonaufnahme, die über die Ernährung erreichte Aufnahme um ein Vielfaches übersteigen kann [BfR, 2007]. Neben potentiell positiven Wirkungen konnte für das Isoflavon Genistein in hohen Konzentrationen auch genotoxisches Potential *in vitro* beobachtet werden [Kulling et al., 1999; Salti et al., 2000]. Dies wirft Fragen nach der Unbedenklichkeit einer Einnahme von hochdosierten Isoflavon-Supplementen auf. Auch über die potentiellen Wirkungen der im Organismus gebildeten Metabolite ist bisher noch wenig bekannt [BfR, 2007].

Im Fokus dieser Arbeit stand die Frage, ob die Bioaktivität von Genistein durch den oxidativen Metabolismus verändert wird. Die im Zuge des Phase I-Stoffwechsels entstehenden Metabolite 3'-OH-Genistein und 6-OH-Genistein unterscheiden sich nur durch die Stellung einer zusätzlichen Hydroxylgruppe und konnten bereits im Urin nach sojareicher Kost detektiert werden [Kulling et al., 2001]. Im Rahmen der Dissertation von Anika Schröter wurden Genistein und die oxidativen Metabolite hinsichtlich ihres genotoxischen Potentials im Comet-Assay untersucht. Hierbei zeigten die Testsubstanzen unterschiedliches Potential DNA-Strangbrüche zu induzieren. So konnte nach 24-stündiger Inkubation für 3'-OH-Genistein stärkere DNA-strangbrechende Wirkungen als für die Muttersubstanz bei gleichen Konzentrationen festgestellt werden, wohingegen nach Inkubation mit 6-OH-Genistein keine signifikante Erhöhung der DNA-Strangbruchrate zu beobachten war.

Aufgrund dieser Beobachtung wurden die Testsubstanzen hinsichtlich Zytotoxizität, DNA-Schädigung, Zellzyklus sowie Apoptoseinduktion untersucht, um Unterschiede im toxischen Potential der Testsubstanzen zu erfassen und um mögliche sekundäre Effekte, die zu einer Erhöhung der DNA-Strangbruchrate im Comet-Assay beitragen können, zu ermitteln. Hierbei wurden alle Versuche in der Kolonkarzinomzelllinie HT-29 unter Zusatz von Katalase (100 U/ml) durchgeführt.

Um zytotoxische Eigenschaften der Testsubstanzen zu erfassen, wurden als Testsysteme der LDH-Assay und WST-1 gewählt, um Einflüsse auf die Membranintegrität und Aktivität mitochondrialer Dehydrogenasen zu erfassen. Nach einstündiger Inkubationszeit konnte

für keine der Testsubstanzen zytotoxische Effekte festgestellt werden. Jedoch zeigte sich nach 24-stündiger Inkubationszeit mit Genistein und 3'-OH-Genistein in hohen Konzentrationen ($\geq 200 \mu\text{M}$) eine Verringerung der mitochondrialen Dehydrogenasenaktivität. Hierbei führte 3'-OH-Genistein zu einer stärkeren Abnahme der Aktivität mitochondrialer Dehydrogenasen als die Muttersubstanz bei gleichen Konzentrationen. Hingegen konnten nach Inkubation mit 6-OH-Genistein keine zytotoxischen Effekte festgestellt werden. Um mögliche DNA-schädigende Wirkungen der Testsubstanzen zu erfassen, wurde dessen Einfluss auf den Phosphorylierungsstatus des Proteins p53 mittels Western Blot untersucht. Das Tumorsuppressorprotein p53 wird bei DNA-Strangbrüchen rasch phosphoryliert, wobei der Phosphorylierungsgrad des Proteins ein Maß für die DNA-Schädigung durch die Testsubstanzen darstellt. Hierbei konnte bereits nach einstündiger Inkubationszeit für Genistein sowie für beide oxidativen Metabolite eine DNA-schädigende Wirkung festgestellt werden. Auch hier zeigte 3'-OH-Genistein stärkere und 6-OH-Genistein schwächere DNA-schädigende Wirkungen als die Muttersubstanz. Jedoch konnte trotz beobachteter Aktivierung des Tumorsuppressors p53 kein Zellzyklusarrest nach Exposition der Zellen mit Genistein zu unterschiedlichen Inkubationszeiten festgestellt werden. Da sich hinsichtlich der Ergebnisse im Comet-Assay die Frage stellt, ob die Erhöhung der DNA-Strangbruchrate zum Teil auch auf eine mögliche apoptotische Fragmentierung zurückzuführen ist, wurden die Testsubstanzen auf ihre apoptoseinduzierende Wirkung untersucht. Hierbei zeigte sich nach Inkubation mit Genistein und 3'-OH-Genistein eine Erhöhung der Apoptoserate. Ebenso schien 3'-OH-Genistein zu einer potenteren Apoptoseinduktion zu führen als die Muttersubstanz bei gleichen Konzentrationen. Nach Inkubation mit 6-OH-Genistein zeigte sich im Gegensatz dazu keine Erhöhung des Anteils an apoptotischen Zellen.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass das toxische Potential und das biologische Wirkprofil von Genistein durch den oxidativen Metabolismus verändert wird. Je nach Stellung der zusätzlichen Hydroxylgruppe wird somit die Wirkung von Genistein verstärkt oder verringert.

10 Summary

Epidemiological studies have associated a high isoflavone-intake with a variety of beneficial effects on human health [Brzezinski und Debi, 1999; Wu et al., 2008; Yan und Spitznagel, 2009; Yan et al., 2010]. Due to these observations the popularity of isoflavon-rich supplements is increasing. They are claimed as “natural” and “risk-free” products, whereas the daily intake of isoflavones may exceed by far those from normal diet [BfR, 2007]. Beside of potential beneficial effects the isoflavone genistein has been reported to exhibit genotoxic potential *in vitro* [Kulling et al., 1999; Salti et al., 2000]. These results have raised concern about possible adverse effects due to extensive isoflavone intake. Additionally the potential effects of the metabolites have not been fully clarified.

In this work the influence of oxidative metabolism on the bioactivity profile of the isoflavone genistein has been investigated. During phase I-metabolism genistein is metabolized by cytochrome P450-dependent monooxygenases to 3'-OH-genistein and 6-OH-genistein, which differ in the position of an additional hydroxyl group and were already detected in urine following soy consumption [Kulling et al., 2001]. In the dissertation of Anika Schröter genistein and the oxidative metabolites were investigated with respect to the genotoxic potential using the comet assay. The test substances showed different DNA strand-breaking potential. 3'-OH-genistein significantly exceeded the strand-breaking potential of genistein, whereas 6-OH-genistein showed no significant genotoxic effects. Due to this observation the influence of the test substances on cytotoxicity, DNA-integrity, cell cycle distribution and induction of apoptosis was determined to estimate differences in the toxicological potential and to investigate possible secondary events which might contribute to an increase of DNA-damage in the comet assay. All experiments were conducted in the human colon carcinoma cell line HT-29 in the presence of catalase (100 U/ml).

To determine cytotoxic effects WST-1 and LDH-assay were performed to investigate the influence of the test substances on membrane integrity and mitochondrial activity. No significant cytotoxic effects were detectable after one hour of incubation. However after 24 hours of incubation a decrease in mitochondrial activity of the cells were observed for genistein and 3'-OH-genistein in high concentrations ($\geq 200 \mu\text{M}$). In addition 3'-OH-genistein significantly exceeded the cytotoxic potential of the parent compound, whereas 6-OH-genistein showed no effects.

To investigate potential DNA-damaging effects the influence of genistein and the oxidative metabolites on the phosphorylation status of p53 protein was determined using Western blot. Already after one hour of incubation with the test substances phosphorylation of p53 found to be increased. 3'-OH-genistein showed stronger and 6-OH-genistein weaker DNA-damaging potential than the parent compound. Although activation of the tumor suppressor p53 was observed, no cell cycle arrest was detectable after incubation with genistein. Because possible apoptotic events could result in the generation of false-positive results in the comet assay, the test substances were tested with respect to their potential to induce apoptosis. After incubation with genistein und 3'-OH-genistein an increase of apoptotic cells was detectable, whereby the 3'-OH-metabolite seems to have more potential to induce apoptosis than the parent compound. On the contrary, after incubation with 6-OH-genistein no increase of apoptotic cells was detectable.

Taken together, the results indicate that oxidative metabolism leads to a modulation in the toxic potential and biological activity of genistein. Depending on the position of the additional hydroxyl group the potential of the parent compound is either enhanced or decreased.

11 Literaturverzeichnis

Adlercreutz H, Fotsis T, Kurzer MS, Wahala K, Makela T, Hase T. Isotope dilution gas chromatographic-mass spectrometric method for the determination of unconjugated lignans and isoflavonoids in human feces, with preliminary results in omnivorous and vegetarian women. *Analytical biochemistry* 1995; 225 (1): 101-108.

Adlercreutz H, van der Wildt J, Kinzel J, Attalla H, Wahala K, Makela T, Hase T, Fotsis T. Lignan and isoflavonoid conjugates in human urine. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 1995; 52 (1): 97-103.

Agullo G, Gamet-Payraastre L, Fernandez Y, Anciaux N, Demigne C, Remesy C. Comparative effects of flavonoids on the growth, viability and metabolism of a colonic adenocarcinoma cell line (HT29 cells). *Cancer letters* 1996; 105 (1): 61-70.

Akiyama T, Ishida J, Nakagawa S, Ogawara H, Watanabe S, Itoh N, Shibuya M, Fukami Y. Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. *The Journal of biological chemistry* 1987; 262 (12): 5592-5595.

Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson J. *Molecular Biology of the Cell*. Garland Science, New York, 1994.

Alberts B, Johnson AD, Lewis J, Raff M, Robert K, Walter P. *Molekularbiologie der Zelle*. Wiley-VCH Verlag, Weinberg, 2004.

Alenzi FQ, Lotfy M, Wyse R. Swords of cell death: caspase activation and regulation. *Asian Pacific journal of cancer prevention* 2010; 11 (2): 271-280.

Allred CD, Allred KF, Ju YH, Goeppinger TS, Doerge DR, Helferich WG. Soy processing influences growth of estrogen-dependent breast cancer tumors. *Carcinogenesis* 2004; 25 (9): 1649-1657.

Amundson SA, Myers TG, Fornace AJ, Jr. Roles for p53 in growth arrest and apoptosis: putting on the brakes after genotoxic stress. *Oncogene* 1998; 17 (25): 3287-3299.

Andlauer W, Kolb J, Furst P. Absorption and metabolism of genistin in the isolated rat small intestine. *FEBS letters* 2000; 475 (2): 127-130.

Bai L, Zhu A. p53: Structure, Function and Therapeutic Applications. *Journal of Cancer Molecules* 2006; 2 (4): 141-153.

Barnes S. The biochemistry, chemistry and physiology of the isoflavones in soybeans and their food products. *Lymphatic research and biology* 2010; 8 (1): 89-98.

Bellion P, Olk M, Will F, Dietrich H, Baum M, Eisenbrand G, Janzowski C. Formation of hydrogen peroxide in cell culture media by apple polyphenols and its effect on antioxidant biomarkers in the colon cell line HT-29. *Molecular nutrition & food research* 2009; 53 (10): 1226-1236.

Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR): Isolierte Isoflavone sind nicht ohne Risiko. Internet:
[http://www.bfr.bund.de/cm/343/isolierte isoflavone sind nicht ohne risiko.pdf](http://www.bfr.bund.de/cm/343/isolierte_isoflavone_sind_nicht_ohne_risiko.pdf) (Stand: 10.10.2013)

Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR): Säuglingsnahrung aus Sojaweiß ist kein Ersatz für Kuhmilchprodukte. Internet:
[http://www.bfr.bund.de/cm/343/saeuglingsnahrung aus sojaeiweiss ist kein ersatz fuer kuhmilchprodukte.pdf](http://www.bfr.bund.de/cm/343/saeuglingsnahrung_aus_sojaeiweiss_ist_kein_ersatz_fue_r_kuhmilchprodukte.pdf) (Stand: 27.11.2013)

Bhagwat S, Haytowitz DB, Holden JM. USDA Database for the Isoflavone Content of Selected Foods. Internet:
<http://www.ars.usda.gov/SP2UserFiles/Place/12354500/Data/isoflav/Isoflav R2.pdf> (Stand: 27.11.2013).

Blajeski AL, Phan VA, Kottke TJ, Kaufmann SH. G(1) and G(2) cell-cycle arrest following microtubule depolymerization in human breast cancer cells. *The Journal of clinical investigation* 2002; 110 (1): 91-99.

Boatright KM, Salvesen GS. Mechanisms of caspase activation. *Current opinion in cell biology* 2003; 15 (6): 725-731.

Boos G, Stopper H. Genotoxicity of several clinically used topoisomerase II inhibitors. *Toxicology letters* 2000; 116 (1-2): 7-16.

Boxberger H. Leitfaden für die Zell- und Gewebekultur. WILEY-VCH Verlag, Weinheim, 2007.

Brooks CL, Gu W. Ubiquitination, phosphorylation and acetylation: the molecular basis for p53 regulation. *Current opinion in cell biology* 2003; 15 (2): 164-171.

Brooks JD, Thompson LU. Mammalian lignans and genistein decrease the activities of aromatase and 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase in MCF-7 cells. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 2005; 94 (5): 461-467.

Brzezinski A, Debi A. Phytoestrogens: the "natural" selective estrogen receptor modulators? *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology* 1999; 85 (1): 47-51.

Cappelletti V, Fioravanti L, Miodini P, Di Fronzo G. Genistein blocks breast cancer cells in the G(2)M phase of the cell cycle. *Journal of cellular biochemistry* 2000; 79 (4): 594-600.

Caspari T. How to activate p53. *Current biology* 2000; 10 (8): 315-317.

Chang HC, Churchwell MI, Delclos KB, Newbold RR, Doerge DR. Mass spectrometric determination of Genistein tissue distribution in diet-exposed Sprague-Dawley rats. *The Journal of nutrition* 2000; 130 (8): 1963-1970.

Chang KL, Kung ML, Chow NH, Su SJ. Genistein arrests hepatoma cells at G2/M phase: involvement of ATM activation and upregulation of p21waf1/cip1 and Wee1. *Biochemical pharmacology* 2004; 67 (4): 717-726.

Chen AC, Donovan SM. Genistein at a concentration present in soy infant formula inhibits Caco-2BBE cell proliferation by causing G2/M cell cycle arrest. *The Journal of nutrition* 2004; 134 (6): 1303-1308.

Chipuk JE, Bouchier-Hayes L, Green DR. Mitochondrial outer membrane permeabilization during apoptosis: the innocent bystander scenario. *Cell death and differentiation* 2006; 13 (8): 1396-1402.

Choi EJ, Lee BH. Evidence for genistein mediated cytotoxicity and apoptosis in rat brain. *Life sciences* 2004; 75 (4): 499-509.

Choi YH, Lee WH, Park KY, 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. *Japanese journal of cancer research* 2000; 91 (2): 164-173.

Choucroun P, Gillet D, Dorange G, Sawicki B, Dewitte JD. Comet assay and early apoptosis. *Mutation research* 2001; 478 (1-2): 89-96.

Clark D, Pazdernik N. *Biotechnologie: Grundlagen und Anwendungen*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 2009.

Coldham NG, Darby C, Hows M, King LJ, Zhang AQ, Sauer MJ. Comparative metabolism of genistin by human and rat gut microflora: detection and identification of the end-products of metabolism. *Xenobiotica; the fate of foreign compounds in biological systems* 2002; 32 (1): 45-62.

Coldham NG, Howells LC, Santi A, Montesissa C, Langlais C, King LJ, Macpherson DD, Sauer MJ. Biotransformation of genistein in the rat: elucidation of metabolite structure by product ion mass fragmentology. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 1999; 70 (4-6): 169-184.

Constantinou A, Mehta R, Runyan C, Rao K, Vaughan A, Moon R. Flavonoids as DNA topoisomerase antagonists and poisons: structure-activity relationships. *Journal of natural products* 1995; 58 (2): 217-225.

Constantinou AI, Kamath N, Murley JS. Genistein inactivates bcl-2, delays the G2/M phase of the cell cycle, and induces apoptosis of human breast adenocarcinoma MCF-7 cells. *European journal of cancer* 1998; 34 (12): 1927-1934.

Coward L, Barnes N, Setchel K, Barnes S. Genistein, Daidzein, and Their beta-Glycoside Conjugates: Antitumor Isoflavones in Soybean Foods from American and Asian Diets. *Journal of agricultural and food chemistry* 1993; 41 (11): 1961-1967.

Darzynkiewicz Z, Roederer M, Tanke H. *Cytometry, 4th Edition - New Developments*. Elsevier Inc. 2004.

Davis JN, Kucuk O, Sarkar FH. Genistein inhibits NF-kappa B activation in prostate cancer cells. *Nutrition and cancer* 1999; 35 (2): 167-174.

Day AJ, Canada FJ, Diaz JC, Kroon PA, McLauchlan R, Faulds CB, Plumb GW, Morgan MR, Williamson G. Dietary flavonoid and isoflavone glycosides are hydrolysed by the lactase site of lactase phlorizin hydrolase. *FEBS letters* 2000; 468 (2-3): 166-170.

Doerge DR, Chang HC, Churchwell MI, Holder CL. Analysis of soy isoflavone conjugation in vitro and in human blood using liquid chromatography-mass spectrometry. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 2000; 28 (3): 298-307.

Doerr H, Gerlich W. *Medizinische Virologie - Grundlagen, Diagnostik, Prävention und Therapie viraler Erkrankungen*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2002.

Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ): HT-29- Cell Culture Data. Internet: http://www.dsmz.de/de/kataloge/catalogue/culture/ACC-299.html?tx_dsmzresources_pi5 (Stand: 12.10.2013)

Earnshaw WC, Martins LM, Kaufmann SH. Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annual review of biochemistry* 1999; 68: 383-424.

Europäische Lebensmittelsicherheitsbehörde (EFSA): Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to soy isoflavones and maintenance of bone mineral density (ID 1655) and reduction of vasomotor symptoms associated with menopause (ID 1654, 1704, 2140, 3093, 3154, 3590) (further assessment) pursuant to Article 13 (1) of Regulation (EC) No 1924/2006. EFSA Journal 2012; 10 (8): 2847.

Eisenbrand G. Isoflavones as phytoestrogens in food supplements and dietary food for special medical purposes: Opinion of the Senate Commission on Food Safety (SKLM) of the German Research Foundation (DFG). Molecular Nutrition and Food Research 2007; 1305-1312.

Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. Toxicologic pathology 2007; 35 (4): 495-516.

Enoch T, Norbury C. Cellular responses to DNA damage: cell-cycle checkpoints, apoptosis and the roles of p53 and ATM. Trends in biochemical sciences 1995; 20 (10): 426-430.

Ernst B, Vögeli A. Moderne Pharmakokinetik. Wiley-VCH Verlag, Weinheim, 2010.

Esaki H, Kawakishi S, Morimitsu Y, Osawa T. New potent antioxidative o-dihydroxyisoflavones in fermented Japanese soybean products. Bioscience, biotechnology, and biochemistry 1999; 63 (9): 1637-1639.

Estler C, Schmidt H. Pharmakologie und Toxikologie: für Studium und Praxis. Schattauer Verlag, Stuttgart, 2007.

Fadok VA, Bratton DL, Frasch SC, Warner ML, Henson PM. The role of phosphatidylserine in recognition of apoptotic cells by phagocytes. Cell death and differentiation 1998; 5 (7): 551-562.

Fanti P, Monier-Faugere MC, Geng Z, Schmidt J, Morris PE, Cohen D, Malluche HH. The phytoestrogen genistein reduces bone loss in short-term ovariectomized rats. Osteoporosis international 1998; 8 (3): 274-281.

Faughnan MS, Hawdon A, Ah-Singh E, Brown J, Millward DJ, Cassidy A. Urinary isoflavone kinetics: the effect of age, gender, food matrix and chemical composition. The British journal of nutrition 2004; 91 (4): 567-574.

Florent M, Godard T, Ballet JJ, Gauduchon P, Sola B. Detection by the comet assay of apoptosis induced in lymphoid cell lines after growth factor deprivation. Cell biology and toxicology 1999; 15 (3): 185-192.

- Fortune JM, Osheroff N. Topoisomerase II as a target for anticancer drugs: when enzymes stop being nice. *Progress in nucleic acid research and molecular biology* 2000; 64: 221-253.
- Franke AA, Custer LJ, Tanaka Y. Isoflavones in human breast milk and other biological fluids. *The American journal of clinical nutrition* 1998; 68 (6): 1466-1473.
- Frankenfeld CL, Patterson RE, Horner NK, Neuhouser ML, Skor HE, Kalthorn TF, Howald WN, Lampe JW. Validation of a soy food-frequency questionnaire and evaluation of correlates of plasma isoflavone concentrations in postmenopausal women. *The American journal of clinical nutrition* 2003; 77 (3): 674-680.
- Frey H, Löscher W. *Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie*. Enke Verlag, Stuttgart 2010.
- Godard T, Deslandes E, Lebailly P, Vigreux C, Sichel F, Poul JM, Gauduchon P. Early detection of staurosporine-induced apoptosis by comet and annexin V assays. *Histochemistry and cell biology* 1999; 112 (2): 155-161.
- Gottifredi V, Shieh S, Taya Y, Prives C. p53 accumulates but is functionally impaired when DNA synthesis is blocked. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2001; 98 (3): 1036-1041.
- Guicciardi ME, Gores GJ. Life and death by death receptors. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2009; 23 (6): 1625-1637.
- Gustafsson JA. An update on estrogen receptors. *Seminars in perinatology* 2000; 24 (1): 66-69.
- Halliwell B. Oxidative stress in cell culture: an under-appreciated problem? *FEBS letters* 2003; 540 (1-3): 3-6.
- Han SI, Kim YS, Kim TH. Role of apoptotic and necrotic cell death under physiologic conditions. *BMB reports* 2008; 41 (1): 1-10.
- Hargreaves DF, Potten CS, Harding C, Shaw LE, Morton MS, Roberts SA, Howell A, Bundred NJ. Two-week dietary soy supplementation has an estrogenic effect on normal premenopausal breast. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 1999; 84 (11): 4017-4024.

Haupt S, Berger M, Goldberg Z, Haupt Y. Apoptosis - the p53 network. *Journal of cell science* 2003; 116 (20): 4077-4085.

Hedlund TE, Maroni PD, Ferucci PG, Dayton R, Barnes S, Jones K, Moore R, Ogden LG, Wahala K, Sackett HM, Gray KJ. Long-term dietary habits affect soy isoflavone metabolism and accumulation in prostatic fluid in caucasian men. *The Journal of nutrition* 2005; 135 (6): 1400-1406.

Hengstler JG, Heimerdinger CK, Schiffer IB, Gebhard S, Sagemüller J, Tanner B, Bolt HM, Oesch F. Dietary topoisomerase II-poisons: contribution of soy products to infant leukemia? *Experimental and Clinical Sciences* 2002; 1: 8-14.

Hermeking H, Lengauer C, Polyak K, He TC, Zhang L, Thiagalingam S, Kinzler KW, Vogelstein B. 14-3-3 sigma is a p53-regulated inhibitor of G2/M progression. *Molecular cell* 1997; 1 (1): 3-11.

Hermey G, Mahlke C, Schwake M, Sommer T. *Der Experimentator - Neurowissenschaften*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 2010.

Hiddemann W, Bartram C. *Die Onkologie*. Springer Medizin Verlag, Heidelberg, 2010.

Hong SJ, Kim SI, Kwon SM, Lee JR, Chung BC. Comparative study of concentration of isoflavones and lignans in plasma and prostatic tissues of normal control and benign prostatic hyperplasia. *Yonsei medical journal* 2002; 43 (2): 236-241.

Hsieh CY, Santell RC, Haslam SZ, Helferich WG. Estrogenic effects of genistein on the growth of estrogen receptor-positive human breast cancer (MCF-7) cells in vitro and in vivo. *Cancer research* 1998; 58 (17): 3833-3838.

Hu M, Krausz K, Chen J, Ge X, Li J, Gelboin HL, Gonzalez FJ. Identification of CYP1A2 as the main isoform for the phase I hydroxylated metabolism of genistein and a prodrug converting enzyme of methylated isoflavones. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 2003; 31 (7): 924-931.

Hubbard SR, Till JH. Protein tyrosine kinase structure and function. *Annual review of biochemistry* 2000; 69: 373-398.

Hwang CS, Kwak HS, Lim HJ, Lee SH, Kang YS, Choe TB, Hur HG, Han KO. Isoflavone metabolites and their in vitro dual functions: they can act as an estrogenic agonist or antagonist depending on the estrogen concentration. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 2006; 101 (4-5): 246-253.

Ismail IA, Kang KS, Lee HA, Kim JW, Sohn YK. Genistein-induced neuronal apoptosis and G2/M cell cycle arrest is associated with MDC1 up-regulation and PLK1 down-regulation. *European journal of pharmacology* 2007; 575 (1-3): 12-20.

Jacobs A, Wegewitz U, Sommerfeld C, Grossklaus R, Lampen A. Efficacy of isoflavones in relieving vasomotor menopausal symptoms - A systematic review. *Molecular nutrition & food research* 2009; 53 (9): 1084-1097.

Johnson DG, Walker CL. Cyclins and cell cycle checkpoints. *Annual review of pharmacology and toxicology* 1999; 39: 295-312.

Kanduc D, Mittelman A, Serpico R, Sinigaglia E, Sinha AA, Natale C, Santacroce R, Di Corcia MG, Lucchese A, Dini L, Pani P, Santacroce S, Simone S, Bucci R, Farber E. Cell death: apoptosis versus necrosis (review). *International journal of oncology* 2002; 21 (1): 165-170.

Kantari C, Walczak H. Caspase-8 and bid: caught in the act between death receptors and mitochondria. *Biochimica et biophysica acta* 2011; 1813 (4): 558-563.

Karlson P, Doenecke D. *Karlson Biochemie und Pathobiochemie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2005.

Karp G. *Molekulare Zellbiologie*. Springer Verlag, Heidelberg, 2005.

Kelly GE, Nelson C, Waring MA, Joannou GE, Reeder AY. Metabolites of dietary (soya) isoflavones in human urine. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 1993; 223 (1-2): 9-22.

Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British journal of cancer* 1972; 26 (4): 239-257.

Kim EJ, Shin HK, Park JH. 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. *Journal of medicinal food* 2005; 8 (4): 431-438.

Klein CB, King AA. Genistein genotoxicity: critical considerations of in vitro exposure dose. *Toxicology and applied pharmacology* 2007; 224 (1): 1-11.

Klus K, Barz W. Formation of polyhydroxylated isoflavones from the isoflavones genistein and biochanin a by bacteria isolated from tempe. *Phytochemistry* 1998; 47 (6): 1045-1048.

Kobayashi T, Nakata T, Kuzumaki T. Effect of flavonoids on cell cycle progression in prostate cancer cells. *Cancer letters* 2002; 176 (1): 17-23.

Krebs EE, Ensrud KE, MacDonald R, Wilt TJ. Phytoestrogens for treatment of menopausal symptoms: a systematic review. *Obstetrics and gynecology* 2004; 104 (4): 824-836.

Kuiper GG, Carlsson B, Grandien K, Enmark E, Haggblad J, Nilsson S, Gustafsson JA. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology* 1997; 138 (3): 863-870.

Kuiper GG, Lemmen JG, Carlsson B, Corton JC, Safe SH, van der Saag PT, van der Burg B, Gustafsson JA. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinology* 1998; 139 (10): 4252-4263.

Kulling SE, Honig DM, Metzler M. Oxidative metabolism of the soy isoflavones daidzein and genistein in humans in vitro and in vivo. *Journal of agricultural and food chemistry* 2001; 49 (6): 3024-3033.

Kulling SE, Honig DM, Simat TJ, Metzler M. Oxidative in vitro metabolism of the soy phytoestrogens daidzein and genistein. *Journal of agricultural and food chemistry* 2000; 48 (10): 4963-4972.

Kulling SE, Metzler M. Induction of micronuclei, DNA strand breaks and HPRT mutations in cultured Chinese hamster V79 cells by the phytoestrogen coumestrol. *Food and chemical toxicology* 1997; 35 (6): 605-613.

Kulling SE, Rosenberg B, Jacobs E, Metzler M. The phytoestrogens coumestrol and genistein induce structural chromosomal aberrations in cultured human peripheral blood lymphocytes. *Archives of toxicology* 1999; 73 (1): 50-54.

Kulling SE, Watzl B. Phytoöstrogene. *Ernährungs-Umschau* 2003; 50 (6): 234-239.

Kum Kum K, Stephen PJ. DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nature genetics* 2001; 27 (3): 247-254.

Kuzumaki T, Kobayashi T, Ishikawa K. Genistein induces p21(Cip1/WAF1) expression and blocks the G1 to S phase transition in mouse fibroblast and melanoma cells. *Biochemical and biophysical research communications* 1998; 251 (1): 291-295.

Laboroptik GmbH (LO): Zählkammer Neubauer - Improved. Internet: <http://www.zaehlkammer.de/deutsch/neubauer.improved.html> (Stand: 02.12.2013)

Lapidot T, Walker MD, Kanner J. Can apple antioxidants inhibit tumor cell proliferation? Generation of H₂O₂ during interaction of phenolic compounds with cell culture media. *Journal of agricultural and food chemistry* 2002; 50 (11): 3156-3160.

Lawen A. Apoptosis—an introduction. *BioEssays* 2003; 25 (9): 888-896.

Leibniz Institute for Age Research - Fritz Lipmann Institute (FLI): Bioinformatics. Internet: [http://www.imb-jena.de/~rake/Bioinformatics WEB/proteins_purification.html](http://www.imb-jena.de/~rake/Bioinformatics_WEB/proteins_purification.html) (Stand:02.12.2013)

Lian F, Bhuiyan M, Li YW, Wall N, Kraut M, Sarkar FH. Genistein-induced G2-M arrest, p21WAF1 upregulation, and apoptosis in a non-small-cell lung cancer cell line. *Nutrition and cancer* 1998; 31 (3): 184-191.

Lindl T, Gstraunthaler G. Zell- und Gewebekultur. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 2008.

Liu J, Ho SC, Su YX, Chen WQ, Zhang CX, Chen YM. Effect of long-term intervention of soy isoflavones on bone mineral density in women: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Bone* 2009; 44 (5): 948-953.

Löffler G. Basiswissen Biochemie mit Pathobiochemie. Springer Medizin Verlag, Heidelberg, 2008.

Lohninger H: Grundlagen der Statistik. Internet: http://www.statistics4u.info/fundstat_germ/ (Stand: 12.10.2013)

Long LH, Hoi A, Halliwell B. Instability of, and generation of hydrogen peroxide by, phenolic compounds in cell culture media. *Archives of biochemistry and biophysics* 2010; 501 (1): 162-169.

Luttmann W, Bratke K, Küpper M, Myrtek D. Der Experimentator - Immunologie. Elsevier Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 2006.

Manach C, Williamson G, Morand C, Scalbert A, Remesy C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *The American journal of clinical nutrition* 2005; 81 (1): 230-242.

Markovits J, Linassier C, Fosse P, Couprie J, Pierre J, Jacquemin-Sablon A, Saucier JM, Le Pecq JB, Larsen AK. Inhibitory effects of the tyrosine kinase inhibitor genistein on mammalian DNA topoisomerase II. *Cancer research* 1989; 49 (18): 5111-5117.

Matsukawa Y, Marui N, Sakai T, Satomi Y, Yoshida M, Matsumoto K, Nishino H, Aoike A. Genistein arrests cell cycle progression at G2-M. *Cancer research* 1993; 53 (6): 1328-1331.

Matsumura K, Tanaka T, Kawashima H, Nakatani T. Involvement of the estrogen receptor beta in genistein-induced expression of p21(waf1/cip1) in PC-3 prostate cancer cells. *Anticancer research* 2008; 28 (2): 709-714.

Messina M, Nagata C, Wu AH. Estimated Asian adult soy protein and isoflavone intakes. *Nutrition and cancer* 2006; 55 (1): 1-12.

Michael D, Oren M. The p53-Mdm2 module and the ubiquitin system. *Seminars in cancer biology* 2003; 13 (1): 49-58.

Miller C, Mohandas T, Wolf D, Prokocimer M, Rotter V, Koeffler HP. Human p53 gene localized to short arm of chromosome 17. *Nature* 1986; 319 (6056): 783-784.

Millipore: Guava Cell Cycle Reagent. Guava Technologies Inc., Hayward 2005. Internet: [http://www.millipore.com/userguides.nsf/a73664f9f981af8c852569b9005b4eee/d747725a81fc0346852575c8004b8012/\\$FILE/MK46000790.pdf](http://www.millipore.com/userguides.nsf/a73664f9f981af8c852569b9005b4eee/d747725a81fc0346852575c8004b8012/$FILE/MK46000790.pdf) (Stand: 09.07.2013)

Millipore: Guava Nexin Reagent. Guava Technologies Inc., Hayward 2008. Internet: [http://www.millipore.com/userguides.nsf/a73664f9f981af8c852569b9005b4eee/802cf1a3edae850f852575c80047161a/\\$FILE/MK46002620.pdf](http://www.millipore.com/userguides.nsf/a73664f9f981af8c852569b9005b4eee/802cf1a3edae850f852575c80047161a/$FILE/MK46002620.pdf) (Stand:09.07.2013)

Millipore: Guava ViaCount Reagent. Guava Technologies Inc., Hayward 2006. Internet: [http://www.millipore.com/userguides.nsf/a73664f9f981af8c852569b9005b4eee/7d84d163f28de86a852575c8004d5030/\\$file/mk46000010.pdf](http://www.millipore.com/userguides.nsf/a73664f9f981af8c852569b9005b4eee/7d84d163f28de86a852575c8004d5030/$file/mk46000010.pdf) (Stand:07.07.2013)

Miltyk W, Craciunescu CN, Fischer L, Jeffcoat RA, Koch MA, Lopaczynski W, Mahoney C, Jeffcoat RA, Crowell J, Paglieri J, Zeisel SH. Lack of significant genotoxicity of purified soy isoflavones (genistein, daidzein, and glycitein) in 20 patients with prostate cancer. *The American journal of clinical nutrition* 2003; 77 (4): 875-882.

Mira L, Fernandez MT, Santos M, Rocha R, Florencio MH, Jennings KR. Interactions of flavonoids with iron and copper ions: a mechanism for their antioxidant activity. *Free radical research* 2002; 36 (11): 1199-1208.

Misra RR, Hursting SD, Perkins SN, Sathyamoorthy N, Mirsalis JC, Riccio ES, Crowell JA. Genotoxicity and carcinogenicity studies of soy isoflavones. *International journal of toxicology* 2002; 21 (4): 277-285.

- Mitchell JH, Duthie SJ, Collins AR. Effects of Phytoestrogens on Growth and DNA Integrity in Human Prostate Tumor Cell Lines: PC-3 and LNCaP. *Nutrition and cancer* 2000; 38 (2): 223-228.
- Mitchell JH, Gardner PT, McPhail DB, Morrice PC, Collins AR, Duthie GG. Antioxidant efficacy of phytoestrogens in chemical and biological model systems. *Archives of biochemistry and biophysics* 1998; 360 (1): 142-148.
- Moll UM, Petrenko O. The MDM2-p53 interaction. *Molecular cancer research : MCR* 2003; 1 (14): 1001-1008.
- Morito K, Hirose T, Kinjo J, Hirakawa T, Okawa M, Nohara T, Ogawa S, Inoue S, Muramatsu M, Masamune Y. Interaction of phytoestrogens with estrogen receptors alpha and beta. *Biological & pharmaceutical bulletin* 2001; 24 (4): 351-356.
- Mortensen A, Kulling SE, Schwartz H, Rowland I, Ruefer CE, Rimbach G, Cassidy A, Magee P, Millar J, Hall WL, Kramer Birkved F, Sorensen IK, Sontag G. Analytical and compositional aspects of isoflavones in food and their biological effects. *Molecular nutrition & food research* 2009; 53: 266-309.
- Morton MS, Arisaka O, Miyake N, Morgan LD, Evans BA. Phytoestrogen concentrations in serum from Japanese men and women over forty years of age. *The Journal of nutrition* 2002; 132 (10): 3168-3171.
- Morton MS, Chan PS, Cheng C, Blacklock N, Matos-Ferreira A, Abranches-Monteiro L, Correia R, Lloyd S, Griffiths K. Lignans and isoflavonoids in plasma and prostatic fluid in men: samples from Portugal, Hong Kong, and the United Kingdom. *The Prostate* 1997; 32 (2): 122-128.
- Munro IC, Harwood M, Hlywka JJ, Stephen AM, Doull J, Flamm WG, Adlercreutz H. Soy isoflavones: a safety review. *Nutrition reviews* 2003; 61 (1): 1-33.
- Nakano H, Ogura K, Takahashi E, Harada T, Nishiyama T, Muro K, Hiratsuka A, Kadota S, Watabe T. Regioselective monosulfation and disulfation of the phytoestrogens daidzein and genistein by human liver sulfotransferases. *Drug metabolism and pharmacokinetics* 2004; 19 (3): 216-226.
- Newbold RR, Banks EP, Bullock B, Jefferson WN. Uterine adenocarcinoma in mice treated neonatally with genistein. *Cancer research* 2001; 61 (11): 4325-4328.

Nicholson DW, Thornberry NA. Apoptosis. Life and death decisions. *Science* 2003; 299 (5604): 214-215.

Nurmi T, Mazur W, Heinonen S, Kokkonen J, Adlercreutz H. Isoflavone content of the soy based supplements. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* 2002; 28 (1): 1-11.

Ola MS, Nawaz M, Ahsan H. Role of Bcl-2 family proteins and caspases in the regulation of apoptosis. *Molecular and cellular biochemistry* 2011; 351 (1-2): 41-58.

Onozawa M, Fukuda K, Ohtani M, Akaza H, Sugimura T, Wakabayashi K. Effects of soybean isoflavones on cell growth and apoptosis of the human prostatic cancer cell line LNCaP. *Japanese journal of clinical oncology* 1998; 28 (6): 360-363.

Oren M. Regulation of the p53 tumor suppressor protein. *The Journal of biological chemistry* 1999; 274 (51): 36031-36034.

Ouyang G, Yao L, Ruan K, Song G, Mao Y, Bao S. Genistein induces G2/M cell cycle arrest and apoptosis of human ovarian cancer cells via activation of DNA damage checkpoint pathways. *Cell biology international* 2009; 33 (12): 1237-1244.

Park SS, Kim YN, Jeon YK, Kim YA, Kim JE, Kim H, Kim CW. Genistein-induced apoptosis via Akt signaling pathway in anaplastic large-cell lymphoma. *Cancer chemotherapy and pharmacology* 2005; 56 (3): 271-278.

Pavletich NP. Mechanisms of cyclin-dependent kinase regulation: structures of Cdks, their cyclin activators, and Cip and INK4 inhibitors. *Journal of molecular biology* 1999; 287 (5): 821-828.

Pietenpol JA, Stewart ZA. Cell cycle checkpoint signaling: cell cycle arrest versus apoptosis. *Toxicology* 2002; 181-182: 475-481.

Pool-Zobel BL, Adlercreutz H, Gleis M, Liegibel UM, Sittlington J, Rowland I, Wahala K, Rechkemmer G. Isoflavonoids and lignans have different potentials to modulate oxidative genetic damage in human colon cells. *Carcinogenesis* 2000; 21 (6): 1247-1252.

Pop EA, Fischer LM, Coan AD, Gitzinger M, Nakamura J, Zeisel SH. Effects of a high daily dose of soy isoflavones on DNA damage, apoptosis, and estrogenic outcomes in healthy postmenopausal women: a phase I clinical trial. *Menopause* 2008; 15 (4): 684-692.

Preedy V. Isoflavones - Chemistry, Analysis, Function and Effects. The Royal Society of Chemistry, Cambridge 2013.

Richter G. Praktische Biochemie - Grundlagen und Techniken. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2003.

Roche: Cell Proliferation Reagent WST-1. Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, 2005.

Internet: https://cssportal.roche.com/LFR_PublicDocs/ras/11644807001_en_11.pdf
(Stand: 02.12.2013)

Roche. Cell Death Detection ELISA ^{PLUS}. Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, 2010.

Internet: https://cssportal.roche.com/LFR_PublicDocs/ras/11774425001_en_11.pdf
(Stand: 02.12.2013)

Roche. Manual Cytotoxicity Kit (LDH) Version 08. Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, 2011.

Internet: https://cssportal.roche.com/LFR_PublicDocs/ras/11644793001_en_08.pdf (Stand: 02.12.2013)

Roos WP, Kaina B. DNA damage-induced cell death by apoptosis. Trends in molecular medicine 2006; 12 (9): 440-450.

Roser S, Pool-Zobel BL, Rechkemmer G. Contribution of apoptosis to responses in the comet assay. Mutation research 2001; 497 (1-2): 169-175.

Salti GI, Grewal S, Mehta RR, Das Gupta TK, Boddie AW, Jr., Constantinou AI. Genistein induces apoptosis and topoisomerase II-mediated DNA breakage in colon cancer cells. European journal of cancer 2000; 36 (6): 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. Biochimica et biophysica acta 2002; 1556 (2-3): 187-196.

Schafer KA. The cell cycle: a review. Veterinary pathology 1998; 35 (6): 461-478.

Schmitt E, Metzler M, Jonas R, Dekant W, Stopper H. Genotoxic activity of four metabolites of the soy isoflavone daidzein. Mutation research 2003; 542 (1-2): 43-48.

Schmitz S. Der Experimentator - Zellkultur. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 2011.

Schwartz D, Rotter V. p53-dependent cell cycle control: response to genotoxic stress. Seminars in cancer biology 1998; 8 (5): 325-336.

Setchell KD. Soy isoflavones--benefits and risks from nature's selective estrogen receptor modulators (SERMs). Journal of the American College of Nutrition 2001a; 20 (5): 354-362.

Setchell KD, Brown NM, Desai P, Zimmer-Nechemias L, Wolfe BE, Brashear WT, Kirschner AS, Cassidy A, Heubi JE. Bioavailability of pure isoflavones in healthy humans and analysis of commercial soy isoflavone supplements. *The Journal of nutrition* 2001b; 131 (4): 1362-1375.

Setchell KD, Brown NM, Zimmer-Nechemias L, Brashear WT, Wolfe BE, Kirschner AS, Heubi JE. Evidence for lack of absorption of soy isoflavone glycosides in humans, supporting the crucial role of intestinal metabolism for bioavailability. *The American journal of clinical nutrition* 2002; 76 (2): 447-453.

Setchell KD, Clerici C. Equol: history, chemistry, and formation. *The Journal of nutrition* 2010; 140 (7): 1355-1362.

Setchell KD, Faughnan MS, Avades T, Zimmer-Nechemias L, Brown NM, Wolfe BE, Brashear WT, Desai P, Oldfield MF, Botting NP, Cassidy A. Comparing the pharmacokinetics of daidzein and genistein with the use of ¹³C-labeled tracers in premenopausal women. *The American journal of clinical nutrition* 2003; 77 (2): 411-419.

Setchell KD, Zimmer-Nechemias L, Cai J, Heubi JE. Exposure of infants to phyto-oestrogens from soy-based infant formula. *Lancet* 1997; 350 (9070): 23-27.

Sfakianos J, Coward L, Kirk M, Barnes S. Intestinal uptake and biliary excretion of the isoflavone genistein in rats. *The Journal of nutrition* 1997; 127 (7): 1260-1268.

Shen JC, Klein RD, Wei Q, Guan Y, Contois JH, Wang TT, Chang S, Hursting SD. Low-dose genistein induces cyclin-dependent kinase inhibitors and G(1) cell-cycle arrest in human prostate cancer cells. *Molecular carcinogenesis* 2000; 29 (2): 92-102.

Sinha BK. Topoisomerase inhibitors. A review of their therapeutic potential in cancer. *Drugs* 1995; 49 (1): 11-19.

Steer TE, Johnson IT, Gee JM, Gibson GR. Metabolism of the soybean isoflavone glycoside genistin in vitro by human gut bacteria and the effect of prebiotics. *The British journal of nutrition* 2003; 90 (3): 635-642.

Stürtz M, Lander V, Schmid W, Winterhalter p. Quantitative Determination of Isoflavones in Soy Based Nutritional Supplements by High-Performance Liquid Chromatography. *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit* 2008; 3 (2): 127-136.

- Tategu M, Arauchi T, Tanaka R, Nakagawa H, Yoshida K. Puma is a novel target of soy isoflavone genistein but is dispensable for genistein-induced cell fate determination. *Molecular nutrition & food research* 2008; 52 (4): 439-446.
- Taylor WR, DePrimo SE, Agarwal A, Agarwal ML, Schonthal AH, Katula KS, Stark GR. Mechanisms of G2 arrest in response to overexpression of p53. *Molecular biology of the cell* 1999; 10 (11): 3607-3622.
- Taylor WR, Stark GR. Regulation of the G2/M transition by p53. *Oncogene* 2001; 20 (15): 1803-1815.
- Thorburn A. Death receptor-induced cell killing. *Cellular signalling* 2004; 16 (2): 139-144.
- Todaka E, Sakurai K, Fukata H, Miyagawa H, Uzuki M, Omori M, Osada H, Ikezuki Y, Tsutsumi O, Iguchi T, Mori C. Fetal exposure to phytoestrogens--the difference in phytoestrogen status between mother and fetus. *Environmental research* 2005; 99 (2): 195-203.
- Ullah MF, Ahmad A, Zubair H, Khan HY, Wang Z, Sarkar FH, Hadi SM. Soy isoflavone genistein induces cell death in breast cancer cells through mobilization of endogenous copper ions and generation of reactive oxygen species. *Molecular nutrition & food research* 2011; 55 (4): 553-559.
- van Duursen MB, Nijmeijer SM, de Morree ES, de Jong PC, van den Berg M. Genistein induces breast cancer-associated aromatase and stimulates estrogen-dependent tumor cell growth in in vitro breast cancer model. *Toxicology* 2011; 289 (2-3): 67-73.
- van Erp-Baart MA, Brants HA, Kiely M, Mulligan A, Turrini A, Sermoneta C, Kilkkinen A, Valsta LM. Isoflavone intake in four different European countries: the VENUS approach. *The British journal of nutrition* 2003; 89 (1): 25-30.
- Vassilev LT, Vu BT, Graves B, Carvajal D, Podlaski F, Filipovic Z, Kong N, Kammlott U, Lukacs C, Klein C, Fotouhi N, Liu EA. In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2. *Science* 2004; 303 (5659): 844-848.
- Vermeulen K, Van Bockstaele DR, Berneman ZN. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell proliferation* 2003; 36 (3): 131-149.
- Vogelstein B, Lane D, Levine AJ. Surfing the p53 network. *Nature* 2000; 408 (6810): 307-310.

- Wakai K, Egami I, Kato K, Kawamura T, Tamakoshi A, Lin Y, Nakayama T, Wada M, Ohno Y. Dietary intake and sources of isoflavones among Japanese. *Nutrition and cancer* 1999; 33 (2): 139-145.
- Walle T, Browning AM, Steed LL, Reed SG, Walle UK. Flavonoid glucosides are hydrolyzed and thus activated in the oral cavity in humans. *The Journal of nutrition* 2005; 135 (1): 48-52.
- Wang C, Kurzer MS. Phytoestrogen concentration determines effects on DNA synthesis in human breast cancer cells. *Nutrition and cancer* 1997; 28 (3): 236-247.
- Wang H, Li Q, Chen H. Genistein affects histone modifications on Dickkopf-related protein 1 (DKK1) gene in SW480 human colon cancer cell line. *PloS one* 2012; 7 (7): 40955.
- Wang H, Murphy PA. Isoflavone Composition of American and Japanese Soybeans in Iowa: Effects of Variety, Crop Year, and Location. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 1994; 42 (8).
- Wang J, Eltoum IE, Lamartiniere CA. Genistein alters growth factor signaling in transgenic prostate model (TRAMP). *Molecular and cellular endocrinology* 2004; 219 (1-2): 171-180.
- Wang TT, Sathyamoorthy N, Phang JM. Molecular effects of genistein on estrogen receptor mediated pathways. *Carcinogenesis* 1996; 17 (2): 271-275.
- Watanabe S, Yamaguchi M, Sobue T, Takahashi T, Miura T, Arai Y, Mazur W, Wahala K, Adlercreutz H. Pharmacokinetics of soybean isoflavones in plasma, urine and feces of men after ingestion of 60 g baked soybean powder (kinako). *The Journal of nutrition* 1998; 128 (10): 1710-1715.
- Weisz L, Oren M, Rotter V. Transcription regulation by mutant p53. *Oncogene* 2007; 26 (15): 2202-2211.
- Win W, Cao Z, Peng X, Trush MA, Li Y. Different effects of genistein and resveratrol on oxidative DNA damage in vitro. *Mutation research* 2002; 513 (1-2): 113-120.
- Wolffram S, Block M, Ader P. Quercetin-3-glucoside is transported by the glucose carrier SGLT1 across the brush border membrane of rat small intestine. *The Journal of nutrition* 2002; 132 (4): 630-635.
- Wu AH, Yu MC, Tseng CC, Pike MC. Epidemiology of soy exposures and breast cancer risk. *British journal of cancer* 2008; 98 (1): 9-14.

- Wu Q, Yang Y, Yu J, Jin N. Soy isoflavone extract stimulate the growth of nude mouse xenografts bearing estrogen-dependent human breast cancer cells (MCF-7). *Journal of Biomedical Research* 2012; 26 (1): 44-52.
- Xu X, Harris KS, Wang HJ, Murphy PA, Hendrich S. Bioavailability of soybean isoflavones depends upon gut microflora in women. *The Journal of nutrition* 1995; 125 (9): 2307-2315.
- Yakovleva T, Pramanik A, Terenius L, Ekstrom TJ, Bakalkin G. p53 latency--out of the blind alley. *Trends in biochemical sciences* 2002; 27 (12): 612-618.
- Yan L, Spitznagel EL. Soy consumption and prostate cancer risk in men: a revisit of a meta-analysis. *The American journal of clinical nutrition* 2009; 89 (4): 1155-1163.
- Yan L, Spitznagel EL, Bosland MC. Soy consumption and colorectal cancer risk in humans: a meta-analysis. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 2010; 19 (1): 148-158.
- Ye R, Boderio A, Zhou BB, Khanna KK, Lavin MF, Lees-Miller SP. The plant isoflavenoid genistein activates p53 and Chk2 in an ATM-dependent manner. *The Journal of biological chemistry* 2001; 276 (7): 4828-4833.
- Yu X, Zhu J, Mi M, Chen W, Pan Q, Wei M. Anti-angiogenic genistein inhibits VEGF-induced endothelial cell activation by decreasing PTK activity and MAPK activation. *Medical oncology (Northwood, London, England)* 2012; 29 (1): 349-357.
- Yu Z, Li W, Liu F. Inhibition of proliferation and induction of apoptosis by genistein in colon cancer HT-29 cells. *Cancer letters* 2004; 215 (2): 159-166.
- Zhai X, Lin M, Zhang F, Hu Y, Xu X, Li Y, Liu K, Ma X, Tian X, Yao J. Dietary flavonoid genistein induces Nrf2 and phase II detoxification gene expression via ERKs and PKC pathways and protects against oxidative stress in Caco-2 cells. *Molecular nutrition & food research* 2013; 57 (2): 249-259.
- Zhan Q, Antinore MJ, Wang XW, Carrier F, Smith ML, Harris CC, Fornace AJ, Jr. Association with Cdc2 and inhibition of Cdc2/Cyclin B1 kinase activity by the p53-regulated protein Gadd45. *Oncogene* 1999; 18 (18): 2892-2900.

Zhao J, Ren F. Influence of hydroxylation and glycosylation in ring A of soybean isoflavones on interaction with BSA. *Spectrochimica acta. Part A, Molecular and biomolecular spectroscopy* 2009; 72 (3): 682-685.

Zubik L, Meydani M. Bioavailability of soybean isoflavones from aglycone and glucoside forms in American women. *The American journal of clinical nutrition* 2003; 77 (6): 1459-1465.

12 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: **Karin Stornig**
Geburtsdatum: **20.12.1987**
Geburtsort: **Villach**
Wohnort: **Fischerstiege 1-7/5/14, 1010 Wien**
E-Mail-Adresse: **karin_stornig@hotmail.com**

Schulbildung

10/1994 - 07/1998 **Volksschule, St. Egyden**
10/1998 - 07/2002 **Hauptschule, Velden**
10/2002 - 07/2007 **Centrum Humanberuflicher Schulen, Villach**

Studium

10/2007- 04/2011 **Bakkalaureatsstudium Ernährungswissenschaften, Universität Wien**
09/2012 - 07/2013 **Masterarbeit an der Universität Wien am Institut für Lebensmittelchemie und Toxikologie mit dem Thema: „Einfluss des oxidativen Metabolismus von Genistein auf die Toxizität und Apoptoseinduktion in humanen Kolonkarzinomzellen“**
seit 04/2011 **Masterstudium Ernährungswissenschaften mit der Spezialisierung „Lebensmittelsicherheit und -qualität“**

13 Anhang

Daten zum WST-1 Assay

Tabelle 7: Mittelwerte der Absorptionen im WST-1 Assay nach einstündiger Inkubation mit Genistein in serumfreiem Medium unter Zusatz von Katalase (100 U/ml). Die Werte sind Ausreißer-bereinigt und angegeben in T/C in %.

n	DMSO	Triton X	0,1 µM	1 µM	10 µM	50 µM	100 µM	200 µM	250 µM	500 µM
1	100	0,31	97,54	97,72	92,59	99,25	93,57	83,93	80,84	95,84
2	100	1,13	92,06	90,15	-	103,43	96,72	92,98	103,27	103,41
3	100	-0,34	97,55	84,44	97,07	87,39	97,32	103,55	102,18	82,82
4	100	0,45	30,02	95,97	92,73	99,25	-	94,65	109,98	113,63
5	100	-	92,42	82,61	97,99	90,26	92,11	103,26	91,26	68,87

Tabelle 8: Mittelwerte der Absorptionen im WST-1 Assay nach einstündiger Inkubation mit 3`-OH-Genistein in serumfreiem Medium unter Zusatz von Katalase (100 U/ml). Die Werte sind Ausreißer-bereinigt und angegeben in T/C in %.

n	DMSO	Triton X	0,1 µM	1 µM	10 µM	50 µM	100 µM	200 µM	250 µM	500 µM
1	100	0,08	90,7	96,63	89,39	87,77	96,31	108,08	93,22	84,7
2	100	-0,65	98,98	99,98	98,32	96,8	101,04	95,5	91,78	95,67
3	100	0,41	110,16	97,18	105,93	106,59	114,57	109,16	123,15	115,7
4	100	0,21	102,91	108,91	100,65	110,08	105,34	101,56	95,4	104,1
5	100	-0,61	-	-	-	112,19	-	109,5	107,05	89,04

Tabelle 9: Mittelwerte der Absorptionen im WST-1 Assay nach einstündiger Inkubation mit 6-OH-Genistein in serumfreiem Medium unter Zusatz von Katalase (100 U/ml). Die Werte sind Ausreißer-bereinigt und angegeben in T/C in %.

n	DMSO	Triton X	0,1 µM	1 µM	10 µM	50 µM	100 µM	200 µM	250 µM	500 µM
1	100	0,6	100,11	108,62	98,86	93,95	88,08	110,83	99,19	117,58
2	100	0,17	92,24	89,92	89,03	97,11	95,86	95,73	101,62	101,41
3	100	-0,16	114,15	106,43	113,30	-	109,25	109,95	-	118,62
4	100	-1,07	92,68	101,45	91,29	95,77	92,78	88,01	101,86	99,33

Tabelle 10: Mittelwerte der Absorptionen im WST-1 Assay nach 24-stündiger Inkubation mit Genistein in serumfreiem Medium unter Zusatz von Katalase (100 U/ml). Die Werte sind Ausreißer-bereinigt und angegeben in T/C in %.

n	DMSO	Triton X	0,1 µM	1 µM	10 µM	50 µM	100 µM	200 µM	250 µM	500 µM
1	100	-0,15	98,27	100,44	107,28	103,25	121,83	57,45	88,76	28,05
2	100	-0,36	97,1	92,48	92,79	100,37	91,91	63,53	74,37	39,61
3	100	0,27	101,54	77,82	102,67	-	-	-	57,18	77,73
4	100	-0,19	-	108,66	105,29	94,87	123,22	47,57	54,37	57,43
5	100	-0,96	98,72	-	-	104,74	115,03	68,15	45,87	44,93
6	100	0,71	97,3	94,02	102,28	93,47	109,04	75,29	49,39	27,91

Tabelle 11: Mittelwerte der Absorptionen im WST-1 Assay nach 24-stündiger Inkubation mit 3'-OH-Genistein in serumfreiem Medium unter Zusatz von Katalase (100 U/ml). Die Werte sind Ausreißer-bereinigt und angegeben in T/C in %.

n	DMSO	Triton X	0,1 µM	1 µM	10 µM	50 µM	100 µM	200 µM	250 µM	500 µM
1	100	-0,05	45,46	126,03	91,82	104,66	81,5	45,87	37,57	22,18
2	100	-0,32	95,83	91,22	106,73	110,54	101,86	48,78	51,58	15,81
3	100	-0,41	80,14	80,14	91,87	-	84,32	51,66	2,82	11,17
4	100	0,25	109,91	109,91	109,76	123,1	98,37	-	19,63	9,19

Tabelle 12: Mittelwerte der Absorptionen im WST-1 Assay nach 24-stündiger Inkubation mit 6-OH-Genistein in serumfreiem Medium unter Zusatz von Katalase (100 U/ml). Die Werte sind Ausreißer-bereinigt und angegeben in T/C in %.

n	DMSO	Triton X	0,1 µM	1 µM	10 µM	50 µM	100 µM	200 µM	250 µM	500 µM
1	100	-0,06	94,27	97,08	109,36	106,52	116,82	93,49	74,79	65,09
2	100	0,43	107,22	109,27	60,05	117,48	117,62	98,0	81,58	80,87
3	100	0,92	94,88	98,99	104,46	111,39	116,31	93,14	104,72	107,12

Daten zum LDH-Assay

Tabelle 13: Mittelwerte der Absorptionen im LDH-Assay nach einstündiger Inkubation mit Genistein in serumfreiem Medium unter Zusatz von Katalase (100 U/ml). Die Werte sind Ausreißer-bereinigt und angegeben in T/C in %.

n	DMSO	Triton X	0,1 µM	1 µM	10 µM	50 µM	100 µM	200 µM	250 µM	500 µM
1	1,78	100	0,87	3,87	2,81	3,08	20,06	1,69	2,24	2,15
2	3,86	100	7,33	5,54	4,44	5,29	6,68	-	6,79	8,04
3	8,18	100	5,69	4,43	4,31	10,68	10,04	4,84	6,92	11,01
4	7,18	100	6,06	6,90	5,74	6,72	5,4	4,61	4,44	5,64
5	6,78	100	4,39	2,88	3,47	4,54	2,77	3,74	3,17	5,04
6	3,88	-	4,31	4,48	4,86	4,05	4,2	5,17	4,75	3,96

Tabelle 14: Mittelwerte der Absorptionen im LDH-Assay nach einstündiger Inkubation mit 3'-OH-Genistein in serumfreiem Medium unter Zusatz von Katalase (100 U/ml). Die Werte sind Ausreißer-bereinigt und angegeben in T/C in %.

n	DMSO	Triton X	0,1 µM	1 µM	10 µM	50 µM	100 µM	200 µM	250 µM	500 µM
1	4,56	100	6,13	6,11	8,56	6	5,62	6,64	7,71	20,40
2	4,02	100	5,25	4,52	7,65	11,42	9,14	9,47	10,61	13,52
3	7,86	100	9,07	5,39	8,31	10,14	12,88	-	-	27,79
4	2,43	100	2,27	3,88	-	6,29	6,42	9,12	9,65	13,78

Tabelle 15: Mittelwerte der Absorptionen im LDH-Assay nach einstündiger Inkubation mit 6-OH-Genistein in serumfreiem Medium unter Zusatz von Katalase (100 U/ml). Die Werte sind Ausreißer-bereinigt und angegeben in T/C in %.

n	DMSO	Triton X	0,1 µM	1 µM	10 µM	50 µM	100 µM	200 µM	250 µM	500 µM
1	3,29	100	5,64	6,11	7,04	13,59	13,67	22,60	28,85	39,82
2	1,77	100	2,64	2,34	3,15	6,47	12,76	14,16	16,45	30,72
3	2,36	100	3,96	4,11	2,88	6,04	-	12,47	11,10	18,379

Anhang

4	-	100	6,74	6,21	4,91	13,73	12,57	21,49	22,30	21,33
---	---	-----	------	------	------	-------	-------	-------	-------	-------

Tabelle 16: Mittelwerte der Absorptionen im LDH-Assay nach 24-stündiger Inkubation mit Genistein in serumfreiem Medium unter Zusatz von Katalase (100 U/ml). Die Werte sind Ausreißer-bereinigt und angegeben in T/C in %.

n	DMSO	Triton X	0,1 µM	1 µM	10 µM	50 µM	100 µM	200 µM	250 µM	500 µM
1	5,7	100	8,22	11,52	9,89	10,82	10,85	9,96	19,08	15,06
2	5,88	100	10,53	6,75	7,90	7,57	10,21	10,81	11,25	5,46
3	10,21	100	11,12	18,83	10,54	-	23,74	13,47	16,62	12,16
4	5,40	100	4,50	4,25	5,09	9,60	6,11	11,66	7,88	3,92
5	-	100	10,20	23,84	15,46	16,70	16,70	-	23,92	10,11
6	4,76	100	4,39	3,51	2,83	2,62	2,62	9,15	8,78	18,82

Tabelle 17: Mittelwerte der Absorptionen im LDH-Assay nach 24-stündiger Inkubation mit 3`-OH-Genistein in serumfreiem Medium unter Zusatz von Katalase (100 U/ml). Die Werte sind Ausreißer-bereinigt und angegeben in T/C in %.

n	DMSO	Triton X	0,1 µM	1 µM	10 µM	50 µM	100 µM	200 µM	250 µM	500 µM
1	7,82	100	19,01	4,26	5,97	6,13	13,47	9,74	14,43	28,71
2	7,93	100	7,70	7,10	4,53	7,62	8,40	3,97	12,73	18,61
3	4,10	100	4,71	4,71	3,38	5,17	7,69	2,84	4,32	14,19
4	5,30	100	4,94	4,94	4,72	9,41	10,19	6,94	30,63	21,13
5	-	100	16,79	-	-	-	11,41	-	-	-

Tabelle 18: Mittelwerte der Absorptionen im LDH-Assay nach 24-stündiger Inkubation mit 6-OH-Genistein in serumfreiem Medium unter Zusatz von Katalase (100 U/ml). Die Werte sind Ausreißer-bereinigt und angegeben in T/C in %.

n	DMSO	Triton X	0,1 µM	1 µM	10 µM	50 µM	100 µM	200 µM	250 µM	500 µM
1	5,78	100	6,84	7,73	6,14	9,37	10,12	7,06	12,09	3,95
2	6,41	100	5,83	6,87	13,17	12,61	15,91	12,36	8,40	6,23
3	10,55	100	12,63	8,40	10,59	12,08	12,14	9,02	7,90	7,78

Daten zum Western-Blot

Tabelle 19: Phosphorylierungsstatus des Proteins p53 nach einstündiger Inkubation mit Genistein in serumfreiem Medium unter Zusatz von Katalase (100 U/ml). Die Werte sind Ausreißer-bereinigt und angeben in T/C in %.

n	DMSO	25 µM	50 µM	100 µM	200 µM	250 µM	UV	HU
1	100	-	156,93	626,42	937	1067,81	892,72	785,31
2	100	282,80	167,73	480,73	854,46	1058,05	-	-
3	100	240,49	185,48	277,65	357,75	419,21	397,22	180,81
4	100	74,52	-	139,70	284,78	170,03	552,82	157,91
5	100	84,72	165,71	369,53	875,56	746,45	2010,78	1346,43
6	100	114,87	121,89	312,84	772,47	614,48	912,20	226,41

Tabelle 20: Phosphorylierungsstatus des Proteins p53 nach einstündiger Inkubation mit 3`-OH-Genistein in serumfreiem Medium unter Zusatz von Katalase (100 U/ml). Die Werte sind Ausreißerbereinigt und angegeben in T/C in %.

n	DMSO	25 µM	50 µM	100 µM	200 µM	250 µM	UV	HU
1	100	130,97	229,79	469,22	1594,25	1458,20	875,12	512,63
2	100	107,13	182,63	403,71	-	384,89	694,40	510,45
3	100	-	-	-	1923,76	1590,89	2364,83	450,45
4	100	96,37	247,84	851,33	1589,32	1751,51	2976,09	-
5	100	82,06	179,29	490,92	1768,26	767,16	407,75	292,74

Tabelle 21: Phosphorylierungsstatus des Proteins p53 nach einstündiger Inkubation mit 6-OH-Genistein in serumfreiem Medium unter Zusatz von Katalase (100 U/ml). Die Werte sind angegeben in T/C in %.

n	DMSO	25 µM	50 µM	100 µM	200 µM	250 µM	UV	HU
1	100	176,36	86,67	200,65	532,31	671,62	518,26	608,21
2	100	87,14	120,17	106,39	202,86	202,93	449,29	269,93
3	100	123,39	214,41	240	315,71	550,36	607,90	640,32

Daten zur Zellzyklusverteilung

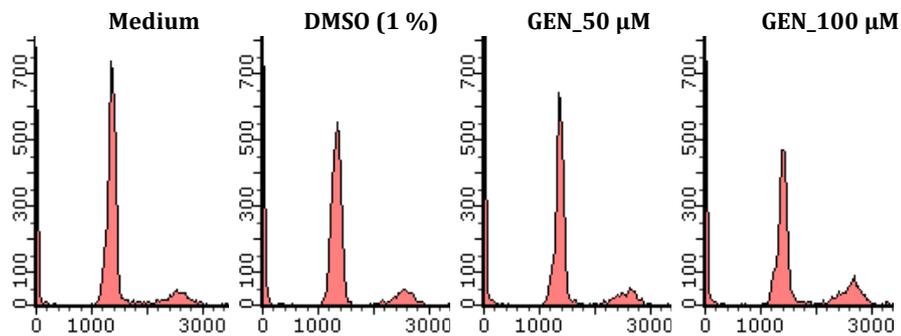


Abbildung 33: Zellzyklusverteilung von HT-29 Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit Genistein in serumfreiem Medium unter Zusatz von Katalase (100 U/ml).

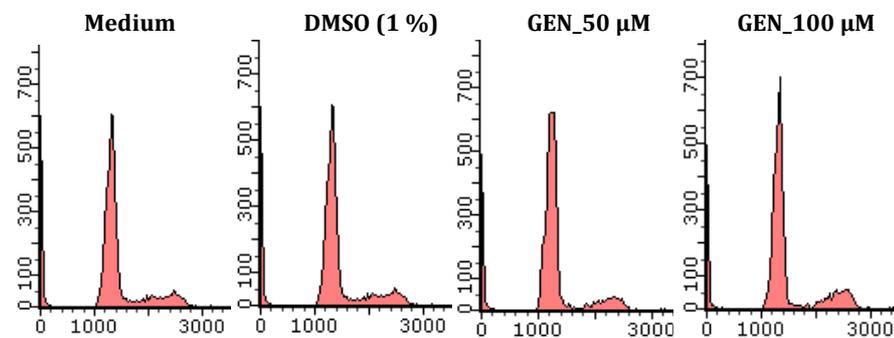


Abbildung 34: Zellzyklusverteilung von HT-29 Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit Genistein in 1 % FKS-haltigem Medium unter Zusatz von Katalase (100 U/ml).

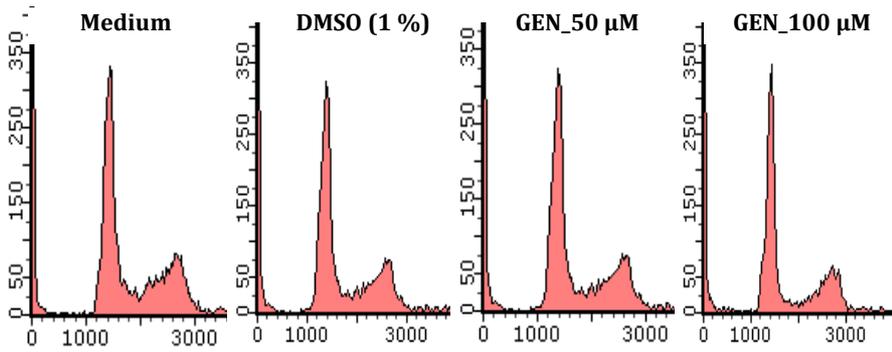


Abbildung 35: Zellzyklusverteilung von HT-29 Zellen nach 24-stündiger Synchronisation der Zellen in serumfreiem Medium und anschließender 48-stündiger Inkubation mit Genistein in 10 % FKS-haltigem Medium unter Zusatz von Katalase (100 U/ml).

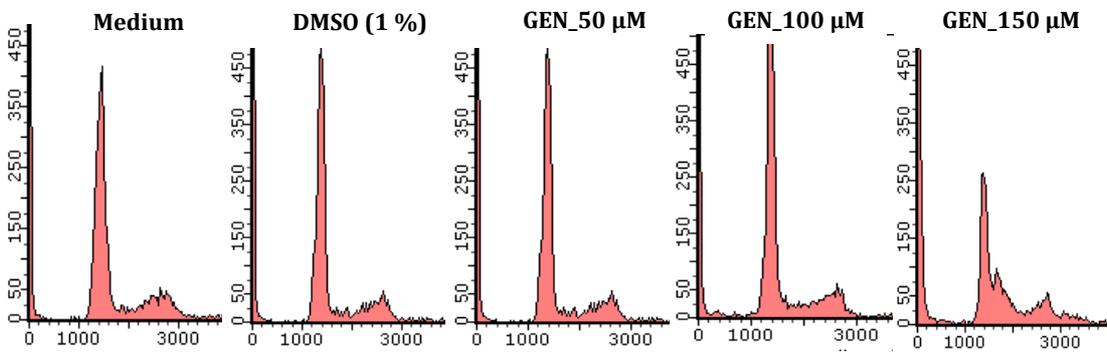


Abbildung 36: Zellzyklusverteilung von HT-29 Zellen nach 24-stündiger Synchronisation der Zellen in serumfreiem Medium und anschließender 72-stündiger Inkubation mit Genistein in 10 % FKS-haltigem Medium unter Zusatz von Katalase (100 U/ml).

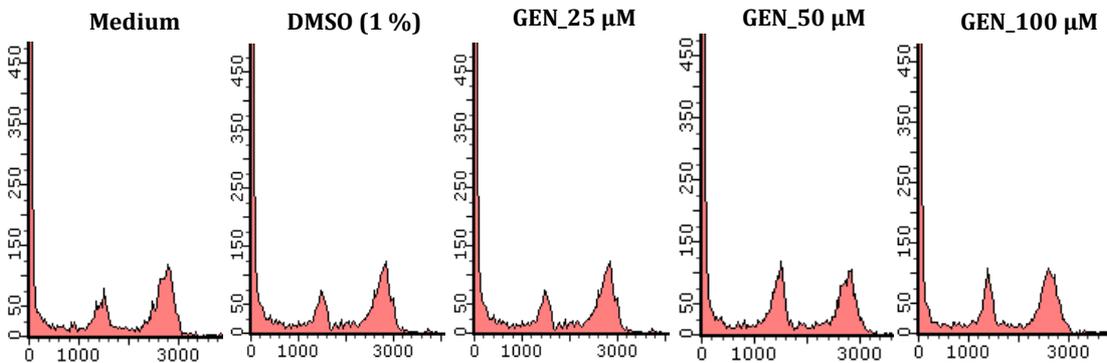


Abbildung 37: Zellzyklusverteilung von HT-29 Zellen nach 18-stündiger Synchronisation der Zellen in nocodazolhaltigem Medium (40 µM) und anschließender 72-stündiger Inkubation mit Genistein in 10 % FKS-haltigem Medium unter Zusatz von Katalase (100 U/ml).

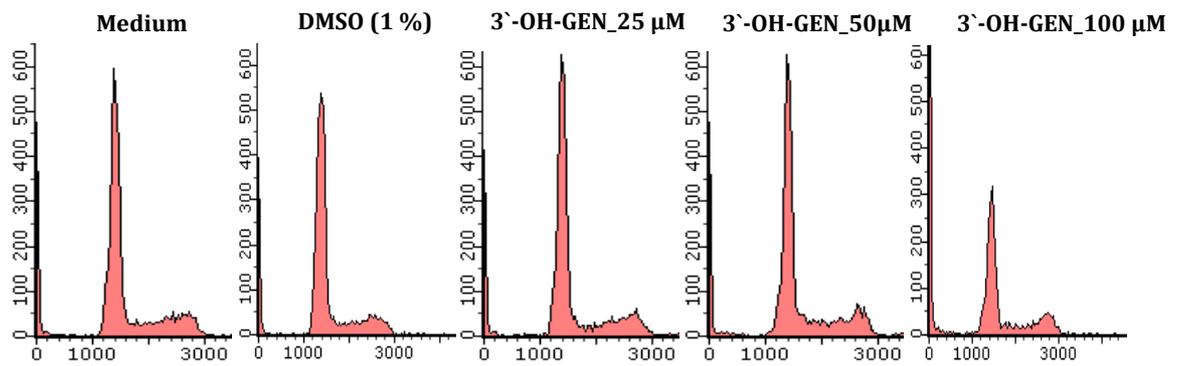


Abbildung 38: Zellzyklusverteilung von HT-29 Zellen nach 24-stündiger Synchronisation der Zellen in serumfreiem Medium und anschließender 72-stündiger Inkubation mit 3`-OH-Genistein in 10 % FKS-haltigem Medium unter Zusatz von Katalase (100 U/ml).

Daten zur Bestimmung der Apoptoserate mittels Cell Death Detection Kit ELISA^{PLUS}

Tabelle 22: Mittelwerte der Absorptionen im Cell Death Detection ELISA^{PLUS} nach 24-stündiger Inkubation der Testsubstanzen in serumfreiem Medium unter Zusatz von Katalase (100 U/ml); Daten angegeben in T/C in %.

	1. Messung	2. Messung	3.Messung	4. Messung
DMSO	0,11	0,11	0,13	0,08
GEN 50 µM	256,91	393,56	24,43	
GEN 100 µM	156,85	145,23	264,93	
GEN 200 µM	775,67	687,47	1025,50	
GEN 250 µM	1356,67	1125,03	1052,11	
3`-OH-GEN 50 µM	224,63	579,54		970,10
3`-OH-GEN 100 µM	382,53	742,74		1932,37
3`-OH-GEN 200 µM	320,65	1063,82		2335,40
3`-OH-GEN 250 µM	689,15	6,55		1062,01
6-OH-GEN 50 µM	421,77	139,68	451,62	
6-OH-GEN 100 µM	110,40	168,27	510,88	
6-OH-GEN 200 µM	173,25	47,64	479,75	
6-OH-GEN 250 µM	248,27	156,24	386,57	
Positivkontrolle	1010,51	963,28	715,80	