

# **Untersuchungen zur Beeinflussung humaner Topoisomerasen und der DNA-Integrität durch Polyphenole aus Beerenfrüchten**

Vom Fachbereich Chemie der Technischen Universität Kaiserslautern  
zur Verleihung des akademischen Grades  
„Doktor der Naturwissenschaften“  
genehmigte Dissertation

Vorgelegt von  
Diplom Lebensmittelchemikerin  
**Jessica Fritz**

**Betreuung:** Prof. Dr. D. Marko  
Karlsruhe/Kaiserslautern 2008

Datum der wissenschaftlichen Aussprache: 19.02.2008

D386

---

Kuka voi itsensä voitta, ei koskan häviä!

Eröffnung des Promotionsverfahrens: 24.10.2007

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 19.02.2008

**Prüfungskommission:**

Vorsitzender: **Prof. Dr. Werner Thiel**

1. Berichterstatter: **Prof. Dr. Doris Marko**

2. Berichterstatter: **Prof. Dr. Gerhard Eisenbrand**

---

Die vorliegende Arbeit entstand zwischen Mai 2004 und Dezember 2007 an den Universitäten in Kaiserslautern und Karlsruhe: Fachbereich Chemie, Fachrichtung Lebensmittelchemie und Toxikologie der Technischen Universität Kaiserslautern und Institut für Biowissenschaften, Abteilung Lebensmittelchemie und Toxikologie an der Universität Karlsruhe (TH).

Ich danke Frau Prof. Marko für Möglichkeit in ihrem Arbeitskreis dieses interessante Thema zu bearbeiten, für viele Anregungen und Denkanstöße, für rege Diskussionen und ihre Unterstützung während meiner Promotion.

Herrn Prof. Eisenbrand danke ich für die Übernahme des Koreferates.

Bei Herrn Prof. Thiel möchte ich mich für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes bedanken.

## **Abkürzungsverzeichnis**

3'PUA	3' $\alpha/\beta$ -ungesättigeter Aldehyd
8-OxoG	8-oxo-7,8-Dihydroguanin
A	Adenin
Abb.	Abbildung
ACF	Aberrante Krypten
ALL	Akute lymphatische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
APE-1	Apurine/apyrimidine Stelle-erkennnde Endonuklease-1
AP-Stelle	Apyrimidine/apurine Stelle
Arg	Arginin
AS	Aminosäure(n)
Asn	Asparagin
Asp	Aspartat
ATM	„ataxia telangiectesia mutated“
ATP	Adenintriphosphat
ATR	„ATM and Rad3 related“
Bax	Protein, Cofaktor von p53
BER	„Base Excision Repair“
BRCA-1	Brustkrebsgen 1, Tumorsuppressorgen
C	Cytosin
CDKs	Zyclin-abhängige Kinasen
Chk1/2	Kinasen
COMT	Catechol-O-methyltransferase
CPT	Camptothecin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
Dox	Doxorubicin
EC <sub>50</sub> -Wert	Konzentration bei der noch 50 % des Effekts gemessen werden
EGCG	Epigallocatechin-3-gallat
EGFR	Epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor
ETO	Etoposid
FAS	Oberflächenprotein

FKS	Fötale Kälberserum
Fpg	Formamidopyrimidin-DNA-glykosylase
G	Guanin
HHDP	Hexahydroxydiphenol
HR	Homologe Rekombination
Hsp90	Hitzeschockprotein aus 90 Aminosäuren
IC <sub>50</sub> -Wert	Konzentration bei der die Aktivität um 50 % gehemmt ist
ICE	Immunodetektion von Enzym-DNA-Komplexen
JNK	c-Jun N-terminale Kinasen
Kap.	Kapitel
kDNA	Kinetoplasten DNA
Lys	Lysin
MAPK	Mitogen aktivierte Proteinkinase
n.d.	Nicht detektiert
NER	„Nucleotid Excision Repair“
NF-κB	„nuclear factor kappa B“
NHEJ	„non-homologous end-joining“
PDGFR	„platelet-derived growth factor receptor“
PIKK	Phosphoinositol-3-kinase-ähnliche Kinasen
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
S.	Seite
SI	Schweifintensität
SOD	Superoxiddismutase
SRB	Sulforhodamin B
T	Thymin
T/C	„test over control“, Prozent der Kontrolle
Tab.	Tabelle
TDP-1	Tyrosyl-DNA-Phosphodiesterase-1
Topo	Topoisomerase
UDP	Uridindiphosphat
UGT	UDP-Glukuronidyltransferase
VEGFR	Vasculärer Endothelialer Wachstumsfaktorrezeptor
Y	Tyrosin
z.B.	Zum Beispiel



<b>Einleitung</b> .....	<b>- 3 -</b>
<b>Theoretische Grundlagen</b> .....	<b>- 4 -</b>
Kolonkrebs .....	- 4 -
Struktur humaner DNA .....	- 5 -
DNA-Integrität .....	- 9 -
Der Zellzyklus .....	- 10 -
DNA-Schäden und zelluläre Reparaturmechanismen .....	- 12 -
Apoptose.....	- 16 -
Humane Topoisomerasen .....	- 20 -
Topoisomerase I .....	- 22 -
Topoisomerase II.....	- 26 -
Hemmstoffe humaner Topoisomerasen .....	- 30 -
Camptothecin.....	- 34 -
Doxorubicin.....	- 36 -
Etoposid.....	- 37 -
Interaktion mit doppelsträngiger DNA.....	- 42 -
Interkalation.....	- 42 -
Bindung an die kleine Furche .....	- 44 -
Polyphenole aus Beerenfrüchten und Rotwein.....	- 45 -
Anthocyane.....	- 48 -
Anthocyanreiche Extrakte .....	- 54 -
Ellagttannine und Ellagsäure .....	- 57 -
Polyphenole als Topoisomerasehemmstoffe .....	- 60 -
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> – Entwicklung in der Zellkultur .....	- 62 -
<b>Problemstellung</b> .....	<b>- 64 -</b>
<b>Ergebnisse und Diskussion</b> .....	<b>- 65 -</b>
Einfluss von Anthocyanidinen auf die DNA-Integrität in HT29-Zellen .....	- 65 -
DNA-schädigende Wirkung des Anthocyanidins Delphinidin.....	- 66 -
Wirkung von Delphinidin auf humane Topoisomerasen in HT29-Zellen .....	- 78 -
Protektion der DNA durch Anthocyanidine .....	- 82 -
Wirkung von anthocyanreichen Extrakten auf die DNA-Integrität von HT29-Zellen und auf die Aktivität humaner Topoisomerasen.....	- 101 -
Akkumulation von Wasserstoffperoxid im verwendeten Zellkulturmedium in Anwesenheit der Extrakte ... - 102 -	
Einfluss der H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> – Akkumulation auf das Wachstum von HT29-Zellen.....	- 104 -
Wirkung der Extrakte auf humane Topoisomerasen .....	- 107 -
Beeinflussung der DNA-Integrität durch Mirtoselect und Oenocyanine.....	- 115 -
Protektion Topoisomerasegift-vermittelter DNA-Schäden durch anthocyanreiche Extrakte.....	- 122 -
Einfluss von Ellagttanninen und Ellagsäure auf das Wachstum von HT29-Zellen, die DNA-Integrität und die Aktivität humaner Topoisomerasen .....	- 131 -
Einfluss der Ellagttannine und der Ellagsäure auf das Wachstum von HT29-Zellen .....	- 131 -
Beeinflussung humaner Topoisomerasen durch die Ellagttannine .....	- 134 -
Beeinflussung der DNA-Integrität.....	- 139 -
Protektion der DNA vor Topoisomerasegift-vermittelten Strangbrüchen durch Ellagttannine .....	- 146 -
<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>- 153 -</b>
<b>Material und Methoden</b> .....	<b>- 156 -</b>
Material .....	- 156 -
Gebrauchs- und Bedarfsgegenstände.....	- 156 -
Chemikalien.....	- 157 -
Kits .....	- 159 -
Antikörper .....	- 159 -
Enzyme.....	- 159 -
Feinchemikalien und Testsubstanzen .....	- 160 -

## Einleitung

---

Verwendete Geräte .....	- 160 -
Zellkultur .....	- 164 -
verwendete Zelllinien .....	- 164 -
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> – Akkumulation im Zellkulturmedium (Amplex <sup>®</sup> Red Kit).....	- 168 -
Wachstumshemmung (Sulforhodamin B (SRB) – Test) .....	- 171 -
Zellzyklusuntersuchung mittels Durchflusszytometrie .....	- 173 -
Interaktion mit doppelsträngiger DNA.....	- 176 -
Interkalation in doppelsträngige DNA (Verdrängung von Ethidiumbromid).....	- 176 -
Bindung an die kleine Furche der DNA (Verdrängung von Hoechst H33258).....	- 177 -
Hemmung humaner Topoisomerasen.....	- 178 -
Plasmidpräparation.....	- 178 -
Bestimmung der DNA-Konzentration .....	- 180 -
Restriktionsverdau.....	- 181 -
Herstellung eines Kernextraktes aus MCF-7 Zellen.....	- 185 -
Hemmung der katalytischen Aktivität der Topoisomerase I (Relaxationsassay) .....	- 187 -
Hemmung der katalytischen Aktivität der Topoisomerase II (Decatenierungsassay) .....	- 189 -
Unterscheidung zwischen Topoisomerase-II-gift und katalytischem Inhibitor der Topoisomerase II (Cleavage Assay).....	- 191 -
Immunodetektion von Komplexen zwischen DNA und Enzymen (ICE – Bioassay).....	- 193 -
Auswertung .....	- 196 -
Einzelzellgelelektrophorese (Comet Assay).....	- 197 -
<b>Literatur.....</b>	<b>- 208 -</b>

### **Einleitung**

Der Zusammenhang einer möglichen Krebsprävention durch die Ernährung ist seit den 1990er Jahren in den Mittelpunkt der Forschung gerückt. Bisher wurden mehr als 20.000 Studien zu diesem Thema veröffentlicht. Die Zunahme der Neuerkrankungen einer Reihe von Tumorerkrankungen in den westlichen Industrienationen in den letzten Jahrzehnten trägt dazu bei, dass sowohl die Strukturaufklärung als auch das Verständnis der zellulären Wirkmechanismen von Lebensmittelinhaltsstoffen im Hinblick auf ein chemopräventives Potential immer mehr an Bedeutung erlangen.

Besonders der Einfluss verschiedener Nahrungsmittelinhaltsstoffe auf zelluläre Zielenzyme, denen bei der Entstehung von kolorektalen Karzinomen eine bedeutende Rolle zugeschrieben wird, rückt immer mehr ins öffentliche und wissenschaftliche Interesse. Da besonders der Gastrointestinaltrakt mit Nahrungsmitteln in Kontakt kommt, scheinen vor allem bioaktive Pflanzenstoffe bei der Prävention vor Kolonkrebs von großer Bedeutung zu sein. Verschiedene epidemiologische Studien konnten bereits zeigen, dass Lebensmittelinhaltsstoffe wie Inulin, konjugierte Linolsäure, Vitamin A und D, Kalzium und auch sekundäre Pflanzenstoffe, wie Curcumin, Quercetin, (-)-Epigallocatechin-3-gallat (EGCG) und Resveratrol das Risiko an Kolonkrebs zu erkranken modulieren können (Issa et al. 2006, Kim and Milner 2007). Auch der Verzehr von anthocyanreichen Beerenfrüchten oder Rotwein wird mit einer Vielzahl positiver Wirkungen assoziiert. Dazu zählen neben einer anti-inflammatorischen Wirkung, auch anti-proliferative Eigenschaften (Coates et al. 2007).

Durch die Einnahme von Nahrungsergänzungsmitteln, z.B. auf Anthocyanbasis, kann jedoch die Menge an verzehrten Einzelsubstanzen deutlich erhöht werden im Vergleich zu den Mengen, die durch den Verzehr von natürlichen Nahrungsmitteln aufgenommen werden. Über mögliche Risiken bei übermäßigem Verzehr von Nahrungsergänzungsmitteln oder Flavonoid-angereicherten Nahrungsmitteln ist bisher jedoch noch wenig bekannt. Für einige Verbindungen, wie z.B. Quercetin, EGCG und Genistein konnten Interaktionen mit Topoisomerasen und in hohen Konzentrationen auch ein pro-oxidatives und auch genotoxisches Potential nachgewiesen werden (Habermeyer et al. 2005, Halliwell 2007). Zur Evaluierung des Risiko-Nutzen-Verhältnisses sollte daher eine mögliche Schädigung zellulärer Strukturen, wie der DNA und das toxische Potential von Nahrungsmittelinhaltsstoffen, wie z.B. Anthocyanen, in ernährungsphysiologisch relevanten Dosen untersucht werden.

## Theoretische Grundlagen

### Kolonkrebs

Kolonkrebs ist neben den hormonell bedingten Krebsarten, Brustkrebs und Prostatakrebs, sowie Lungenkrebs eine der häufigsten Krebserkrankungen in den westlichen Industrienationen. Die Verbreitung dieser Krebsart wird vorwiegend auf Umweltfaktoren und vor allem auf die Ernährung zurückgeführt (Parkin et al. 1999).

Auf zellulärer Ebene entsteht Kolonkrebs durch fortschreitende Anreicherung von genetischen und epigenetischen Veränderungen von normalem Gewebe bis zu einem Karzinom (Grady 2004). Bei der Krebsentstehung werden drei Phasen unterschieden, die Initiation, die Promotion und die Progression. Die Initiation bezeichnet die Phase, in der die initiierende Mutation gesetzt wird. Beispielsweise wird ein potentiell kanzerogenes Produkt durch Phase I-metabolisierende Enzyme, wie CYP450-abhängige Monooxygenasen, überführt. Auch durch Strahlung oder Viren kann es zur Initiation kommen und eine genetische Veränderung auftreten. Während der Promotionsphase kommt es zu weiterem vermehrtem Auftreten von DNA-Schäden und zur Modulation der Regulationsmechanismen der Proliferation, wie beispielsweise die Überexpression verschiedener Enzyme (Ornithin-Decarboxylase, DNA-Polymerasen).

In der Progressionsphase bildet sich der Tumor. Die Mutation ist fixiert und die Tumorzellen beginnen unkontrolliert zu wachsen (Depeint et al. 2002).

Während der Entwicklung erfahren die Kolonzellen genetischen und morphologischen Veränderungen und es wird ein Wachstumsvorteil für die veränderten Zellen geschaffen. Die früheste Läsion, die erfasst werden kann, sind die aberranten Krypten (ACF). Das genaue neoplastische Potential dieser Läsionen ist nicht bekannt. Vermutlich tragen diese Läsionen Mutationen in k-RAS und APC und können sich so in freie Adenokarzinome weiterentwickeln. Dysplasien tragen vermehrt APC-Mutationen und haben ein hohes Potential für die Entstehung von Kolonkrebs (Grady 2004).



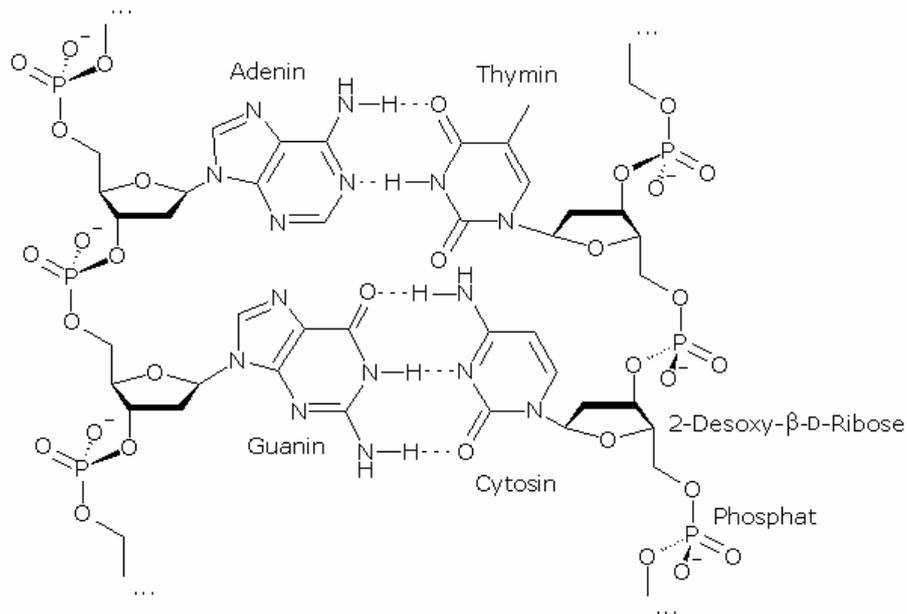
**Abb. 1:** Schematische Darstellung der Krebsentstehung (Grady 2004)

In der Chemoprävention und Chemotherapie sind viele Ziele bekannt um in den Verlauf der Tumorgenese einzugreifen. Um beispielsweise die Initiation zu unterbinden, kann die Expression von Phase II Enzymen erhöht werden, um so ein schnelleres Entfernen des Karzinogens zu erreichen. Ein schnelles Abfangen von Radikalen kann durch Antioxidantien bewirkt werden, um auf diese Weise DNA-Schäden zu reduzieren. Um in die Promotion einzugreifen werden Enzymhemmstoffe benötigt, die für die Promotion spezifische Enzyme, wie Proteinkinasen oder Topoisomerasen, hemmen (Depeint et al., 2002). Dabei können möglicherweise Nahrungsmittelinhaltstoffe oder Nahrungsergänzungsmittel zur Prävention beitragen.

Viele Nahrungsergänzungsmittel versprechen chemopräventiv zu wirken. Dabei sollen bioaktive Pflanzeninhaltsstoffe protektive Eigenschaften besitzen und die DNA vor Schädigung durch verschiedene Mechanismen wie oxidativen Schaden zu schützen. Um zu verstehen, wie die DNA geschützt werden kann muss zunächst die Struktur der DNA und einige wichtige DNA-metabolische Ereignisse erklärt werden.

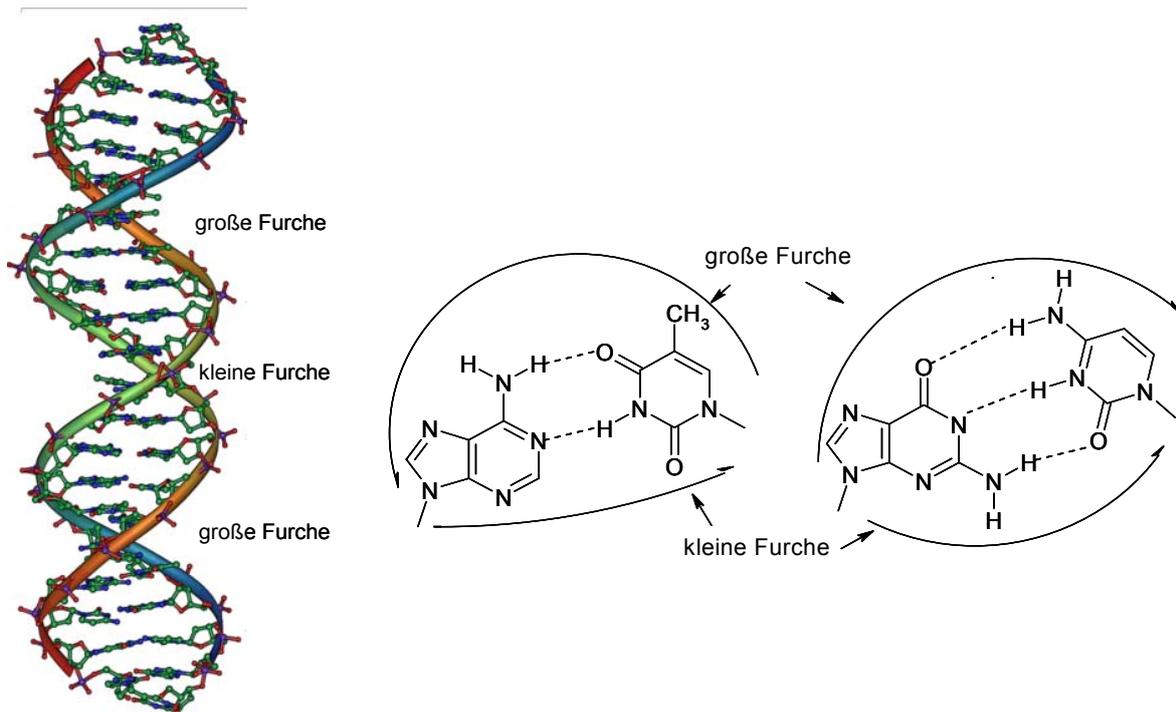
### **Struktur humaner DNA**

Die komplette Erbinformation liegt in jeder Zelle des menschlichen Körpers auf 46 Molekülen (Chromosomen) Desoxyribonukleinsäure (DNA) kodiert vor. Die doppelhelikale Struktur der DNA basiert auf den Bindungen der Basenpaare, da durch die sterische Lage der Basenpaare eine sehr regelmäßige Struktur gebildet wird. Dabei ist Adenin über zwei Wasserstoffbrücken mit Thymin verbunden und Cytosin über drei Wasserstoffbrücken mit Guanin. Die Basen eines DNA-Einzelstrangs sind als Nukleotide, das heißt mit einem Zucker (2-Desoxy- $\beta$ -D-Ribose) und einem Phosphat gekoppelt, über Phosphodiesterbindungen mit einander verbunden (Abb. 2) (Stryer et al. 1999).



**Abb. 2:** Struktureller Aufbau der DNA-Doppelhelix. Die Basen zweier Stränge sind über Wasserstoffbrückenbindungen (- - -) verbunden, die Basen eines Strangs als Nukleotide über Phosphodiesterbindungen (Alberts et al. 2003).

Die einzelnen Basenpaare haben eine ähnliche Ausdehnung und halten so die beiden Zucker-Phosphat-Rückgrate gleich weit auseinander. Die beiden Zucker-Phosphat-Rückgrate sind ineinander verwunden und so wird die Effizienz der Basenpaarpackung zusätzlich erhöht. Dabei bilden jeweils zehn Basenpaare eine vollständige Umdrehung. Die dreidimensionale Darstellung lässt zwei unterschiedlich große Furchen in der DNA erkennen (Abb. 3). Die unterschiedlichen Furchen entstehen dadurch, dass sich die glykosidischen Bindungen eines Basenpaares nicht diametral gegenüber stehen. Die große Furche ist 1,2 nm breit die kleine Furche 0,6 nm. Die kleine Furche beinhaltet das 2-O des Pyrimidins und das 3-N des Purins eines Basenpaares (Abb. 3).

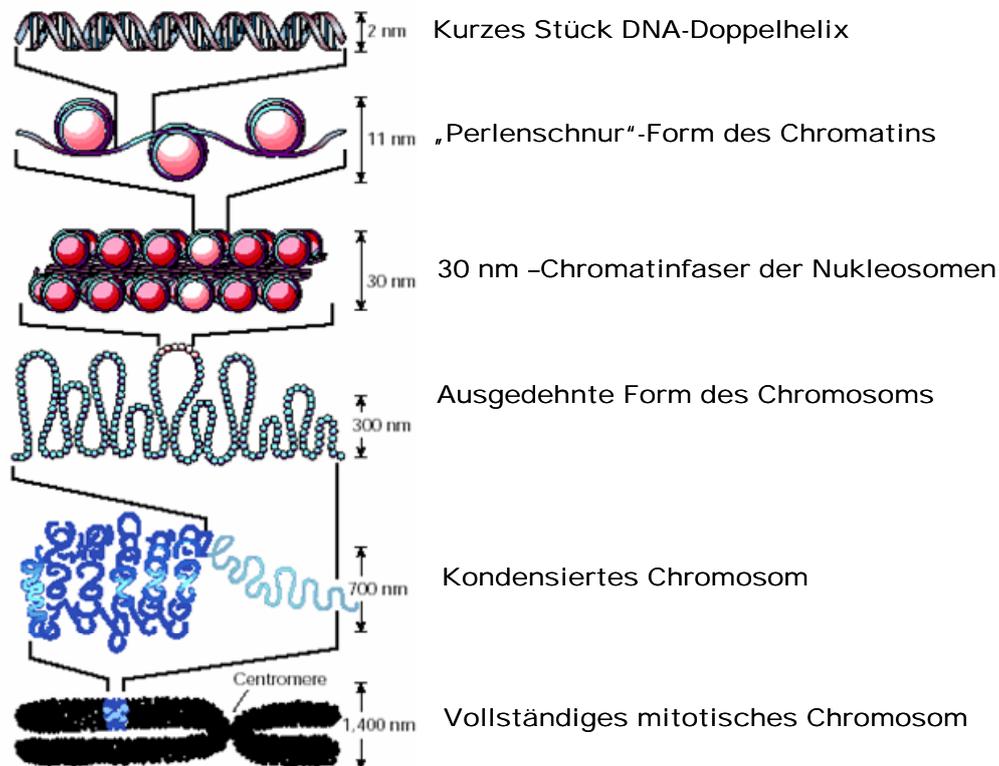


**Abb. 3:** Die DNA-Furchen, dreidimensional und anhand der Basenstruktur dargestellt (nach Berg et al. 2003).

Die Windungsrichtung und Substrukturen der DNA können variieren, die humane DNA hat jedoch meist die so genannte B-Form. Bei der B-Form sind die gegenläufigen Einzelstränge rechtsgängig zu einer Doppelhelix verwunden. Diese Form ist energetisch sehr günstig. Durch die beinahe rechtwinklige Ausrichtung der aromatischen Basen zur Helixachse und mit einem Abstand von 0,34 nm der Basen zueinander können die  $\pi$ -Elektronen in Wechselwirkungen treten und so zur Stabilität der Struktur beitragen (Berg et al. 2003).

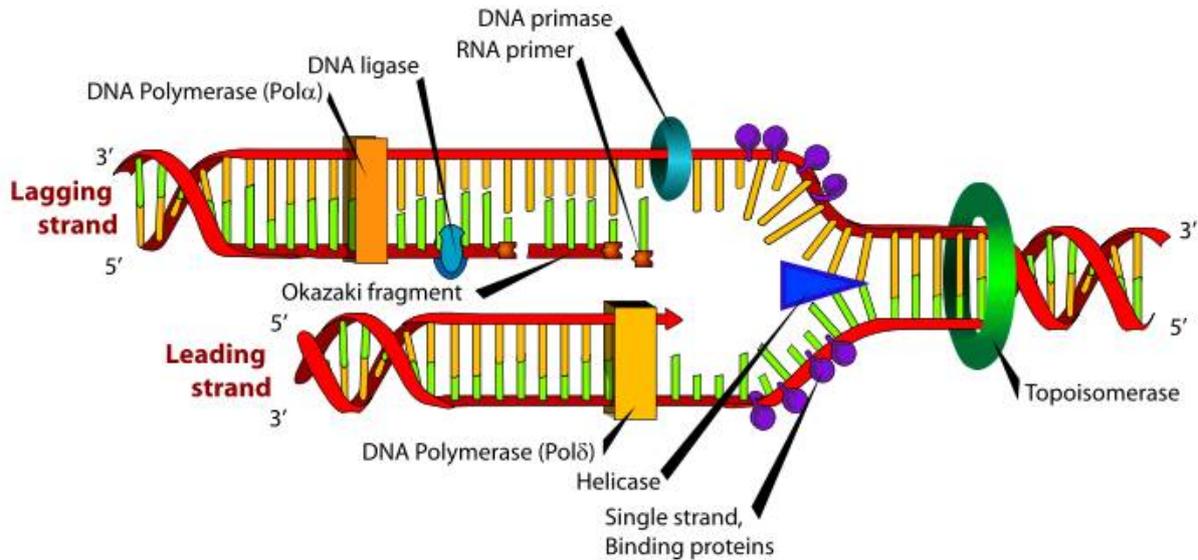
Die DNA ist mit einer Länge von 2 Metern und 3,2 Milliarden Nukleotiden ein sehr großes Molekül, welches im verhältnismäßig extrem kleinen Raum des Zellkerns mit einem Durchmesser von 10  $\mu\text{m}$  Platz finden muss. Dazu ist es nötig, dass die DNA-Moleküle möglichst dicht und dabei gut strukturiert gepackt werden und schließlich als Chromosome vorliegen. Mit der Entdeckung des Chromatins, dem Komplex aus DNA und Proteinen konnte die Packordnung der DNA aufgeklärt werden. Es handelt sich bei der Chromatinstruktur um ein dynamisches System welches die Genexpression und den DNA-Metabolismus reguliert. Die beteiligten Proteine, die Histone, dienen dabei nicht wie zuerst vermutet als reine Packungsfaktoren sondern als Repressorproteine, welche die Genexpression regulieren (Sandman 1998). Die wichtigste Untereinheit bildet das Nukleosom, welches aus 165 Basenpaaren DNA besteht, die mit zwei superhelikalen Windungen um ein Oktamer von Trägerhistonen gewickelt sind. Die einzelnen Nukleosomen sind durch ein kurzes Verbindungsstück (zw. 10 und 80 Basenpaare) mit einander verbunden und bilden eine 30 nm

dicke Chromatinfaser, welche durch ein weiteres zwischen Verbindungsstück und Nukleosom bindendes Histon stabilisiert wird (Felsenfeld und Groudine 2003).



**Abb. 4:** Packung der DNA als Chromosom (Felsenfeld und Groudine 2003)

Die Regulation der Genexpression erfolgt durch Eingang eines regulatorischen Signals und über Veränderung der Chromatinstruktur. Nukleosome, die aktive Gene tragen sind zugänglich für Enzyme, die die DNA angreifen und es kommt zu einer kontrollierten Spaltung der Struktur. Bei der Transkription und der Replikation muss die DNA für die Replikationsgabel zugänglich gemacht werden indem immer kurze DNA-Teile entwunden werden, damit der Enzymkomplex die DNA ablesen und verdoppeln kann. Das bedeutet, dass die DNA-Topologie verändert werden muss. Dies geschieht durch humane Topoisomerasen, die sowohl ineinander verwundene Doppelstränge trennen als auch die Verdrillung der DNA entwunden können.



**Abb. 5:** Die DNA-Replikationsgabel (Ruiz, 2007).

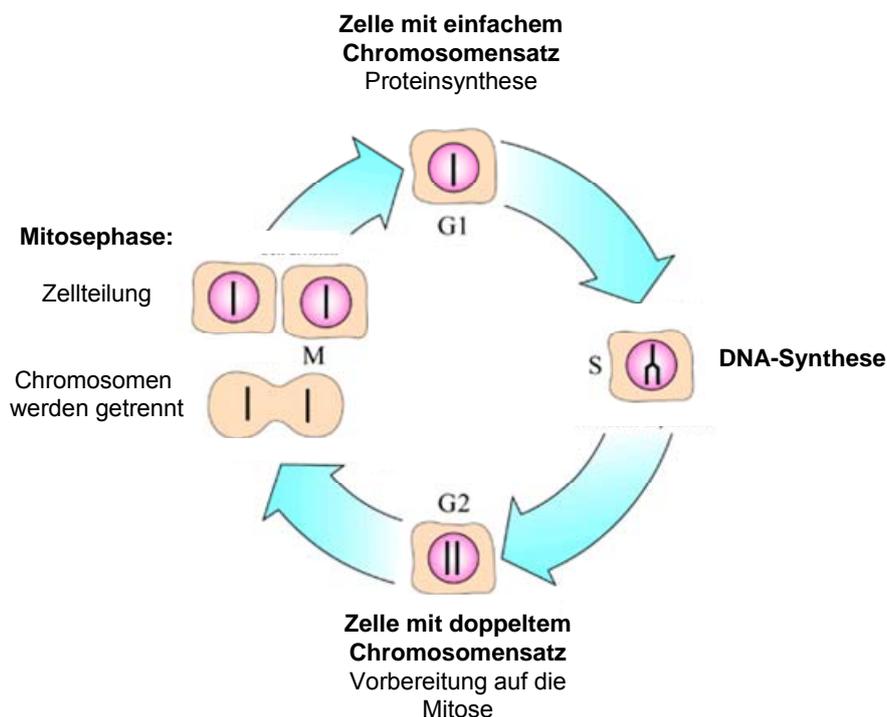
Die entwundene DNA wird nun von der DNA-Helicase in die zwei Einzelstränge aufgeschnitten. Zwei unterschiedliche Polymerasen binden an den Einzelsträngen und synthetisieren den jeweiligen Gegenstrang. Dabei benötigen die Polymerasen neben dem abzulesenden DNA-Stück auch noch einen RNA-Primer zur Bindung, der von einer DNA-Primase gesetzt wird. Die Polymerase  $\delta$  bindet den Führungsstrang (leading strand) und beginnt die Synthese des komplementären Strangs. Die Polymerase  $\alpha$  beginnt die Synthese des zweiten Strangs, wobei sie die so genannten Okazaki-Fragmente, kurze Nukleotidketten synthetisiert, welche durch eine Ligase verknüpft werden (Sutton und Walker 2001, Alberts 2003, Felsenfeld und Groudine 2003, Vindigni 2007).

## DNA-Integrität

Um die DNA-Integrität aufrecht zu erhalten sind zelluläre Kontroll- und Reparaturmechanismen erforderlich. Während des Durchlaufens des Zellzykluses wird an bestimmten Kontrollpunkten die Vollständigkeit und Unversehrtheit der DNA überprüft. Liegen Unregelmäßigkeiten vor, greifen schadensabhängig verschiedene Reparaturmechanismen. Die Kenntnis über den Wirkmechanismus von bioaktiven Substanzen kann Aufschluss über die Art der Wirkung und mögliche negative Folgen geben. Demnach sollte dieser durch *in vitro* und *in vivo* Studien erforscht werden um eine Risikobewertung einer Substanz bzw. eines Substanzgemisches ermöglichen zu können. Dazu ist es wichtig zu verstehen, wie die Kontroll- und Reparaturmechanismen arbeiten.

## Der Zellzyklus

Der Zellzyklus lässt sich in verschiedene Phasen gliedern. Aus der G<sub>1</sub>-Phase, in der die Zelle an Größe zunimmt und neue Proteine synthetisiert, kann sie in der Ruhephase G<sub>0</sub> oder in die Synthesephase gehen. In der Synthese-(S-)Phase wird die DNA repliziert. Zwischen der S-Phase und der Mitose-(M-)Phase, in der es zur Trennung der Chromosomen in die Tochterzellen kommt, liegt die G<sub>2</sub>-Phase in welcher sich die Zelle auf die Teilung vorbereitet.

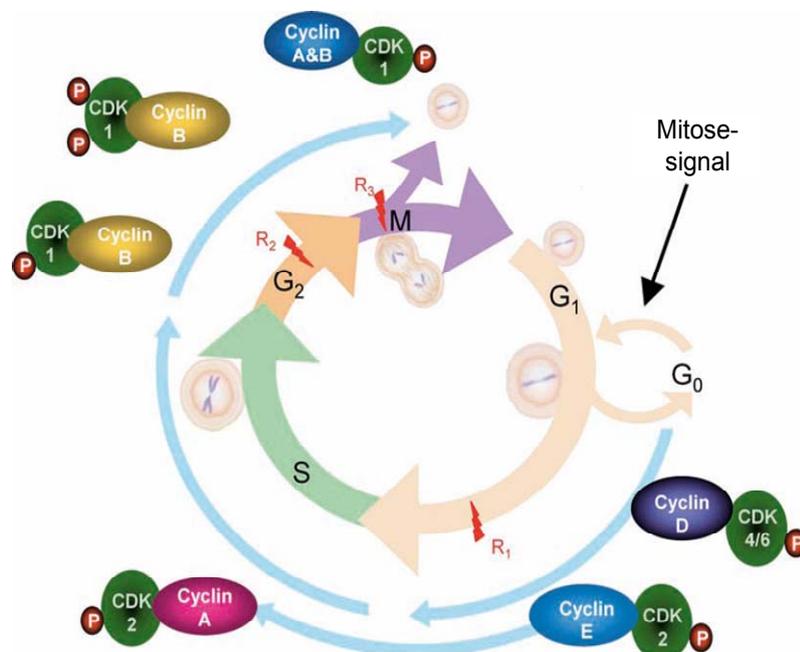


**Abb. 6:** Der Zellzyklus gliedert sich in G<sub>1</sub>-, S-, G<sub>2</sub>- und M-Phase (nach Leland et al. 2001)

Während des Zellzyklus gibt es für die Zelle wichtige Kontrollpunkte, wie den Restriktionspunkt, am Beginn der S-Phase, an dem die Zelle entscheidet ob sie neue DNA synthetisiert (Weinberg 1996). Die Bezeichnung „Kontrollpunkt“ steht nicht für ein stationäres Ereignis sondern beschreibt vielmehr biochemische Reaktionswege. Diese lassen in Abhängigkeit von DNA-Schädigung, den Zellzyklus fortfahren oder arretieren und umfasst die gesamte zelluläre Antwort auf DNA-Schäden, als Anhalten der Zellzyklusprogression, Induktion der Reparatur oder des programmierten Zelltods während der Zellteilung. Obwohl die Kontrollwege während des gesamten Zellzyklus arbeiten, geschieht die Verlangsamung oder Arretierung meist beim Übergang von einer Phase in die nächste (Nasmyth 1996, Conti et al. 2007).

Wie alle Signaltransduktionswege können die beteiligten Proteine in drei Gruppen gegliedert werden: Sensoren, Mediatoren, und Effektoren. In Tabelle 1 sind die Säugerproteine, die an der Signalübertragung der Zellzyklusregulation beteiligt sind, aufgeführt. Wie bei der DNA-Reparatur müssen auch bei den Zellzykluskontrollen zuerst die DNA-Schäden durch Sensoren erkannt werden. Es wird vermutet, dass es sich in beiden Fällen um die gleichen Sensoren handelt. Bei den Sensoren werden zwei Gruppen unterschieden: der RCF/PCNA-verwandte Rad17-RFC/9-1-1-Komplex und die Phosphoinositol-3-kinase-ähnlichen Kinasen (PIKK) (Melo and Toczycki 2002, Sancar et al. 2004).

Die beiden PIKK ATM („ataxia telangiectasia mutated“) und ATR („ATM and Rad3 related“) spielen bei der Erkennung von DNA-Schäden eine bedeutende Rolle sowohl in Bezug auf die DNA-Reparatur als auch bei der Zellzykluskontrolle und auch bei der Apoptose (Kap. Apoptose). Durch Aktivierung ihrer intrinsischen Kinaseaktivität bei der Bindung an die DNA können ATM und ATR die „Übermittler“ Chk1 und Chk2 phosphorylieren und aktivieren, was durch Phosphorylierung des Tumorsuppressorproteins p53 und des Cdc25 zu einem Arrest des Zellzyklus' über die Regulation der Zyklin-abhängigen Kinasen (CDKs) führt. Je nach Zellzyklusphase in der sich die Zelle gerade befindet werden dabei unterschiedliche Kombinationen von Zyklinen und CDKs aktiviert (Abb. 7).



**Abb. 7:** Die unterschiedlichen Zyklin/CDK-Komplexe regulieren das Durchlaufen des Zellzykluses (Eisenbrand et al. 2004).

ATM und ATR können jedoch auch andere Proteine wie BRCA-1 oder c-Abl phosphorylieren und damit die DNA-Reparatur in Gang setzen. Bei einer hohen Schadensrate und damit verstärkter Phosphorylierung von p53 und c-Abl wird der programmierte Zelltod (Apoptose) eingeleitet (Christmann 2003, Sancar 2004).

### **DNA-Schäden und zelluläre Reparaturmechanismen**

Die DNA kann beispielsweise durch Strahlung, Alkylierung oder Oxidation geschädigt werden. Daraus resultieren Einzel- und Doppelstrangbrüche, Basen- oder Desoxyribosemodifikationen und DNA-DNA- oder DNA-Protein-Crosslinks. Dabei dominiert die Schädigung der DNA durch reaktive Sauerstoffspezies (reactive oxygen species, ROS), was meist zur Oxidation von DNA-Basen, apurinen- oder apyrimidinen Stellen und DNA-Strangbrüchen führt. ROS entstehen endogen oder exogen (Valko et al. 2004, Friedberg 2003):

- bei der Bestrahlung mit UV-, Röntgen oder Gamma-Strahlung
- als Produkte von metallkatalysierten Reaktionen
- als Nebenprodukte der mitochondrialen Atmung
- als Produkte von Makrophagen während einer Entzündung
- Redoxcycling

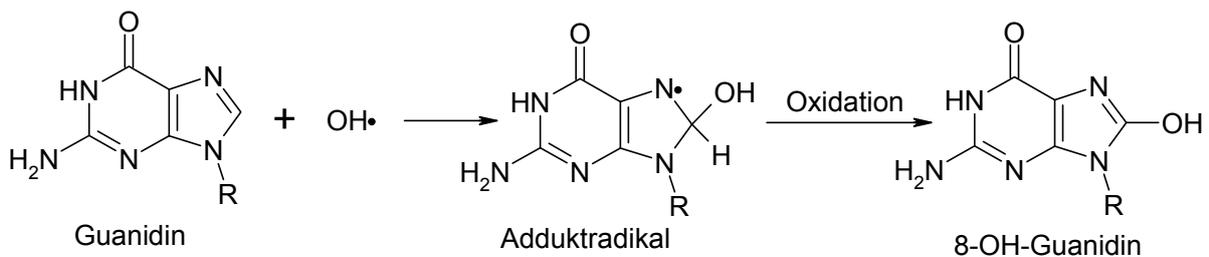
Zu den reaktiven Agenzien zählen das Superoxidradikalanion ( $O_2^{\cdot-}$ ), das Hydroxylradikal ( $\cdot OH$ ), Singulett-Sauerstoff ( $^1O_2$ ) und auch Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ), wobei das Hydroxylradikal mit einer Halbwertszeit von unter einer Nanosekunde als reaktivstes Agens wirkt. Es entsteht in Anwesenheit redoxaktiver Metalle, wie Eisen und Kupfer, welche den zellulären Redoxstatus kontrollieren, über die so genannte Fentonreaktion:



Zum Schutz vor reaktiven Sauerstoffspezies besitzt die Zelle Antioxidantien und Enzyme zum Abbau der ROS, wie Glutathionperoxidase, Superoxiddismutase oder Katalase. Die Superoxiddismutase katalysiert die Dismutation des Superoxidradikalanions:



Das Enzym arbeitet meist zusammen mit Wasserstoffperoxid-abbauenden Enzymen wie Katalase und Glutathionperoxidase. Die Katalase katalysiert die Dismutation von  $\text{H}_2\text{O}_2$  zu  $\text{H}_2\text{O}$ . Diese Schutzmechanismen fangen den größten Teil der gebildeten ROS ab. Es kann jedoch auch zu Reaktionen der ROS mit Biomolekülen wie Proteinen oder der DNA kommen. Entsteht beispielsweise das Hydroxylradikal in der Nähe der DNA kann dies zur Radikalreaktionen mit den DNA-Basen oder mit dem Zucker-Phosphat-Rückgrat und so zu geschädigten Basen und Strangbrüchen führen. Das Radikal kann ein Wasserstoffatom von der pyrimidinen Methylgruppe oder des Zuckers abstrahieren oder durch eine radikalische Additionsreaktion mit der DNA ein Addukt bilden. Das bekannteste Beispiel für ein Hydroxyladdukt ist das 8-OH-Guanin (Abb. 8), das mutagen und kanzerogen wirkt. Daher eignet es sich sehr gut als Biomarker für oxidativen Stress und kann durch chromatographische Auftrennung bestimmt werden (Valko et al. 2004, Friedberg 2003).

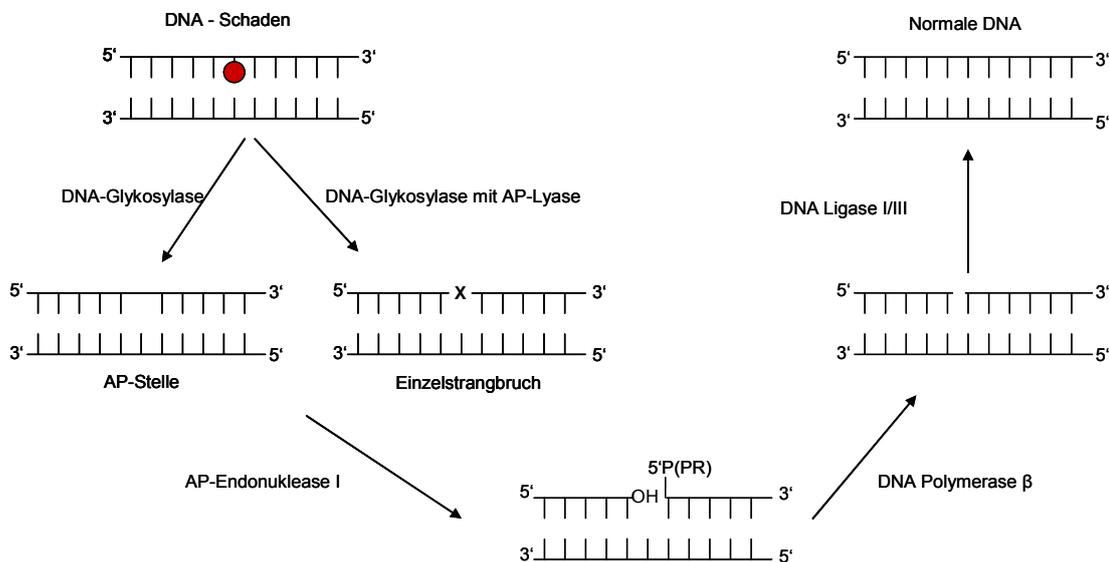


**Abb. 8:** Entstehung des 8-Hydroxyguanidin durch Addition eines Hydroxylradikals und Oxidation

Die Zelle besitzt neben den Abwehrmechanismen gegen oxidativen Stress eine Vielzahl weiterer Schutz- und Reparatursysteme. Es konnten bislang etwa 130 DNA-Reparaturgene identifiziert werden deren Funktion jedoch teilweise noch nicht aufgeklärt werden konnte. Die DNA-Reparaturgene können in Untergruppen gegliedert werden: Gene, die mit der Signalübermittlung und der Regulation der DNA-Reparatur in Verbindung stehen und solche, die mit bestimmten Reparaturmechanismen verbunden sind (Christmann et al. 2003, Helleday et al. 2007, Lake und Bedford 2007). Die folgenden Reparaturmechanismen werden unterschieden:

- **Direkte Aufhebung des DNA Schadens.** DNA-Schäden, welche direkt aufgehoben werden können sind beispielsweise N- und O-Alkylierungen der Pyrimidine oder Purine. Eine der häufigsten Veränderung dieser Art ist die Methylierung des Guanins in O<sup>6</sup>-Position, welche ohne Reparatur zu einer Fehlpaarung und Mutation von GC nach AT führt. Die Reparatur erfolgt bei O<sup>6</sup>-Alkylierungen durch die O<sup>6</sup>-Methylguanin-DNA-Methyltransferase.

- **„Mismatch“ Reparatur (MMR).** Mit Hilfe von MMR können spontane oder durch Desaminierung oder Oxidation der Basen verursachte Fehlpaarungen, wie G/T, G/G, A/C oder C/C erkannt und behoben werden.
- **„Base Excision Repair“ (BER).** Dieser Mechanismus ist zuständig für die Erkennung und Entfernung von veränderten DNA-Basen, wie beispielsweise oxidierten Basen, die durch Spontanoxidation in der Zelle oder durch exogenen Einfluss entstehen können (Izumi et al. 2003). Das bekannteste Oxidationsprodukt, das über diesen Mechanismus erkannt wird ist das 8-oxo-7,8-Dihydroguanin (8-OxoG), welches im Gleichgewicht mit dem 8-OH-Guanin steht (Abb. 8) und ein starkes Mutagen ist, da es eine Fehlpaarung mit Adenin eingeht. Eine DNA-Glykosylase entfernt die oxidierte Base und generiert eine apyrimidine- oder apurine-Stelle (AP-Stelle) oder einen Einzelstrangbruch mit einem 3'- $\alpha,\beta$ -ungesättigten Aldehyd (3'-PUA). Die apurine/apyrimidine Stelle-erkennende Endonuklease (APE-1) wandelt das 3'-Ende in ein 3'-OH. Die Polymerase  $\beta$  ersetzt die 5'-abasischen Stelle durch ein neues Nukleotid. Die DNA Ligase I oder III verschließt den Strangbruch. Auch alkylierte DNA-Basen werden zum Teil durch BER repariert.

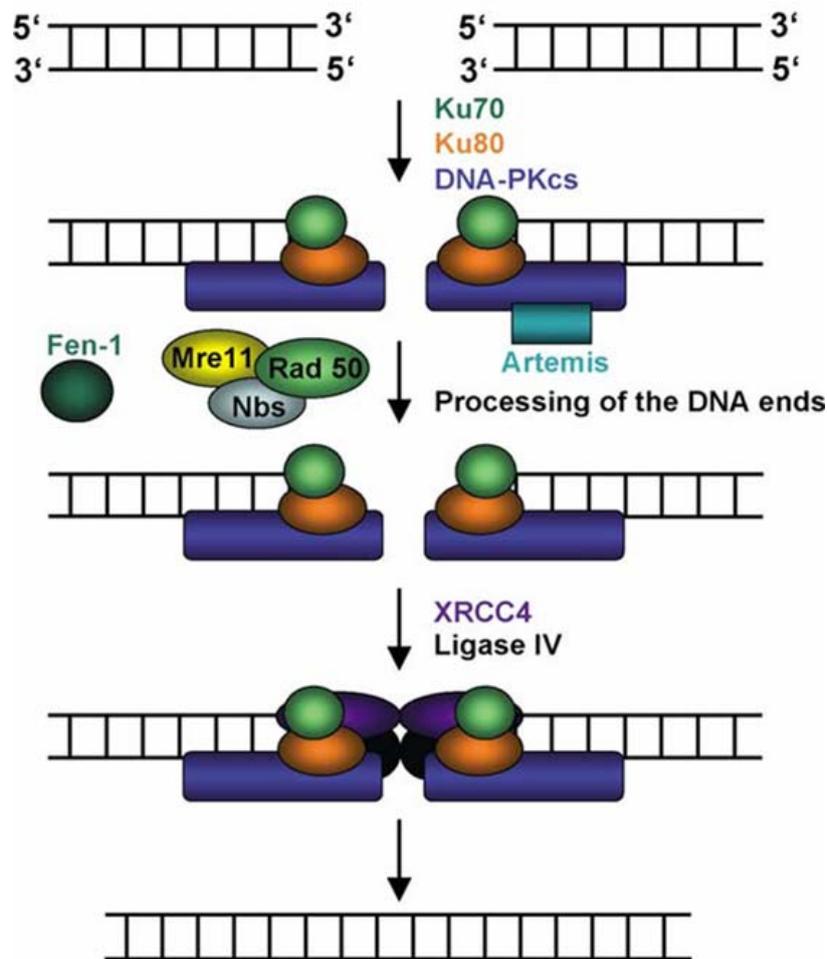


**Abb. 9:** Vereinfachte Darstellung der „base excision repair“ (Izumi et al. 2003). Die DNA-Glykosylase entfernt die oxidierte Base und generiert eine AP-Stelle oder einen Einzelstrangbruch mit einem 3'-PUA (X). Die APE-1 wandelt das 3'-Ende in ein 3'-OH. Die Polymerase  $\beta$  ersetzt die 5'-abasische Stelle durch ein neues Nukleotid. Die DNA Ligase I oder III verschließt den Strangbruch.

- **„Nucleotid Excision Repair“ (NER).** Sperrige DNA-Schäden, wie Addukte mit Chemikalien wie Aflatoxinen oder Benzo[a]pyren werden durch NER repariert.

Dabei sind etwa 30 Proteine in den komplexen Mechanismus involviert. Dabei wird ein Teil eines DNA-Strangs entfernt und danach die DNA durch Polymerisation und Verschluss wieder in ihren Ursprungszustand gebracht.

- **Reparatur von Doppelstrangbrüchen.** Doppelstrangbrüche induzieren potent genotoxisches Effekte wie Chromosomenbrüche oder chromosomale Wechsel oder führen zum programmierten Zelltod (s.S. 13ff). Bei der Reparatur von Doppelstrangbrüchen werden zwei Wege unterschieden, die homologe Rekombination (HR) und das nicht-homologe Zusammenfügen zweier Enden (non-homologous end-joining, NHEJ), wobei in Säugern der zweite Weg dominiert.



**Abb. 10:** Reparatur von Doppelstrangbrüchen durch „non-homologous end-joining“ (Hefferin und Tomkinson 2005). Ku70 und Ku80, Proteine mit einer Größe von 70 bzw. 80 AS; DNA-PKcs, DNA-Proteinkinase c; Fen-1, Ligase; Mre11, eine Endonuklease; Rad50, eine Exonuklease; Nbs1, eine Helicase; XRCC4, ein Phosphoprotein

Das NHEJ-System kann Doppelstrangbrüche ohne Sequenzhomologie der Enden verbinden. Dazu bindet zunächst ein heterodimerer Proteinkomplex aus Ku70 und Ku80 an die beiden Enden damit diese nicht durch Exonukleasen abgebaut werden. Anschließend bindet die katalytische Untereinheit der DNA-abhängigen Proteinkinase (DNA-PKcs) an diesen Komplex und bildet so das aktive DNA-PK-Holoenzym, einer zellulären Serin/Threoninkinase. Ein Ziel für dieses Enzym ist das Phosphoprotein XRCC4, welches an eine Ligase 4 gekoppelt ist. Dieser Komplex bindet an die DNA-Enden und verbindet diese miteinander. Die meisten Doppelstrangbrüche können jedoch nicht sofort verschlossen werden sondern müssen zunächst vorbereitet werden indem durch einen Enzymkomplex, der eine Endonuklease-, Exonuklease- und Helicaseaktivität besitzt (MRE11-Rad50-NBS1), ein DNA-Überhang erzeugt wird. Zudem ist noch das Protein Artemins, eine einzelstrang-spezifische Exonuklease, an der Bildung von DNA-Überhängen beteiligt (Critchlow and Jackson 1998, Hefferin and Tomkinson 2005).

### **Apoptose**

Als Apoptose wird der programmierte oder aktive Zelltod bezeichnet, der für die Regulation der Gewebshomöostase eine wichtige Rolle spielt. Die Regulation der Apoptose ist direkt abhängig vom physiologischen Zustand der Zelle und eine fehlerhafte Regulation dieses Mechanismus' resultiert in der Entwicklung von Gendefekten, Autoimmunkrankheiten, Neurodegeneration und Krebs. Die charakteristischen pathophysiologischen Merkmale der Apoptose sind eine poröse Zellmembran, ein Schrumpfen der Zelle, Chromatinkondensation und DNA-Fragmentierung. Schließlich wird der Inhalt der sterbenden Zellen in die so genannten apoptotischen Körperchen verpackt und von benachbarten Makrophagen aufgenommen (Jin und El-Deiry 2005).

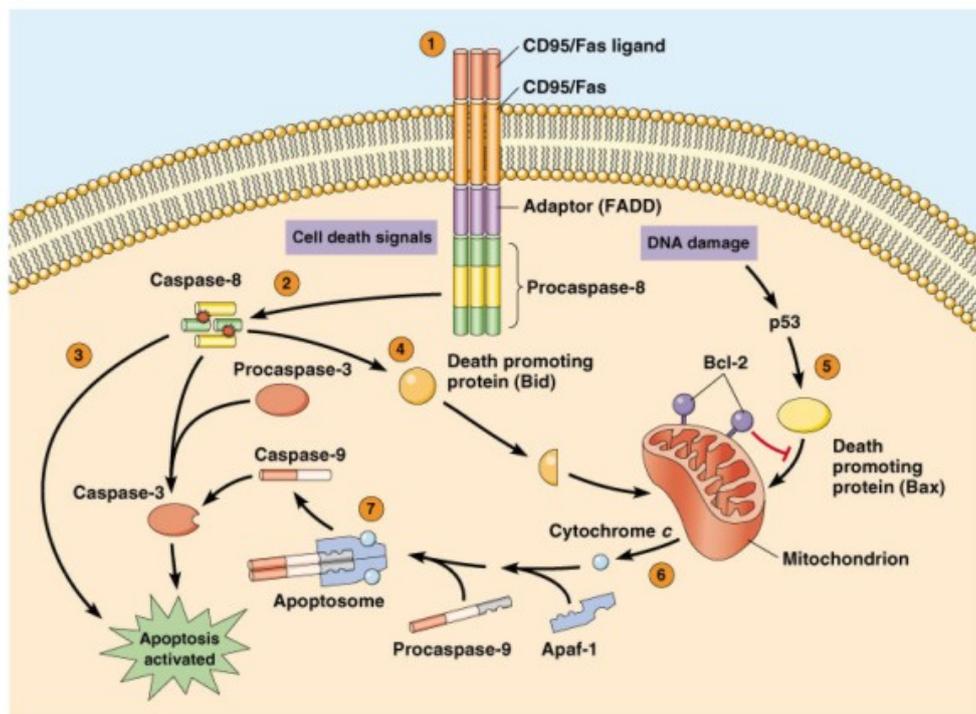
Die Apoptose wird über zwei unterschiedliche Wege eingeleitet, den extrinsischen Weg und den intrinsischen Weg. Bei beiden Signalwegen dienen spezielle Proteasen, die Caspasen als Haupteffektoren. Die Aktivierung des extrinsischen Wegs wird durch Bindung eines Liganden an den „Todesrezeptor“ eingeleitet. Der intrinsische Weg hingegen wird über DNA-Schäden aktiviert, wobei die Mitochondrien involviert sind (Green et al. 2004).

Der extrinsische Signalweg wird durch die Bindung verschiedener Substrate an spezielle Oberflächenrezeptoren, die so genannten „Todesrezeptoren“ ausgelöst. Nach Ligandenbindung oligomerisiert der Rezeptor, rekrutiert das Adaptorprotein FADD (Fas-associated death domain) und Caspase 8 und bildet mit diesen zusammen den DIS-Komplex (death-

induced signaling). Auf die Autoaktivierung der Caspase 8 in diesem Komplex folgt die Aktivierung der Effektorcaspasen (Caspasen 3, 6 und 8).

Der intrinsische Signalweg wird über unterschiedliche apoptotische Stimuli aktiviert, die alle im Mitochondrium zusammenlaufen. Nach Abgabe von Cytochrom c aus dem Mitochondrium in das Plasma bindet dieses an den Apoptose-Protease-aktivierenden Faktor 1 (Apaf-1) und an die Procaspase 9 und formt so einen Komplex, Apoptosom genannt. In diesem Komplex wird nun die Caspase 9 aktiviert und kann nun die Procaspase 3 aktivieren.

Die Caspase 3 aktiviert anschließend weitere Proteasen und Nuklearen, die die terminalen Ereignisse des programmierten Zelltodes einleiten. Dazu zählen die Verpackung des zellulären Inhalts in die so genannten apoptotischen Körperchen und die anschließende Phagozytose.



**Abb. 11:** Signalwege der Apoptose (Hengartner 2000). C-Flip, anti-apoptisches Protein; FADD, Adaptorprotein; CD95L, ; BclL, anti-apoptisches Protein; Bcl-2, regulierendes Protein; Bax, Kofaktor von p53; p53, Tumorsuppressorgene AF, Apoptosefaktor; Apaf-1, Apoptose-Protease-aktivierenden Faktor 1; Bid, „BH3 interacting domain death agonist“; IAPs, Apoptose-hemmendes Protein

Bisher konnten 14 Caspasen (Effektorproteine) identifiziert werden. Sie werden als inaktive Zymogene mit einer Prodomäne, einer großen (p20) und einer kleinen (p10) und synthetisiert.

Die aktiven Enzyme bestehen dann aus einem Heterotetramer zweier p20/p10 Heterodimere mit zwei aktiven Zentren. Die Einzigartigkeit der Proteasen erklärt sich über die Fähigkeit der Spaltung einer Bindung zwischen Asparaginsäure und einer weiteren Aminosäure. Aufgrund ihrer Funktion können die Caspasen in drei Gruppen eingeteilt werden: Entzündungsvermittelte oder stress-induzierte Caspasen (1, 4, 5, 11, 12, 13), apoptotische Initiatorcaspasen mit einer langen Prodomäne (extrinsisch: 8 und 10; intrinsisch 2 und 9) und apoptotische Effektorcaspasen (3, 6 und 7).

Es konnte bereits gezeigt werden, dass Polyphenole verschiedene Elemente der Apoptoseinduktion modulieren (Tab. 1, Martin 2006).

**Tab. 1:** Modulation der Apoptose durch Polyphenole (nach Martin 2006)

<b>Polyphenol</b>	<b>Vorkommen</b>	<b>Art der Modulation</b>
Epigallocatechin-3-gallat	Grüntee, Schokolade	Aktiviert FAS Hemmt NF-κB Caspaseaktivierung Veränderte Membranfunktion
Catechin	Tee	Hemmt p38, PI3K, und AP-1 Aktivierung
Genistein	Sojabohnen	Hemmt NF-κB Aktiviert Caspasen Induziert Bax
Resveratrol	Rote Trauben, Beeren, Erdnüsse	Hemmt NF-κB Aktiviert Caspasen Induziert Fas-Ligand
Curcumin	Curry, Kurkuma, Senf	Hemmt NF-κB und AP-1 Aktiviert Caspasen Induziert Bax Unterbricht MTP
Ellagsäure	Erdbeeren, Walnüsse,	Erhöht Caspase 3-Aktivierung

## Theoretische Grundlagen

---

	Pekannüsse	Hochregulation von p53 Aktiviert MAPK, JNK, p38
--	------------	--

## Humane Topoisomerasen

Die Strukturaufklärung der DNA-Doppelhelix warf weitere Fragen auf, beispielsweise wie die Replikationsgabel angreifen soll, wenn die DNA eng strukturiert vorliegt. Die Struktur der DNA weist für die Replikationsapparatur enorme topologische Probleme auf. Die DNA hat jedoch eine dynamische Struktur. Sie kann gekrümmt oder geknickt auftreten und entwunden werden. Eine wichtige topologische Eigenschaft der DNA ist ihre Verwindungszahl. Sie ist definiert als die Anzahl der Rechtswindungen eines DNA-Strangs um den anderen. Topoisomerasen sind Enzyme, welche den topologischen Status der DNA verändern können indem sie transiente Strangbrüche im Zucker-Phosphat-Rückgrat generieren. Dabei bilden die Enzyme kovalente Bindungen mit dem DNA-Rückgrat aus. So können sie die Verwindungszahl der DNA und damit die räumliche Struktur der DNA verändern (Boege 1996, Osheroff 1998).

Kurz nach der Aufklärung ihrer Wirkung war klar, dass die Topoisomerasen eine entscheidende Rolle bei der Teilung und Aktivität von Zellen, sowie in jedem Aspekt des DNA-Metabolismus, der Replikation, der Transkription und der Rekombination spielen (Hardy et al. 2004).

**Tab. 2:** Klassen der Topoisomerasen (Topo) und deren Eigenschaften, VZ: Verwindungszahl, fett gedruckt: humane Topoisomerasen

Typ	Tyrosin- bindung	Enzyme	DNA- Schritt	Veränderung der VZ	ATP	Mg <sup>2+</sup> - Cofaktor
IA	5'-Ende	Bakterielle Topo I + III <b>Topo III<math>\alpha</math>/<math>\beta</math></b> Reverse Gyrase	Einzelstrang	+1	-	+
IB	3'-Ende	<b>Topo I</b> Topo V	Einzelstrang	+/- n	-	-
IIA	5'-Ende	<b>Topo II<math>\alpha</math>/<math>\beta</math></b> DNA-Gyrase Topo IV	Doppelstrang	+/- 2	+	+

IIB	5'-Ende	Topo VI	Einzelstrang	+/- 2	+	+
-----	---------	---------	--------------	-------	---	---

Topoisomerasen werden aufgrund ihrer Struktur, ihrer Aktivität und ihres Vorkommens in verschiedene Klassen und Typen unterteilt. In Säugern existieren drei Klassen von dieser Enzymgruppe, bekannt als Typ I, Typ II und Typ III - Topoisomerasen:

- Typ I - Topoisomerasen agieren indem sie transiente Einzelstrangbrüche in das Rückgrat der DNA einführen und dem Molekül somit eine kontrollierte Rotation oder ein Durchführen des komplementären DNA-Strangs ermöglichen. Das Resultat dieses Vorgangs ist, dass die Enzyme so die Über- oder Unterverwindung der Doppelhelix regulieren können.
- Typ II - Topoisomerasen hingegen führen transiente Doppelstrangbrüche ein und ermöglichen das Durchführen eines weiteren Doppelstrangs durch die Bruchstelle. Diese Enzyme sind also in der Lage ineinander verkettete Tochterchromosome zu trennen (Osheroff 1998).
- Über die genau Wirkung der Typ III – Topoisomerasen ist noch wenig bekannt und daher wird auf diesen Typ im Rahmen dieser Arbeit nicht näher eingegangen.

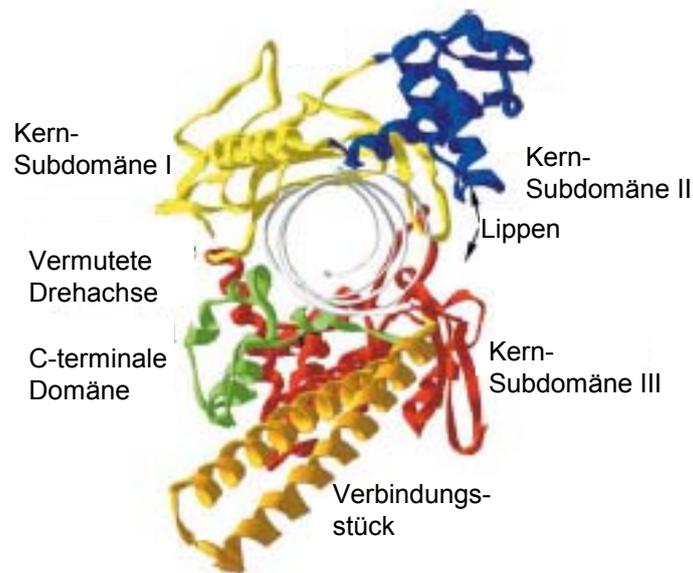
In den 1980er Jahren eröffnete sich ein weiteres interessantes Forschungsgebiet auf diesem Feld als entdeckt wurde, dass Topoisomerasen ein primäres Ziel für eine Vielzahl von klinisch interessanten, zytotoxischen Substanzen sind. Topoisomerase-hemmende Substanzen wirken antibakteriell und töten Krebszellen in einer einzigartigen Weise (Osheroff 1998).

Die Reaktion der Topoisomerase mit der DNA ist abhängig von der Ionenstärke, dem pH-Wert, der Temperatur und der Magnesiumkonzentration. Der Einfluss der Ionenstärke bei der Reaktion der Topoisomerase mit der DNA zeigten Osheroff et al. 1983. Die optimale Ionenstärke wird bei Salzkonzentrationen zwischen 100 und 150  $\mu\text{M}$  erreicht. Die Magnesiumkonzentration sollte zwischen 5 und 10  $\mu\text{M}$  liegen. Bei der Verwendung von Tris-Puffer tritt erst bei einem  $\text{pH} > 6,5$  eine Enzymaktivität auf, die dann mit höherem pH-Wert zunimmt. Das Temperaturoptimum für die Enzymaktivität liegt bei  $30^\circ\text{C}$  (Osheroff et al. 1983, Osheroff 1986).

## Topoisomerase I

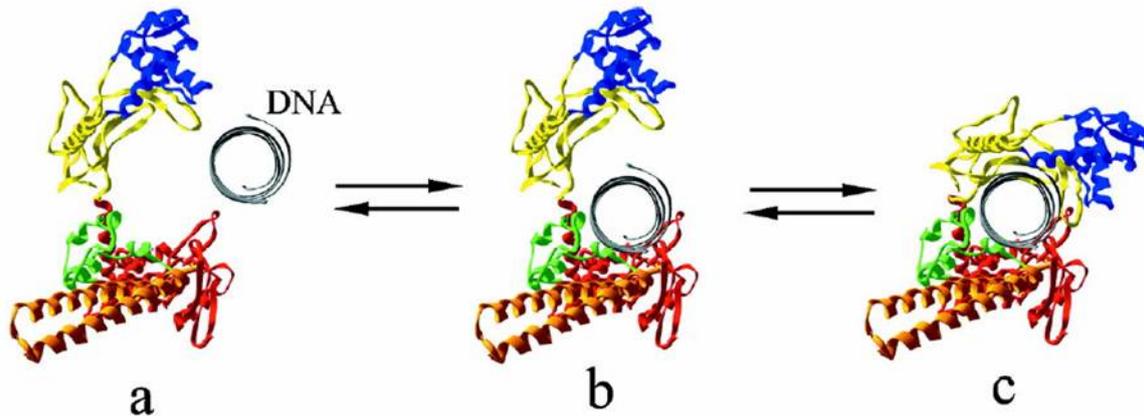
Topoisomerase-I-Enzyme sind Monomere mit einer Größe von 80 bis 100 kDa und einem Tyrosin (Y723) im aktiven Zentrum. Diese Enzyme schneiden einen Einzelstrang der DNA während der Katalyse und führen einen zweiten DNA-Strang durch die entstandene Lücke (Berger, 1998).

Die eukaryotische Topoisomerase I ist die einzig bekannte Topoisomerase I, die kovalent an die DNA bindet. Die human Topoisomerase I ist etwa  $55 \times 70 \times 85 \text{ \AA}$  und 91 kDa groß und enthält wie in Abbildung 12 gezeigt verschiedene Untereinheiten: die N-terminale Domäne, die Kernsubdomänen I – III, eine Verbindungsdomäne und die C-terminale Domäne. Das aktive Zentrum mit dem Tyrosin 723 ist in der C-terminalen Domäne lokalisiert (Champoux 2001, Stewart 1997).



**Abb. 12:** Die Struktur der Topoisomerase I mit DNA. Die verschiedenen Domänen sind farblich voneinander abgehoben, Kernsubdomänen I – III (gelb, blau, rot), die Verbindungsdomäne (orange) und die C-terminale Domäne (grün) (nach Champoux 2001).

Schematisch kann die Topoisomerase auch als leicht geöffnete Hand dargestellt werden. Dabei bilden die Subdomänen I und II die vier Finger, die Verbindungseinheit den Daumen und die Subdomäne III und die C-terminale Domäne die Handfläche (Abb. 13).

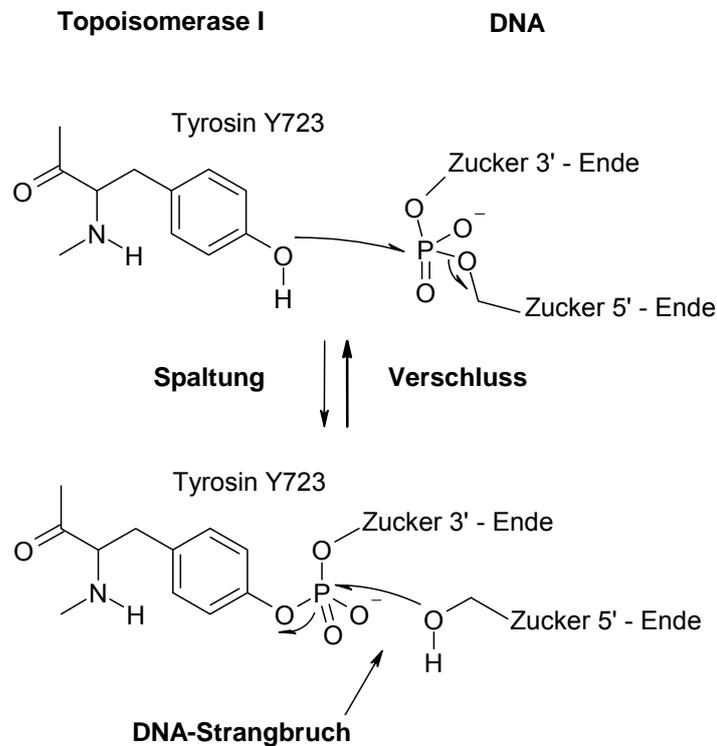


**Abb. 13:** Modell des Mechanismus der Topoisomerase I – Bindung an die DNA (modifiziert nach Champoux 2001). a) Das Enzym erkennt eine Bindungsstelle an der DNA. b) Das aktive Zentrum bindet an die DNA. c) Stabilisierung des DNA-Enzym-Intermediats durch Konformationsänderung

Anhand dieses Modells kann der katalytische Zyklus des Enzyms verständlich gemacht werden. Dieser kann in vier Schritte unterteilt werden: Enzymbindung an die DNA, Einführung eines DNA-Strangbruchs, Einzelstrangpassage und Verschluss des Strangbruchs. Die einzelnen Schritte laufen wie folgt erklärt ab.

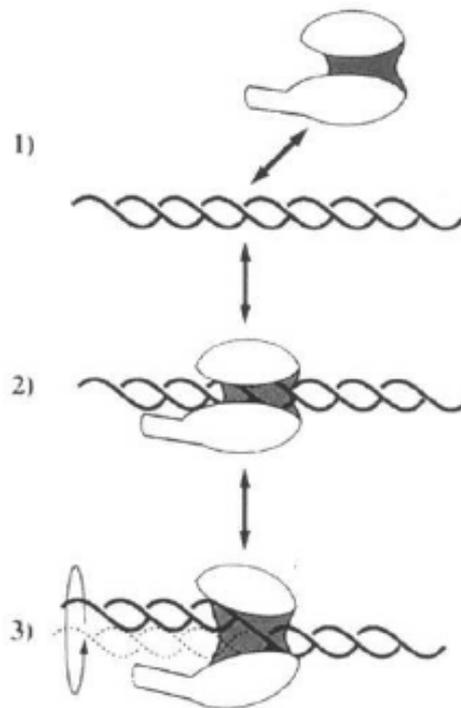
1. **Das Enzym bindet an die DNA:** Die humane Topoisomerase I umgreift die DNA mit den „Fingern“ (Subdomänen I und II) und der „Handinnenfläche“ (Subdomäne III und C-terminale Ende) des Enzyms, durch verschiedene Enzym-DNA-Interaktionen am Zucker-Phosphat-Rückgrat der DNA. Die meisten DNA-Enzym-Kontakte befinden sich dabei in der Nähe der Bruchstelle und werden von den Aminosäuren Arg-488, Lys-532, Arg-590 und His-623 über Wasserstoffbrücken mit der DNA gebildet (Interthal 2004). Die DNA wird dadurch für das Schneiden positioniert. Hierbei ist zu beachten, dass die Topoisomerase I nur an doppelsträngige DNA bindet, nicht an Einzelstrangsequenzen. Die Bindung ist dort am effektivsten, wo die DNA superspiralisiert vorliegt.
2. **Einführung eines DNA-Strangbruchs:** Die Topoisomerase I bindet kovalent an das 3'-Ende der DNA und bildet einen DNA-Enzym-Komplex, den so genannten „cleavage“ Komplex mit der DNA. Dabei bindet das Tyrosin (Y723) im aktiven Zentrum des Enzyms an ein 3'-Phosphat unter Ausbildung eines Strangbruchs und generiert so eine freie 5'-Hydroxygruppe. Dies geschieht durch einen nukleophilen Angriff des Tyr-723 an einem Phosphat der DNA (Abb. 14). Die Reaktion ist sensitiv

gegenüber physiologischen Modifikationen der DNA, wie Cytosinmethylierung, Anwesenheit von abasischen Stellen, Uracilsubstitution und Fehlpaarungen.



**Abb. 14:** Nukleophiler Angriff des Tyrosins Y723 im aktiven Zentrum der Topoisomerase I am Phosphat des 3'-Endes eines DNA-Strangs und zweite Transesterbindung zum Verschluss des Strangbruchs durch nukleophilen Angriff des freien Hydroxysauerstoffs des 5'-Endes (modifiziert nach Pommier 1998).

3. **Einzelstrangpassage:** Beim Rotationsmodell wird angenommen, dass der geschnittene Strang stationär gehalten wird, während der ungeschnittene Strang gedreht und so eine Windung der DNA gelöst wird (Stewart 1998).



**Abb. 15:** Das Rotationsmodell der Topoisomerase I. 1) Die Topoisomerase lagert an die DNA an. 2) Das Enzym bindet an die DNA und fügt einen Einzelstrangbruch ein. 3) Der ungeschnittene Strang wird durch Rotation durch die entstandene Lücke geführt und die DNA so um eine Verwindung entwunden (Berger 1998).

4. **DNA-Verschluss:** Der DNA-Verschluss ist eine zweite Transesterreaktion. Die 5'-Hydroxylgruppe des geschnittenen Strangs wirkt nun als Nukleophil und greift die Phosphotyrosinbindung an und die Bruchstelle wird wieder verschlossen. Die Energie für diese Reaktion stammt aus der gespeicherten Energie der superspiralisierten DNA (Pommier 1998, Berger 1998). Lys-532 spielt beim Verschluss der Bruchstelle eine wichtige Rolle indem es als Protonendonator für den 5'-Sauerstoff fungiert und so zum Entlassen der DNA aus dem Enzym beiträgt (Interthal et al. 2004).

Die Topoisomerase I kann durch diesen Mechanismus die superspiralisierte DNA entwenden und wieder verdrillen, sowohl positiv, wie auch negativ. So ermöglicht sie der Replikationsgabel den Zugang und die Durchführung der Replikation.

Baker et al. konnten 1995 zeigen, dass die Topoisomerase I konstitutiv während des gesamten Zellzyklus exprimiert wird. Das Enzym ist vor allem im Zellkern und Nukleolus lokalisiert, wobei die N-terminale Domäne eine wichtige Rolle für die Lokalisation spielt und außerdem eine Verbindung der Topoisomerase I mit dem RNA-Polymerase I – Holoenzym des

Nukleolus vermittelt (Christensen et al. 2004). Es findet jedoch ein dynamischer Austausch der Topoisomerase I zwischen dem Nukleoplasma und dem Nukleolus statt, mit einer Anhäufung des Enzyms im Nukleolus:

- Protein-Protein-Wechselwirkungen und der Verbindung des Enzyms mit der DNA während der Transkription und Replikation
- geringeren Mobilität des Enzyms im Nukleolus verglichen mit der Mobilität im Nukleoplasma (Christensen et al. 2003)

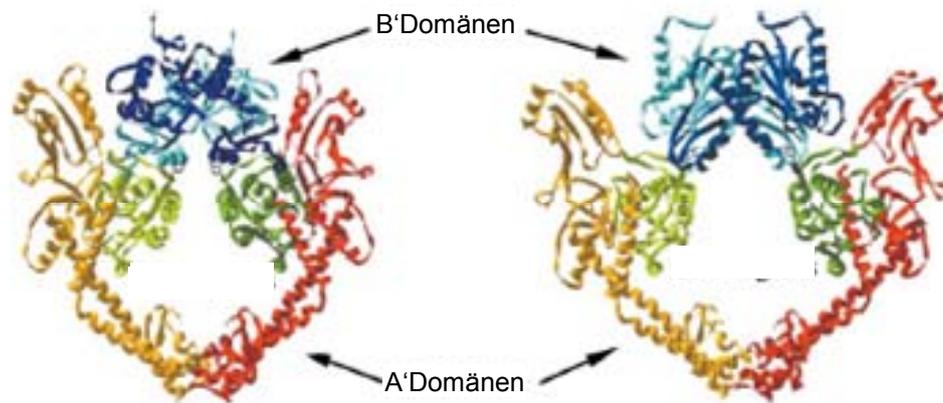
Hierbei können die Protein-Protein-Wechselwirkungen zur verminderten Mobilität des Enzyms im Nukleolus beitragen.

### **Topoisomerase II**

Da die DNA nicht nur einfach verwunden ist sondern eine komplexe ineinander verschlungene Struktur besitzt müssen zur Entwindung auch Doppelstränge entwirrt werden. Dies kann die Topoisomerase I nicht leisten und ein zweites Enzym, die Topoisomerase II, welche einen transienten Doppelstrangbruch im Zucker-Phosphat-Rückgrat der DNA einfügen kann, wird benötigt. Das Typ II – Enzym arbeitet als Homodimer mit einer Gesamtgröße von etwa  $75 \times 70 \times 75 \text{ \AA}$ . Es sind zwei Isoformen der Topoisomerase II bekannt, Topoisomerase II $\alpha$  mit einem Gewicht von 170 kDa und Topoisomerase II $\beta$  mit einem Gewicht von 180 kDa. Topoisomerase II $\beta$  wird, wie Topoisomerase I während des kompletten Zellzykluses exprimiert, während die  $\alpha$ -Isoform vorwiegend während der Mitose exprimiert wird (Meyer et al. 1997, Austin et al. 1992, Wilstermann und Osheroff 2003). Die Isoformen unterscheiden sich nicht nur in Molekulargewicht und Expression während des Zellzykluses sondern auch in ihrer Funktion (Burden und Osheroff 1998, Mandraju et al. 2007). Die Topoisomerase II $\beta$  übernimmt die so genannten „housekeeping“ Funktionen, unabhängig in welcher Zellzyklusphase sich die Zelle befindet. Bei der Zellteilung hingegen übernimmt die Topoisomerase II $\alpha$  die Aufgabe die DNA-Topologie zu regulieren, sie ist somit an Prozessen wie der Replikation und der Trennung der Tochterchromatiden beteiligt. Eine vollständige Unterscheidung der Aufgabengebiete der beiden Isoformen kann jedoch nicht getroffen werden, da auch Heterodimere zwischen Topoisomerase II $\alpha$  und II $\beta$  ausgebildet werden (Burden und Osheroff, 1998). Die Unterschiede in der Funktion der beiden Isoformen spielt auch bei der Wirkung von Topoisomerasegiften eine Rolle. Eine

Hemmung der Topoisomerase II $\alpha$  führt zu einer effektiveren Hemmung des Zellwachstums als eine Hemmung der  $\beta$ -Isoform (Azarova et al. 2007).

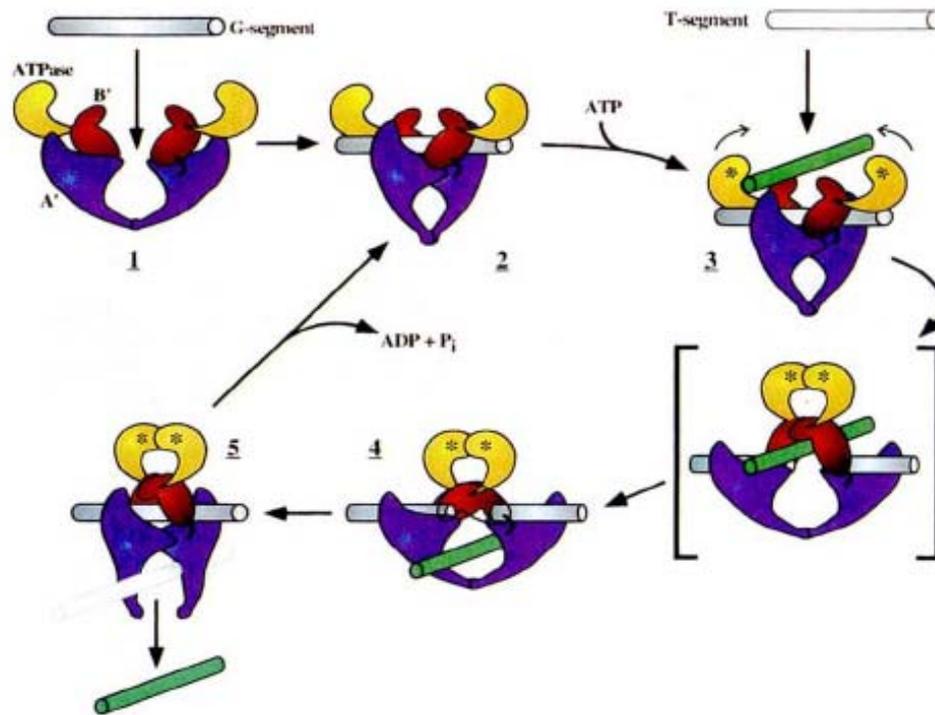
Die Topoisomerase II-Struktur wird in drei Domänen unterteilt (Abb. 16). Am N-terminale Ende bis AS160 befindet sich eine B'-Domäne mit einer ATP-Bindungstasche. Die A'-Domäne (AS161-1200) beinhaltet das aktive Zentrum mit dem Tyrosin 723. Das carboxyterminale Ende ist eine variable Domäne und trägt die nukleare Lokalisationssequenz (Burden und Osheroff 1998).



**Abb. 16:** Die Struktur der Topoisomerase II mit den drei Domänen A' (gelb und rot), B' (hellblau und blau) und der variablen Domäne (hellgrün und grün). Links: halboffene Form, rechts: offene Form (Berger 1998)

In einer Reaktion, in der die ATP-Bindung- und ATP-Hydrolyse-gekoppelt ist, schneiden diese Proteine einen Doppelstrang der DNA, transportieren einen zweiten Doppelstrang durch die Öffnung und verschließen diese wieder (Berger 1998, Issacs et al. 1998).

Das Modell der Topoisomerase besteht aus drei verstellbaren Klemmen, die durch je ein Set von Scharnieren verschlossen werden können. Dabei wird die eine Klemme, die ATPase-Domäne, geöffnet und verschlossen durch ATP-Bindung und ATP-Hydrolyse. Die zweite Klemme (B'-Domäne) ist für die Stabilisierung des ungeschnittenen DNA-Strangs und die dritte Klemme (A'-Domäne) für die Stabilisierung des zu schneidenden DNA-Strangs und das Einfügen des DNA-Doppelstrangbruchs verantwortlich.



**Abb. 17:** Der katalytische Kreislauf der Topoisomerase II. 1) Anlagerung des Enzyms an einen DNA-Doppelstrang (G-segment) 2) Konformationsänderung des Enzyms und Bindung an diesen Strang 3) ATP-Bindung, Bindung eines zweiten DNA-Strangs (T-segment), Einführung eines DNA-Doppelstrangbruchs im G-segment 4) Transport des zweiten Doppelstrangs durch die Lücke Verschieben des Strangbruchs, 5) Konformationsänderung und Öffnen des Enzyms zur Freigabe des T-segments 6) ATP-Hydrolyse und Freigabe des T-segments, Enzym und DNA liegen wieder getrennt vor und können einen neuen Zyklus durchlaufen (modifiziert nach Berger 1998).

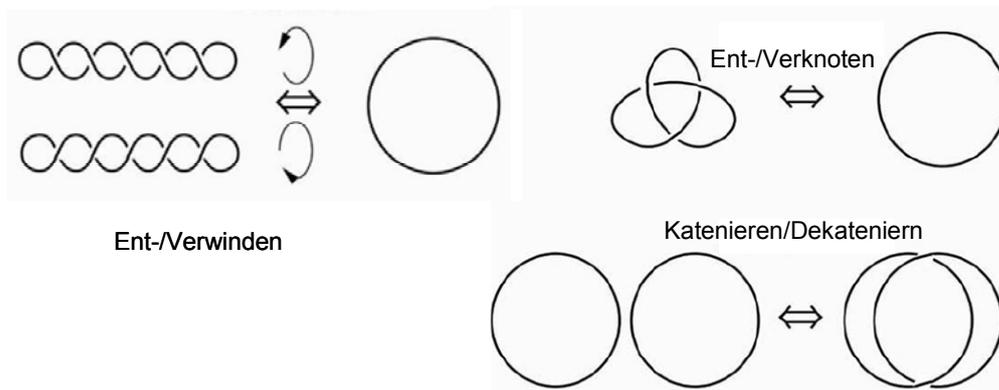
Der katalytische Kreislauf der Topoisomerase II kann in sechs Schritte unterteilt werden (Abb. 17):

1. **Bindung an die DNA:** Das Enzym erkennt topologische Strukturen und bindet vorzugsweise an superspiralisierte DNA. Neben der nicht sehr stark ausgeprägten Sequenzspezifität der Topoisomerase II für Teilungsstellen erkennt das Enzym unübliche DNA-Strukturen wie Haarnadelstrukturen, Z-geformte DNA und DNA-Tetraplexe.
2. **Schneiden des einen DNA-Strangs:** Zwei Tyrosine greifen an gegenüberliegenden Stellen der beiden Strängen einer Doppelhelix mit einem Abstand von 4-Basen an, um einen sicheren Wiederverschluss zu garantieren und binden kovalent unter Bildung einer 5'-Phosphotyrosinbindung an die DNA. Dabei befindet sich je ein Tyrosin in je

einem aktiven Zentrum eines Monomers. Die Nukleotidbindung treibt die Dimerisierung der ATPase-Domäne, das Schneiden des ersten Strangs und den Transport des zweiten Strangs durch die Schnittstelle an.

3. **Durchführen des zweiten DNA-Strangs:** Der ungeschnittene Strang wird durch Konformationsänderung des Enzyms nach ATP-Bindung durch die Schnittstelle hindurchgeführt. Dabei ist die alleinige Bindung des ATPs wichtig für die Konformationsänderung.
4. **Verschließen des geschnittenen DNA-Strangs:** Das Enzym baut ein Gleichgewicht zwischen Strangbruch und Wiederverschluss auf, wobei die Kinetik der Konformationsänderung vor und nach dem Transport des DNA-Strangs durch die Lücke vergleichbar sind. Nach dem Transport des ungeschnittenen Strangs durch die Schnittstelle wird diese wieder verschlossen und der durchgeführte Doppelstrang wird durch eine weitere Konformationsänderung aus dem Enzym entlassen.
5. **ATP-Hydrolyse:** Die ATPase-Domäne wird durch Hydrolyse von ATP wieder geöffnet und der verschlossene DNA-Strang wird wieder aus dem Enzym entlassen. Es ist ebenfalls beschrieben, dass die Hydrolyse auch schon zur Konformationsänderung des Enzyms beiträgt. Phosphorylierung des Enzyms an einer spezifischen Phosphorylierungsstelle in der variablen Domäne erhöht die Hydrolyserate um das zwei- bis dreifache.
6. **Enzymrecycling:** Nach der ATP-Hydrolyse kann auch der zuvor geschnittene DNA-Strang aus dem Enzym entlassen werden. Das Enzym steht nun wieder für eine weitere Reaktion zu Verfügung (Burden und Osheroff 1998).

Die Durchführung eines Doppelstrangs durch einen weiteren erlaubt dem Typ II Enzym Duplex DNA-Ringe zu katenieren und zu dekatenerieren sowie die superhelikale Struktur der DNA zu verändern (Abb. 18) (Burden und Osheroff 1998, Berger 1998).



**Abb. 18:** Strukturelle Veränderungen der DNA durch Topoisomerase II: Entwirren negativ- oder positivverdrillter DNA und positives oder negatives Verdrillen, Ver- und Entknoten von ineinander verschlungenen Doppelhelices, Katenieren und Dekatenieren von DNA-Zirkeln (Boege 1996).

Die Regulation der Topoisomerase II – Genexpression ist durch positive und negative Kontrollen gesteuert erkennbar sowohl an Promotoraktivität als auch an der mRNA-Stabilität. So spielt beispielsweise der Proliferationsstatus eine wichtige Rolle, da in nicht proliferierenden Zellen im Vergleich zu proliferierenden Zellen der steady-state-Level an Topoisomerase II $\alpha$  stark abgesenkt wird. In Tumorgewebe wurden verglichen mit normalem Gewebe hohe Mengen dieses Enzyms gefunden (Hasegawa 1993, Boege 1996). Daraus ergab sich, dass sich Topoisomerasehemmstoffe möglicherweise für die Krebstherapie eingesetzt werden könnten (Azarova et al. 2007).

### Hemmstoffe humaner Topoisomerasen

Humane Topoisomerasen bieten aufgrund ihrer Proliferations-unterstützenden Aktivität ein gutes Ziel für antikanzerogen wirkende Substanzen. Die Topoisomerasehemmstoffe können in zwei Klassen unterteilt werden, Topoisomerasegifte und katalytische Inhibitoren. Topoisomerasegifte können das Enzym-DNA-Intermediat stabilisieren. Durch Kollision mit der Replikationsgabel können so fatale DNA-Schäden entstehen. Katalytische Hemmstoffe binden an das Enzym bevor dieses an die DNA binden kann (Pommier 1998, Bailly 2000).

### **Katalytische Hemmstoffe humaner Topoisomerasen**

Katalytische Inhibitoren sind eine heterogene Gruppe von Substanzen. Sie können:

- die Bindung zwischen DNA und Topoisomerase behindern (Aclarubicin und Sumarin)
- nicht-kovalente Komplexe zwischen DNA und dem Enzym stabilisieren (Merabon, ICRF-187, Bisdioxopiperazinderivate)
- die ATP-Bindung bei der Topoisomerase II hemmen (Novobiocin).

Katalytische Topoisomerasehemmstoffe haben meist noch weitere zelluläre Zielorte und zusätzliche Aktivitäten. Während die Topoisomerasegifte wegen ihrer Antitumoraktivität medizinisch genutzt werden, weist die Nutzung katalytischer Inhibitoren eine Vielzahl von Gründen auf, ihre Aktivität als antineoplastische Agenzien (Aclarubicin und MST-16), als Kardioprotektoren (ICRF-187) oder zur Unterstützung anderer Chemotherapeutika (Sumarin und Novobiocin; Larsen et al., 2003b).

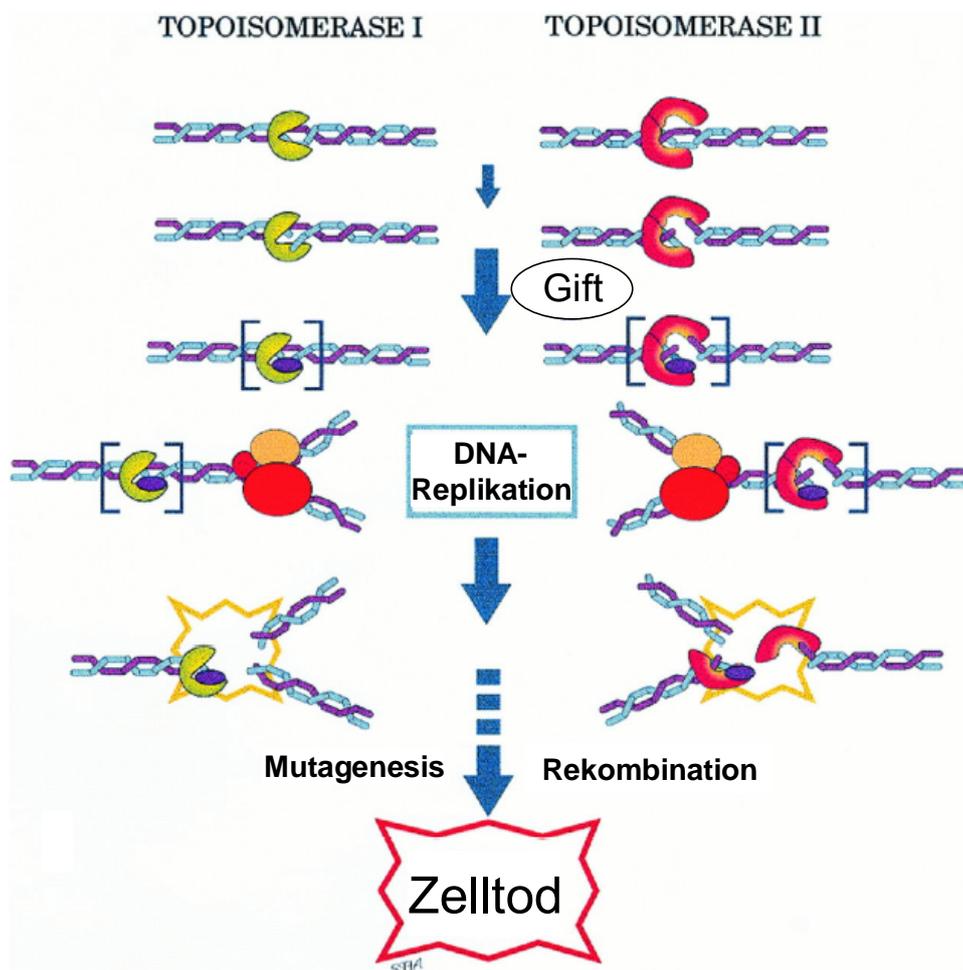
Katalytische Hemmstoffe können unter bestimmten Voraussetzungen auch einen G<sub>2</sub>-Arrest verursachen, wenn z.B. die Chromatiddekatenierung nicht komplett durchgeführt werden konnte (Exposition mit Merabon oder Aclarubicin). Für einige Substanzen (Novobiocin, ICRF-193, ICRF-187) ist auch ein Arrest in der Mitosephase beschrieben (Larsen et al. 2003a,b).

Die katalytischen Hemmstoffe finden klinischen Einsatz zum Schutz vor den Nebenwirkungen einiger Topoisomerasegifte (z.B. der Kardiotoxizität von Doxorubicin), zum Schutz vor Mutationen gesunder Zellen und zur Prävention von Resistenzen gegen Chemotherapeutika (Hochster et al. 1992, Ishida et al. 1996, Sargent et al. 2001).

### **Topoisomerasegifte**

Die Menge an Topoisomerase-DNA-Komplexen liegt regulär in der Zelle bei weniger als einem 1 % der gesamten Menge von Topoisomerase II $\alpha$ . Die Topoisomerase-induzierten DNA-Strangbrüche sind notwendig, aber wie jeder DNA-Schaden können sie auch eine Gefahr für die Zelle darstellen. Normalerweise wird durch die Topoisomerasen ein kurzlebiger, transienter, reversibler Komplex zwischen der DNA und dem Enzym erzeugt und es findet sich in der Zelle ein Grundgehalt an diesen Komplexen. Die zur Zeit in der Chemotherapie verwendeten Topoisomerase-modulierenden Substanzen, Etoposid, Doxorubicin erhöhen den zellulären Status an Enzym-DNA-Komplexen und verursachen so

schließlich den Tod der Zellen, indem sie die Topoisomerasen in „zelluläre Toxine“ verwandeln. Die Replikationsapparatur kann mit diesen Komplexen kollidieren und es resultieren daraus für die Zelle fatale DNA-Schäden (Abb. 19). Eine Substanz, die einen Strangbruch in der Nähe von Replikationsstellen oder Genen mit hoher Transkriptionsaktivität induzieren besitzt ein höheres toxisches Potential, als eine Substanz, die den Strangbruch an einer wenig aktiven Stelle des Genoms stabilisiert, da die Schädigung durch Topoisomerasegifte durch DNA-Replikation und Transkription verstärkt wird (Corbett und Osheroﬀ 1993, Anderson und Berger 1994, Froelich-Ammon und Osheroﬀ 1995, Wu und Liu 1997, Burden und Osheroﬀ 1998, Errington et al. 2004, Azarova et al. 2007).



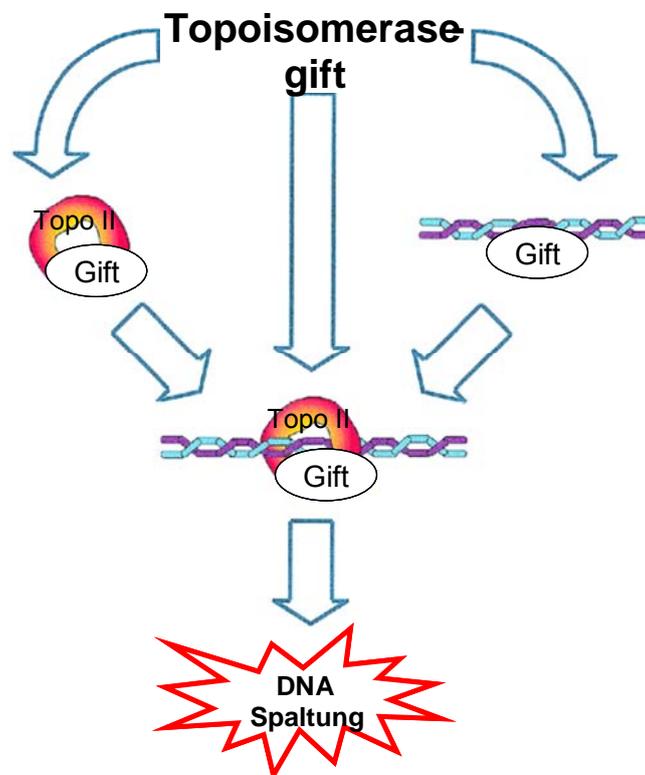
**Abb. 19:** Mechanismus der Toxizität von Topoisomerasegiften (Froelich-Ammon und Osheroﬀ 1995).

Topoisomerasegifte weisen jedoch Unterschiede in ihrem Wirkungsort und ihrer Bindungsstärke auf. Der Wirkmechanismus der Substanzen beruht im Allgemeinen darauf das Gleichgewicht von Strangbruch und Wiederverschluss zu stören, so dass es vermehrt zu

unverschlossenen Strangbrüchen kommt. Die Hemmung des Verschlusses kann wie folgt geschehen:

- durch physikalische Blockierung
- durch Deplatzen eines Endes
- durch nicht kovalente Wechselwirkungen (Wilstermann und Osheroff 2003).

Für die Bildung von ternären Komplexen zwischen dem Topoisomerasegift und dem DNA-Enzym-Intermediats gibt es drei mögliche Wege (Abb. 20). Entweder bindet eine Substanz an die DNA und dieser Komplex bildet dann mit dem Enzym einen ternären Komplex oder die Substanz bindet erst nach der Bindung des Enzyms an die DNA. Die dritte und wahrscheinlichste Möglichkeit wäre die Bindung der Substanz an das Enzym und anschließend die Bindung dieses Komplexes an die DNA (Burden und Osheroff 1998). Dabei kann auch die Bindungsstelle am Enzym sehr unterschiedlich sein. Topoisomerase-II-Gifte können beispielsweise an der B'-Domäne oder an der ATPase-Domäne binden. Die Hemmung der Enzymaktivität kann in jeder Phase des katalytischen Zyklus geschehen und demnach sehr vielfältig sein (Robinson et al. 1993, Larsen et al. 2003a).

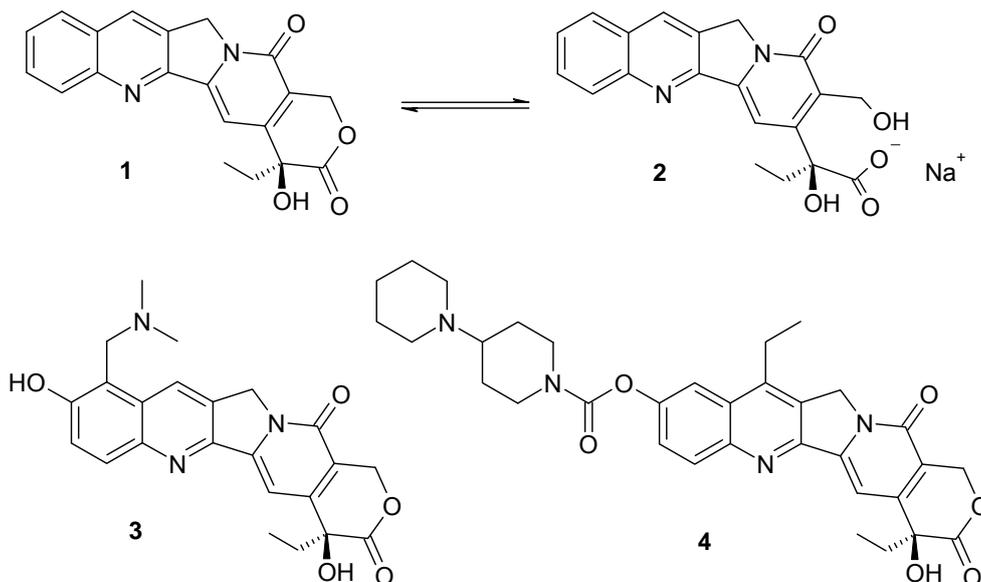


**Abb. 20:** Mögliche Wege zur Ausbildung des ternären Komplexes zwischen einem Topoisomerasegift und dem DNA-Topoisomerase-Intermediat (Froelich-Ammon und Osheroff 1995).

Topoisomerasegifte zeigen neben ihren unterschiedlichen Wirkorten am Enzym auch eine Sequenzspezifität bei der Bindung an die DNA. So bevorzugt beispielsweise Doxorubicin Adenin in (-1)-Position des Strangbruchs, Etoposid an gleicher Stelle Cytosin oder Thymin, wohingegen Camptothecin in (+1)-Position ein Guanin bevorzugt (Cabrano et al. 1997, Palumbo 2002).

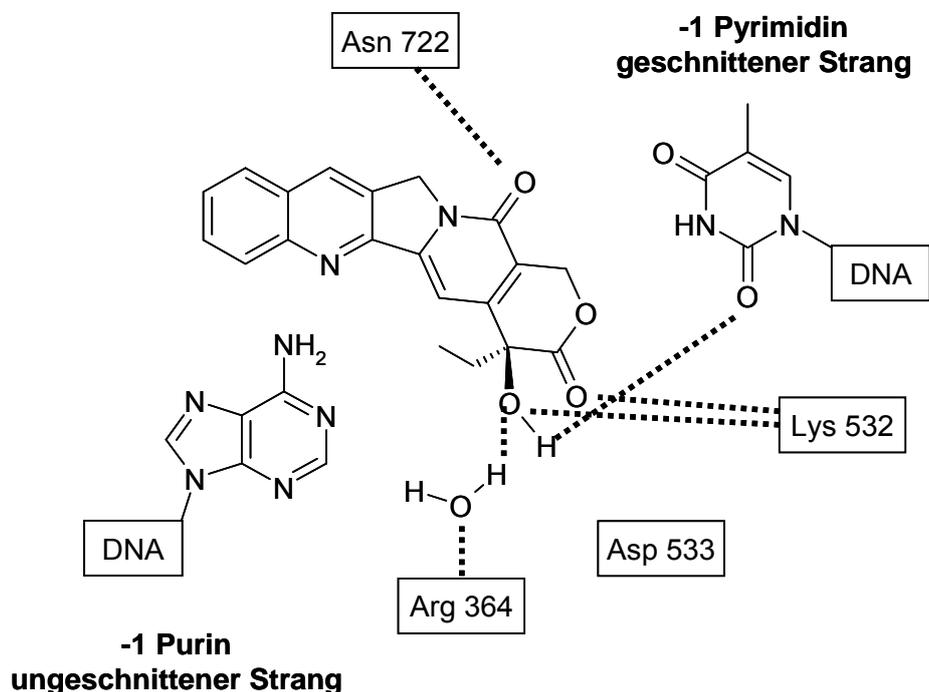
## Camptothecin

Camptothecin (Abb. 21) wurde 1958 als ein antikanzerogenes Alkaloid entdeckt. Es wurde aus einem für traditionelle chinesische Medizin eingesetzten Extrakt aus dem in China und Tibet beheimateten Baumes *Camptotheca acuminata* isoliert (Wall 1993). Die Erfolge der präklinischen Studien führten zu einer schnellen Zulassung der Substanz. Aufgrund der schlechten Wasserlöslichkeit wurde jedoch das wasserlösliche Natriumsalz eingesetzt, welches wesentlich ineffektiver war als die Ursprungssubstanz. Erst die Entdeckung des Mechanismus der Topoisomerasehemmung entfachte erneut Interesse an der Substanz. Weitere wasserlösliche Derivate, Topotecan und Irinotecan, wurden zum Einsatz gegen Kolon- und Ovarienkrebs halbsynthetisch entwickelt (Moertel 1984, Hsiang et al. 1985, Vanhoefer et al. 2001).



**Abb. 21:** Camptothecin (1), sein wasserlösliches Natriumsalz (2) und die wasserlöslichen Derivate Topotecan (3, Hycamtin<sup>®</sup>) und Irinotecan (4, Camptosar<sup>®</sup>)

Camptothecin (CPT) und seine Derivate können den Enzym-DNA-Komplex stabilisieren und sind demnach Topoisomerasegifte (Pommier 1998, Oberlies et al. 2004). Der zugrunde liegende Mechanismus der Stabilisierung des Topoisomerase-DNA-Komplexes ist jedoch noch nicht vollständig geklärt. Da jedoch CPT weder an das Enzym alleine noch an die DNA alleine bindet, scheint die Interaktion mit dem Enzym-DNA-Intermediat von entscheidender Bedeutung zu sein (Hertzberg et al. 1989, Pommier 1998). Eine Vielzahl von Studien hat sich mit dieser Problematik beschäftigt und einige Modelle der Anlagerung des Topoisomerasegifts an den Komplex wurden entwickelt (Pommier et al. 1995, Redinbo et al. 1998, Kerrigan und Pilch 2001, Laco et al. 2002, Wang et al. 1998). Durch Mutationsanalysen mit der Topoisomerase I wurde gezeigt, dass die Aminosäuren Asp533, Arg364, Asn722 und Lys532 eine wichtige Rolle spielen bei der Ausbildung des ternären Komplexes über Wasserstoffbrücken zwischen CPT, der DNA und der Topoisomerase I. Pommier et al. entwickelten ein Modell (Abb. 22), welches die mögliche Struktur des Komplexes unter Beteiligung der genannten Aminosäuren darstellt (Pommier et al. 1994, Laco et al. 2002).



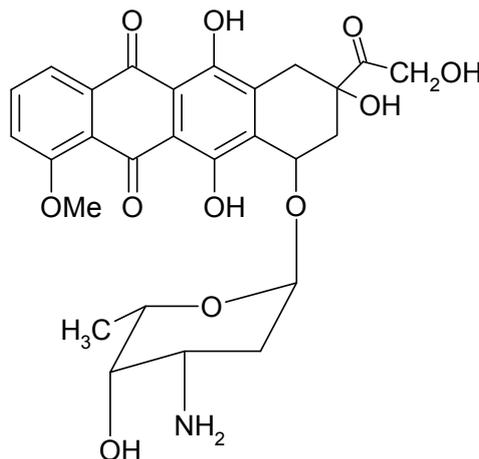
**Abb. 22:** Modifizierte Darstellung des Modells von Pommier für die stabilisierenden Wechselwirkungen von Camptothecin mit der DNA (modifiziert nach Pommier et al. 1994), Asn, Asparagin; Arg, Asparagin; Asp, Aspartat; Lys, Lysin

Camptothecin führt durch die Stabilisierung der DNA-Enzym-Komplexe und anschließender Kollision mit der Replikationsgabel mit dem Komplex zu DNA-Doppelstrangbrüchen und zum Zelltod (Pommier 1998). Andere biologische Aktivitäten des CPT tragen zudem zur toxischen Wirkung der Substanz und ihrer Derivate bei. CPT unterstützt beispielsweise die schnelle Konjugation der Topoisomerase I mit Ubiquitin, was in einer 26S-Proteasomenkomplex-vermittelten Degradation des Enzyms resultiert (Lui et al. 2000, Mao et al. 2001).

Die Toxizität von Camptothecin konnte *in vitro* an einigen Modellen gezeigt werden. Die Substanz hemmt das Wachstum von V79-Zellen und induziert Schwesterchromatidaustausch in kultivierten humanen Lymphozyten (Mi et al. 1995, Degrassi et al. 1989).

## Doxorubicin

Doxorubicin, welches unter dem Handelsnamen Adriamycin als antikanzerogenes Antibiotikum zugelassen ist, gehört zur Gruppe der Anthracycline und wird zur Behandlung vieler verschiedener Krebsarten eingesetzt. Aufgrund der Kardiotoxizität ist die Dosis limitiert, wobei die Kardiotoxizität der Substanz jedoch nicht mit der Hemmung der Topoisomerase in Verbindung steht (Di Marco et al. 1981, Parker et al. 1999, DeVita 2001).



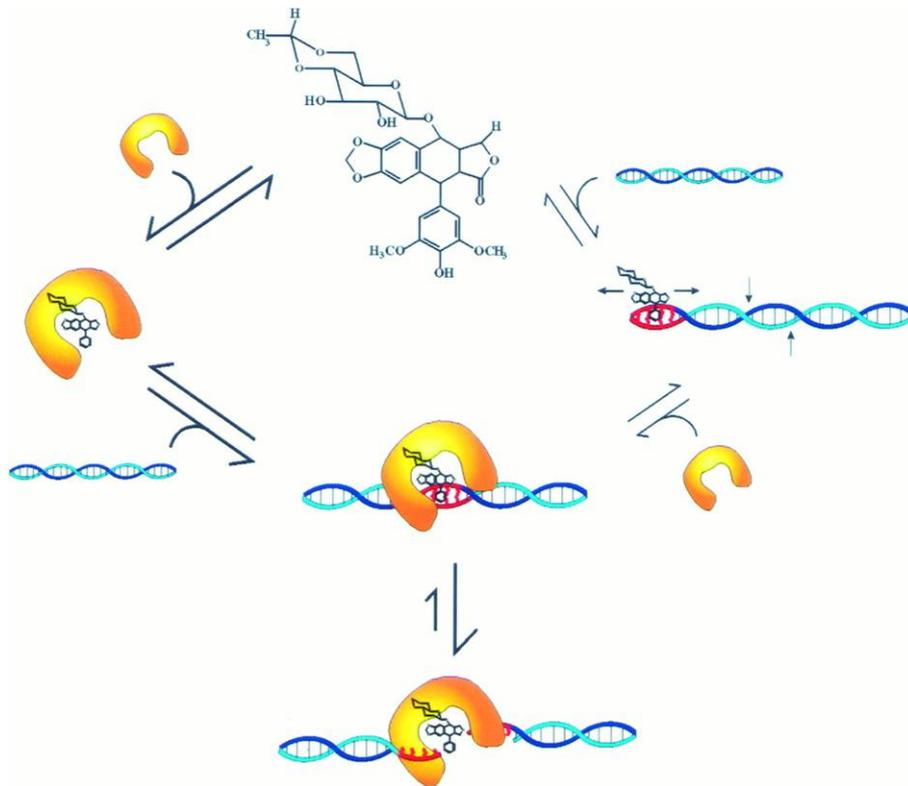
**Abb. 23:** Die Struktur von Doxorubicin

Anthracycline sind als gute Topoisomerase-I-Hemmstoffe beschrieben. Doxorubicin stabilisiert das Topoisomerase-II-DNA-Intermediat und wirkt demnach als Topoisomerase-II-gift. Neben dieser Wirkung werden Doxorubicin noch weitere zytotoxische

Wirkmechanismen zugesprochen. Zum einen wird die Wirkung als Hemmstoff der Proliferation auf die Fähigkeit der Substanz zwischen die DNA-Basen zu interkalieren, zurückgeführt. Eine zweite Erklärung liefert die Fähigkeit der Substanz die Wirkung nuklearer Helicasen zu modulieren, die Doppelstränge in Einzelstränge zu teilen. Die dritte mögliche Erklärung wäre die Induktion von oxidativem Stress (Hande 1998, Binaschi et al. 1998). Außerdem konnten Doxorubicin-DNA-Addukte beobachtet werden, wobei die Substanz kovalent an die exozyklische Aminogruppe des Guanins bindet und über Wasserstoffbrückenbindung auch mit dem zweiten DNA-Strang verbunden ist. Die Aminobindung ist jedoch mit einer Halbwertszeit von 5 bis 40 Sekunden nicht sehr stabil (Cutts et al. 2005). Doxorubicin erhöht die Aktivität von Caspase 3 in HL-60/MX2-Zellen zwei bis sechs Stunden nach Inkubation und stimuliert so die Apoptose (Tao et al. 2007a und b, Swift et al. 2006).

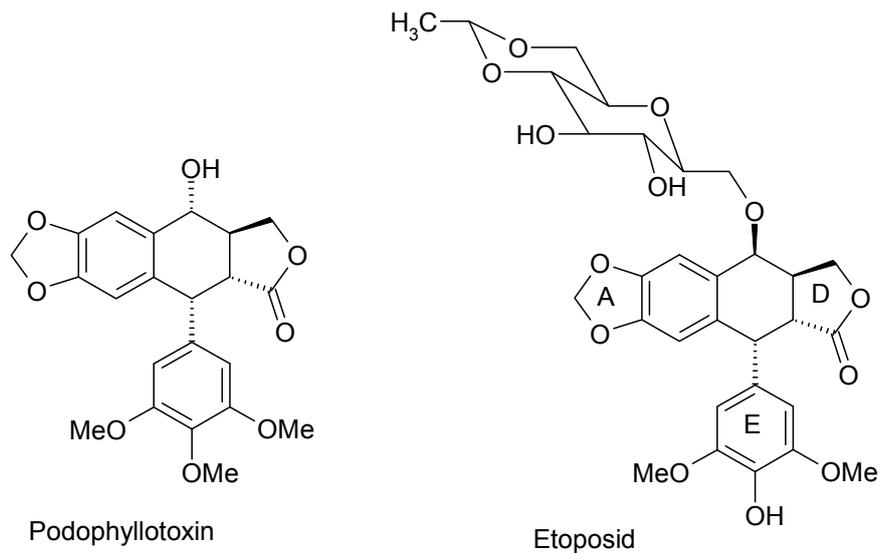
### **Etoposid**

Podophyllotoxine werden schon seit über 1000 Jahren von unterschiedlichen Kulturen als Medikament eingesetzt, bevor der Wirkmechanismus entdeckt wurde. In den 1990er Jahren wurde entdeckt, dass Podophyllin antineoplastisch wirkt. Die Substanz hat jedoch ein hohes toxisches Potential. Weitere Aldehydkondensationsprodukte mit Antitumorwirkung gegen Leukämie wurden aus den Wurzeln der indischen Podophyllumpflanze gewonnen. Intensive Isolationsversuche brachten ein Glukosid hervor und zwei Analoge dieses Glukosids mit höherer antineoplastische Aktivität konnten synthetisiert werden: Etoposid (VP-16) und Teniposid (VM-26) (Slevin 1991, Hande 1998a). Klinische Studien mit den Substanzen zeigten ihre antineoplastische Wirkung gegen akute myeloische Leukämie, Hodgkin's Krankheit und Lungen-, Brust- und Ovarienkrebs. Der Wirkmechanismus war jedoch noch unbekannt. Etoposid verursacht in therapeutisch relevanten Konzentrationen DNA-Einzel- und Doppelstrangbrüche. Da die Substanz an aufgereinigter DNA keine Strangbrüche induzieren konnte aber jedoch an isoliertem Kernextrakt, musste ein nuklearer Bestandteil zur Induktion der Strangbrüche beitragen. Tatsächlich war dies ein entscheidender Beitrag zur Entdeckung der Topoisomerasen in humanen Zellen. Etoposid war die erste Substanz für die eine Hemmung der Topoisomerase gezeigt werden konnte (Hande 1998a, Baldwin und Osheroff 2005).



**Abb. 24:** Schematische Darstellung des Reaktionsweges der Stabilisierung des Topoisomerase II-DNA-Intermediates durch Etoposid, (modifiziert nach Burden et al. 1996)

Etoposid (ETO) stabilisiert als Topoisomerase-II-Gift den Enzym-DNA-Komplex und erhöht so die Menge an DNA-Doppelstrangbrüchen. Dabei interagiert die Substanz hauptsächlich mit dem Enzym und, im Gegensatz zu Doxorubicin nicht mit der DNA. Erst durch Bindung der Topoisomerase II an die DNA bildet sich der ternäre Komplex aus. Es konnte gezeigt werden, dass Etoposid in Abwesenheit der DNA stöchiometrisch an die Topoisomerase bindet (Kingma 1999). Der genaue Mechanismus der Enzymhemmung ist jedoch nicht aufgeklärt. Es wird angenommen, dass entweder Etoposid nicht-kovalent mit dem Enzym verbunden ist, oder dass es die Position eines DNA-Endes verändert, so dass es nicht zum DNA-Verschluss kommt (Wilstermann und Osheroff 2001, Montecucco und Biamonti 2007).



**Abb. 25:** Strukturen von Podophyllotoxin und Etoposid

Etoposid weist wichtige Strukturmerkmale auf, die zur Aktivität als Topoisomerasegift von Bedeutung sind. Wilstermann und ihre Mitarbeiter identifizierten den A-, B- und E-Ring als aktivitätsbestimmende Strukturmerkmale des Topoisomerasegiftes identifizieren (Wilstermann et al. 2007).

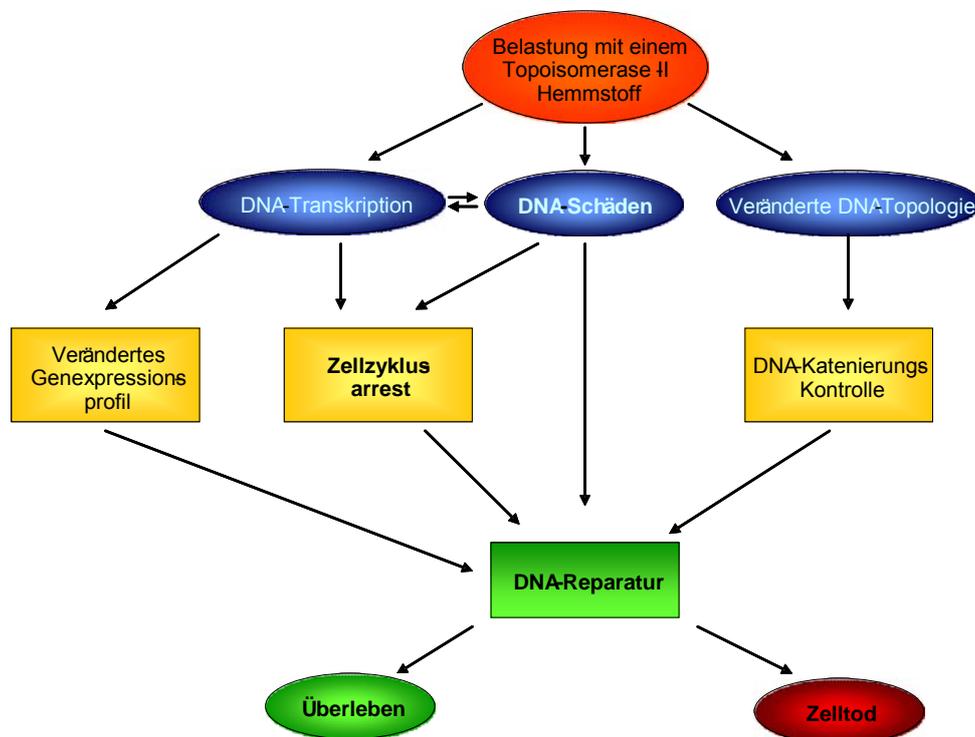
Etoposid wird eingesetzt bei der Behandlung von Lungenkrebs, bösartigen Keimzellen, Leukämien, Weichgewebssarkomen und Neuroblastomen. Allerdings hat Etoposid auch toxische Eigenschaften. In hohen Dosen wirkt es hepatotoxisch (Clapp und Hande 2002).

Der ernstzunehmendste adverse Effekt von Etoposid ist die Entwicklung von akuter nicht-lymphatischer Leukämie. Translokationen des MLL-Gens auf dem Chromosom 11q23 sind die bekanntesten durch Topoisomerase-II-Inhibitoren verursachten Chromosomenaberrationen. Etwa 80 % der Kinder (jünger als ein Jahr) mit akuter myelotischer Leukämie (AML) und akuter lymphoplastischer Leukämie (ALL) weisen Translokationen auf dem Mull-Gen auf (Felix 1998, Hande 1998b). Dies führt zu der Annahme, dass die materiale Exposition von Topoisomerasehemmstoffen während der Schwangerschaft die Entwicklung von frühkindlicher Leukämie begünstigt (Hengstler et al. 2002). Dabei scheint die Entwicklung von sekundären Erkrankungen nach Behandlung mit Etoposid Topoisomerase-II $\beta$ -vermittelt zu sein. Mit Hilfe von knock-out Versuchen an Mäusen konnten Azarova et al. zeigen, dass Etoposid zwar mit beiden Isoenzymen interagiert, jedoch vor allem die Topoisomerase-II $\beta$ -DNA-Komplexe stabilisiert und die Melanomanzahl in den Topoisomerase-II $\beta$ -defizienten Mäusen signifikant höher lag als in den Topoisomerase-II $\beta$ -exprimierenden Mäusen. Die Entwicklung eines reinen Topoisomerase-II $\alpha$ -Giftes wäre also

wünschenswert, denn so könnten möglicherweise nicht nur sekundäre Leukämien sondern auch die Toxizität der Medikamente in anderen Geweben reduziert werden, da Topoisomerase II $\alpha$  ausschließlich in proliferierenden Zellen exprimiert wird (Azarova et al. 2007).

### *Zelluläre Antwort auf die Hemmung der Topoisomerase II*

Die Hemmung der Topoisomerase und damit Stabilisierung von DNA-Strangbrüchen löst die verschiedensten Antwortmechanismen auf DNA-Schäden aus (Abb. 26).



**Abb. 26:** Zelluläre Antwort auf Topoisomerase-II-inhibitoren.

Wie in Kapitel beschrieben kann ein DNA-Schaden die verschiedenen Zellzykluskontrollwege in den unterschiedlichen Zellzyklusphasen aktivieren. Ein durch Doxorubicin oder Etoposid verursachter DNA-Schaden wird ATR-vermittelt erkannt und die Kinase aktiviert durch Phosphorylierung die Chk1-Kinase und die Chk2-Kinase. Vermutlich werden zwei unterschiedliche Signalwege dadurch beeinflusst, die zu einem Arrest in der G<sub>2</sub>- oder M-Phase führen (Larsen et al. 2003a).

Auch katalytische Hemmstoffe der Topoisomerasen können einen Zellzyklusarrest in der G<sub>2</sub>-Phase bewirken, ohne jedoch einen DNA Strangbruch zu generieren. Dies geschieht über den

Weg der Katenierungskontrolle, der die Chromatinkatenierung während der Mitose kontrolliert und bei mangelhafter Dekatenierung der Chromosomen einen Arrest in der Mitosephase bewirkt. Durch eine ATR-abhängige Hemmung der polo-ähnlichen Kinase 1 (Plk1) wird vermehrt Zyklin B1 phosphoryliert und zudem die nukleäre Akkumulation von Cdc25 verringert sowie die CDK1 hemmend phosphoryliert, was in einem Arrest in der späten G<sub>2</sub>- und der M-Phase resultiert (Deming et al. 2001).

Neben der Verursachung von Strangbrüchen spielt die Topoisomerase II auch eine aktive Rolle bei der zellulären Antwort auf verschiedene DNA-Schäden. Topoisomerase II $\alpha$  wird nur während der Proliferation exprimiert, wohingegen Topoisomerase II $\beta$  konstitutiv in allen Geweben exprimiert wird. Die beiden Isoenzyme spielen so unterschiedliche aber wichtige Rollen in der Interphase der Mitose. Die beiden Topoisomerase-II-Isoenzyme sind über unterschiedliche Wege mit der DNA-Reparatur verbunden:

- Sie dienen als Bindungspartner von stress-induzierten Proteinen wie p53 und dem Topoisomerase-Bindungsprotein-1 (TopBP1). Dabei können diese Proteine die katalytische Aktivität der Enzyme verhindern und die Topoisomerasen vermitteln vermutlich die Bindung der Proteine an das Chromatin (Cowell et al. 2000).
- Durch oxidativen Stress wird die alpha-Isoform-Expression herunterreguliert (Yamane et al. 1997, 1999 und 2002).
- Bei der BER entstandene abasische Stellen verbunden mit einem DNA-Strangbruch können von Topoisomerasen in permanente Strangbrüche umgewandelt werden (Wilstermann und Osheroff 2001).
- Durch Bindung der Topoisomerase II $\alpha$  an die CDK1 wird die Chromosomenkondensation initiiert und dadurch auch der letzte regulierende Schritt vor dem Start der Mitose (Wang et al. 1997, Sandri et al. 2002).

Die Entdeckung der Bildung des Topoisomerase II/CDK1-Komplexes und der damit verbundenen Aktivität des Komplexes als erster Schritt der Mitosephase oder letzter Schritt zur Verlängerung der G<sub>2</sub>-Phase, eröffnet ein interessantes Ziel für die Entwicklung neuer Topoisomerasehemmstoffe (Larsen et al. 2003b).

Topoisomerase II kann zudem auch einen Komplex mit dem Hitzeschockprotein Hsp90, einem ubiquitären Chaperon, welches eine Vielzahl von Proteinen aktiviert, bilden. Die Hemmung von Hsp90 verhindert die Bildung des DNA-Topoisomerase-Komplexes und führt damit zu einer Erhöhung des Gehalts an freier Topoisomerase II. In Anwesenheit eines

Topoisomerasegiftes kommt es vermehrt zu DNA-Strangbrüchen und nachfolgend zu vermehrter Apoptose (Barker et al. 2006a und b).

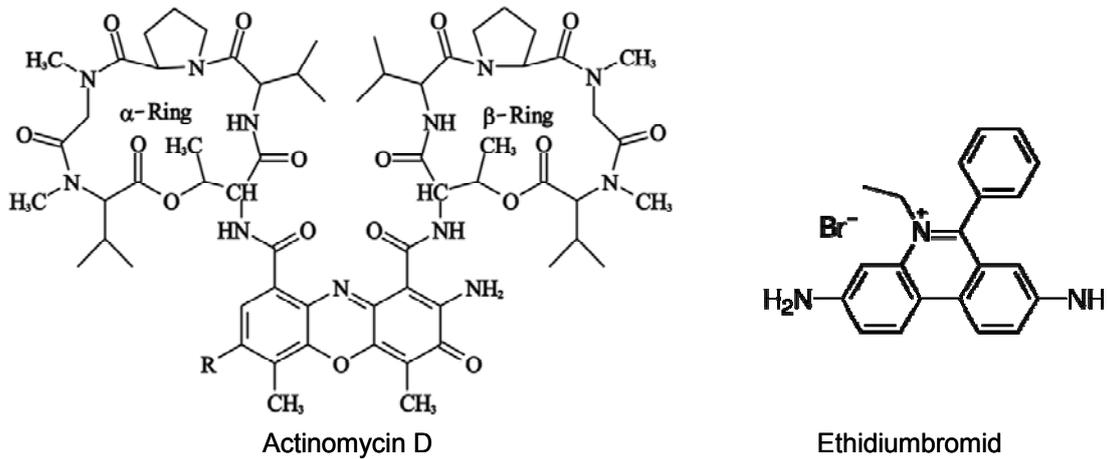
### **Interaktion mit doppelsträngiger DNA**

Interaktionen mit der doppelsträngigen DNA können genau wie die Substanzen, die mit der DNA interagieren, sehr vielfältig sein. Eine Einteilung kann jedoch nach dem Ort der Bindung einer Substanz erfolgen. Interkalatoren sind Substanzen, die sich zwischen die Basenpaare fügen. Eine weitere wichtige Klasse sind die Substanzen, die an die kleine Furche der DNA binden, die so genannten „minor groove binder“.

### **Interkalation**

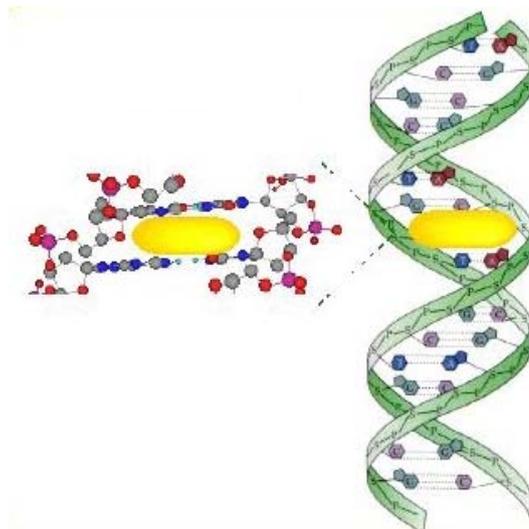
Teilplanare Substanzen, wie Actinomycin D (Abb. 27), ein polypeptides Antibiotikum, hemmen die Transkription indem sie über Wasserstoffbrücken spezifisch an die doppelhelikale Struktur der DNA binden und diese daran hindern als Matrize für die RNA-Synthese zu dienen. Die Substanz schiebt sich mit ihrem planaren Teil zwischen benachbarte Basenpaare. Diese Art der Bindung wird als Interkalation bezeichnet. So kann eine interkalierende Substanz das Zellwachstum hemmen, indem sie die Replikation behindert. Neben Actinomycin D zeigt auch Ethidiumbromid (Abb. 27) die Eigenschaft zu interkalieren (Berg et al. 2004).

Ethidiumbromid kann sich zwischen die gestapelten Basenpaare, bevorzugt in GC-reichen Regionen, schieben. Bei dieser Interaktion mit der DNA fluoresziert die Substanz und kann so auch zur Bestimmung von DNA eingesetzt werden. Auf Basis dieser Eigenschaft konnte auch ein Test entwickelt werden, mit dem die Fähigkeit einer Substanz bestimmt wird mit Ethidiumbromid um die Interkalation zu konkurrieren (Morgan et al. 1979).



**Abb. 27:** Die Strukturen der DNA-Interkalatoren Actinomycin D und Ethidiumbromid

Viele unterschiedliche Substanzklassen, beispielsweise Anthracycline, Chinole und einige Flavonoide interkalieren zwischen die DNA-Basen wie in Abb. 28 dargestellt. Die Interkalation scheint einen wesentlichen Beitrag zur Topoisomerasehemmung und Mutagenität der Substanzen leisten (Brana et al. 2001). Allerdings sind nicht alle Interkalatoren potente Topoisomerasegifte und nicht alle Topoisomerasegifte interkalieren. Eine kombinierte Wirkung als Topoisomerasegift und Interkalanz lässt jedoch vermuten, dass diese Substanzen als potente Klastogene wirken (Chen et al. 1993, Bell et al. 1997, Bailly et al. 2000).



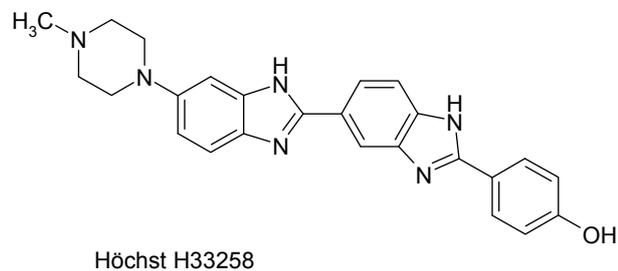
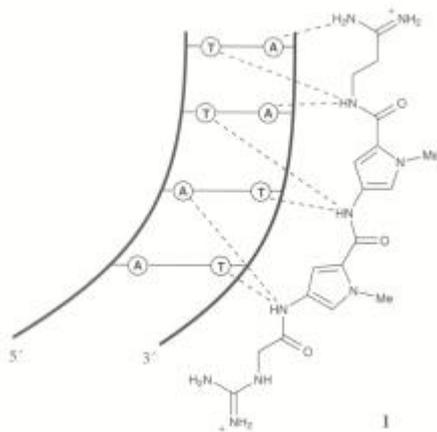
**Abb. 28:** Darstellung einer Interkalation (Moucheron und Kirsch-De Mesmaeker 1998),

Viele interkalativ wirkende Antitumorwirkstoffe induzieren somit Topoisomerase-assoziierte DNA-Strangbrüche. Tewey et al. (1984) postulierten, dass Topoisomerase II ein zelluläres Ziel für Interkalatoren ist und dass der zytotoxische Effekt dieser Substanzen einen spezifische Beeinflussung der Topoisomeraseaktivität mit einschließt. Diese Substanzen stabilisieren den Enzym-DNA-Komplex durch folgende Mechanismen:

- Die Interkalation zwischen die DNA verursacht Torsionsstress und dies bewirkt eine vermehrte Bildung von Enzym-DNA-Komplexen.
- Die Interkalatoren wirken als allosterische Effektoren der Topoisomerase II oder des Enzym-DNA-Komplexes.
- Eine interkalative Bindung an die DNA macht es der Substanz unmöglich spezifisch mit dem Enzym zu reagieren, so dass sie die Topoisomeraseaktivität durch Stabilisierung des Komplexes stört (Tewey et al. 1984).

### Bindung an die kleine Furche

Die kleine Furche bietet eine Reihe von Möglichkeiten zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen. Netropsin ist in der Lage dort zu binden und mit Hilfe weiterer Stabilisierung mit der DNA einen Komplex zu bilden.



**Abb. 29:** Bindung von Netropsin an die kleine Furche der DNA, Struktur des Fluoreszenzfarbstoffs Hoechst H33258

Es wird davon ausgegangen, dass die Bindung an die kleine Furche durch einige dieser Substanzen an den Bindungsstellen blockiert wird und die Topoisomerase I so dazu

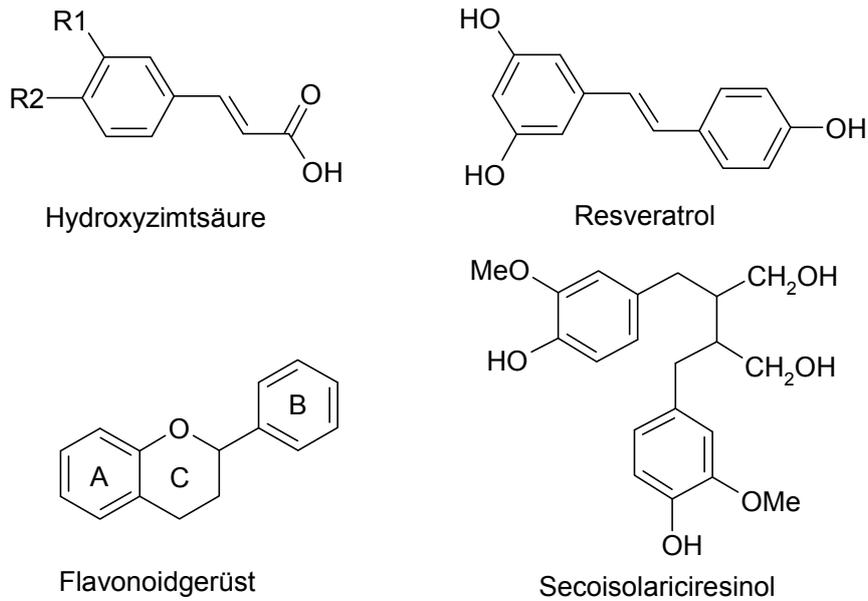
gezwungen ist an ligandfreien Regionen zu wirken. Es ist daher nicht sicher ob eine Bindung an die kleine Furche eine erhöhte Rate an DNA-Brüchen verursacht. Nicht alle Substanzen, die an die kleine Furche der DNA binden stabilisieren auch den Komplex zwischen Topoisomerase I und der DNA (Chen et al. 1993).

Für einige Liganden konnte eine Sequenzspezifität beobachtet werden, wobei AT-Cluster und GC-reiche Sequenzen bevorzugt werden. In hohen Konzentrationen binden die Liganden auch an schwächere Bindungsstellen. Für den Hoechst-Farbstoff H33258 konnte eine starke Verformung der DNA-Struktur in Regionen, wo AT-Cluster und GC-reiche Sequenzen an einander grenzen, gezeigt werden. In sehr hohen Konzentrationen können Liganden alle DNA-Bindungsstellen belegen und die DNA kann von den Topoisomerasen nur dort geschnitten werden, wo das Enzym den Liganden verdrängen kann (Bell et al. 1997).

### **Polyphenole aus Beerenfrüchten und Rotwein**

Viele Tausend unterschiedliche Polyphenole konnten bisher in höheren Pflanzen und mehrere Hundert in den essbaren Pflanzen identifiziert und bestimmt werden. Diese können aufgrund ihrer Struktur in Gruppen und Untergruppen unterteilt werden:

- Phenolische Säuren:
  - Derivate der Benzoesäure
  - Derivate der Hydroxyzimtsäure
- Flavonoide
  - Flavone
  - Flavanone
  - Flavonole
  - Catechine (Flavan-3-ole) und deren Polymere, die Procyanidine
  - Isoflavone
  - Anthocyane
- Stilbene
- Lignane



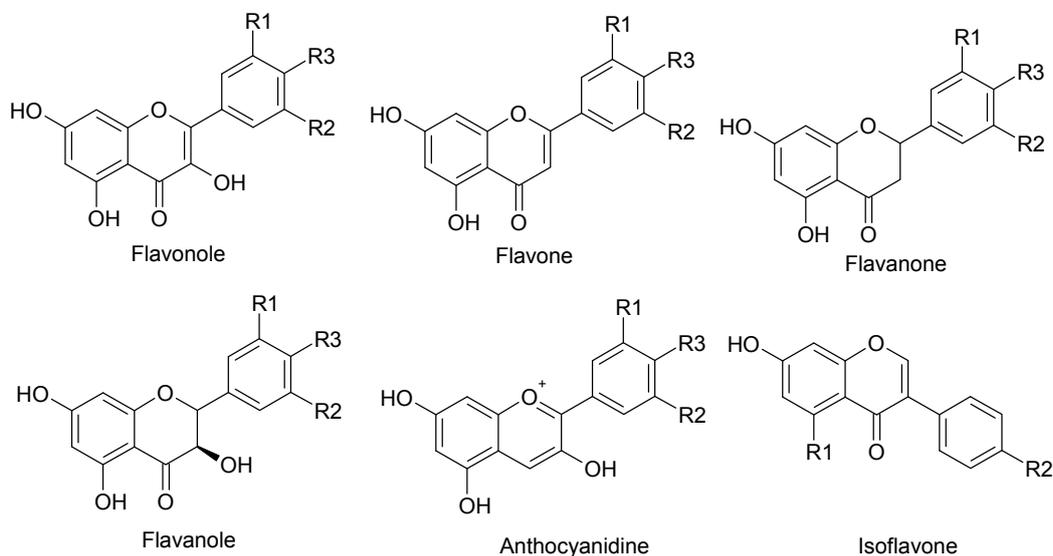
**Abb. 30:** Struktur einiger Polyphenole: Hydroxyzimtsäure, Resveratrol (Stilben), das Flavonoidgerüst, das Lignan Secoisolariciresinol

Früchte und Getränke, wie Tee und Rotwein stellen die Hauptquellen für Polyphenole dar. Dabei sind einige Polyphenole ubiquitär in allen pflanzlichen Produkten verbreitet wohingegen andere bevorzugt oder gar spezifisch in bestimmten Pflanzen vorkommen, beispielsweise Flavanone in Zitrusfrüchten oder Isoflavone in Sojaprodukten. Die Polyphenolmuster einzelner Pflanzen sind kaum bekannt und nur für wenige Früchte beschrieben. Außerdem variiert der Gehalt an Polyphenole der Früchte in Abhängigkeit der Sorte, der Anbauart, der Erntezeit, von Umweltfaktoren, der Verarbeitung und Lagerungsbedingungen. Der Reifegrad hat einen Einfluss auf das Polyphenolmuster; so nimmt mit wachsender Reife der Gehalt an phenolischen Säuren ab und der Gehalt an Anthocyanen zu. Während der Lagerung werden die Polyphenole meist oxidiert. Dabei werden polymerisierte Produkte gebildet, was zu einer veränderten farblichen und geschmacklichen Qualität der Früchte und Getränke führt (Aherne et al. 2002).

Mehr als 4000 Flavonoide sind verantwortlich für die Farbe von Blättern im Herbst oder die Farben von Früchten und Getränken (Rice-Evans et al., 2000). Diese polyphenolischen, niedrig-molekularen Substanzen zählen zur Gruppe der sekundären Pflanzenstoffe und werden aus Phenylalanin und Essigsäure über den Shikimisäureweg gebildet. Es ist ersichtlich, dass diese Substanzgruppe sehr komplex und von großer struktureller Vielfalt ist, deren gemeinsames Merkmal das aus drei Ringen (A, B und C) bestehende Grundgerüst darstellt (Abb. 30). Der Benzolring A ist mit einem Sechsring C kondensiert, welcher in

Position zwei (bzw. drei bei den Isoflavonen) mit einem weiteren Benzolring substituiert ist, sowie ein Sauerstoff in Position 1 besitzt.

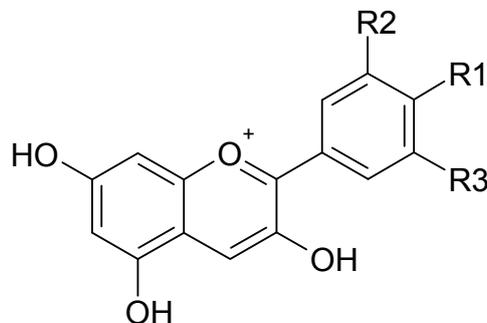
Aufgrund weiterer Strukturmerkmale lassen sich die Substanzen, wie Abbildung 31 zeigt, in sechs Gruppen unterteilen: Anthocyanidine, Catechine, Flavone, Flavonole, Flavanone und Isoflavone. Die Unterteilung erfolgt aufgrund der folgenden Merkmale: eine Oxygruppe an Position 4, eine Doppelbindung zwischen Position 2 und 3, oder einer Hydroxylgruppe an Position 3 des C-Rings. Der Phenolring B sitzt bei den meisten Flavonoiden an Position 2 des C-Rings, außer bei den Isoflavonen. Die Isoflavone sind in Position 3 mit dem Phenolring substituiert. Außer den Catechinen kommen die Flavonoide in Pflanzen nur in geringen Mengen als Aglyka vor, sondern vorwiegend als Glykoside. Dies erhöht die Polarität der Verbindungen, was für die Lagerung in der Vakuole der Pflanzenzellen notwendig ist. Als Hauptzucker dient die Glukose, daneben kommen auch Arabinose, Galaktose, Glucorhamnose, Lignin, L-Rhamnose oder Xylose vor. Die bevorzugte Position für eine Glykosylierung bei Flavonolen ist die C-3 Position (Aherne et al., 2002; Rice-Evans et al., 2000). Aufgrund der Themenstellung wird nur auf die Gruppe der Anthocyane näher eingegangen.



**Abb. 31:** Strukturen der Flavonoidgruppen

## Anthocyane

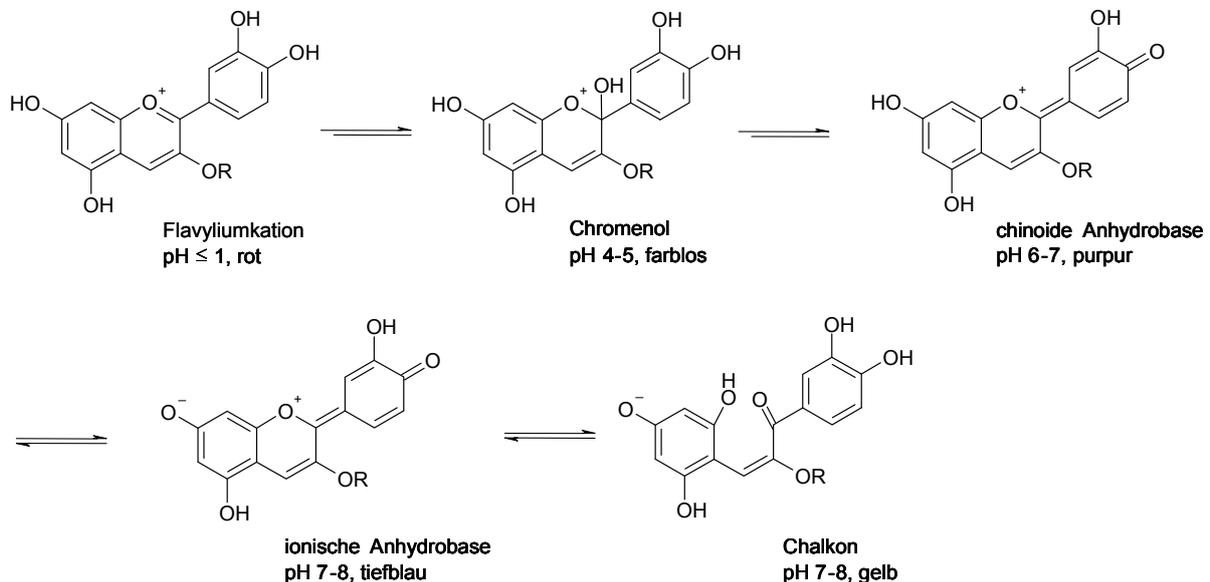
Anthocyane (griech. *anthos*, Blume; *kyanos*, blau) sind eine Gruppe natürlich vorkommender wasserlöslicher Pigmente, die für die Färbung vieler Blüten und Früchte verantwortlich sind. Sie agieren in Pflanzen als Antioxidantien, Phytoalexin und wirken antimikrobiell (Kong et al., 2003, Collins 2005). Die Anthocyane sind in dunkelroten Früchten, wie Beeren und Kirschen weit verbreitet. Es wurden bisher mehr als 600 Anthocyane in Pflanzen charakterisiert. Diese unterscheiden sich in Anzahl und Position der Hydroxy- und Methoxygruppen, sowie der Art, der Anzahl und der Position der Zucker und dem Grad der Acetylierung. Das Flavylumkation ist dabei meist mit Glukose, Rhamnose, Galaktose, Arabinose oder Xylose in 3-Position des C-Ring oder in 5- oder 7-Position des A-Rings als Mono-, Di-, oder Triglykosid gebunden. Die eigentlichen Chromophore der Anthocyane stellen dabei die Aglyka, die Anthocyanidine dar. Obwohl 17 verschiedene Anthocyanidine bekannt sind, sind die sechs wichtigsten Pelargonidin, Paeonidin, Cyanidin, Malvidin, Petunidin und Delphinidin, da nur sie in höheren Pflanzen vorkommen. Die weitverbreitetsten Glykoside sind die 3-O-Glykoside der nicht methylierten Anthocyanidine Cyanidin, Delphinidin und Pelargonidin. Sie kommen in 80 % der pigmentierten Blätter, 69 % aller Früchte und 50 % aller Blumen vor (Kong et al., 2003).



	R1	R2	R3
<b>Pelargonidin</b>	OH	H	H
<b>Cyanidin</b>	OH	OH	H
<b>Delphinidin</b>	OH	OH	OH
<b>Päonidin</b>	OH	OMe	H
<b>Petunidin</b>	OH	OMe	OH
<b>Malvidin</b>	OH	OMe	OMe

**Abb. 32:** Die Strukturen der wichtigsten Anthocyanidine: Pelargonidin, Cyanidin, Delphinidin, Päonidin, Petunidin und Malvidin.

In Pflanzengewebe produzieren die Anthocyane blaue, violette, purpurne und rote Färbungen, abhängig vom pH-Wert und der Anwesenheit von Copigmenten. Anthocyane haben zwei Absorptionsmaxima, bei 270-280 nm und bei 510-540 nm (Mülleider et al., 2001). In wässriger Lösung kommen sie in vier molekularen Formen vor: dem Flavylumkation, quinoide Base, hemiacetale Base oder Chalkon. Die relativen Mengen dieser vier Formen variieren sowohl abhängig vom pH-Wert als auch von der Struktur. Die Anthocyanidine existieren vorwiegend als stabiles Flavylumkation bei einem pH < 2. Diese einzigartige Struktur bedingt auch das spezielle Verhalten der Anthocyane bei Absorption, Metabolismus, Bioverfügbarkeit und schließlich der biologischen Wirkung.



**Abb. 33:** Struktur der Anthocyane in Abhängigkeit des pH-Wertes der Umgebung

Anthocyane kommen in der Nahrung in großen Mengen vor, die Hauptanthocyanquellen sind Auberginen, blaue Trauben und Beeren. Die durchschnittliche Aufnahmemenge pro Person wird z. B. in den USA auf 12,5 mg/Tag geschätzt, vorwiegend verzehrt in Form von Beeren, Rotwein und Säften (Wu et al. 2006).

## **Resorption der Anthocyane**

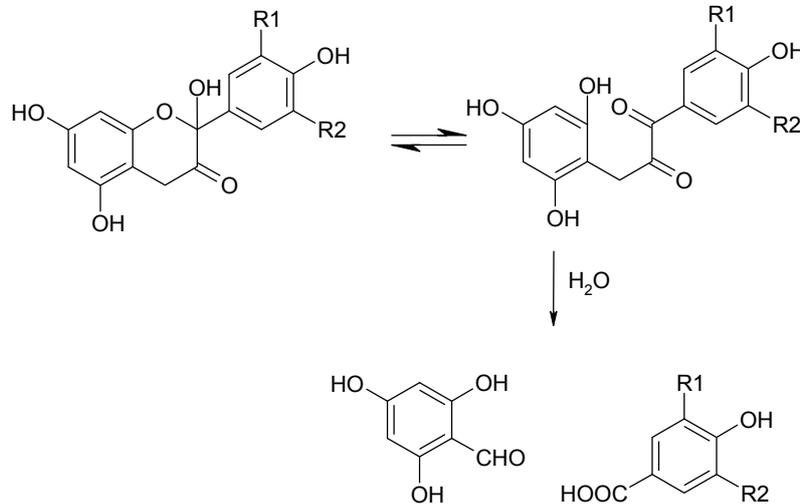
Der Mechanismus der Resorption der Anthocyane ist nicht vollständig aufgeklärt und die Theorien darüber widersprechen sich teilweise. Es konnten fünf Charakteristika beschrieben werden, die sich von denen anderer Flavonoide unterscheiden:

- Anthocyane können als intakte Glykoside resorbiert werden: Sowohl in Plasma als auch im Urin konnten Anthocyanidinglykoside detektiert werden (Prior et al. 2004).
- Anthocyane werden schnell resorbiert und eliminiert und so ist die tatsächliche Bioverfügbarkeit gering. Die maximale Anthocyankonzentration im Plasma wird nach etwa 0,5 bis 2 Stunden erreicht (Miyazawa et al. 1999)
- Die chemische Struktur verändert die Resorption der Anthocyane. Es werden beispielsweise Pelargonidinglykoside achtmal schneller absorbiert als Cyanidinglykoside und auch der Acylierungsgrad hat einen großen Einfluss auf die Resorption (Wu et al. 2004 und 2005).
- Der Abbau der Anthocyane geschieht im unteren Gastrointestinaltrakt. Der mikrobielle Metabolismus im Kolon wurde mehrfach beschrieben. Anthocyane, die nicht im Dünndarm aufgenommen werden erreichen das Kolon und auch bereits absorbierte Anthocyane können über den enterohepatischen Kreislauf mit der Galle ausgeschieden werden (Wu et al. 2006).
- Andere Nahrungsbestandteile verändern die Aufnahme der Anthocyane. Alkohol hat wenig Einfluss auf die Anthocyanaufnahme. Eine fettreiche oder kohlenhydratreiche Ernährung verzögert die Aufnahme der Anthocyane, aber beeinflusst nicht die Gesamtresorption (Frank et al. 2003, Nielsen et al. 2003).

## **Metabolismus der Anthocyane**

Die Hauptmetabolite der Anthocyane sind Glukuronide und Methylkonjugate, wohingegen nur geringe Mengen an Sulfaten beschrieben wurden. Die Struktur der Anthocyanidine hat einen Einfluss auf die Art der Metabolisierung. So konnten Wu et al. 2002 Glukuronide von Pelargonidin und Cyanidin, jedoch nicht von Delphinidin nach Gabe der entsprechenden Anthocyanidine detektieren. Die beteiligten Enzyme sind UDP-Glukuronidtransferasen (UGTs), UDP-Glukosiddehydrogenase und die Catechol-*O*-methyltransferase (COMT), die

im Dünndarm, der Leber und der Niere lokalisiert sind. Die Glukuronidierung geschieht meist an der 3-Position des C-Rings, während die Methylierung oftmals an der 3'- oder 4'-Position des B-Rings passiert (Wu et al. 2004, Ichiyanagi et al. 2004).



**Abb. 34:** Zerfall der Anthocyane bei einem  $\text{pH} \geq 4$  zu einem  $\alpha$ -Diketon und weiter zu einem Aldehyd und einer phenolischen Säure

Neben der direkten Konjugation der Anthocyane besteht auch die Möglichkeit, dass nach Hydrolyse und Abspaltung des Zuckerrestes die Abbauprodukte konjugiert werden. Es wird davon ausgegangen, dass im Kolon bakterielle Enzyme die glykosidische Bindung spalten und die Aglyka dann frei vorliegen (Keppler und Humpf 2005). Bei physiologischen pH sind diese jedoch instabil und es entsteht ein reaktives  $\alpha$ -Diketon, welches direkt in einen Aldehyd (für alle Anthocyanidine gleich) und eine spezifische phenolische Säure zerfällt (Abb. 34 und Tab. 3).

**Tab. 3:** Phenolische Säuren als Abbauprodukte der Anthocyanidine

Anthocyanidin	Phenolische Säure
Pelargonidin	Benzoessäure
Cyanidin	Protocatechusäure
Delphinidin	Gallussäure
Päonidin	Vanillinsäure
Malvidin	Syringasäure

Keppler und Humpf (2005) konnten mit Hilfe eines Schweinezäkummodells fünf phenolische Säuren und den Phloroglucinolaldehyd nach Inkubation verschiedener Glykoside und Aglyka der Anthocyane mit Schweinemikroflora nachweisen, welches den vermuteten Metabolisierungsweg bestätigt. Es konnten jedoch nur geringe Mengen der methylierten Säuren, Syringasäure und Vanillinsäure, detektiert werden, da diese zu Gallussäure und Protocatechusäure *O*-demethyliert werden (Keppler und Humpf 2005).

### **Bioverfügbarkeit der Anthocyane**

Mit geringen nanomolar gemessenen Plasmakonzentrationen ist die Aufnahme und Verfügbarkeit der Anthocyane sehr gering. Nach Gabe von bis zu 2 g Anthocyanen in Form von Beeren, Extrakten oder Konzentraten wurden nur maximale Plasmaspiegel von 10 – 15 nmol/l erreicht. Bisherige Studien zur Bioverfügbarkeit geben an, dass nur 0,004 % bis 0,1 % der Anthocyane bioverfügbar sind. Allerdings berücksichtigen die wenigsten dieser Studien die Bildung von Metaboliten und die Analysemethoden sind ebenfalls noch nicht vollständig optimiert, da eine chromatographische Trennung der Substanzklasse sehr schwierig ist und Metabolite bisher nicht erfasst werden konnten (Manach et al. 2005).

Lapidot et al. fanden auch eine rasche Ausscheidung mit einer maximalen Urinkonzentration nach 2,5 Stunden. Allerdings wurden nur 1,0 bis 6,7 % der aufgenommenen Anthocyane im Urin wieder detektiert (Lapidot et al. 1998).

Die Verteilung der Anthocyane und ihrer Metabolite ist ein wichtiger Faktor bezüglich der biologischen Wirkungen am jeweiligen Wirkort. Mohsen et al. konnten Pelargonidin oder dessen Metabolite in Niere, Leber, Gehirn und Lunge zwei Stunden nach Applikation messen, jedoch nicht in der Milz und dem Herzen (Mohsen et al. 2006, Borges et al. 2007).

### **Biologische Wirkungen der Anthocyane**

Die bedeutendste Wirkung der Anthocyane und mit ein Grund für die detaillierte Untersuchung dieser Substanzen ist ihre antioxidative Wirkung. Diese beruht auf verschiedenen Mechanismen, wie Wasserstoffaufnahme, Metallchelatierung und das Binden an Proteine. Die Aglyka und Glykoside, sowie eine komplexer Extrakt aus Aronia wirken *in vitro* als starke Antioxidantien (Borkowski et al. 2005). Allerdings wurde keine präventive

Wirkung auf oxidative DNA-Schäden beobachtet (Pool-Zobel et al. 1999, Ramirez-Tortosa et al. 2001, Kong et al. 2003). Die Anthocyane können auch vor UVA- und UVB-induziertem oxidativen Stress in humanen Kreatinozyten schützen (Tarozzi et al. 2005, Cimino et al. 2006, Afaq et al. 2007).

Untersuchungen *in vitro* zeigten eine Vielzahl weiterer biologischer Wirkungen der Anthocyane, Anthocyanidine oder anthocyanreichen Extrakte. Neben dem Einfluss auf Entzündungen und das Herzkreislaufsystem wurden krebspräventive Eigenschaften untersucht. So konnten verschiedene Gruppen eine gesteigerte Apoptose, einen Rückgang der Zellproliferation und eine Hemmung verschiedener Proliferation-assoziiierter Signalkaskaden zeigen (Hou 2003, Prior et al. 2006, Yi et al. 2007). Hierbei spielen im Wesentlichen folgende Eigenschaften der Substanzen eine Rolle:

- Schutz der DNA (Azevedo et al. 2003)
- Enzymhemmung
- Erhöhung der Zytokinbildung
- anti-inflammatorische Wirkung
- Membranstärkung (Lila et al. 2004).

An HT29-Zellen hemmen Cyanidin, Delphinidin und Malvidin das Zellwachstum mit  $IC_{50}$ -Werten um 40  $\mu$ M. Delphinidin hemmt die Aktivität verschiedener Rezeptortyrosinkinasen im zellfreien System und *in vitro*. Delphinidin ist ein potenter Hemmstoff der Rezeptortyrosinkinaseaktivität des EGFR und des ErbB2-Rezeptors (Marko et al. 2004, Fridrich et al. *eingereicht*), sowie von VEGFR 1 und VEGFR 2. Malvidin hemmt die Aktivität der cAMP-spezifischen Nukleotidphosphodiesterase 4 im cAMP-Signalweg, was vermutlich zu den wachstumshemmenden Eigenschaften des Anthocyanidins beiträgt (Meiers et al. 2001, Marko et al. 2004). Die entzündungshemmende Wirkung wird auf die Hemmung des nuklearen Faktors *kappa* B-Signalwegs sowie die Hemmung der Cyclooxygenase-2 zurückgeführt (Hou et al. 2004). Die Hemmung humaner Topoisomerasen durch Anthocyane wird in einem gesonderten Kapitel behandelt.

Die meisten dieser *in vitro*-Studien wurden aufgrund der einfacheren Beschaffung und höheren Reinheit mit Anthocyanidinen, also den Aglyka, durchgeführt, die jedoch in der Natur kaum vorkommen (Hou et al. 2004). Allerdings konnten auch für isolierte Glykoside, wie das Cyanidin-3-glukosid protektive Wirkungen beobachtet werden, wie beispielsweise die verringerte Bildung von Mikrokernen durch Wasserstoffperoxid bei Vor- oder Coinkubation mit dem Anthocyan (Fimognari et al. 2004).

## **Anthocyanreiche Extrakte**

Da sich die Nahrung komplex zusammensetzt sind die Wirkungen einzelner Substanzen zwar relevant um die Substanzen herauszufiltern, die für eine positive Wirkung verantwortlich sind, jedoch um die Wirkung der Nahrungsmittel oder Nahrungsergänzungsmittel auf bestimmten zelluläre Wirkungen zu untersuchen ist es daher erforderlich auch komplexe Gemische der Polyphenole einzusetzen. Es spiegelt die Wirkung der komplexen Nahrungsmittel besser wider. Die volle Komplexität der Nahrungsmittel kann dadurch zwar nicht erfasst werden, da die Matrixeffekte nicht berücksichtigt werden, jedoch ein eventueller additiver oder synergistischer Effekt wird erfasst.

Neben den Einzelsubstanzen gibt es bereits eine Reihe von Studien zur Wirkung komplexer Gemische. Trauben-, Blaubeer- und Aroniaextrakte zeigen eine Wachstumshemmung an HT29-Zellen in Konzentrationen  $\geq 25 \mu\text{g/ml}$  (Zhao et al. 2007). Ein Himbeerextrakt bewirkt in HT29-Zellen einen Arrest in der G<sub>1</sub>-Phase des Zellzykluses (Coates et al. 2007). Auch die antioxidative Wirkung der Anthocyane konnte mit Hilfe einer in vivo-Studie an gesunden Probanden nach Aufnahme von 0,75 Litern eines anthocyanreichen Saftes gezeigt werden. Dabei konnte eine signifikante Erniedrigung der oxidativen DNA-Schäden in den Plasmaproben der Probanden während der Zeit der Saftaufnahme gemessen werden, im Gegensatz zu den Schäden während der „run-in-Phase“ und der „wash-out-Phase“ (Weisel et al. 2006).

Cooke et al. (2006) konnten die Reduktion der Adenombildung bei APC<sup>min</sup>-Mäusen nach Gabe von 0,3 % eines Heidelbeerextrakts in der Nahrung nachweisen. Bei dem Extrakt handelt es sich um ein Nahrungsergänzungsmittel der Firma INDENA<sup>®</sup> namens Mirtoselect<sup>®</sup>.

### **Mirtoselect**

Mirtoselect ist ein Heidelbeerextrakt aus reifgeernteten Heidelbeeren, der etwa 36 % Anthocyane enthält.

Bei den enthaltenen Anthocyanen handelt es sich um die Delphinidin-, Cyanidin-, Petunidin-, Päonidin- und Malvidinglykoside, die in Tabelle 4 aufgeführt sind. Die Anthocyane des Extrakts können chromatographisch (HPLC) getrennt und bestimmt werden. Dies wurde mit einer HPLC-Methode von der Firma INDENA<sup>®</sup> veröffentlicht. Eine schnellere Methode zur Identifikation der Substanzen in Plasma und Urin mittels LC/MS/MS entwickelte die Gruppe um Cooke (Cooke et al. 2006).

**Tab. 4:** In Mirtoselect enthaltene Anthocyane und Anthocyanidine mit Retentionszeiten für HPLC und LC/MS/MS (Cooke et al. 2006)

	Retentionszeit [min]		Substanz
	HPLC	LC/MS/MS	
1	11,8	3,01 ± 0,04	Delphinidin-3-O-galaktosid
2	14,15	3,40 ± 0,05	Delphinidin-3-glukosid
3	16,23	3,94 ± 0,05	Cyanidin-3-O-galaktosid
4	16,66	4,20 ± 0,06	Delphinidin-3-O-arabinosid
5	19,41	4,60 ± 0,06	Cyanidin-3-O-glukosid
6	21,01	5,29 ± 0,06	Petunidin-3-O-galaktosid
7	21,6	5,47 ± 0,06	Cyanidin-3-O-arabinosid
8	24,16	6,09 ± 0,07	Petunidin-3-O-glukosid
9	24,89	-	Delphinidin
10	26,38	6,89 ± ,12	Päonidin-3-O-galaktosid
11	26,92	7,42 ± 0,08	Petunidin-3-O-arabinosid
12	30,18	8,21 ± 0,06	Päonidin-3-O-glukosid
13	30,81	8,60 ± 0,05	Malvidin-3-O-glukosid
14	32,52	9,02 ± 0,04	Päonidin-3-O-arabinosid
15	34,18	9,34 ± 0,04	Malvidin-3-O-galaktosid
16	35,41	-	Cyanidin
17	37,15	10,0 ± 0,03	Malvidin-3-O-arabinosid
18	40,45	-	Petunidin
19	44,33	-	Päonidin
20	44,75	-	Malvidin

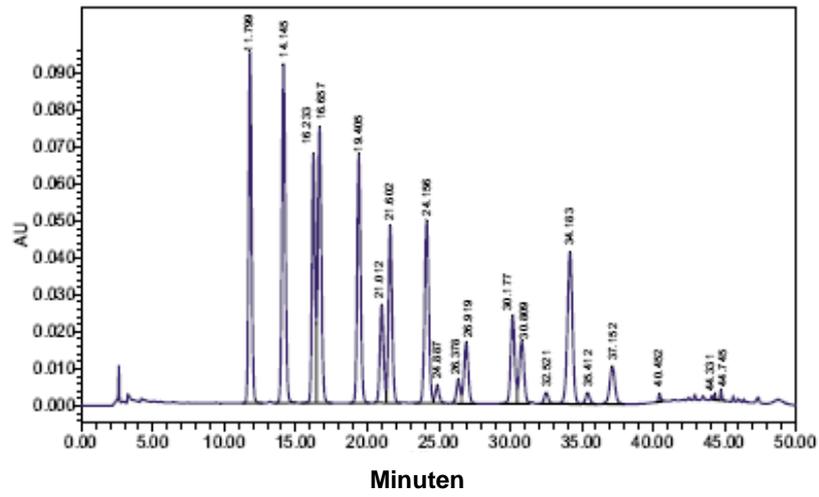
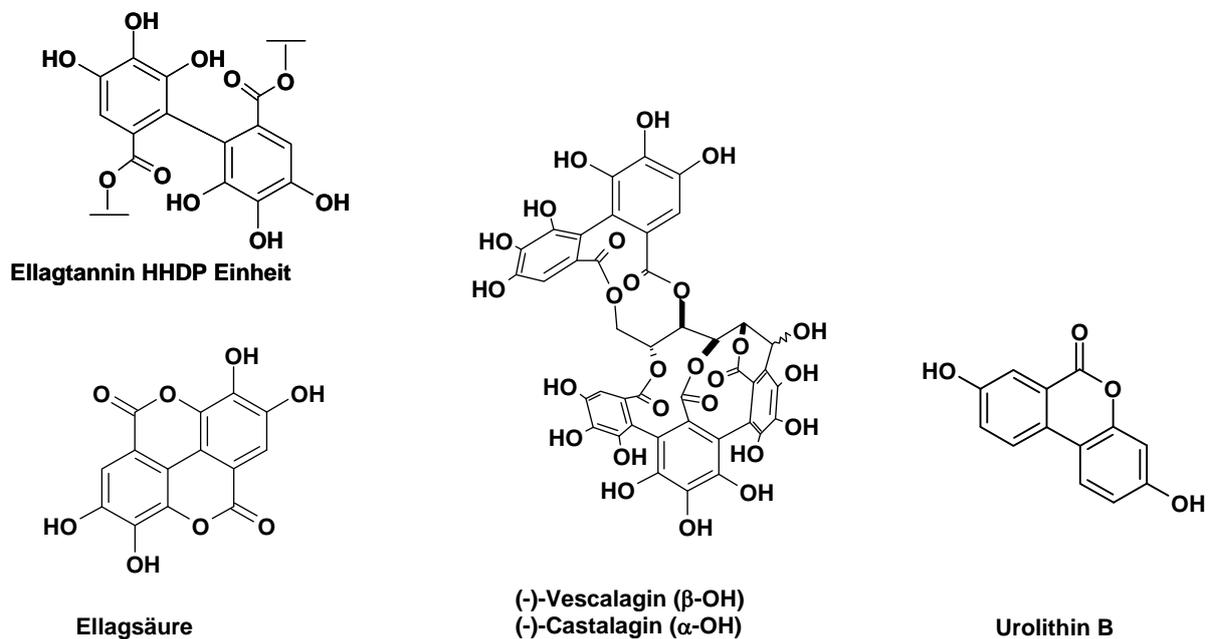


Abb. 35: HPLC-Chromatogramm der Anthocyane in Mirtoselect (INDENA®).

## Ellagtannine und Ellagsäure

Ellagtannine gehören zur Gruppe der hydrolysierbaren Tannine und sind wie Proanthocyanidine wasserlösliche phenolische Substanzen mit einem relativ hohen Molekulargewicht. Sie entstehen beim Metabolismus von Gallussäure in Pflanzen und sind Ester der hexahydroxydiphenolischen (HHDP) Säure (Abb. 36) und einem offenkettigen Polyol, wie z.B. Glukose. Vescalagin und Castalagin, zwei Epimere, sind Ester einer offenkettigen Glukose mit einer HHDP-Einheit und einer 2,3,5-Nonahydroxyterphenoyleinheit. Durch Substitution an der C1-Position des offenkettigen Zuckers mit Glykosiden führt zu komplexeren Ellagtanninen, z.B. mit Lyxose zu Grandinin und mit Xylose zu Roburin E. In saurem oder basischem Milieu werden die Esterbindungen hydrolysiert und es entsteht die wasserunlösliche Ellagsäure, von der die Ellagtannine ihren Namen haben. Monomere Ellagtannine können in höheren Pflanzen weiter oxidiert werden und Dimere, Trimere und Tetramere mit einem Molekulargewicht von bis zu 4.000 g/mol bilden (Clifford und Scalbert 2000, Quideau et al. 2005).



**Abb. 36:** Struktur der HHDP-Einheit, der Ellagsäure, Vescalagin und Castalagin, sowie dem Abbauprodukt Urolithin B

Asiatische Arbeitsgruppen konnten mehr als 150 Ellagtannine aus chinesischen Heilpflanzen isolieren. Diesen Pflanzen wurde neben anderen positiven Wirkungen, wie antioxidative und

anti-inflammatorischer auch eine potente antikanzerogene Wirkung zugesprochen (Okuda et al. 1981 und 1993, Nishioka et al. 1995, Chung et al. 1998). In westlichen Ländern finden Tannine einen Einsatz als Gerbstoffe. Die Hauptquellen für eine Aufnahme von Ellagttanninen über die Nahrung in westlichen Ländern stellen rote Früchte, wie Erdbeeren, Himbeeren oder Brombeeren dar. Daneben konnten sie auch in Mango, Walnüssen, Haselnüssen oder Likören aus Beeren nachgewiesen werden (Clifford und Scalbert 2000). Auch verschiedene Eichenarten sind reich an Ellagttanninen. So konnten auch in holzfassgelagerten Whiskeys oder Rotweinen Ellagttannine bestimmt werden. Glabasnia et al. detektierten unter anderem Castalagin, Vescalagin, Grandinin und Roburin E in Rotwein, der in Holzfässern der amerikanischen Eiche (*Quercus alba*) gelagert wurde (König et al. 1994, Glabasnia et al. 2006). Neuere Arbeiten konnte diese und weitere Ellagttannine in Eichenholzextrakten nachweisen. Das Holz wurde hierfür 3 Jahre natürlich getrocknet und anschließend „getoastet“. Der Gehalt an Ellagttanninen liegt dabei in amerikanischer Eiche (*Quercus alba*) zwischen 0,12 mg Roburin B/g Holz und 2,86 mg Castalagin/g Holz. Die beiden Stereoisomere Castalagin und Vescalagin (Abb. 36) stellen dabei den größten Anteil an Ellagttanninen in dieser Holzart dar, die insgesamt ca. 4 mg der beiden Ellagttannine/g Holz enthält (Cadahía et al. 2001). Daneben kommen vor allem noch weitere glykosylierte Ellagttannine in Holz vor. Die Ellagttannine beeinflussen den Geschmack der Getränke, dabei spielt die Größe der Fässer und deren Alter eine entscheidende Rolle. Je größer die Fässer, desto geringer der Einfluss auf den Geschmack (Perez-Prieto et al. 2003). Die Aufnahme der Substanzen aus Rotwein ist abhängig von der Lagerzeit des Weins in Holzfässern.

Da sich die Ellagttannine vorwiegend in den nichtessbaren Pflanzenteilen befinden wurde ihnen als Nahrungsmittelinhaltsstoffen mit positiven biologischen Wirkung erst spät Beachtung geschenkt, obwohl ihr Vorkommen in verschiedenen Nüssen und Beeren bereits seit den 1960er Jahren bekannt ist (Clifford and Scalbert 2000).

Da noch nicht sehr viel über die Gehalte an Ellagttanninen in der Nahrung bekannt ist gibt es bisher auch kaum Daten zu Aufnahmemenge oder Bioverfügbarkeit der Substanzen. Eine Abschätzung über die Aufnahmemenge ist ebenfalls schwierig, da die Menge verzehrter Beeren zwar erfasst wird, jedoch auch die verarbeitete Form, beispielsweise als Joghurt. In diesen Produkten ist der Gehalt an Ellagttanninen stark reduziert gegenüber den Ausgangsnahrungsmitteln.

Die biologischen Wirkungen der Ellagttannine sind bisher nur teilweise aufgeklärt und die ermittelten Daten sind zum Teil widersprüchlich. Je nach Art der Applikation und der Formulierung kam es zu einer Hemmung prokanzerogener Faktoren oder es wurde kein

Einfluss auf diese gefunden. Neben einer antioxidativen Wirkung der Ellagtannine *in vitro* wurden bisher nur wenige Wirkungen bestimmt (Mullen et al. 2002, Cerdá et al. 2003, Moharram et al. 2003). Es konnte beispielsweise die Induktion von Apoptose in humanen Tumorzellen durch makrozyklische Ellagtannine mittels DNA-Fragmentierung und Caspaseaktivierung bestimmt werden (Sakagami et al. 2000). Auch die Hemmung humaner Topoisomerasen durch die Substanzen konnte beobachtet werden, auf die in einem gesonderten Kapitel näher eingegangen wird.

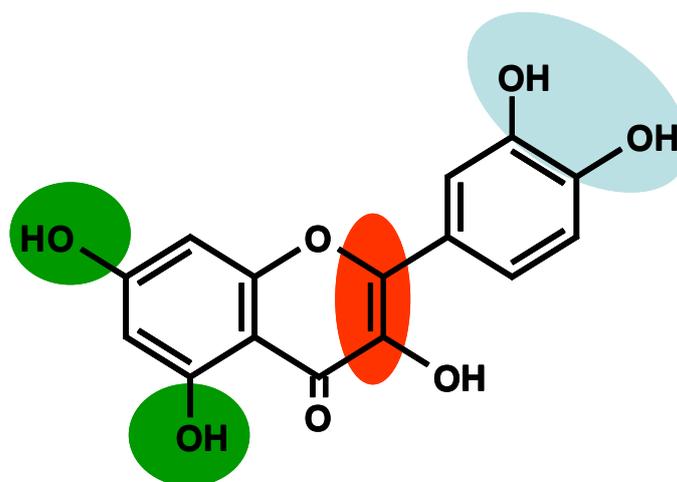
Die Erforschung der biologischen Wirkungen der Ellagsäure ist weiter vorangeschritten. In den 1980er Jahren konnte eine Schutzwirkung von Ellagsäure vor Benzo-[a]-pyren-induzierten Neoplasien in Mäusen beobachtet werden (Lesca et al. 1983, Chang et al. 1985). Narayanan et al. konnten *in vitro* an CaSki-Zellen (epitheliale Zellen einer Cervix Karzinommetastase) eine Apoptosestimulation und eine Reduktion der Mitoserate, sowie eine erhöhte p21-Expression nach Inkubation mit Ellagsäure ( $\leq 1$  mM) bestimmen. Jedoch zeigte Ellagsäure keinen Einfluss auf die p53-Expression (Narayan et al. 1999). Des Weiteren hemmt Ellagsäure die Aktivität der wachstumsassoziierten Rezeptortyrosinkinasen VEGFR und PDGFR in niedrig mikromolare Konzentrationen im zellfreien Testsystem (Labrecque et al. 2005).

Zur Aufnahme, dem Metabolismus und der Bioverfügbarkeit der Ellagtannine im Menschen gibt es bisher keine definierten Studien und obwohl *in vitro* Versuche und Tierstudien gezeigt haben, dass es zu einer Hydrolyse der HHDP-Einheit kommt, ist weiter unklar ob dies auch im Bereich des physiologischen pH-Wertes und unter Beteiligung der humanen Mikroflora der Fall ist. Möglicherweise kann die Darmflora die unlösliche Ellagsäure und die Tannine metabolisieren und die Aufnahme in den Körper erhöhen. In einer Studie an Mäusen konnte Ellagsäure sowohl in Urin, Galle als auch im Blut als Sulfat-, Glukuronid- und Glutathionkonjugat nachgewiesen werden (Teel und Martin 1988). Cerdá et al. konnten einen charakteristischen Metaboliten von Ellagtanninen und Ellagsäure im Urin von Probanden nach Walnussverzehr bestimmen: Urolithin B. Dabei vermutet die Gruppe eine Metabolisierung der Substanzen durch die Mikroflora des Kolons. Auch Urolithin B kann anschließend glukuronidiert werden. Das Glukuronid dieser Substanz wurde ebenfalls detektiert (Cerdá et al. 2005 und 2006).

## Polyphenole als Topoisomerasehemmer

Die Hemmung humaner Topoisomerasen durch verschiedene polyphenolische Nahrungsmittelinhaltsstoffe wurde bereits mehrfach beschrieben. Die Arbeiten fokussieren sich dabei vorwiegend auf die Aktivität der Einzelsubstanzen. Sehr viele Arbeiten beschreiben eine Hemmung von sowohl Topoisomerase I wie auch Topoisomerase II durch niedrige Konzentrationen (ca. 30-50  $\mu\text{M}$ ) des Flavonols Quercetin. Dabei konnte *in vitro* in zellfreien Versuchen die Wirkung als Topoisomerasegift beschrieben werden. Als Hemmstoffe humaner Topoisomerasen konnten auch das Flavon Luteolin, das Flavanon Eriodictiol, das Catechin EGCG, das Isoflavon Genistein und auch der Ellagsäure beschrieben werden (Mitra et al. 2000, Chowdhury et al. 2002, Austin et al. 1992, Constantinou et al. 1995, Boege et al. 1996, Bandele und Osheroff 2007).

Bei näherer Betrachtung der bisherigen Ergebnisse scheint das Substitutionsmuster der Flavonoide einen großen Einfluss auf die Hemmwirkung auf die Topoisomerasen zu besitzen. Der Hydroxylierungsgrad des B-Rings ist hier von entscheidender Bedeutung: Je mehr Hydroxygruppen desto besser ist die Hemmwirkung (Yamashida et al. 1990, Austin et al. 1992, Constantinou et al. 1995, Boege et al. 1996, Cho et al. 2000, Bandele und Osheroff 2007). In Abbildung 37 sind die Strukturmerkmale aufgezeigt, die beispielsweise bei Flavonen/Flavonolen für eine potente Topoisomerashemmung charakterisiert wurde.



**Quercetin**

**Abb. 37:** Struktur-/Aktivitätsanforderungen zur Hemmung der Topoisomerase II durch Flavone/Flavonole

Die Untersuchungen beschränken sich nicht nur auf einzelne Aglyka sondern es wurden auch verschiedene Glykoside oder komplexe Gemische, wie Fruchtextrikte auf ihre Fähigkeit getestet, Topoisomerasen zu hemmen. Die Gruppe um Martín-Cordero konnten in einem zellfreien System die Stabilisierung von Topoisomerase-DNA-Komplexen durch drei Isoflavonglykoside bestimmen (Martín-Cordero et al. 2000). Eine andere Arbeitsgruppe zeigte ähnliche Ergebnisse für zwei Myricetinglykoside. Die gleiche Gruppe untersuchte weitere Glykoside und fand weitere Topoisomerasehemmstoffe unter ihnen (López-Lázaro et al. 2000, 2002a und 2002b). Ein Teeextrakt, daraus gewonnene Subfraktionen, sowie isolierte Substanzen konnten als Hemmstoffe der Aktivität humaner Topoisomerasen identifiziert werden (González de Mejía et al. 2006). Auch verschiedene Weinextrakte weisen eine Hemmung der Topoisomerase I im zellfreien System auf (Stagos et al. 2005). Ein Traubenextrakt hemmt die Topoisomerase II-Aktivität effektiver als die bis dahin getesteten bekannten Einzelsubstanzen (Jo et al. 2007).

Frühere Arbeiten in unserem Arbeitskreis beschäftigten sich mit dem Einfluss von Anthocyanidinen auf die Aktivität humaner Topoisomerasen und auf die DNA-Integrität. So konnte gezeigt werden, dass die Anthocyanidine mit vicinalen Hydroxygruppen am B-Ring (Cyanidin und Delphinidin) im zellfreien System effektiv die Aktivität der Topoisomerasen I, II $\alpha$  und II $\beta$  ab Konzentrationen  $\geq 2,5 \mu\text{M}$  hemmen. Alle getesteten Anthocyanidine weisen eine Affinität zur DNA auf, da sie alle Ethidiumbromid aus der großen und Hoechst H33258 von der kleinen Furche der DNA verdrängen können. Obwohl im zellfreien System keine Stabilisierung des Topoisomerase-DNA-Intermediats gefunden werden konnte, zeigten Cyanidin, Malvidin und Delphinidin eine strangbrechende Wirkung in HT29-Zellen nach einstündiger Inkubation (Habermeier et al. 2005).

Der Einfluss von Ellagttanninen auf humane Topoisomerasen ist auch bereits bekannt. Zwei bekannte Ellagttannine, Vescalagin und das Epimer Castalagin hemmen bereits ab einer Konzentration von  $1 \mu\text{M}$  die Topoisomerase II-Aktivität (Quideau et al. 2005). Ein weiterer Topoisomerasehemmstoff, das Acutissimin A konnte von der gleichen Arbeitsgruppe in Rotwein bestimmt werden (Quideau et al. 2003). Kashiwada et al. konnten bereits 1993 die Hemmung der Topoisomerase II durch Acutissimin A nachweisen, wobei eine komplette Hemmung des Enzyms bereits ab einer Konzentration von  $0,2 \mu\text{M}$  erreicht wird.

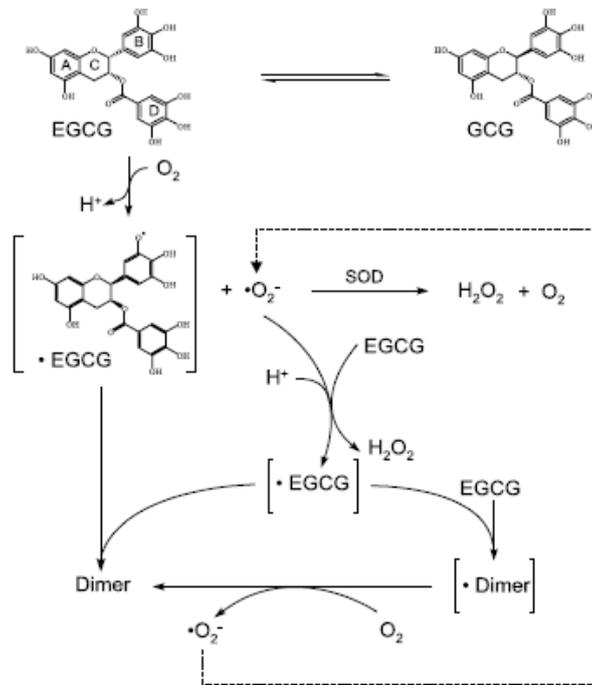
## H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – Entwicklung in der Zellkultur

Die meisten *in vitro*-Studien arbeiten mit Zellkultur um kostengünstig an einem Modell die Wirkung von Substanzen auf humane und speziell auf Karzinomzellen zu untersuchen. Dabei wird davon ausgegangen, dass das Kulturmedium keinen Einfluss auf die biologischen Wirkungen der Testsubstanzen hat. Da meist mit einer Kontrolle unter den gleichen Bedingungen gearbeitet wird, sollte dies auch vorausgesetzt werden können. Problematisch ist es, wenn die Testsubstanz selbst mit den Mediuminhaltsstoffen reagiert und unerwünschte Nebenprodukte entständen.

Die Arbeitsgruppe um Lapidot fand eine Akkumulation von Wasserstoffperoxid bei Inkubation mit phenolischen Substanzen im Zellkulturmedium. Dabei gibt es auch Unterschiede zwischen den Medien wobei in „Dulbecco’s Modified Eagle Medium“ (DMEM) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> vermehrt gebildet wird (Lapidot et al. 2002a). Auch eine andere Arbeitsgruppe kann diesen Befund bestätigt und eine rasche Wasserstoffperoxidentwicklung in DME-Medium nach einstündiger Inkubation mit 1 mM Quercetin, Catechin, Epigallocatechin und Epigallocatechin-3-gallat von bis zu 115 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nach einer Stunde Inkubation gemessen (Long et al. 2000). Diese Entdeckung wirft die Frage auf, ob bisherige Ergebnisse für biologische Wirkungen der Polyphenole Artefakte des gebildeten H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sind. Ein pro-oxidativer Effekt von Quercetin, Catechin und Ascorbinsäure in hohen Konzentrationen konnte durch Zugabe von Metmyoglobin, welches das gebildete Wasserstoffperoxid abfängt, signifikant vermindert werden (Lapidot et al. 2002b). Nakagawa et al. und Hou et al. schlagen einen möglichen Mechanismus der Wasserstoffperoxidbildung vor. Dabei wird H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> im sauren Milieu aus dem Sauerstoffradikalanion gebildet.

Unter Zellkulturbedingungen neigt EGCG zur Autoxidation. Die Reaktion wird vermutlich durch Metallionen im Medium katalysiert und es entstehen Superoxidradikalanionen und EGCG-Radikale. Ein Superoxidradikal kann mit einem weiteren EGCG-Molekül reagieren und es entsteht H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und ein weiteres EGCG-Radikal. Zwei EGCG-Radikale können zu einem Dimer abreagieren. Ein EGCG-Radikal kann jedoch auch mit einem EGCG ein Dimerradikal bilden, welches mit molekularem Sauerstoff zu dimerem EGCG und einem Sauerstoffradikalanion reagiert. Ein alternativer Weg ist die Oxidation EGCG-Radikals durch molekularen Sauerstoff wodurch ein Superoxidradikalanion und ein Chinon entstehen. Das Chinon kann mit einem zweiten EGCG-Molekül ein Dimer bilden. In beiden Fällen kommt es zu einer Reaktion zwischen einem Superoxidradikalanion und einem Molekül EGCG und

zur Bildung von EGCG-Dimeren und Wasserstoffperoxid (Nakagawa et al. 2004, Hou et al. 2005).



**Abb. 38:** Postulierter Mechanismus für die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Akkumulation (Hou et al., 2005) EGCG: (-)-Epigallocatechin-3-gallat, GCG: Gallocatechin-3-gallat, •EGCG: (-)-Epigallocatechin-3-gallat-Radikal

Wasserstoffperoxid zeigt vielfältige biologische Wirkungen und nimmt Einfluss auf zelluläre Mechanismen (Cantoni et al. 1989):

- Zellproliferation
- Genexpression
- Transkription
- Signaltransduktion
- Apoptose
- Differenzierung
- Zelluläre Kalziumspiegel

Der Einsatz von Katalase oder Metmyoglobin als Antioxidantien wird vorgeschlagen um einen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-vermittelten Effekt auszuschließen (Lapidot et al. 2002a und 2002b, Halliwell et al. 2000). Durch Katalase wird das Wasserstoffperoxid zu Wasser und Sauerstoff dismutiert und so oxidativer Stress vermieden.

### **Problemstellung**

Bisherige Arbeiten im Arbeitskreis haben gezeigt, dass Anthocyanidine mit vicinalen Hydroxygruppen am B-Ring (Cyanidin und Delphinidin) die Aktivität humaner Topoisomerasen vom Typ I und Typ II im zellfreien System potent hemmen. Dabei wirken sie als rein katalytische Inhibitoren und nicht als Topoisomerasegifte (Habermeyer et al. 2005). Jedoch induzieren diese Substanzen in Konzentrationen  $\geq 50 \mu\text{M}$  in HT29-Zellen DNA-Strangbrüche (Habermeyer et al. 2005).

Eines der Ziele dieser Arbeit war die Aufklärung der zellulären Mechanismen der DNA-schädigenden Wirkung der Anthocyanidine. Wir konnten bereits zeigen, dass unter Zellkulturbedingungen bei der Inkubation mit Delphinidin im Kulturmedium hochreaktives Wasserstoffperoxid entsteht (Kern et al. 2007). Aufbauend auf diesen Ergebnissen sollte der Frage nachgegangen werden, in welchem Maße das akkumulierte  $\text{H}_2\text{O}_2$  zur DNA-Schädigung durch Anthocyanidine *in vitro* beiträgt. Des Weiteren sollte der Einfluss der Topoisomerasehemmung zur strangbrechenden Wirkung von Delphinidin näher beleuchtet werden. Die katalytische Hemmwirkung von Delphinidin auf humane Topoisomerasen im zellfreien System sollte nun mittels ICE-Bioassays, einem Testsystem zur Detektion kovalenter DNA-Topoisomerase-Intermediate auf zellulärer Ebene, an HT29-Zellen verifiziert werden. Darüber hinaus sollte vertiefend untersucht werden inwieweit Delphinidin die DNA-strangbrechende Effekte von Topoisomerasegiften modulieren kann. Dies soll anhand von Kombinationsversuchen an HT29-Zellen mittels Einzelzellgelelektrophorese und ICE-Bioassay untersucht werden.

Da bislang wenig über die Wirkung von Anthocyanen bzw. anthocyanhaltigen Lebensmitteln auf die DNA-Integrität bekannt ist, sollten in dieser Arbeit erstmals zwei polyphenol-/anthocyanreiche Extrakte im Hinblick auf eine Topoisomerase-vermittelte DNA-Schädigung untersucht. Bei den Extrakten handelt es sich um Mirtoselect, ein als Nahrungsergänzungsmittel erhältlicher Heidelbeerextrakt und um Oenocyanine, ein zum Färben von Lebensmitteln eingesetzter Weintraubenextrakt.

Neben den Anthocyanen wurde in Beerenfrüchten eine weitere polyphenolische Substanzklasse identifiziert, die Ellagatannine. Sie liegen sowohl glykosyliert (z.B. Grandinin, Roburin E) als auch nicht glykosyliert (z.B. Castalagin, Vescalagin) in Lebensmitteln, wie beispielsweise in holzfassgereiften Rotweinen vor. Dieser Klasse an hydrolysierbaren Tanninen werden anti-proliferative, apoptotische und antioxidative Wirkungen zugeschrieben (Mullen et al. 2002, Cerdá et al. 2003, Moharram et al. 2003). Jedoch ist wenig über ihre

zellulären Wirkmechanismen bekannt. Bislang sind nur die Stereoisomere Castalagin und Vescalagin als Hemmstoffe humaner Topoisomerasen im zellfreien System charakterisiert worden (Quideau et al. 2003, Quideau et al. 2005). Der Einfluss der glykosylierten Verbindungen Grandinin und Roburin E auf die Aktivität von Topoisomerasen sollte in der vorliegenden Dissertation erstmals untersucht werden. Die Relevanz der im zellfreien System bestimmten Effekte für die DNA-Integrität sollte dabei anschließend auf zellulärer Ebene verifiziert werden.

Mit dieser Arbeit sollen zelluläre Wirkmechanismen von Lebensmittelinhaltsstoffen charakterisiert werden, die für die DNA-Integrität von Bedeutung sind, um so in Zeiten wachsenden Interesses an Nahrungsergänzungsmitteln zu einer Risiko-Nutzen-Evaluierung beizutragen.

## ***Ergebnisse und Diskussion***

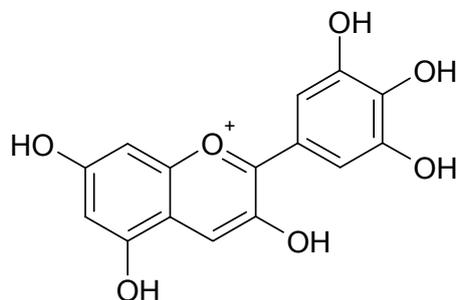
Die Ergebnisse lassen sich in drei Abschnitte unterteilen:

- Einfluss der Anthocyanidine auf die DNA-Integrität der humanen Kolonkarzinomzelllinie (HT29)
- Effekte von polyphenol-/anthocyanreichen Extrakten auf humane Topoisomerasen und die DNA-Integrität
- Effekte von Ellagantanninen und einem ellagantanninreichen Eichenholzextrakt auf humane Topoisomerasen und die DNA-Integrität

### **Einfluss von Anthocyanidinen auf die DNA-Integrität in HT29-Zellen**

Delphinidin (Abb. 39) verursacht DNA-Strangbrüche in HT29-Zellen ab einer Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  (Habermeyer et al. 2005). Es konnte in unserem Arbeitskreis zudem gezeigt werden, dass diese Wirkung nicht Topoisomerase-vermittelt ist, da das Enzym TDP-1 die durch Delphinidin induzierten Strangbrüche nicht erkennen kann (Holbach 2005, unveröffentlichte Daten). Zunächst wird geprüft, ob die DNA-strangbrechende Wirkung des Anthocyanidins Delphinidin auf im Medium entstandenes Wasserstoffperoxid zurückgeführt werden kann und ob das Ausbleiben der antioxidativen Wirkung unter Zellkulturbedingungen, welches von verschiedenen Arbeitsgruppen beschrieben wurde auch

auf die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies begründet ist (Pool-Zobel et al. 1999, Lazzé et al. 2003).



Delphinidin

**Abb. 39:** Die Struktur von Delphinidin

Weiter wird untersucht, ob Delphinidin als Hemmstoff der katalytischen Aktivität humaner Topoisomerasen das strangbrechende Potential von Topoisomerasegiften verändern kann.

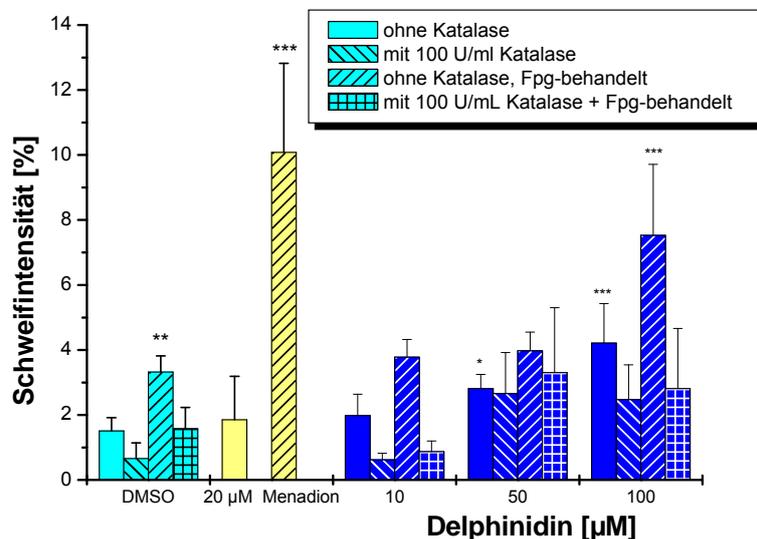
### **DNA-schädigende Wirkung des Anthocyanidins Delphinidin**

#### **Induktion von DNA-Strangbrüchen durch Delphinidin**

Einige Arbeitsgruppen haben beschrieben, dass Polyphenole im Zellkulturmedium Wasserstoffperoxid bilden können (Lapidot et al. 2002a und 2002b, Kong et al. 2000). Das Anthocyanidin Delphinidin wurde in unserer Arbeitsgruppe auf die Bildung von Wasserstoffperoxid in DME-Medium, welches für Kultivierung und Inkubation der für Kolonkarzinomzelllinie HT29 verwendet wurde, untersucht (Kern et al. 2007). Mittels Amplexrot<sup>®</sup>-Test wurde dabei die Entstehung der reaktiven Sauerstoffspezies H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> im Medium nach verschiedenen Inkubationszeiten (15 min, 45 min, 24 h, 72 h) bestimmt. Der Test basiert darauf, dass 10-Acetyl-3,7-dihydrophenoxazin durch eine peroxidasekatalysierte Reaktion mit Wasserstoffperoxid zu fluoreszierendem Resorufin umgesetzt wird, welches durch Absorptionsmessung quantifiziert werden kann. Die Menge an Resorufin ist proportional zur Menge an gebildetem Wasserstoffperoxid. Es wurde eine konzentrationsabhängige Zunahme der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Bildung nach Inkubation von HT29-Zellen mit Delphinidin in FKS-haltigem (10 %) Medium gezeigt. Eine maximale Konzentration von 11,46 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

konnte nach 45-minütiger Inkubation mit 75  $\mu\text{M}$  Delphinidin bestimmt werden. Durch Zugabe von 100 U/ml kann die Wasserstoffperoxidakkumulation im Inkubationsmedium vollständig unterdrückt werden (Kern et al. 2007).

Frühere Ergebnisse in unserem Arbeitskreis zeigten, dass alle Anthocyanidine ab einer Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  nach einstündiger Inkubation von HT29-Zellen DNA-Strangbrüche induzieren. Dabei war Delphinidin das potenteste strangbrechende Agens. Abbildung 40 zeigt die Ergebnisse der Einzelzellgelelektrophorese (Cometassay) nach einstündiger Inkubation mit Delphinidin in Konzentrationen zwischen 10  $\mu\text{M}$  und 100  $\mu\text{M}$  in An- und Abwesenheit von Katalase.



**Abb. 40:** Cometassay: Einfluss von gebildeten Wasserstoffperoxid auf die DNA-schädigende Wirkung von Delphinidin in HT29-Zellen (1 h, serumfrei). Positivkontrolle 20  $\mu\text{M}$  Menadion, Zugabe von Katalase um das gebildete  $\text{H}_2\text{O}_2$  zu dismutieren (von oben nach unten gestreift), Fpg-Behandlung zur Detektion oxidativer DNA-Schäden. Abgebildet sind die Mittelwerte  $\pm$  Stabw.,  $n = 3-5$  \*Signifikanter Unterschied zur jeweiligen Kontrolle (\* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ )

Durch Behandlung mit einem bakteriellen Enzym Formamidopyrimidin-DNA-Glykosylase (Fpg) können im Cometassay auch oxidative DNA-Schäden, die so genannten Fpg-sensitiven Stellen detektiert werden. Dazu zählen neben Formamidopyrimidinen auch das 8-OH-Guanin oder auch alkylierte Basen. Das Enzym erkennt den DNA-Schaden und entfernt die geschädigte Base unter Induktion eines DNA-Strangbruchs. Als Positivkontrolle für oxidativen Stress wurde der Redoxcyclus Menadion in einer Konzentration von 20  $\mu\text{M}$  eingesetzt. Da Menadion in Anwesenheit von Katalase keine oxidativen DNA-Schäden

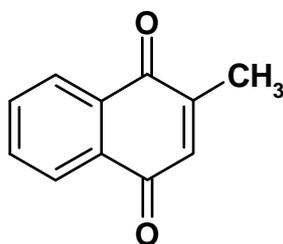
verursacht, wird der Positivkontrolle keine Katalase zugesetzt, damit die Wirkung des Fpg-Enzyms verdeutlicht werden kann. Delphinidin zeigt nach Fpg-Behandlung ein pro-oxidatives Potenzial ab einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  (Abb. 40, von links unten nach rechts oben gestreifte Balken).

Der Einfluss des gebildeten Wasserstoffperoxids auf die DNA-schädigende Wirkung des Anthocyanidins wird im Cometassay durch Zugabe von 100 U/ml Katalase bestimmt. Die Katalase bewirkt eine Dismutation des  $\text{H}_2\text{O}_2$  zu Wasser und Sauerstoff. In Anwesenheit von Katalase werden nur noch geringe delphinidinvermittelte DNA-Strangbrüche und keine oxidativen DNA-Strangbrüche (Delphinidin  $\geq 100 \mu\text{M}$ ) gemessen. Dies lässt darauf schließen, dass die oxidativen DNA-Schäden in Abwesenheit von Katalase durch das gebildete Wasserstoffperoxid verursacht wurden. Auch die durch Delphinidin verursachten nicht-oxidativen DNA-Schäden sind in Anwesenheit von Katalase reduziert. Die Inkubation von HT29-Zellen mit Delphinidinkonzentrationen  $\geq 50 \mu\text{M}$  führt zu einem Anstieg an DNA-Strangbrüchen auch nach Zusatz von Katalase, der sich jedoch zur Kontrolle als nicht signifikant erwies.

Insgesamt zeigen diese Ergebnisse, dass akkumuliertes  $\text{H}_2\text{O}_2$  in vitro zur DNA-schädigenden Wirkung von Delphinidin beiträgt.

### Antioxidative Wirkung von Delphinidin unter Zellkulturbedingungen

In Abwesenheit von Katalase zeigte Delphinidin keine antioxidative Kapazität bei Vor- und Koinkubation mit dem Redoxcyclus Menadion (Abb. 41, Daten nicht gezeigt).

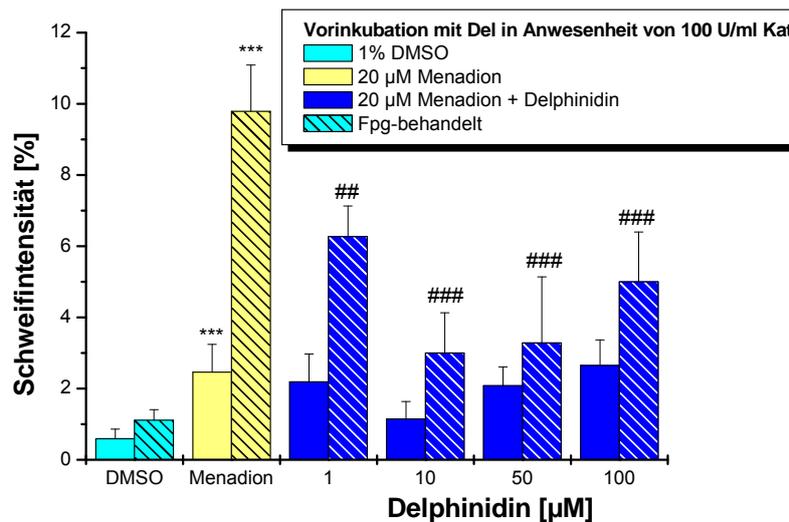


Menadion

**Abb. 41:** Struktur des Redoxcyclers Menadion

Abbildung 42 zeigt die antioxidative Wirkung von Delphinidin unter Zellkulturbedingungen bei Dismutation des akkumulierten Wasserstoffperoxids durch Katalasezusatz. Dazu wurden die HT29-Zellen eine Stunde mit dem Anthocyanidin in Anwesenheit von 100 U/ml Katalase und anschließend eine Stunde mit 20  $\mu\text{M}$  Menadion, einem Redoxcyclus ohne Zusatz von Katalase inkubiert.

In Anwesenheit von Katalase zeigt sich bereits ab einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  Delphinidin eine signifikante Reduktion der menadionverursachten oxidativen DNA-Strangbrüche (Abb. 42, gestreifte Balken). Dieser Effekt ist bei einer Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  Delphinidin maximal, wobei die oxidativen Schäden um ca. 85 % reduziert werden konnten. Bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  Delphinidin sind auch die nicht-oxidativen DNA-Schäden reduziert.



**Abb. 42:** Cometassay: Einfluss von gebildeten Wasserstoffperoxid auf die antioxidative Wirkung von Delphinidin in HT29-Zellen (1 h, serumfrei). Positivkontrolle 20  $\mu\text{M}$  Menadion, Zugabe von Katalase um das gebildete  $\text{H}_2\text{O}_2$  zu dismutieren (gestreifte Balken), Fpg-Behandlung zur Detektion oxidativer DNA-Schäden. Abgebildet sind die Mittelwerte  $\pm$  Stabw., \*Signifikanter Unterschied zur jeweiligen Kontrolle (\* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ ), # Signifikanter Unterschied zu Menadion mit Fpg-Behandlung (# =  $p < 0,05$ ; ## =  $p < 0,01$ ; ### =  $p < 0,001$ ); Kat, Katalase

Das Ausbleiben der antioxidativen Wirkung, welche in Abwesenheit von Katalase beobachtet wurde, ist demnach durch die oxidative Wirkung des gebildeten Wasserstoffperoxids begründet. Auch andere Arbeitsgruppen konnten unter Zellkulturbedingungen keinen Schutz vor oxidativen DNA-Schäden durch Delphinidin bestimmen. Die Gruppe um Pool-Zobel

konnte zeigen, dass Cyanidin und verschiedene Anthocyane und anthocyanreiche Extrakte in einem zellfreien System potente Antioxidantien darstellen. Die Substanzen verursachten eine marginal strangbrechende Wirkung (Cometassay) und konnten die strangbrechende Wirkung von Wasserstoffperoxid in HT29-Zellen nicht verhindern (Pool-Zobel et al. 1999). Auch die *tert*-Butylhydroperoxid-bedingten oxidativen DNA-Schäden können unter Zellkulturbedingungen durch Anthocyane nur zu einem geringen Teil verringert werden (Lazzé et al. 2003).

Im Zellkulturmedium entstehen über 10  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  nach 45 Minuten Inkubation mit 75  $\mu\text{M}$  Delphinidin und damit die Konzentration an Wasserstoffperoxid, die ausreicht um Zellen effektiv zu schädigen. Wasserstoffperoxid gehört zu den reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und kann in Zellen oxidativen Stress und neben Lipidperoxidation auch oxidative DNA-Schäden verursachen (Kirkland 1991). Das im Zellkulturmedium akkumulierte Wasserstoffperoxid könnte demnach für die in der Literatur beschriebenen Probleme bei der Bestimmung der antioxidativen Kapazität der Anthocyane unter Zellkulturbedingungen verantwortlich sein. In zellfreien Systemen agieren die Anthocyanidine oder ihre Glykoside als sehr potente Antioxidantien und sind zwei- bis fünffach potenter als beispielsweise das Vitamin E-Derivat Trolox (Pool-Zobel 1999, Borkowski 2005). Auch *in vivo*-Studien konnte die antioxidative Wirkung anthocyanreicher Nahrung belegen. In einer humanen Interventionsstudie an gesunden männlichen Probanden wurde der Einfluss eines anthocyan-/polyphenolreichen Saftes auf oxidative DNA-Schäden und den Glutathionspiegel untersucht. Während der Phase der Saftaufnahme ist das Level der oxidativen DNA-Schäden signifikant erniedrigt worden und stieg in der Phase nach der Saftaufnahme wieder an (Weisel et al. 2006). *In vivo* besitzen Zellen eine Reihe von Schutzmechanismen, um einer Schädigung durch oxidativen Stress entgegenzuwirken. Die Zellen können durch ein System von Enzymen und Antioxidantien (Superoxiddismutase, Katalase, Glutathion) die reaktiven Sauerstoffspezies inaktivieren. Allerdings bleibt die Frage weiterhin offen, ob es sich tatsächlich nur um eine Artefaktbildung in der Zellkultur handelt.

P. Holbach konnte durch den Einsatz von Tdp-1-überexprimierenden Zellen zeigen, dass die delphinidinvermittelten DNA-Schäden nicht durch eine Stabilisierung des DNA-Topoisomeraseintermediates verursacht werden. Die DNA-Strangbrüche, die in Anwesenheit von Katalase nach Inkubation mit Delphinidin bestimmt wurden, können jedoch durchaus topoisomerase-vermittelt sein. Durch katalytische Hemmung der Enzyme kann es zu topologischem Stress in der Zellen kommen und so DNA-Schäden verursacht werden (Deming et al 2001, Larsen et al. 2003). Auch eine Bindung der Substanz an die DNA ist

vorstellbar. Die planare Verbindung kann auf verschiedene Arten mit der DNA interagieren. M. Habermeyer konnte in zellfreien Testsystemen eine Verdrängung von Ethidiumbromid aus der DNA und eine Verdrängung des Hoechstfarbstoffes H33258 von der kleinen Furche der DNA nachweisen. Die Substanz ist also möglicherweise in der Lage zu interkalieren oder an die kleine Furche der DNA zu binden (Habermeyer et al. 2005). Auch eine oxidative Schädigung ist auch nicht vollständig auszuschließen, da das Fpg-Enzym nicht alle oxidativen DNA-Schäden in zusätzliche Einzelstrangbrüche umwandelt.

Delphinidin kann unter Zellkulturbedingungen die DNA vor Schädigung durch oxidativ-wirkende Substanzen, wie Menadion schützen. Das Ausbleiben dieses Effekts, das bisher von einigen Gruppen festgestellt wurde ist auf die oxidative Wirkung des im Zellkulturmedium gebildeten  $H_2O_2$  zurückzuführen.

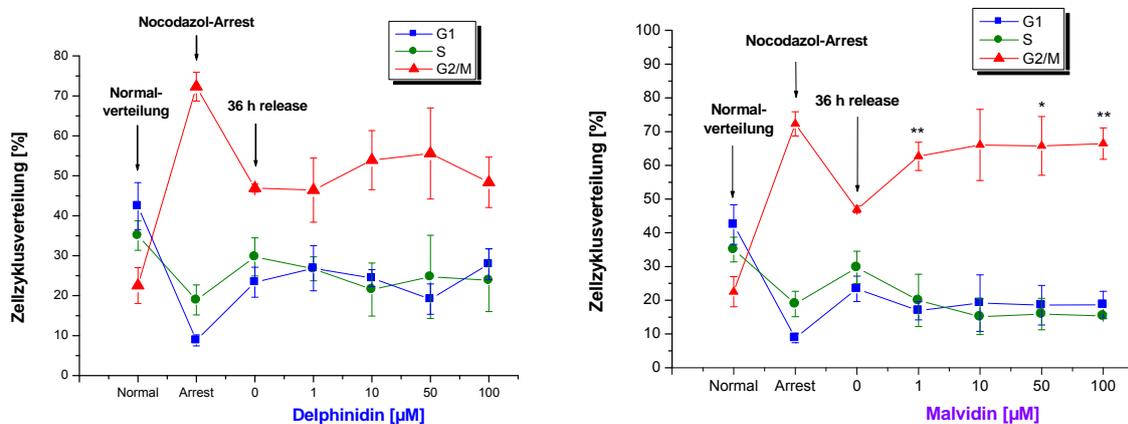
### **Beeinflussung der Zellzyklusverteilung durch Delphinidin und Malvidin**

Delphinidin ist im zellfreien System in der Lage Ethidiumbromid aus der DNA zu verdrängen ( $EC_{50} = 13,7 \pm 1,5 \mu M$ ) und möglicherweise selbst in die DNA zu interkalieren oder an die DNA zu binden. Auch eine Verdrängung von Hoechst H33258 von der kleinen Furche der DNA durch Delphinidin ( $EC_{50} = 15,2 \pm 1,9 \mu M$ ) konnte gezeigt werden (Habermeyer et al. 2005). Des Weiteren kann die katalytische Hemmung der Topoisomerasen einen Einfluss auf die DNA-Integrität haben. Um einen Effekt von Substanzen auf die DNA-Integrität in Zellen zu untersuchen kann neben einer DNA-schädigenden Wirkung auch die Zellzyklusverteilung untersucht werden. Stoffe, die zelluläre Signalkaskaden beeinflussen und so das Signal zur Proliferation und die Synthese der Transkriptionsfaktoren hemmen verursachen einen Arrest der Zellen in der  $G_1$ -Phase des Zellzykluses. Stoffe, die hingegen die Synthese der DNA und die Ausbildung der Mitosespindel verhindern indem sie Topoisomerasen oder die Tubulinpolymerisation hemmen bewirken einen Arrest in der  $G_2/M$ -Phase des Zellzykluses. Substanzen, die viele zelluläre Mechanismen beeinflussen, können sowohl einen Arrest in der  $G_1$ - sowie auch einen  $G_2/M$ -Phase bewirken. Bei der Untersuchung der Zellzyklusverteilung würde dann möglicherweise kein Unterschied zur Normalverteilung detektiert werden können, daher wurden die HT29-Zellen für die in dieser Arbeit durchgeführten durchflusszytometrischen Bestimmung der Zellzyklusverteilung zunächst der  $G_1$ - bzw. in der  $G_2/M$ -Phase synchronisiert. Die Synchronisation in der  $G_1$ -Phase wurde durch eine 48-stündige Inkubation mit serumfreien Medium erreicht. Zur Synchronisation in der  $G_2/M$ -Phase wurden die Zellen 16 h unter serumhaltigen Bedingungen mit  $40 \mu M$  Nocodazol inkubiert, welches die Tubulinpolymerisation hemmt. Die Untersuchung der Arretierung in

der jeweiligen Phase erfolgt nach einer 36-stündigen Inkubation mit DMSO bzw. den Anthocyanidinen in serumhaltigen Medium (10 % FKS). Die Messung der Zellzyklusverteilung erfolgte durchflusszytometrisch nach Fixierung der Zellen in 70 %igem kalten Ethanol und Färbung der Zellen mit DAPI/SR101-Lösung.

Da der Fokus dieser Arbeit auf der Wirkung der Anthocyanidine auf die DNA-Integrität und der Beeinflussung humaner Topoisomerasen und somit auf dem Einfluss auf die DNA-Synthese und Mitose liegt wird auf die Zellzyklusverteilung nach Synchronisation in der G<sub>1</sub>-Phase nicht näher eingegangen. P. Holbach konnte im Rahmen seiner Diplomarbeit eine Arretierung der Zellen in der G<sub>1</sub>-Phase durch Delphinidin und keine Beeinflussung der G<sub>1</sub>-Phase durch Malvidin bestimmen (Holbach 2005).

In Abbildung 43 sind die Ergebnisse der Zellzyklusverteilung nach Synchronisation in der G<sub>2</sub>/M-Phase des Zellzykluses dargestellt. Die Normalverteilung der HT29-Zellen in den Zellzyklusphasen liegt bei 42,2 % in der G<sub>1</sub>-Phase, 35,0 % in der S-Phase und 22,5 % in der G<sub>2</sub>/M-Phase. Durch Synchronisation in der G<sub>2</sub>/M-Phase wurde eine Verteilung von 8,8 % in der G<sub>1</sub>-Phase, 18,9 % in der S-Phase und 72,2 % in der G<sub>2</sub>/M-Phase und somit ein deutlicher G<sub>2</sub>/M-Arrest erreicht. Nach 36-stündiger Inkubation mit DMSO befanden sich die Zellen nicht ganz, jedoch aber zum größten Teil in der Normalverteilung. Nach Inkubation mit Delphinidin zeigt sich ein nicht signifikanter Arrest in der G<sub>2</sub>/M-Phase ab 10 µM, der sich bei einer Konzentration von 50 µM noch verstärkt. Bei 100 µM Delphinidin nimmt dieser Effekt jedoch wieder ab. Dies könnte durch Zytotoxizität oder Apoptose begründet werden. Jedoch konnte kein sub-G<sub>2</sub>/M-Peak, der ein Hinweis auf Apoptose ist, detektiert werden. Hou et al. konnten nach sechsständiger Inkubation mit 100 µM Delphinidin die DNA-Fragmentierung und somit die Apoptose an der Leukämiezelllinie HL-60 nachweisen (Hou et al. 2003).



**Abb. 43:** Zellzyklusverteilung von HT29-Zellen nach Synchronisation in der G<sub>2</sub>/M-Phase und anschließender serumhaltiger Inkubation mit Delphinidin bzw. Malvidin für 36 Stunden, Abgebildet sind die Mittelwerte ± Stabw. n = 3-4; \*Signifikanz im Bezug zur DMSO-Kontrolle (\* = p < 0,05; \*\* = p < 0,01; \*\*\* = p < 0,001), (Holbach 2005)

Da Delphinidin humane Topoisomerasen in ihrer Aktivität hemmt und möglicherweise auch an die DNA bindet (Habermeyer et al. 2005) war ein Arrest in der G<sub>2</sub>/M-Phase durch Delphinidin zu erwarten. Dies wurde durch die Zellzyklusuntersuchung bestätigt, wenn sich der Arrest auch als nicht signifikant erwies.

Malvidin, das keinen Topoisomerasehemmstoff darstellt sollte somit zu keinem Topoisomerase-vermittelten Arrest in der G<sub>2</sub>/M-Phase führen. Daher wurde Malvidin als Vergleichssubstanz eingesetzt. Unvorhersehbarer Weise konnte bereits ab einer Konzentration von 1 µM Malvidin ein signifikanter Arrest in der G<sub>2</sub>/M-Phase ermittelt werden. Im Vergleich zur DMSO-Kontrolle, bei der sich 46 % der Zellen in der G<sub>2</sub>/M-Phase befanden liegt der Anteil an Zellen nach Inkubation mit 1 µM Malvidin in dieser Phase bei 63 % und erhöht sich bei Inkubation mit höheren Malvidinkonzentrationen nur noch minimal auf 66 %. Das methoxylierte Anthocyanidin zeigte ebenfalls eine Affinität zur Bindung an DNA in zellfreien Testsystemen. Dabei verdrängt es EtBr mit einem EC<sub>50</sub>-Wert von 33,4 ± 1,8 µM und H33258 mit einem EC<sub>50</sub>-Wert von 28,0 ± 1,8 µM (Habermeyer et al. 2005). Der bei der Zellzyklusuntersuchung gezeigte Effekt in sehr niedrigen Malvidinkonzentration kann jedoch weder durch eine Hemmung der Topoisomeraseaktivität noch durch mögliche interkalative oder DNA-bindende Aktivität der Substanz erklärt werden und beruht auf bisher unbekanntem Wirkmechanismen. M. Roth konnte im Rahmen seiner Diplomarbeit auch eine Hemmung der Tubulinpolymerisation als mögliche Ursache für den beobachteten Arrest in der G<sub>2</sub>/M-Phase ausschließen (Roth 2006).

### **Oligo GEArray<sup>®</sup> Human Cancer Microarray (OHS-802) zur Charakterisierung des Wirkmechanismus' von Malvidin**

Malvidin zeigt schon in niedrigen Konzentrationen einen G<sub>2</sub>/M-Arrest, der nicht durch bisherige Ergebnisse zu erklären ist. Um eine große Anzahl an möglichen zellulären Zielstrukturen und somit Hinweise auf den möglichen Wirkmechanismus zu erfassen wird ein

Mikroarray durchgeführt. Mit dieser Technik lässt sich der Einfluss einer Substanz auf die Expression einer Vielzahl von Genen überblicken. Auf einer Trägermembran sind genspezifische Oligonukleotide aufgebracht mit denen die biotinylierte c-RNA hybridisiert. Die RNA der inkubierten Zellen wird dafür zunächst in c-DNA umgeschrieben und anschließend unter Zugabe von biotinyliertem UTP mit einer RNA-Polymerase biotinylierte c-RNA gewonnen. So kann mit einer kleinen Menge zellulärer RNA eine große Menge an c-RNA für die Hybridisierung gewonnen werden. Nach Hybridisierung können die Membranen chemoluminometrisch detektiert werden.

Der Oligo GEMArray<sup>®</sup> Human Cancer Microarray (OHS-802) wurde für die Bestimmung der Beeinflussung der Zellzyklusverteilung ausgewählt, da er Gene, die für den Zellzyklus wichtige Proteine kodieren, umfasst. Dazu zählen einige Zyklin-abhängige Kinasen, Zykline sowie Regulatoren des Zellzyklus wie p53. Insgesamt werden 127 Gene, die den Zellzyklus beeinflussen mit diesem Array erfasst. Daneben befinden sich auf dem Array Gensequenzen für Gene der Apoptose, des Zellwachstums und der Differenzierung, der Motilität, der Signaltransduktion sowie weitere Gene, die mit der Tumorgenese verbunden sind. Die Aufteilung der 404 Gene ist in Tabelle 7 aufgeführt.

**Tabelle 7:** Einteilung der Gene des Oligo GEMArray<sup>®</sup> Human Cancer Microarrays (OHS-802)

Gruppe	Untergruppe	Anzahl der Gene
Apoptose	Anti-Apoptose	18
	Caspaseaktivierung	4
	Antwort auf DNA-Schäden	3
	Induktion der Apoptose	8
	Signale der Apoptoseinduktion	10
	Weitere Faktoren der Apoptose	24
	Apoptoseregulation	6
	Andere	3
Zellzyklus	Zellzyklusarrest	13
	Kontrollpunkte	4

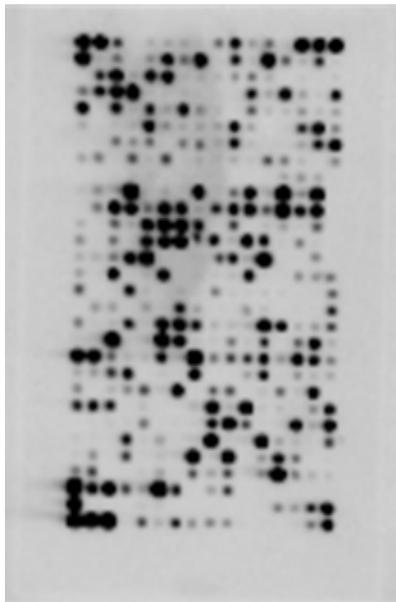
## Ergebnisse und Diskussion

	Regulation des Zellzykluses	81
	Andere	29
Zellwachstum und Differenzierung	Differenzierung	6
	Wachstum	63
	Proliferation	41
	Wachstumsfaktoren	11
	Regulationsmechanismen	46
Zellmotilität	Migration und Motilität	10
	Zell-Zell-Adhäsion	2
	Zell-Matrix-Adhäsion	6
	Metalloendopeptidasen	10
Signaltransduktion	Oberflächenrezeptorgekoppelt	13
	Frizzled Signalweg	9
	G-Protein-gekoppelt	17
	Insulinrezeptorsignalweg	2
	Integrin-vermittelt	4
	JAK-STAT-Kaskade	6
	Intrazelluläre Signalkaskaden	29
	Notch-Signalweg	2
	Ras-Protein-vermittelt	3
	Rho-vermittelt	4
	Kleine GTPase-vermittelt	13
	Wnt-Rezeptorsignalweg	16
andere	-	188

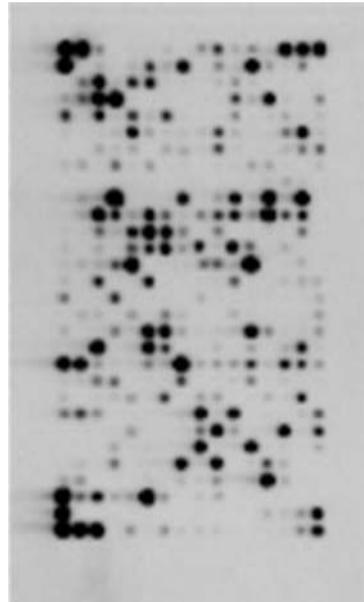
Die HT29-Zellen wurden entsprechend der Bedingungen der Untersuchung der Zellzyklusverteilung inkubiert. Die Zellen wurden mit 40  $\mu\text{M}$  Nocodazol in der  $G_2/M$ -Phase synchronisiert (16 h) und anschließend 36 h mit DMSO bzw. 1  $\mu\text{M}$  Malvidin inkubiert. Zur Kontrolle wurde ein Teil der Probe zur Bestimmung der Zellzyklusverteilung eingesetzt. Nur wenn der Arrest nachgewiesen wurde, wurde der Array durchgeführt. Danach wurde mit Hilfe eines Testkits die RNA der Zellen gewonnen und am Nanodrop<sup>®</sup>-Spektrophotometer die Konzentration der RNA und durch gelektrophoretische Trennung die Reinheit der RNA bestimmt. Eine definierte Menge reiner RNA wurde nun zur Gewinnung der biotinylierten RNA eingesetzt und die Genexpression der Zielgene auf der Membran bestimmt.

Abbildung 44 zeigt repräsentativ die Arraymembranen nach Inkubation mit dem Lösungsmittel DMSO bzw. 1  $\mu\text{M}$  Malvidin. Dabei befinden sich rechts unten auf jeder Membran die Kontrollen, auf welche die Signale normalisiert werden. Wie zu erkennen ist, wird keines der getesteten Gene sichtbar durch Malvidin beeinflusst. Auch die Auswertung der Ergebnisse mit der speziellen Software AIDA lieferte keine Ergebnisse für die Modulation der Genexpression durch 1  $\mu\text{M}$  Malvidin. Der Zellzyklusarrest in der  $G_2/M$ -Phase durch 1  $\mu\text{M}$  Malvidin wurde in den Kontrolllexperimenten zu den Arrays entsprechend den vorherigen Ergebnissen detektiert und kann auch nach Durchführung des Arrays nicht erklärt werden.

**A**



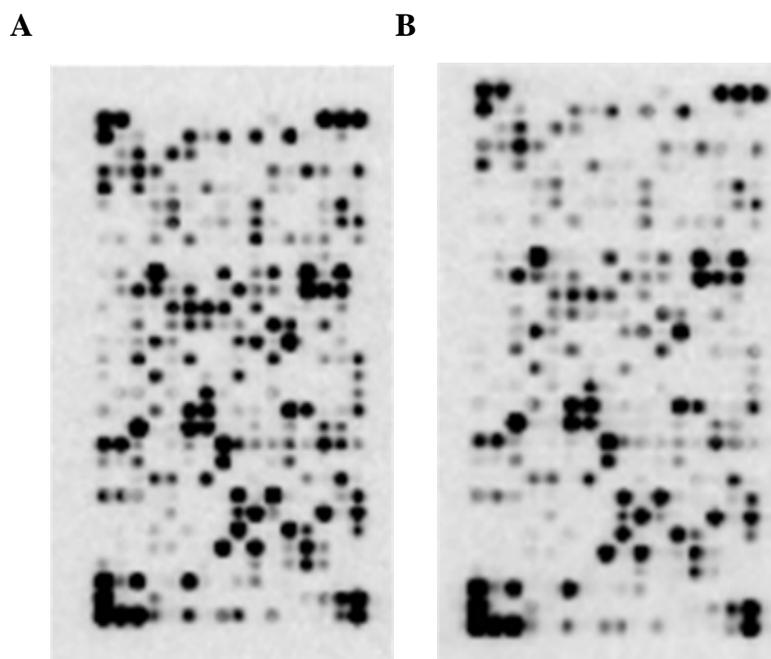
**B**



**Abb. 44:** GEArray<sup>®</sup> Human Cancer Microarray nach Synchronisation der HT29-Zellen in der G<sub>2</sub>/M-Phase und 36-stündiger Inkubation mit DMSO (A) bzw. 1 µM Malvidin (B)

Das Ergebnis muss nicht bedeuten, dass Malvidin die Expression keines der getesteten Gene verändert, da möglicherweise der Zeitpunkt falsch gewählt wurde. Nach 36 Stunden wird die Genexpression auf Transkriptionsebene nicht durch das Anthocyanidin moduliert und es wurde eine kürzere Inkubationszeit gewählt um möglicherweise eine Beeinflussung der Genexpression durch 1 µM Malvidin zu bestimmen. Die Zellen wurden nach Synchronisation in der G<sub>2</sub>/M-Phase für 12 Stunden mit DMSO bzw. 1 µM Malvidin inkubiert und der Array wiederholt. Abbildung 45 zeigt die repräsentativen Membranen zweier unabhängiger Experimente nach 12-stündiger Inkubation mit DMSO bzw. Malvidin.

Auch die 12-stündige Inkubation lieferte keine anderen Ergebnisse. Es kann kein Unterschied der Intensität der Spots der beiden Membranen erkannt werden und auch die mathematische, softwaregestützte Auswertung lieferte keine signifikant unterschiedlichen Effekte. Die Genexpression nach Inkubation mit 1 µM Malvidin entspricht der Genexpression nach Inkubation mit dem Lösungsmittel DMSO, gemessen auf der Transkriptionsebene.



**Abb. 45:** GEArray<sup>®</sup> Human Cancer Microarray nach Synchronisation der HT29-Zellen in der G<sub>2</sub>/M-Phase und 12-stündiger Inkubation mit DMSO (A) bzw. 1 µM Malvidin (B)

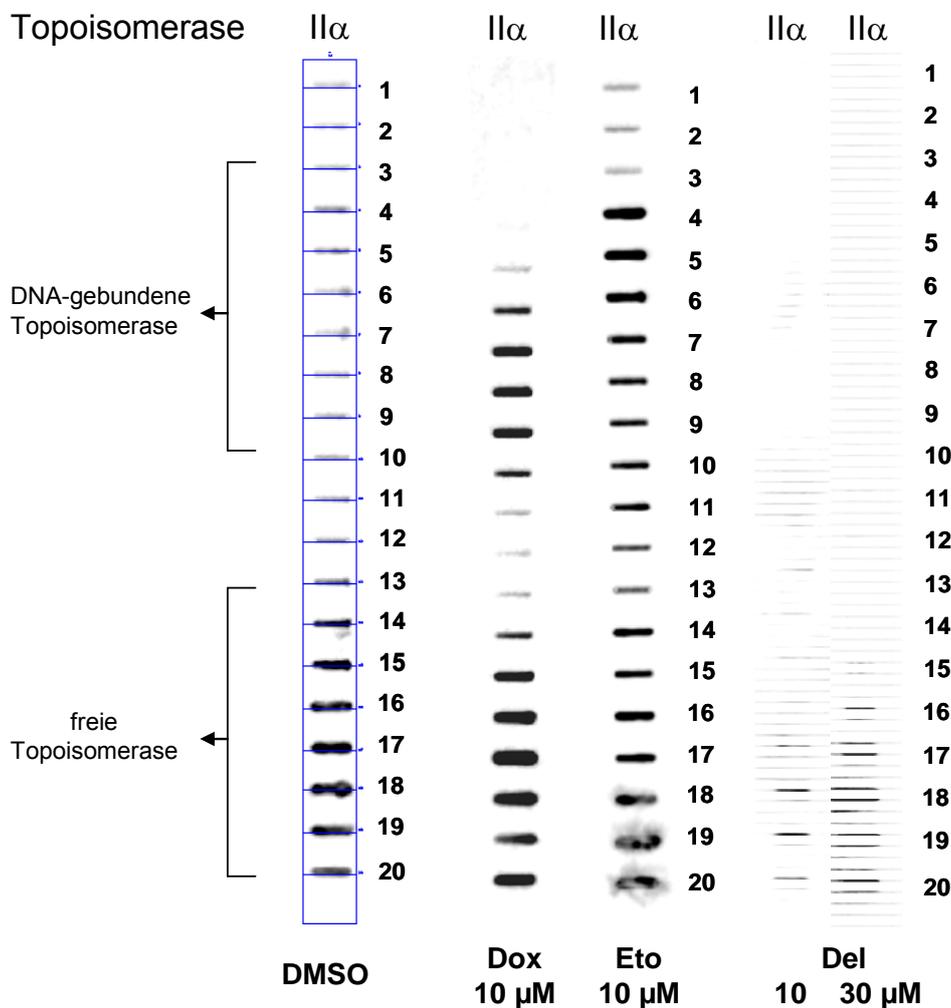
Malvidin scheint in dieser niedrigen Konzentration die Transkription der getesteten Gene nicht beeinflussen zu können. Damit kann der durch 1  $\mu\text{M}$  Malvidin verursachte Zellzyklusarrest in der  $G_2/M$ -Phase nicht aufgeklärt werden. Möglicherweise ist die gewählte Inkubationszeit noch immer zu lang. Malvidin ist nach einer Stunde nicht mehr im Zellkulturmedium zu finden (Kern et al. 2007). Nach Aufnahme der Substanz in die Zellen kann die Genexpression nach kurzer Zeit angeschaltet werden. Um sicher zu gehen, dass die Gene nicht beeinflusst werden, hätte die Transkription nach kürzeren Inkubationszeitpunkten (3h, 6h) bestimmt werden müssen. Durch die limitierte Menge an Arrays, sowie die unsicheren Erfolgchancen bei weiteren Untersuchungen wurde von weiteren Untersuchungen abgesehen. Es ist möglich, dass die Transkription keines der getesteten Gene verändert wird und der  $G_2/M$ -Arrest durch Malvidin durch einen Einfluss auf ein Protein geschieht, welches nicht auf dem Array zu finden ist. Da auf der Transkriptionsebene keine Modulation zellzyklus-assoziiierter Gene bestimmt werden konnte, konnte auch die darauf aufbauenden Untersuchungen zur Verifizierung auf Proteinebene nicht durchgeführt werden.

Der zelluläre Wirkmechanismus von Malvidin, der zu einem Arrest in der  $G_2/M$ -Phase des Zellzykluses führt konnte noch nicht aufgeklärt werden.

### **Wirkung von Delphinidin auf humane Topoisomerasen in HT29-Zellen**

Im zellfreien Testsystem erwiesen sich die Anthocyanidine Delphinidin und Cyanidin als Hemmstoffe der Topoisomerasen I und II. Delphinidin ist in der Lage die katalytische Aktivität der Topoisomerase I ab 5  $\mu\text{M}$  vollständig zu hemmen. Die Topoisomerasen  $II\alpha$  und  $II\beta$  sind ab einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  Delphinidin vollständig inaktiviert. Dabei wirkt Delphinidin als katalytischer Hemmstoff der Enzymaktivität und verhindert die Bindung des Enzyms und die Erzeugung des DNA-Strangbruchs. Die Induktion des Strangbruchs den das Enzym in das Zucker-Phosphat-Rückgrat der DNA einführt ist notwendig um die DNA-Stränge zu ver- und entwirren. Topoisomerasegifte, wie die Chemotherapeutika Doxorubicin und Etoposid hingegen erhöhen die quasi-stationäre Konzentration des Topoisomerase-DNA-Komplexes. Mittels ICE-Bioassay (Immunodetektion von Komplexen zwischen DNA und Topoisomerasen) kann in Zellen die DNA-gebundene Topoisomerase von der freien Topoisomerase abgetrennt werden. Somit kann in intakten Zellen bestimmt werden, ob eine Substanz als Topoisomerasegift wirkt. Die Inkubation erfolgte in Anwesenheit von 100 U/ml

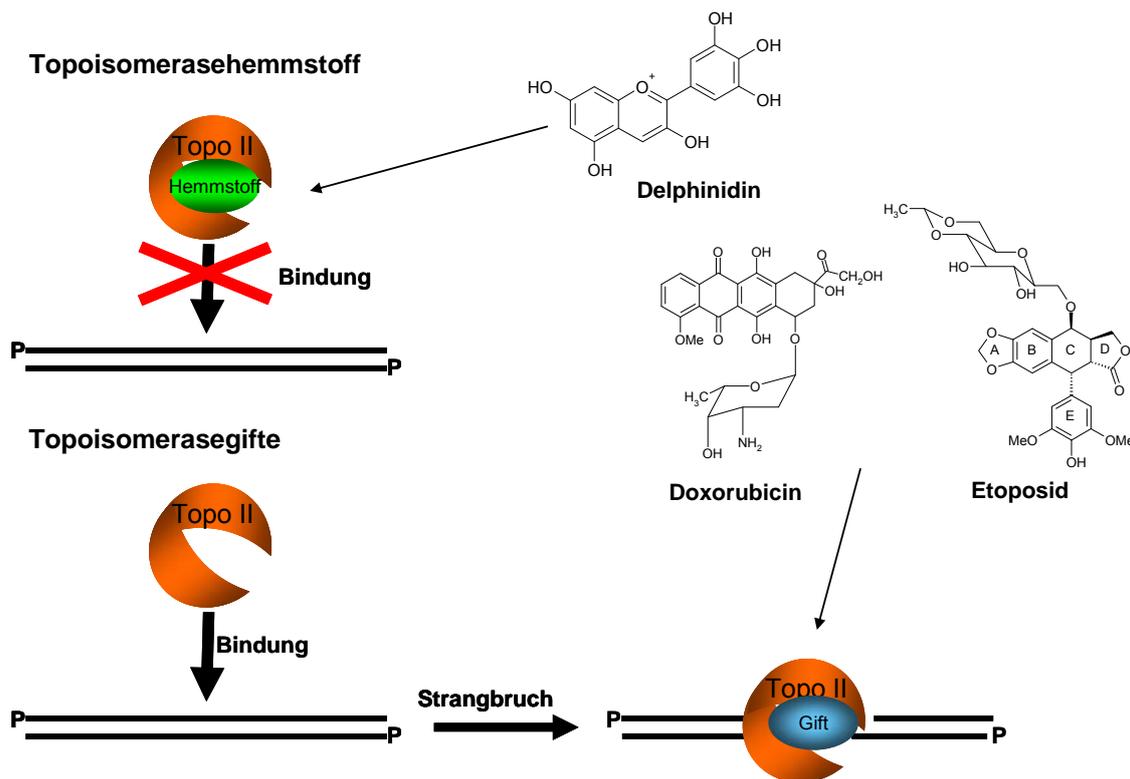
Katalase, um einen Einfluss des akkumulierten Wasserstoffperoxids durch Inkubation mit Delphinidin auszuschließen. Die Zellen wurden mit Sarkosylat lysiert und das Lysat über einen Cäsiumchloriddichtegradienten getrennt. Nach Fraktionierung des Gradienten wurden die Zellproteine auf eine Nitrozellulosemembran übertragen und die Topoisomerasen mit spezifischen Antikörpern chemoluminometrisch erfasst (Subramanian et al. 2001). Der DNA-Gehalt in den einzelnen Proben wurde mit dem Nanodrop®-Spektrophotometer ermittelt. Dadurch werden die DNA-haltigen Fraktionen bestimmt. Der höchste Gehalt an DNA findet sich in den Fraktionen 3 – 10, anschließend nimmt der DNA-Gehalt ab. Es können zwar noch Nukleotide detektiert werden, dabei handelt es sich jedoch nicht um intakte DNA, sondern um Fragmente.



**Abb. 46:** ICE-Bioassay: Bestimmung der freien und DNA-gebundenen Topoisomerase II $\alpha$  nach Inkubation (1h, serumfrei, 100 U/ml Katalase) mit DMSO, den Topoisomerasegiften Doxorubicin (10  $\mu$ M) und Etoposid (10  $\mu$ M), sowie Delphinidin (10  $\mu$ M und 30  $\mu$ M)

HT29-Zellen besitzen nur wenig Topoisomerase I (keine Detektion von Topoisomerase I-Protein, Daten nicht gezeigt). Da nur wenig Topoisomerase I in den Kolonkarzinomzellen enthalten ist kann auch die Stabilisierung des DNA-Enzym-Komplexes durch 100  $\mu\text{M}$  Camptothecin nicht untersucht werden. Im Gegensatz dazu kann freie Topoisomerase II $\alpha$  in diesen Zellen gut detektiert werden (Abb. 46, Spalte 1). Der Gehalt an Topoisomerase II $\beta$  in HT29-Zellen ist höher als der an Topoisomerase I, jedoch für eine optimale Detektion im ICE-Bioassay zu gering, weshalb das Testsystem zunächst mit Antikörpern gegen Topoisomerase II $\alpha$  etabliert wurde.

Nach einstündiger serumfreier Inkubation mit 10  $\mu\text{M}$  Doxorubicin (Spalte 2) und 10  $\mu\text{M}$  Etoposid (Spalte 3) konnte in HT29-Zellen Topoisomerase II $\alpha$  in den DNA-haltigen Fraktionen detektiert werden. Dies bedeutet, dass die Substanzen in der Lage sind in HT29-Zellen das DNA-Topoisomerase-Intermediat zu stabilisieren.



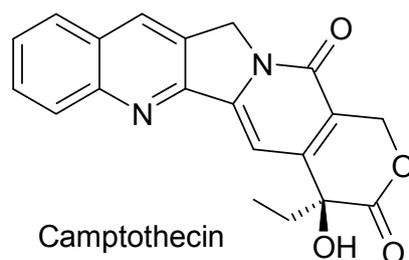
**Abb. 47:** Schematische Darstellung der Topoisomerasehemmung. Delphinidin wirkt als Topoisomerasehemmstoff und die Topoisomerasegifte Doxorubicin und Etoposid stabilisieren das Topoisomerase-DNA-Intermediat und somit den DNA-Doppelstrangbruch

Nach Inkubation mit 10  $\mu\text{M}$  und 30  $\mu\text{M}$  Delphinidin konnte in HT29-Zellen keine Stabilisierung des DNA-Topoisomerase-Intermediats nachgewiesen werden. Dies bestätigt die Ergebnisse, die Habermeyer et al. mittels Western Blot-Technik im so genannten Immunoband-Depletion-Assay für Delphinidin ermittelt hat. Bis zu einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  kann Delphinidin in HEK293-Zellen den Enzym-DNA-Komplex (Topoisomerase II $\alpha$  und II $\beta$ ) nicht stabilisieren und wirkt demnach auch in humanen Zellen als reiner katalytischer Hemmstoff (Habermeyer et al. 2005). Im Gegensatz zu anderen Flavonoiden, wie Genistein oder Quercetin (Bandeletti und Osheroff 2007) wirkt das Anthocyanidin Delphinidin nicht als Topoisomerasegift.

## Protektion der DNA durch Anthocyanidine

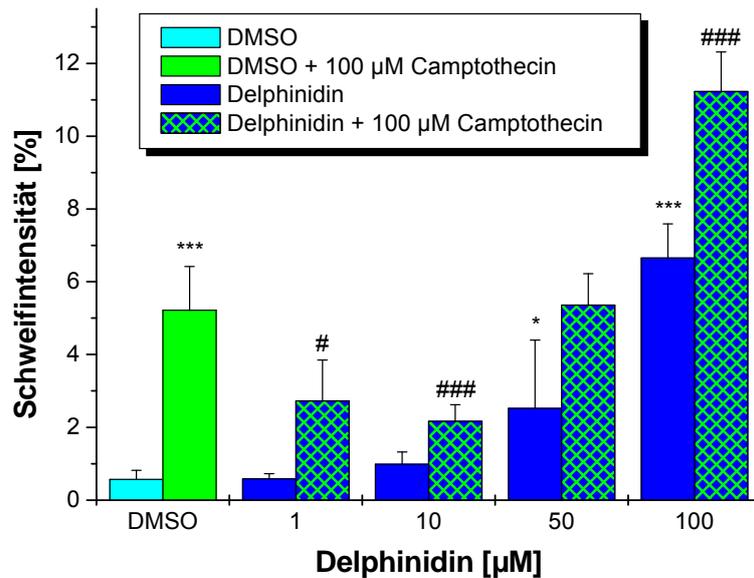
### Topoisomerase I

Delphinidin ist ein katalytischer Topoisomerasehemmstoff und kann die Bindung von Topoisomerasen an die DNA und so auch die Einführung bzw. Stabilisierung des DNA-Strangbruchs verhindern (Habermeyer et al. 2005). Dies lässt vermuten, dass katalytische Hemmstoffe wie Delphinidin die strangbrechende Wirkung von Topoisomerasegiften, wie Camptothecin, Etoposid und Doxorubicin modulieren können (Clapp und Hande 2002, Hande 1999 und 2002). Dies wurde mittels Cometassay an HT29-Zellen getestet. Dazu wurden die Zellen zunächst mit dem Anthocyanidin für eine halbe Stunde vorinkubiert und anschließend mit dem Topoisomerasegift zusammen kokubiert.



**Abb. 48:** Struktur des Topoisomerase I-Gifts Camptothecin

Trotz der geringen Expression von Topoisomerase I-Protein in HT29-Zellen detektiert wurde der Einfluss von Delphinidin auf die DNA-schädigende Wirkung von Camptothecin (Abb. 48) untersucht (Abb. 49). Der Lösungsmittelanteil im Inkubationsmedium wurde auf 0,2 % herabgesetzt, da es bei höheren Lösungsmittelkonzentrationen zu einer Reduktion der Zellviabilität kam. Nach 1,5 Stunden konnte nach Inkubation mit dem Lösungsmittel eine Schweifintensität (SI) von 0,57 % bestimmt werden.



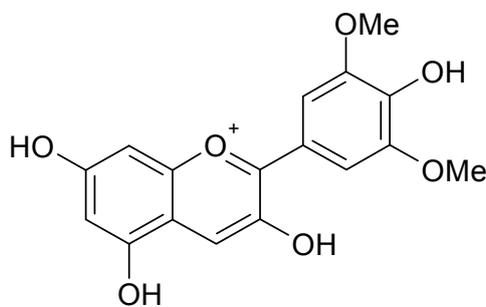
**Abb. 49:** Modulation der strangbrechenden Wirkung von Camptothecin durch Delphinidin, gemessen mittels Cometassay. 30 min Vorinkubation mit den entsprechenden Konzentrationen an Delphinidin und anschließend 1 h Koinkubation mit 100 µM Camptothecin (serumfrei, 0,2 % DMSO, ohne Katalasezusatz). Bestimmt wurde die Schweifintensität (Intensität des Schweifes/Gesamtintensität des „Kometen“), Abgebildet sind die Mittelwerte ± Stabw., n = 3 – 5, \*Signifikanter Unterschied zur jeweiligen Kontrolle (\* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ ), # Signifikanter Unterschied zu Camptothecin mit (# =  $p < 0,05$ ; ## =  $p < 0,01$ ; ### =  $p < 0,001$ )

Nach einstündiger serumfreier Inkubation mit 100 µM Camptothecin verursacht dieses signifikant DNA-Strangbrüche in humanen Kolonkarzinomzellen *in vitro*. Die gemessene Schweifintensität nach Inkubation mit dem Topoisomerasegift liegt bei 5,2 %. Delphinidin kann die strangbrechende Wirkung des Topoisomerasegiftes unterdrücken, was sich durch eine Reduktion der Schweifintensität ermitteln lässt. In Konzentration < 50 µM vermindert Delphinidin die Camptothecin-verursachten DNA-Strangbrüche mit einem maximalen Effekt bei 10 µM Delphinidin (SI = 2,2 %). Ab einer Konzentration von 50 µM verursacht Delphinidin selbst DNA-Strangbrüche und kann die camptothecin-verursachten DNA-Schäden nicht mehr unterbinden. Wird die Schweifintensität der Koinkubation von 100 µM Delphinidin und 100 µM Camptothecin mit der Schweifintensität der Einzelinkubationen verglichen kann ein additiver Effekt der Strangbruchraten beobachtet werden.

Bei einer Kombination von 100 µM Delphinidin und 100 µM Camptothecin liegt die Schweifintensität bei 11,2 % und damit etwa so hoch wie die Addition der

Schweifintensitäten von Camptothecin alleine (5,2 %) und Delphinidin alleine (5,4 %). Es kommt also zu einem additiven Effekt bei dieser Konzentration. Der durch Delphinidin verursachte DNA-Schaden ist in Abwesenheit von Katalase gemessen und ist nach gefundenen Ergebnissen vermutlich zum größten Teil durch im Medium akkumuliertes Wasserstoffperoxid verursacht. Um zu bestätigen, dass gebildetes Wasserstoffperoxid für das Ausbleiben des protektiven Effekts in Konzentrationen  $\geq 50 \mu\text{M}$  Delphinidin verantwortlich ist sollte der Versuch unter Zusatz von Katalase wiederholt werden. Dies war im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht mehr möglich.

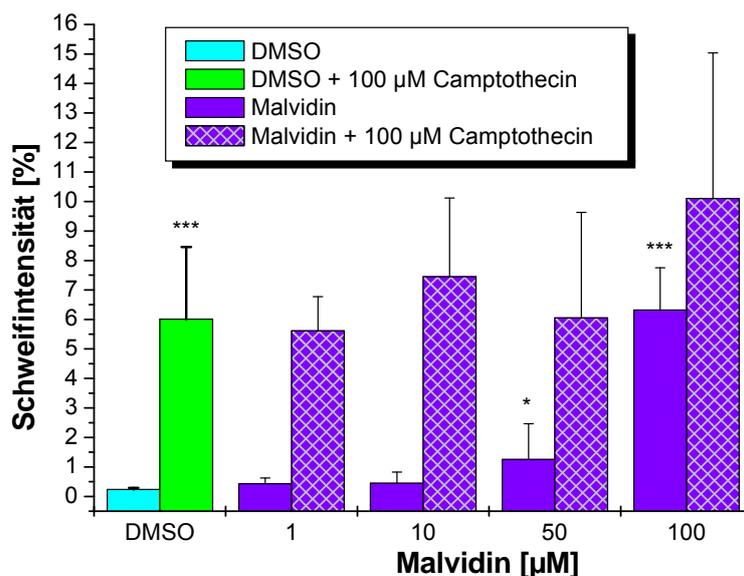
Um zu überprüfen ob die Reduktion der Strangbrüche Topoisomerase-vermittelt ist wird der Cometassay unter den gleichen Bedingungen mit Malvidin (Abb. 50) durchgeführt (Abb. 51).



Malvidin

**Abb. 50:** Struktur von Malvidin

Malvidin wirkt im zellfreien System bis zu einer Konzentration von  $100 \mu\text{M}$  nicht als Topoisomerasehemmstoff und kann auch im zellfreien Test nicht die Stabilisierung des Topoisomerase I-DNA-Komplexes durch Camptothecin nicht verhindern (Habermeyer et al. 2005).



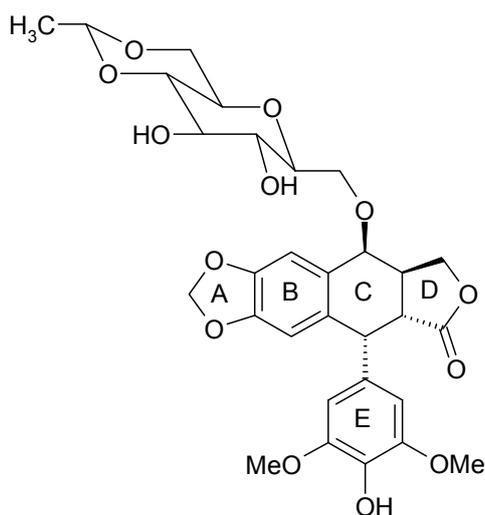
**Abb. 51:** Modulation der strangbrechenden Wirkung von Camptothecin durch Malvidin, gemessen mittels Cometassay. 30 min Vorinkubation mit den entsprechenden Konzentrationen an Malvidin und anschließend 1 h Koinkubation mit 100 µM Camptothecin (serumfrei, 0,2 % DMSO). Bestimmt wurde die Schweifintensität (Intensität des Schweifes/Gesamtintensität des „Kometen“), Abgebildet sind die Mittelwerte  $\pm$  Stabw.,  $n = 3 - 4$ , \*Signifikanter Unterschied zur jeweiligen Kontrolle (\* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ ), # Signifikanter Unterschied zu Camptothecin mit (# =  $p < 0,05$ ; ## =  $p < 0,01$ ; ### =  $p < 0,001$ )

Tatsächlich kann Malvidin bis zu einer Konzentration von 100 µM die strangbrechende Wirkung des Camptothecins nicht modulieren. Der für Delphinidin gezeigte Effekt ist demnach vermutlich Topoisomerase-vermittelt, da nur der Topoisomerasehemmstoff Delphinidin die durch Camptothecin verursachten DNA-Schäden reduzieren kann.

Obwohl die HT29-Zellen nicht viel Topoisomerase I-Protein exprimieren, kann die strangbrechende Wirkung von Camptothecin durch Delphinidin moduliert werden. Allerdings zeigen Malvidin und Delphinidin auch andere Unterschiede in ihrer Wirkqualität. Delphinidin hemmt beispielsweise die Aktivität des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors, der am Beginn der proliferationsfördernden MAPK-Kaskade steht, Malvidin dagegen nicht (Marko et al. 2004, Meiers et al. 2001). So können möglicherweise weitere Wirkungen auf zelluläre Ziele für den protektiven Effekt durch Delphinidin gegenüber Topoisomerase-I-Gift-induzierten DNA-Strangbrüchen beitragen.

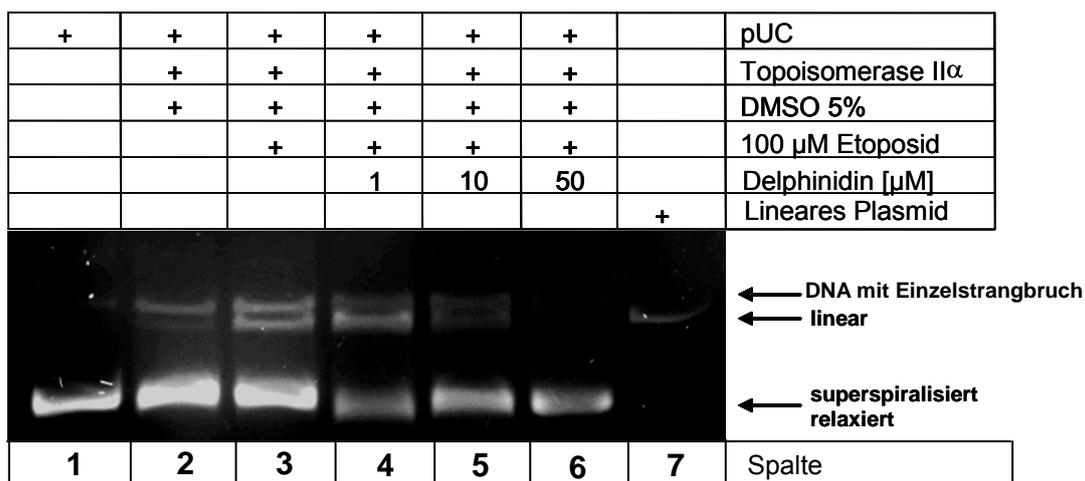
## Topoisomerase II

Um den Einfluss von Delphinidin auf die DNA-schädigende Wirkung von Topoisomerase-II-  
Giften zu untersuchen wird zunächst im zellfreien System überprüft, ob Delphinidin die  
Stabilisierung des Topoisomerase-II-DNA-Komplexes verhindern kann. Durch eine spezielle  
gelelektrophoretische Trennung in Anwesenheit von Ethidiumbromid können verschiedene  
Formen der Plasmid-DNA getrennt werden.



**Abb. 52:** Struktur von Etoposid, einem Topoisomerase-II-Gift

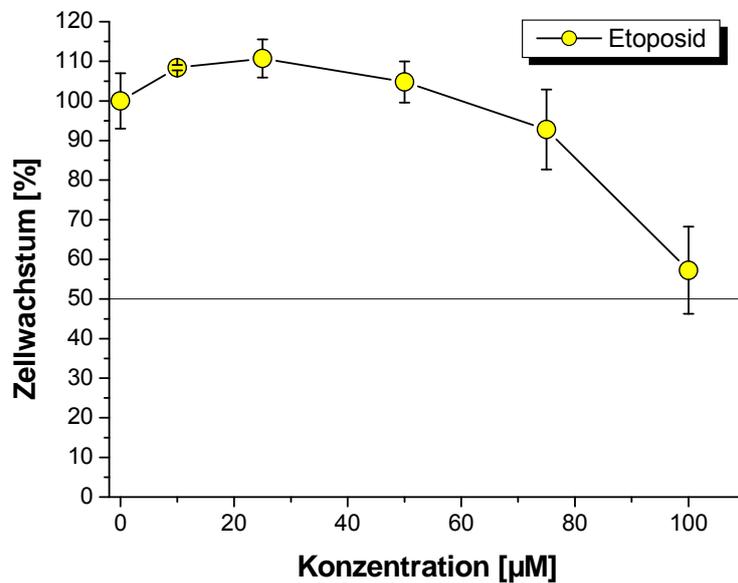
Abbildung 53 zeigt die Wirkung von Delphinidin auf die Stabilisierung des Topoisomerase-II-DNA-Intermediats durch Etoposid (Abb. 52). Spalte 1 zeigt, dass die unbehandelte, superspiralisierte Plasmid-DNA während der Elektrophorese in ein mit Ethidiumbromid versetztes Agarosegel wandert. Durch die Aktivität der Topoisomerase können nach dem Verdau und der Denaturierung des Enzyms durch Proteinase K und Natriumdodecylsulfat auch „genickte“ und linearisierte DNA detektiert werden (Spalte 2). Zur Kontrolle wurde durch Restriktionsverdau gewonnenes linearisiertes Plasmid mitgeführt (Spalte 7).



**Abb. 53:** Gelelektrophoretische Trennung verschiedener DNA-Formen (Cleavage Assay) zur Bestimmung der Stabilisierung des Topoisomerase-II-DNA-Intermediats durch Etoposid und der Modulation der Etoposidwirkung durch Delphinidin, n = 3

Etoposid erhöht in einer Konzentration von 100  $\mu$ M den Gehalt an linearisiertem Plasmid (Spalte 3), das bedeutet der DNA-Strangbruch, der durch das Enzym induziert wurde konnte stabilisiert werden und liegt nach Denaturierung des Enzyms frei vor. Delphinidin kann ab einer Konzentration von 10  $\mu$ M (Spalte 5) die Stabilisierung des Topoisomerase-II-DNA-Intermediats durch 100  $\mu$ M Etoposid reduzieren und ab 50  $\mu$ M vollständig verhindern. Das Anthocyanidin verhindert im zellfreien System als reiner katalytischer Topoisomerase-II-Inhibitor die Bindung des Enzyms an die DNA und somit auch die Ausbildung des Topoisomerase-II-DNA-Komplexes sowie die Stabilisierung des Komplexes durch das Topoisomerase-II-Gift Etoposid.

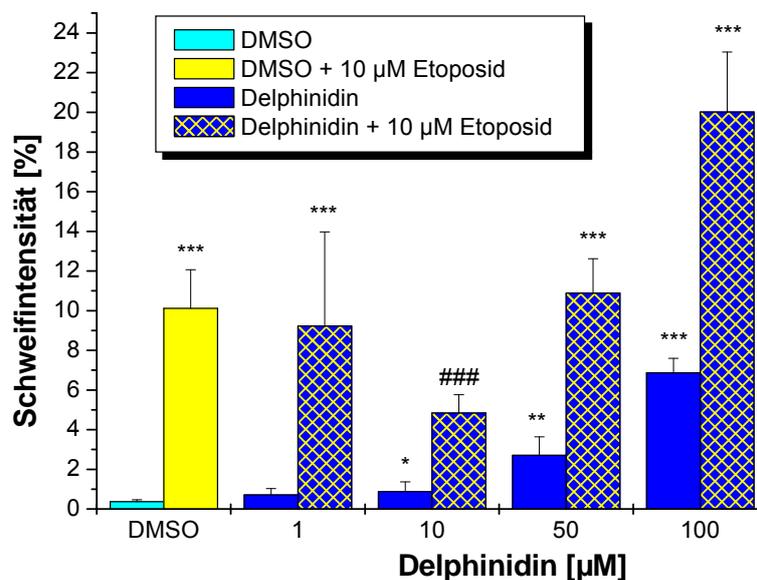
Für die zellulären Untersuchungen muss zunächst die Wirkung der Topoisomerasegifte auf das Zellwachstum untersucht werden, um eine Konzentration an Etoposid für den Einsatz im Cometassay festzulegen, bei der die Zellen noch intakt sind, um so apoptosevermittelte DNA-Schäden auszuschließen. Der Einfluss des Topoisomerase-II-Giftes Etoposid auf das Wachstum von HT29-Zellen wurde mittels Sulforhodamin B-Test (SRB-Test) bestimmt (Abb. 54). Dazu werden 20.000 HT29-Zellen/Loch in 24 Lochplatten ausgestreut und mit aufsteigenden Konzentrationen an Etoposid für 24 Stunden inkubiert (10 % FKS, 1 % DMSO).



**Abb. 54:** Einfluss von Etoposid auf das Wachstum von HT29-Zellen (SRB-Test). Inkubation für 24 h (1 % DMSO, 10 % FKS). Abgebildet sind die Mittelwerte  $\pm$  Stabw.,  $n = 4$ , in einer Vierfachbestimmung

Bis zu einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  konnte kein  $\text{IC}_{50}$ -Wert ermittelt werden, jedoch ist das Zellwachstum nach Inkubation mit 100  $\mu\text{M}$  Etoposid deutlich reduziert (55 % in Bezug zur DMSO-Kontrolle). Da der Einfluss von Etoposid auf das Wachstum von HT29-Zellen nach 24 h bestimmt wurde, könnte für eine einstündige Inkubation im Cometassay Konzentrationen von Etoposid bis 100  $\mu\text{M}$  eingesetzt werden. Da jedoch eine Koinkubation mit Delphinidin durchgeführt werden soll, sollte die strangbrechende Wirkung von Etoposid nicht zu hoch liegen um mögliche additive Effekte noch detektieren zu können. Deswegen wurde eine Etoposidkonzentration von 10  $\mu\text{M}$  für die Untersuchungen mittels Cometassays gewählt.

Eine DNA-schädigende Wirkung für 10  $\mu\text{M}$  Etoposid nach einstündiger Inkubation konnte mit einer Schweifintensität von 10,12 % detektiert werden (Abb. 55). Delphinidin kann die strangbrechende Aktivität des Topoisomerase-II-Giftes modulieren. Dabei wurde zunächst mit den entsprechenden Konzentrationen an Delphinidin vorinkubiert und anschließend mit dem Topoisomerasegift koinkubiert. Der Effekt ist nicht so stark ausgeprägt, wie bei der Modulation der DNA-Schädigung durch das Topoisomerase I-Gift Camptothecin. Die Schweifintensität wird durch die Koinkubation mit 10  $\mu\text{M}$  Delphinidin um etwa 50 % auf 4,84 % reduziert. Wie bei der Koinkubation mit Camptothecin findet sich auch bei der Koinkubation mit Etoposid ein maximaler Effekt bei 10  $\mu\text{M}$  Delphinidin. Ebenso zeigt sich bei der Kombination von 10  $\mu\text{M}$  Etoposid und 100  $\mu\text{M}$  Delphinidin ein additiver Effekt (Schweifintensität beträgt 20,01 %). Die strangbrechende Wirkung von Delphinidin kann vermutlich auf das im Zellkulturmedium bei Inkubation mit Delphinidin gebildete Wasserstoffperoxid zurückgeführt werden, da die Versuche in Abwesenheit von Katalase durchgeführt wurden.



**Abb. 55:** Modulation der strangbrechenden Wirkung von Etoposid durch Delphinidin, gemessen mittels Cometassay. 30 min Vorinkubation mit den entsprechenden Konzentrationen an Delphinidin und anschließend 1 h Koinkubation mit 10  $\mu\text{M}$  Etoposid (serumfrei, 0,2 % DMSO). Bestimmt wurde die Schweifintensität (Intensität des Schweifes/Gesamtintensität des „Kometen“), Abgebildet sind die Mittelwerte  $\pm$  Stabw.,  $n = 3 - 4$ , \*Signifikanter Unterschied zur jeweiligen Kontrolle (\* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ ), # Signifikanter Unterschied zu Etoposid (# =  $p < 0,05$ ; ### =  $p < 0,01$ ; #### =  $p < 0,001$ ),

Für Doxorubicin (Abb. 56) konnte im zellfreien System die gelelektrophoretische Trennung der DNA-Formen nicht durchgeführt werden, da Doxorubicin eine Verschiebung der DNA-Banden verursacht (Daten nicht gezeigt). Dafür ist möglicherweise die starke Interkalation der Substanz verantwortlich (Hande 1998).

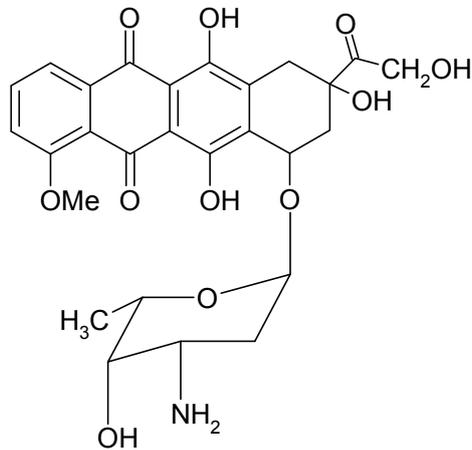


Abb. 56: Struktur von Doxorubicin

Der Einfluss auf das Zellwachstum wurde auch für diese Substanz mittels SRB-Tests bestimmt (Abb. 57). Dafür wurden die HT29-Zellen mit verschiedenen Konzentrationen Doxorubicin für 24 Stunden inkubiert (1 % DMSO, 10 % FKS). Der ermittelte IC<sub>50</sub>-Wert liegt bei  $8,6 \pm 2,1 \mu\text{M}$  (Abb. 51).

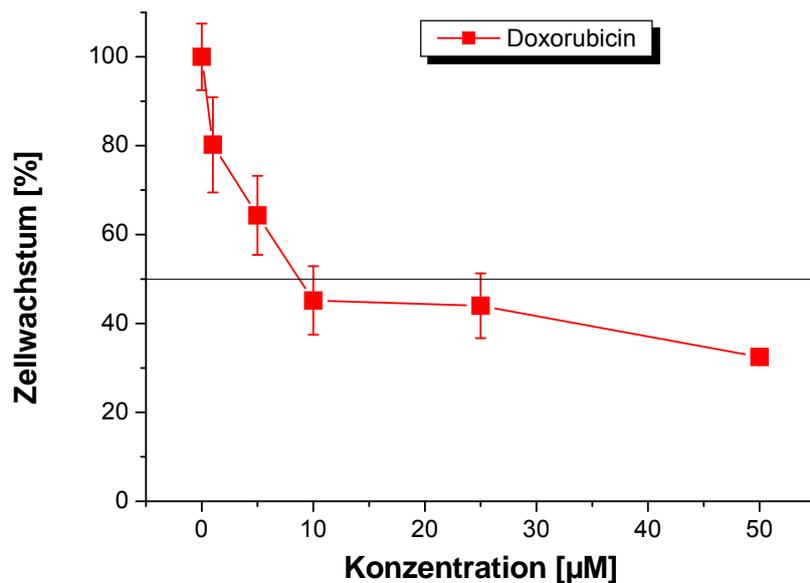
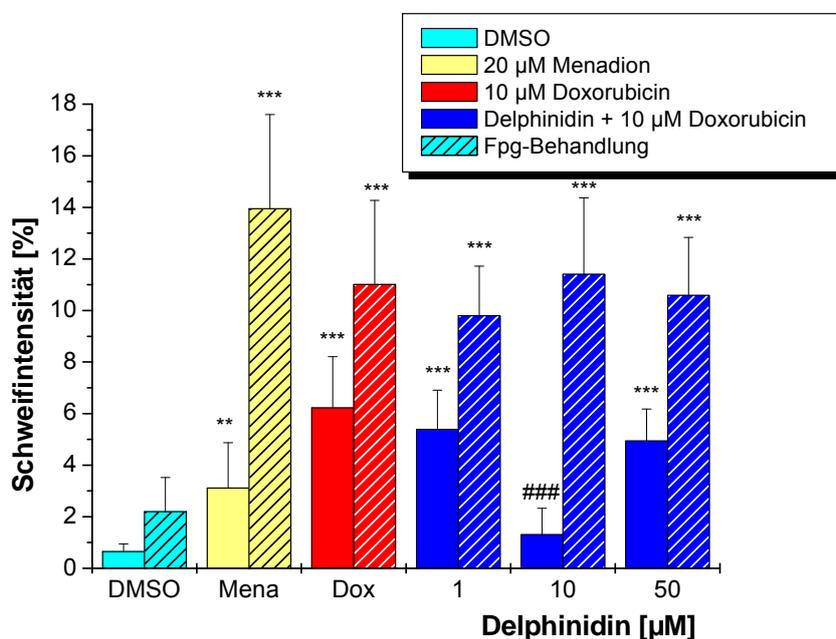


Abb. 57: Einfluss von Doxorubicin auf das Wachstum von HT29-Zellen (SRB). Inkubation für 24 h (1 % DMSO, 10 % FKS). Abgebildet sind die Mittelwerte  $\pm$  Stabw., n = 4 in einer Vierfachbestimmung

Da für den Cometassay die Zellen nur eine Stunde inkubiert werden und gleichzeitig auch die Zellviabilität nach der Inkubation überprüft wird kann eine Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  Doxorubicin in diesem Test eingesetzt werden.

Es wird eine sehr viel effektivere Wachstumshemmung durch Doxorubicin im Vergleich zu Etoposid ermittelt (Abb. 54, Abb. 57). Dies konnten auch weitere Arbeitsgruppen an unterschiedlichen Testsysteme zeigen (Bidwell und Raucher 2006, Li et al. 2006, Ulukaya et al. 2007).

Die Modulation der strangbrechenden Wirkung von Doxorubicin durch Delphinidin wurde ebenfalls mittels Cometassays ermittelt und ist in Abbildung 58 graphisch dargestellt.

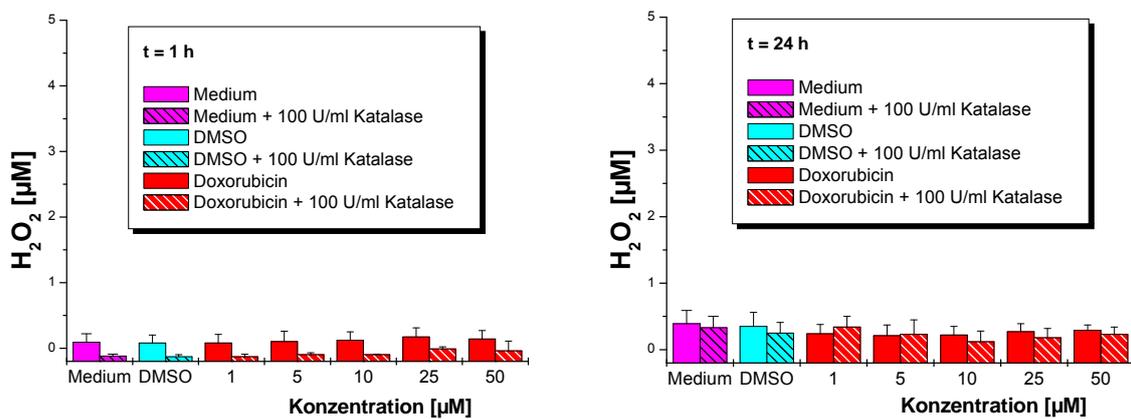


**Abb. 58:** Modulation der strangbrechenden Wirkung von Doxorubicin durch Delphinidin, gemessen mittels Cometassay. 30 min Vorinkubation mit den entsprechenden Konzentrationen an Delphinidin und anschließend 1 h Koinkubation mit 10  $\mu\text{M}$  Doxorubicin (serumfrei, 0,2 % DMSO). Bestimmt wurde die Schweifintensität (Intensität des Schweifes/Gesamtintensität des „Kometen“), Fpg-Behandlung zur Detektion oxidativer DNA-Schäden. Abgebildet sind die Mittelwerte  $\pm$  Stabw.,  $n = 3 - 5$ , \*Signifikanter Unterschied zur jeweiligen Kontrolle (\* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ ), # Signifikanter Unterschied zu Doxorubicin mit (# =  $p < 0,05$ ; ## =  $p < 0,01$ ; ### =  $p < 0,001$ )

Doxorubicin verursacht in der eingesetzten Konzentration DNA-Strangbrüche. Die Schweifintensität liegt bei 6,22 %. Delphinidin reduziert diese DNA-Strangbrüche bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  Delphinidin auf ein Minimum (SI = 1,31 %). In höheren Konzentrationen (ab 50  $\mu\text{M}$  Delphinidin) nimmt die DNA-schädigende Wirkung wieder zu.

Es bestätigen sich die bisher für Camptothecin und Etoposid ermittelten Ergebnisse einer optimalen Wirkkonzentration von 10  $\mu\text{M}$  Delphinidin.

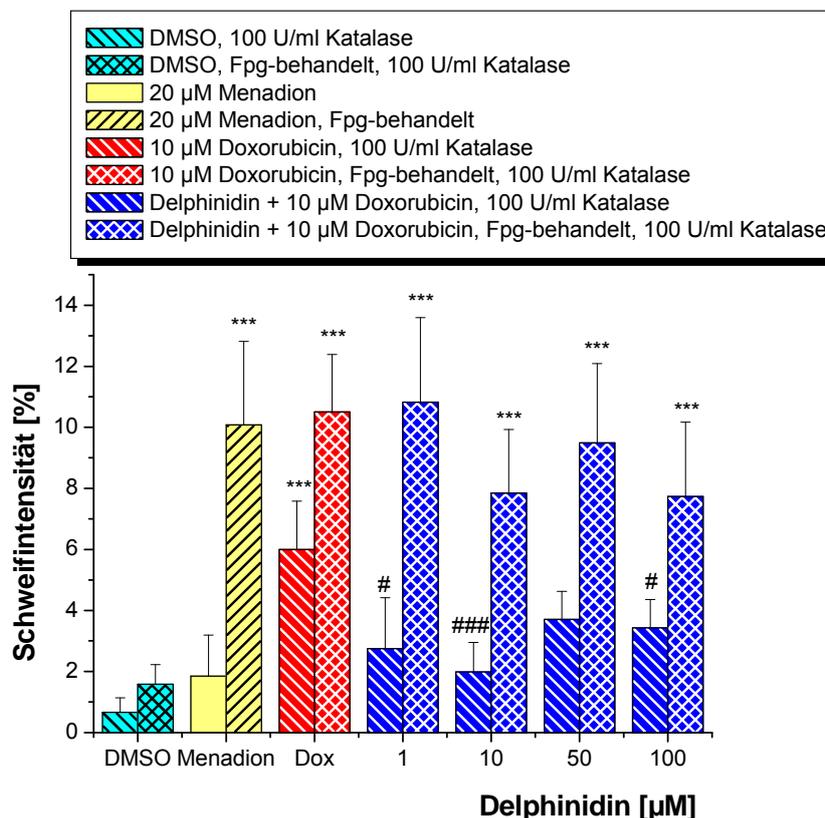
Da Doxorubicin in der Lage ist oxidative DNA-Strangbrüche zu induzieren wird der Cometassay zusätzlich mit dem Enzym Formamidopyrimidin-DNA-Glykosylase (Fpg) durchgeführt, um auch oxidative DNA-Schäden erfassen zu können. Delphinidin wirkt im zellfreien Testsystem als starkes Antioxidans (Borkowski et al. 2005) und könnte möglicherweise die oxidativ-verursachten DNA-Schäden durch Doxorubicin verhindern. Es konnte bestätigt werden, dass Doxorubicin oxidative DNA-Schäden nach 1 h Inkubation von HT29-Zellen (Abb. 58) verursacht. Delphinidin kann diese bis zu einer Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  nicht verhindern. Da bei der Inkubation von HT29-Zellen mit Delphinidin im Medium Wasserstoffperoxid gebildet wird (Kern et al. 2007), kann möglicherweise das Ausbleiben der antioxidativen Wirkung in diesem Testsystem dadurch begründet werden. Um dies auszuschließen wurde der Versuch in Anwesenheit von Katalase wiederholt. Dafür musste jedoch zuerst ausgeschlossen werden, dass die Doxorubicin-vermittelten oxidativen DNA-Strangbrüche nicht auch durch akkumuliertes Wasserstoffperoxid entstehen, da bekannt ist, dass Doxorubicin auch oxidativen Stress verursacht (Hande 1998). Die Bildung von Wasserstoffperoxid im Zellkulturmedium in Anwesenheit von Doxorubicin wurde mittels Amplexrot<sup>®</sup>-Test erfasst (Abb. 59).



**Abb. 59:** Amplexrot<sup>®</sup>-Test zu Bestimmung des H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Gehalts im Zellkulturmedium nach Inkubation von HT29-Zellen mit verschiedenen Konzentrationen an Doxorubicin nach 1 h und nach 24 h (serumhaltig), n = 2 in einer Doppelbestimmung.

Durch Inkubation mit Doxorubicin entsteht bis zu einer Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  im Inkubationsmedium in Anwesenheit von HT29-Zellen kein Wasserstoffperoxid. Weder nach einer Stunde noch nach 24 Stunden konnten im Vergleich zur Medium- oder zur DMSO-

Kontrolle keine erhöhte H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration im Medium detektiert werden. Somit kann der Einfluss von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> im Medium auf die oxidative Schädigung durch Doxorubicin ausgeschlossen werden. Zur Modulation der Doxorubicin-vermittelten oxidativen DNA-Schäden durch Delphinidin werden die HT29-Zellen in Anwesenheit von 100 U/ml Katalase entsprechend der vorherigen Versuche inkubiert (Abb. 60).



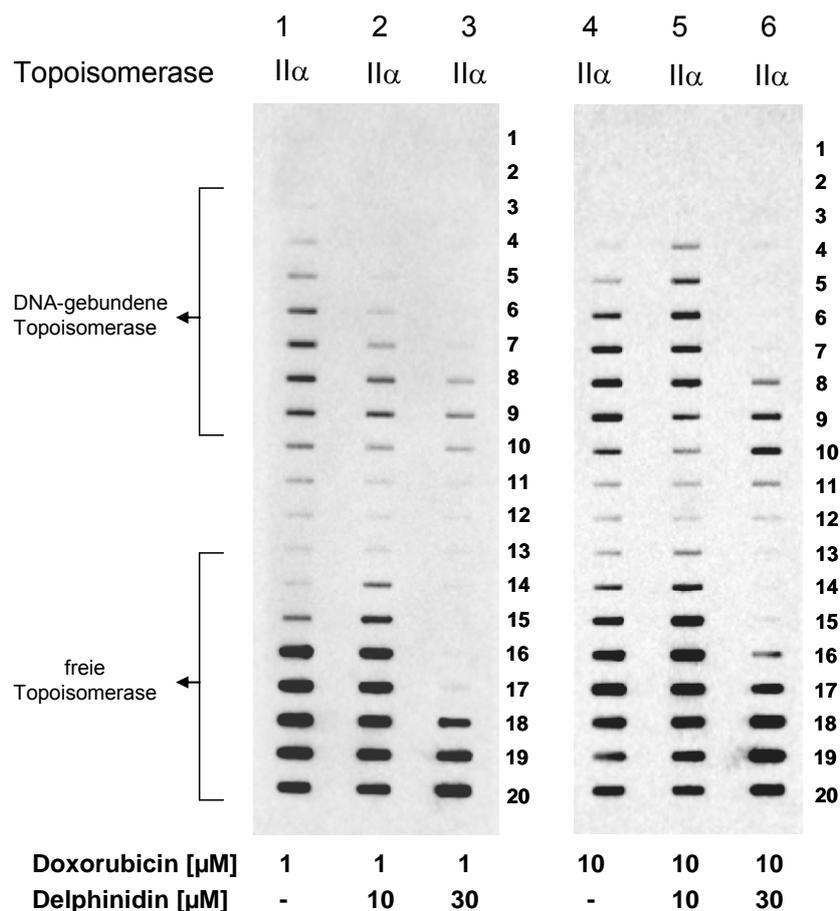
**Abb. 60:** Modulation der strangbrechenden Wirkung von Doxorubicin durch Delphinidin in Anwesenheit von Katalase (100 U/ml), gemessen mittels Cometassay. 30 min Vorinkubation mit den entsprechenden Konzentrationen an Delphinidin und anschließend 1 h Koinkubation mit 10 µM Doxorubicin (serumfrei, 0,2 % DMSO). Bestimmt wurde die Schweifintensität (Intensität des Schweifes/Gesamtintensität des „Kometen“), Fpg-Behandlung zur Detektion oxidativer DNA-Schäden. Abgebildet sind die Mittelwerte ± Stabw., n = 3 – 5, \*Signifikanter Unterschied zur jeweiligen Kontrolle (\* = p < 0,05; \*\* = p < 0,01; \*\*\* = p < 0,001), # Signifikanter Unterschied zu Doxorubicin mit (# = p < 0,05; ## = p < 0,01; ### = p < 0,001)

Delphinidin kann bis zu einer Konzentration von 100 µM die durch Doxorubicin verursachten oxidativen DNA-Schäden nicht verringern. Die nicht-oxidativen DNA-Schäden, die durch Doxorubicin verursacht werden können jedoch durch Delphinidin (10 µM) auch in Anwesenheit von Katalase verringert werden. Der Wiederanstieg der DNA-Schäden erwies sich in höheren Konzentrationen an Delphinidin (≥ 50 µM) als deutlich geringer im

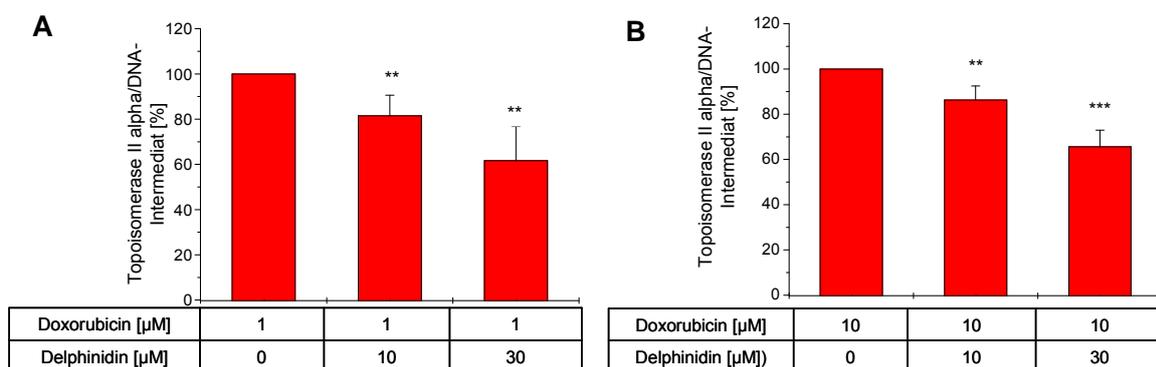
Gegensatz zu den Versuchen ohne Katalasezugabe. Dies lässt vermuten, dass das akkumulierte  $H_2O_2$  zum Ausbleiben der Protektion vor Topoisomerasegift-vermittelten DNA-Schäden in höheren Konzentrationen an Delphinidin ( $\geq 50 \mu M$ ) beiträgt.

Des Weiteren sollte überprüft werden ob der ermittelte protektive Effekt entgegen den Topoisomerasegiften tatsächlich Topoisomerase-vermittelt ist. Dazu wurde ein ICE-Bioassay mit HT29-Zellen durchgeführt (Abb. 61). Die Inkubationsbedingungen wurden entsprechend denen im Cometassay gewählt. Die Zellen werden zunächst mit DMSO bzw. mit  $10 \mu M$  oder  $30 \mu M$  Delphinidin für 30 min vorinkubiert (0,2 % DMSO) und anschließend mit Doxorubicin eine Stunde koinkubiert. Nach Auftrennung der Zellbestandteile über einen Cäsiumchloridgradienten und Übertragung der DNA- und proteinreichen Fraktionen auf eine Nitrozellulosemembran wird das Topoisomerase-II $\alpha$ -Protein mittels polyklonaler Antikörper bestimmt.

Doxorubicin wirkt als Topoisomerasegift und stabilisiert den Enzym-DNA-Komplex. Es kann nach Inkubation von HT29-Zellen mit  $1 \mu M$  (Abb. 55, Spalte 1) und  $10 \mu M$  (Abb. 55, Spalte 4) Doxorubicin in den Fraktionen (3 - 11) kovalent an die DNA gebundene Topoisomerase II $\alpha$  bestimmt werden. Die Menge an Enzym in den DNA-haltigen Fraktionen kann durch Delphinidin in den Konzentrationen  $10 \mu M$  (Spalten 2,5) und  $30 \mu M$  (Spalten 3,6)  $\mu M$  signifikant reduziert werden.



**Abb. 61:** ICE-Bioassay: Bestimmung der DNA-gebundenen Topoisomerase II $\alpha$  nach Vorinkubation (30 min, serumfrei, 100 U/ml Katalase, HT29-Zellen) mit DMSO, 10  $\mu$ M und 30  $\mu$ M Delphinidin und Koinkubation mit dem Topoisomerase-II-gift Doxorubicin (1  $\mu$ M und 10  $\mu$ M), n = 3



**Abb. 62:** ICE-Bioassay: Bestimmung der DNA-gebundenen Topoisomerase II $\alpha$  nach Vorinkubation (30 min, serumfrei, 100 U/ml Katalase) mit DMSO, 10  $\mu$ M und 30  $\mu$ M Delphinidin und Koinkubation mit dem Topoisomerase-II-gift Doxorubicin (1  $\mu$ M, **A** und 10  $\mu$ M, **B**), n = 3, Abgebildet sind die Mittelwerte  $\pm$  Stabw., \*Signifikanter Unterschied zur jeweiligen Kontrolle (\* = p < 0,05; \*\* = p < 0,01), T/C [%]

Die Menge an Topoisomerase in den DNA-haltigen Fraktionen der Doxorubicinproben wurde auf die DNA-Konzentration normiert und als 100 % Topoisomerase/DNA-Intermediat angesetzt (Abb. 62). Delphinidin reduziert den Anteil an DNA-gebundener Topoisomerase II $\alpha$  nach Inkubation mit 1  $\mu$ M Doxorubicin (Abb. 62A) um 19 % (10  $\mu$ M Delphinidin) bzw. 38 % (30  $\mu$ M Delphinidin). Der Anteil an DNA-gebundener Topoisomerase II $\alpha$  durch 10  $\mu$ M Doxorubicin (Abb. 62B) wird durch 10  $\mu$ M Delphinidin um 14 % und durch 30  $\mu$ M Delphinidin um 34 % reduziert. Delphinidin kann somit als katalytischer Topoisomerase-hemmstoff in intakten Zellen die Giftwirkung von Doxorubicin modulieren. Die durch 10  $\mu$ M Etoposid stabilisierten Topoisomerase-II $\alpha$ -DNA-Intermediate wurden durch Kombination mit 10  $\mu$ M oder 30  $\mu$ M Delphinidin nicht vermindert (Daten nicht gezeigt).

Das Anthocyanidin kann jedoch nicht vollständig die Bindung des Enzyms an die DNA verhindern. Die durch Doxorubicin induzierten DNA-Schäden hingegen werden beinahe vollständig aufgehoben. Dies lässt vermuten, dass das Enzym auch in Anwesenheit von Delphinidin an die DNA binden kann, das Enzym aber nicht in der Lage ist einen DNA-Strangbruch zu induzieren.

**Zusammenfassung und Diskussion – Delphinidin und Malvidin**

In Tabelle 8 sind die Ergebnisse der Untersuchungen zur DNA-schädigenden bzw. DNA-schützenden Eigenschaften der Anthocyanidine Delphinidin und Malvidin aufgeführt.

**Tab. 8:** Zusammenfassung der Ergebnisse der Untersuchungen zur DNA-schädigende bzw. DNA-protektiven Wirkung der Anthocyanidine Delphinidin und Malvidin, n.g., nicht getestet; Mv, Malvidin

	Delphinidin	Malvidin
Induktion von DNA-Strangbrüchen	<b>In Abwesenheit von Katalase:</b> signifikante Induktion von DNA-Strangbrüchen ab 50 µM  <b>In Anwesenheit von Katalase:</b> Keine Induktion von DNA-Strangbrüchen	n.g.
Beeinflussung der Zellzyklusverteilung	<b>Arrest</b> in der <b>G<sub>1</sub>-Phase</b>  Kein signifikanter Arrest in der G <sub>2</sub> /M-Phase bis 100 µM	Kein Arrest in der G <sub>1</sub> -Phase  Signifikanter <b>Arrest</b> in der <b>G<sub>2</sub>/M-Phase ab 1 µM</b>
Charakterisierung der Wirkmechanismen von Mv	n.g.	<b>Array:</b> Die Transkription keines der getesteten Gene konnte durch 1 µM Mv nach den gewählten Zeitpunkten moduliert werden.
Wirkung auf Topoisomerasen in HT29-Zellen	<b>Keine Stabilisierung</b> des DNA-Topoisomerase-II-Intermediats ≤ 30 µM	n.g.
Protektion vor Topo-I-Gift-induzierten DNA-Schäden	<b>Protektiver Effekt</b> mit Wirkoptimum bei <b>10 µM</b> (gegen 100 µM Camptothecin)	<b>Kein</b> protektiver Effekt bis 50 µM
Protektion vor Topo-II-Gift-induzierten DNA-Schäden	<b>Protektiver Effekt</b> mit Wirkoptimum bei <b>10 µM</b> (gegen 10 µM Doxorubicin und 10 µM Etoposid)	n.g.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Delphinidin (75 µM) im Zellkulturmedium bis zu 11,5 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bildet. Die reaktive Sauerstoffspezies verursacht in HT29-Zellen einen DNA-Schaden. Der größte Anteil der Delphinidin-vermittelten DNA-Schäden ist auf die DNA-

strangbrechende Wirkung des entstandenen Wasserstoffperoxids zurückzuführen. Bis zu einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  wird in Anwesenheit von 100 U/ml Katalase im Kulturmedium maximal eine Schweifintensität von 3 % erreicht. Mittels ICE-Bioassay konnte gezeigt werden, dass Delphinidin in Konzentrationen bis 30  $\mu\text{M}$  nicht das Topoisomerase-II $\alpha$ -DNA-Intermediat stabilisieren kann. Damit wurde bestätigt, dass das Anthocyanidin auch in HT29-Zellen nicht als Topoisomerasegift sondern als rein katalytischer Topoisomerase-hemmstoff wirkt, der die DNA-Integrität nur marginal beeinflusst. Auch nach Dismutation des  $\text{H}_2\text{O}_2$  können noch Delphinidin-vermittelte Strangbrüche detektiert werden, die möglicherweise durch topologischen Stress, der durch Anlagerung der Substanz an die DNA direkt oder Hemmung der Topoisomerasen entsteht, verursacht worden sind.

In den Untersuchungen zur Zellzyklusverteilung wurde für Delphinidin eine Tendenz zu Arretierung der HT29-Zellen in der  $G_2/M$ -Phase detektiert, welche bei Inkubation mit 50  $\mu\text{M}$  Delphinidin ein Maximum erreicht. Die Abnahme der Zellzahl in der  $G_2/M$ -Phase in höheren Konzentration vermutlich auf eine Apoptoseinduktion zurückzuführen, die bereits an der Leukämiezelllinie HL-60 gezeigt wurde (Hou et al. 2006). Als katalytischer Hemmstoff humaner Topoisomerasen kann Delphinidin die strangbrechende Wirkung der Topoisomerasegifte Camptothecin (100  $\mu\text{M}$ ), Etoposid (10  $\mu\text{M}$ ) und Doxorubicin (10  $\mu\text{M}$ ) mit einer maximal effektiven Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  Delphinidin reduzieren. Der Mechanismus dieser Wirkung ist vermutlich die Verhinderung der Bindung des Enzyms an die DNA bzw. die Verhinderung der Topoisomerase-vermittelten Strangbruchinduktion. Die Bestimmung der Modulation der Topoisomerasegift-vermittelten Induktion von DNA-Strangbrüchen in HT29-Zellen wurde in Abwesenheit von Katalase durchgeführt und daher ist es möglich, dass Delphinidin auch in Konzentrationen  $> 10 \mu\text{M}$  die Topoisomerasegift-induzierte Strangbruchrate reduzieren kann. Dies konnte exemplarisch für Doxorubicin gezeigt werden. Ab einer Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  Delphinidin entsteht in Anwesenheit von HT29-Zellen im Zellkulturmedium  $\text{H}_2\text{O}_2$ , welches DNA-Strangbrüche verursachen kann. Daher wird Katalase (100 U/ml) eingesetzt, um das Wasserstoffperoxid zu dismutieren. Der maximale Hemmeffekt spiegelt sich jedoch auch nach Dismutation des  $\text{H}_2\text{O}_2$  bei einem Delphinidin/Doxorubicin-Verhältnis von 1 : 1 (10  $\mu\text{M}$  Delphinidin und 10  $\mu\text{M}$  Doxorubicin) wider. Die DNA-schädigende Wirkung von 10  $\mu\text{M}$  Doxorubicin wird durch die gleiche Konzentration an Delphinidin um etwa 65 % reduziert. Sowohl bei einem Einsatz niedrigerer als auch höherer Konzentrationen Delphinidin wurde nur eine Reduktion der Strangbruchrate um 40 – 50 % beobachtet (Abb. 60). Bei einem Einsatz von 100  $\mu\text{M}$  Delphinidin ist ein Wiederanstieg der Strangbruchrate zu verzeichnen. Allerdings liegt die Zellviabilität bei

Inkubation mit dieser hohen Konzentration an Delphinidin in einem Bereich von 60 bis 85 %, so dass die beobachteten Strangbrüche nicht eindeutig auf eine DNA-schädigende Wirkung zurückgeführt werden können.

Fraglich ist, ob die DNA-schädigenden Effekte durch Delphinidin ernährungsphysiologisch von Relevanz sind. Bisherige Studien zur Bioverfügbarkeit der zeigen, dass nur geringe Mengen der Anthocyanidine (bis 0,1 %) systemisch verfügbar sind (Manach et al. 2005). Weiter ist zu beachten, dass die Aglyka nur in sehr geringen Konzentrationen natürlich vorkommen. In Pflanzen und somit auch in Früchten und Gemüse dominieren die glykosidischen Verbindungen, die Anthocyane (Mülleider et al. 2001). Die DNA-schädigende Wirkung von Delphinidin spielt somit vermutlich ernährungsphysiologisch eine untergeordnete Rolle.

Malvidin, welches die Topoisomeraseaktivität nicht hemmt, kann die strangbrechende Wirkung des Topoisomerase-I-Giftes auch nicht beeinflussen. Dieses Ergebnis bestätigt die These, dass der für Delphinidin bestimmte protektive Effekt gegenüber der DNA-schädigenden Wirkung von Topoisomerasegiften tatsächlich Topoisomerase-vermittelt ist. Das methoxylierte Anthocyanidin bildet im Zellkulturmedium nur bis zu 1,3  $\mu\text{M}$  Wasserstoffperoxid nach 45-minütiger Inkubation mit 50  $\mu\text{M}$  Malvidin (Kern et al. 2007). Daher kann ausgeschlossen werden, dass das Ausbleiben der Modulation der Topoisomerasegift-vermittelten DNA-Schädigung artifiziell durch Wasserstoffperoxid-induzierten oxidativen Stress erzeugt wurde.

Auch Malvidin ist jedoch in der Lage ab einer Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  DNA-Strangbrüche in HT29-Zellen zu induzieren (Habermeyer et al. 2005) und es bewirkt schon ab einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  eine Arretierung der Zellen in der G<sub>2</sub>/M-Phase des Zellzykluses (Fritz et al. 2007). Der Mechanismus dieser Wirkung ist jedoch bisher ungeklärt. Malvidin hemmt weder die Aktivität der Topoisomerasen noch die Tubulinpolymerisation, so dass diese Mechanismen ausgeschlossen werden können (Habermeyer et al. 2005, Roth 2006). Auch die Durchführung eines Mikroarray und damit die Untersuchung der Transkription verschiedener Gene, die an unterschiedlichen Prozessen der Zellteilung und Proliferation beteiligt sind, brachte keine mögliche Erklärung. Die Inkubationszeiten bei diesem Versuch (36 h, 12 h), die an die Inkubationszeiten der Zellzyklusuntersuchungen angepasst wurden, wurden vermutlich falsch gewählt und eine Untersuchung der Transkription verschiedener Gene müsste nach kürzen (3 h, 6 h) Inkubationszeiten geprüft werden, um mögliche Wirkmechanismen zu charakterisieren. Daneben sollte auch eine größere Auswahl an Genen untersucht werden, um die Bestimmung des Wirkmechanismus von Malvidin zu ermöglichen.



## **Wirkung von anthocyanreichen Extrakten auf die DNA-Integrität von HT29-Zellen und auf die Aktivität humaner Topoisomerasen**

Nachdem es sich gezeigt hat, dass einzelne Substanzen wie beispielsweise die Anthocyanidine Delphinidin und Malvidin an die DNA binden, die Aktivität humaner Topoisomerasen hemmen oder auch einen Zellzyklusarrest in der G<sub>2</sub>/M-Phase des Zellzyklus bewirken können, stellt sich die Frage ob die Substanzen auch in ihrer natürlich vorkommenden Form als Nahrungsmittel oder Nahrungsergänzungsmittel ähnliche Wirkungen zeigen. Anthocyanidine kommen in der Natur beinahe ausschließlich in Form von Glykosiden, das heißt als Anthocyane vor. Daher wurden zwei polyphenol-/anthocyanreiche Extrakte auf ihre Wirkung auf die Aktivität humaner Topoisomerasen und auf die DNA-Integrität getestet.

Bei diesen Extrakten handelt es sich um Mirtoselect und Oenocyanine. Mirtoselect ist ein auf dem Markt erhältliches Nahrungsergänzungsmittel aus Heidelbeeren (s.S. 54). Oenocyanine ist ein anthocyanreicher Extrakt aus roten Trauben, der zum Färben von Wein eingesetzt werden kann. Die Anthocyankomposition von Mirtoselect ist bekannt und in Abbildung 35 dargestellt. Über den Gehalt an weiteren polyphenolischen Substanzen wurden vom Hersteller keine Angaben gemacht. Die genauen Inhaltsstoffe des Traubenextrakts Oenocyanine sind nicht bekannt. Die Extrakte sollten sich dennoch in der Zusammensetzung und der Menge an enthaltenen Anthocyanen unterscheiden, da sie sich farblich deutlich unterscheiden.

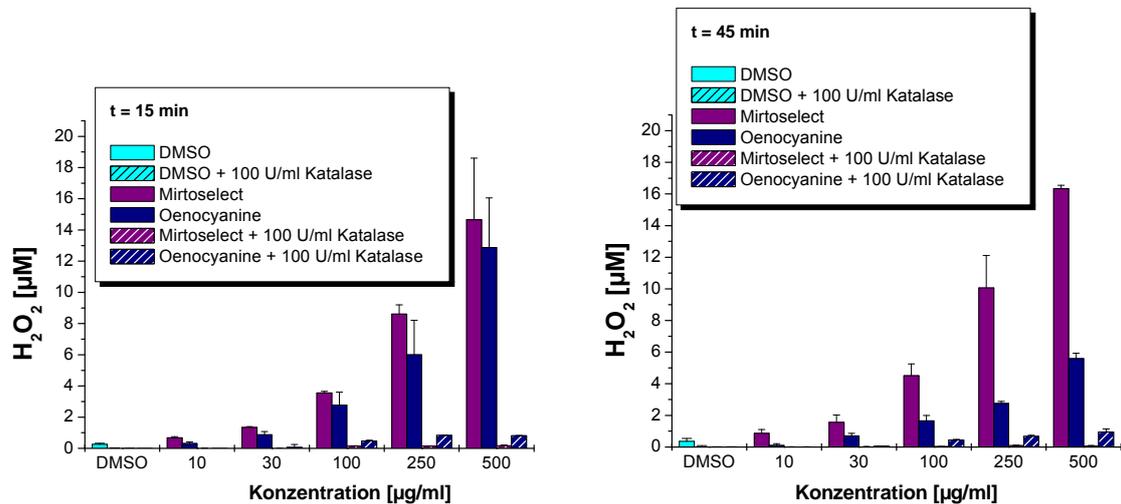
Die Arbeitsgruppe von Wu et al. charakterisierte in Blaubeeren einen hohen Gehalt an Delphinidin- (121 mg/100g), Malvidin- (131 mg/100g) und Petuninglykosiden (71 mg/100g) wohingegen in roten Trauben ein im Vergleich zu Blaubeeren geringerer Gesamtgehalt der Anthocyane vorliegt, wobei Päonidin- (10 mg/100g) und Malvinglykoside (10,5 mg/100g) dominieren (Wu et al. 2006). Koponen et al. konnten diese Ergebnisse zum größten Teil bestätigen, jedoch wurden von dieser Gruppe keine Malvinglykoside in kultivierten Heidelbeeren gefunden, sondern nur in den wilden Blaubeeren. Auch diese Gruppe konnte in roten Trauben vorwiegend Malvinglykoside bestimmen während in Heidelbeeren und Blaubeeren Delphinidin das Hauptglykon darstellt (Koponen et al. 2006). Neben Anthocyanen können die Extrakte auch Ellagantanine, phenolische Säuren oder Procyanidine enthalten (Seeram 2006).

Da sich die Wirkung der einzelnen Aglyka unterscheidet, ist es möglich, dass auch die unterschiedlich zusammengesetzten Extrakte unterschiedliche biologische Wirkungen aufweisen. Beispielsweise hemmt Delphinidin die Aktivität humaner Topoisomerasen,

Malvidin dagegen nicht (Habermeyer et al. 2005). Delphinidin hemmt die Autophosphorylierung des EGF-Rezeptors, Malvidin die Aktivität der cAMP-spezifischen Nukleotidphosphodiesterase 4 (Marko et al. 2004). Deshalb sollen einige biologische Wirkungen der beiden Extrakte untersucht werden, wie der Einfluss auf das Wachstum von HT29-Zellen, auf humane Topoisomerasen, die Zellzyklusverteilung oder die Induktion von DNA-Strangbrüchen.

### Akkumulation von Wasserstoffperoxid im verwendeten Zellkulturmedium in Anwesenheit der Extrakte

Polyphenole können unter Zellkulturbedingungen Wasserstoffperoxid im Inkubationsmedium generieren. Auch die Anthocyanidine Delphinidin und Cyanidin akkumulieren diese reaktive Sauerstoffspezies im DME-Medium bei Inkubation von HT29-Zellen mit den Substanzen (Kern et al. 2007). Daher sollte überprüft werden, ob die Extrakte, die reich an polyphenolischen Substanzen sind, Wasserstoffperoxid im verwendeten Zellkulturmedium bilden können.



**Abb. 63:** Amplexrot<sup>®</sup>-Test zu Bestimmung des H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Gehalts im Zellkulturmedium nach Inkubation von HT29-Zellen mit verschiedenen Konzentrationen an Mirtoselect (lila) und Oenocyanine (marineblau) nach 15 min und 45 min in Abwesenheit (ausgefüllte Balken) und Anwesenheit (gestreifte Balken) von 100 U/ml Katalase, n = 2 in einer Doppelbestimmung, abgebildet sind die Mittelwerte ± Stabw.

Dazu werden HT29-Zellen in einer 24-Lochplatte ausgesät und nach 48-stündiger Anwachsphase mit den Extrakten in einem Konzentrationsbereich von 10 µg/ml bis 500 µg/ml inkubiert. Nach 15 min, 45 min und 72 h wurde der Gehalt an Wasserstoffperoxid im Medium durch die Amplexrot<sup>®</sup>-Reaktion bestimmt. Der Farbstoff reagiert mit Wasserstoffperoxid unter Katalyse durch eine Peroxidase zu Resorufin, dessen Gehalt photometrisch bei einer Wellenlänge von 590 nm ermittelt wird und der direkt proportional zur Menge an gebildetem Wasserstoffperoxid ist (Abb. 63).

Beide Extrakte akkumulieren nach 15 min ähnliche Gehalte an Wasserstoffperoxid. Die Bildung der reaktiven Sauerstoffspezies nimmt konzentrationsabhängig zu und nach 15-minütiger Inkubation mit 500 µg/ml Mirtoselect oder Oenocyanine liegt der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Gehalt im Medium bei 14,7 ± 4,0 µM bzw. 12,9 ± 3,2 µM. Auch nach 45 Minuten nimmt die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration mit aufsteigenden Extraktkonzentrationen zu, das Bild unterscheidet sich dennoch von dem nach 15 min. Verglichen mit den Werten nach 15 min liegt der Gehalt an gebildetem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bei Inkubation mit Mirtoselect nach 45 min höher (16,3 ± 0,2 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bei 500 µg/ml Mirtoselect) und bei Inkubation mit Oenocyanine niedriger (5,6 ± 0,3 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bei 500 µg/ml Oenocyanine). Nach 72-stündiger Inkubation konnte kein Wasserstoffperoxid im Zellkulturmedium mehr detektiert werden. Durch Zugabe von 100 U/ml Katalase zum Inkubationsmedium konnte die Bildung des Wasserstoffperoxids vollständig unterbunden werden. Dies konnte auch für andere Polyphenole gezeigt werden (Dashwood et al. 2002, Lee et al. 2005, Yokomizo und Moriwaki 2006). Der Unterschied der Entstehung von Wasserstoffperoxid durch Inkubation mit Mirtoselect bzw. Oenocyanine nach 45 min zeigt, dass die Extrakte unterschiedliche Polyphenolmuster aufweisen.

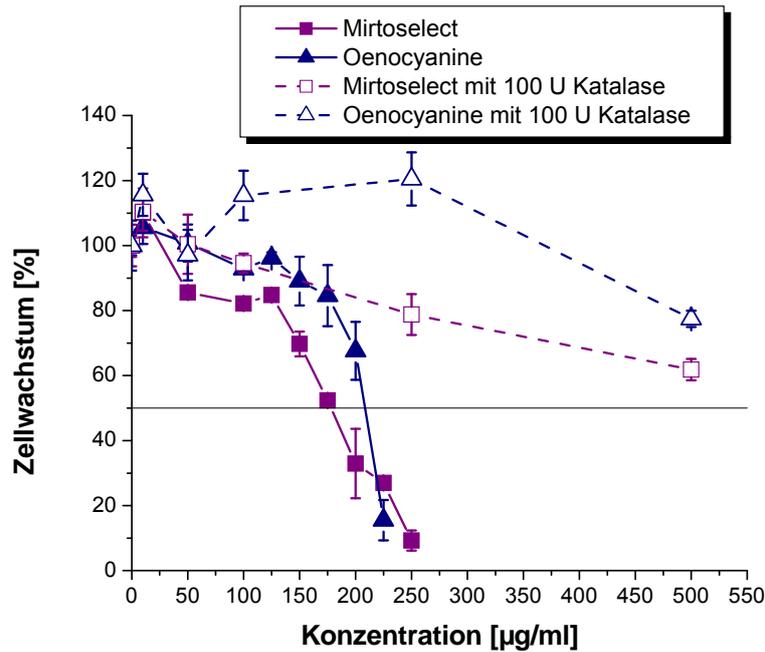
Die Anthocyanidine beispielsweise sind unter den Inkubationsbedingung sehr instabil. Der Weintraubenextrakt (Oenocyanine) enthält vermutlich Substanzen, die weniger stabil sind als die Inhaltsstoffe des Heidelbeerextrakts, da nach 45 min bei Inkubation mit Oenocyanine weniger H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> entsteht als bei 45minütiger Inkubation mit Mirtoselect. Des Weiteren ist es möglich, dass keine Abbauprodukte aus den Oenocyanineinhaltsstoffen entstehen, die selbst H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> akkumulieren. Im Gegensatz zu Oenocyanine ist Mirtoselect reich an Delphinidinglykosiden. Delphinidin ist bereits nach 30 min nicht mehr im Zellkulturmedium (DMEM, Inkubation von HT29-Zellen) nachweisbar. Im Gegensatz zu den anderen Abbauprodukten akkumuliert Gallussäure, das Abbauprodukt des Delphinidins, substantielle Konzentrationen an Wasserstoffperoxid (Kern et al. 2007).

Ob das gebildete Wasserstoffperoxid einen Einfluss auf die biologischen Wirkungen der polyphenolreichen Extrakte hat wird exemplarisch anhand der Wachstumshemmung bestimmt.

### **Einfluss der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – Akkumulation auf das Wachstum von HT29-Zellen**

Der Einfluss des akkumulierten Wasserstoffperoxids im Zellkulturmedium bei Inkubation mit den Extrakten Mirtoselect und Oenocyanine wird durch die Modulation des Wachstums von HT29-Zellen in Abwesenheit und Anwesenheit von 100 U/ml Katalase untersucht.

Für die Untersuchung der Modulation des Zellwachstums wird ein Sulforhodamin B-Test mit HT29-Zellen durchgeführt. Dazu werden 4.500 Zellen/pro Loch in eine 24-Lochplatte ausgesät und nach 48-stündiger Anwachsphase für 72 Stunden mit aufsteigenden Extraktkonzentrationen in serumhaltigen (10 % FKS) DME-Medium inkubiert. Die lebenden Zellen werden mit 50%iger Trichloressigsäure am Plattenboden fixiert und die toten Zellen werden durch Waschen der Platte entfernt. Die fixierten Zellen werden mit dem Farbstoff Sulforhodamin B, der an Zellproteine bindet, angefärbt und der überschüssige Farbstoff abgewaschen. Mit einer geeigneten Trisbase-Lösung (10 M, pH 10) wird der Farbstoff aus den Zellen herausgelöst und photometrisch bei 570 nm im Plattenlesegerät quantifiziert. Die Intensität der Lösung ist direkt proportional zur Anzahl der lebenden Zellen nach Inkubation. Nach Abzug des Blindwertes (10 M Trisbase) wird die Absorption der Kontrolle als 100 % gesetzt und die Probenwerte auf die Kontrolle bezogen. Die Ergebnisse für die Wachstumshemmung durch Mirtoselect und Oenocyanine in Anwesenheit und Abwesenheit von 100 U/ml sind in Abbildung 64 dargestellt.



**Abb. 64:** Einfluss von Mirtoselect (lila) und Oenocyanine (marineblau) auf das Wachstum von HT29-Zellen in Abwesenheit (durchgezogene Linie) und Anwesenheit (gestrichelte Linie) von 100 U/ml Katalase (SRB). Inkubation für 72 h (1 % DMSO, 10 % FKS). Abgebildet sind die Mittelwerte  $\pm$  Stabw.,  $n = 3-5$

In Abwesenheit von Katalase hemmen die anthocyanreichen Extrakte effektiv das Wachstum der HT29-Zellen. Es konnte für Mirtoselect ein  $IC_{50}$ -Wert von  $176,9 \pm 9,8 \mu\text{g/ml}$  und für Oenocyanine ein  $IC_{50}$ -Wert von  $204,3 \pm 8,6 \mu\text{g/ml}$  bestimmt werden. Würde Mirtoselect aus reinem Delphinidin bestehen entspräche der ermittelte  $IC_{50}$ -Wert einer Konzentration von  $520 \mu\text{M}$  Delphinidin. Bei dieser Konzentration an Delphinidin ist das Wachstum der HT29-Zellen jedoch vollständig gehemmt (Marko et al. 2004), so dass der Heidelbeerextrakt neben Delphinidin weitere weniger potente Substanzen enthalten muss. Wird davon ausgegangen, dass Oenocyanine aus reinem Malvidin besteht entspricht der Wert von  $204,3 \mu\text{g/ml}$  einer Konzentration von  $554 \mu\text{M}$  Malvidin. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass bei dieser Konzentration an Malvidin das Wachstum der HT29-Zellen vollständig gehemmt ist (Marko et al. 2004). Die Wachstumshemmung durch die Extrakte ist also deutlich schwächer als die der Anthocyanidine. Wie die Analyse der in Mirtoselect enthaltenen Anthocyane und Anthocyanidine gezeigt hat, dominieren in diesem Extrakt die glykosidischen Verbindungen (Cooke et al. 2006). Es liegen keine Daten zur Beeinflussung des Wachstums von HT29-Zellen durch einzelne Anthocyane vor, so dass die Wirkung der Extrakte mit der einzelner Anthocyane an dieser Zelllinie nicht verglichen werden kann. Es konnte jedoch für Cyanidin-

3-galaktosid und auch für Malvidin-3-glukosid an LxFL529L und A431-Zellen gezeigt werden, dass die Glykoside das Zellwachstum erst in höheren Konzentrationen ( $> 100 \mu\text{M}$ ) als die die Aglyka nennen (Meiers et al. 2001). Eine mögliche Erklärung für den geringen Einfluss der Extrakte im Vergleich zu den Anthocyanidinen ist eine schlechtere Aufnahme der Glykoside in die Zellen.

In Anwesenheit von 100 U/ml Katalase konnte nur ein geringer Einfluss der beiden getesteten Extrakte auf das Wachstum der HT29-Zellen bestimmt werden. Die beobachtete Wachstumshemmung in Abwesenheit von Katalase ist demnach vermutlich artifiziell durch das akkumulierte Wasserstoffperoxid verursacht. Wasserstoffperoxid verursacht oxidativen Stress in den Zellen und kann die Zellen durch Lipidperoxidation der zellulären Membranen oder oxidative DNA-Schäden angreifen. Auch die Induktion von Apoptose ist durch Wasserstoffperoxid beschrieben (Halliwell et al. 2000).

Ein Einfluss von Wasserstoffperoxid auf die Wachstumshemmung konnte auch für das Abbauprodukt des Delphinidins, die Gallussäure, bestimmt werden. Dabei verschob sich der  $\text{IC}_{50}$ -Wert in Anwesenheit von Katalase um etwa  $7 \mu\text{M}$  von  $42 \mu\text{M}$  auf  $49 \mu\text{M}$ . Der Effekt ist also wesentlich schwächer als bei der Inkubation mit den anthocyanreichen Extrakten. Dies ist nicht durch die Bildung einer geringeren Menge an Wasserstoffperoxid zu erklären, da auch Gallussäure nach Inkubation von  $75 \mu\text{M}$  der Substanz nach 15 min bereits  $12 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$  im Medium akkumuliert. Nach 45 min steigt der Gehalt auf bis zu  $19 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$  an. Eine mögliche Ursache wäre die höhere Stabilität der Anthocyane im Medium verglichen mit der Gallussäure. Das Abbauprodukt des Delphinidins kann nach 24 Stunden nicht mehr im Medium nachweisbar. Delphinidin verhält sich jedoch anders als sein Abbauprodukt in Anwesenheit von Katalase. Durch den Zusatz von Katalase steigert sich die wachstumshemmende Wirkung von  $25 \mu\text{M}$  ( $\text{IC}_{50}$ -Wert) auf  $1 \mu\text{M}$  ( $\text{IC}_{50}$ -Wert). Dies lässt darauf schließen, dass akkumuliertes  $\text{H}_2\text{O}_2$  die wachstumshemmende Eigenschaft von Delphinidin vermindert, was möglicherweise auf die geringere Stabilität der Substanz in Gegenwart von  $\text{H}_2\text{O}_2$  zu begründen ist (Kern et al. 2007). Insgesamt zeigen die Versuche mit freiem Aglykon, dass Delphinidin selbst keinen oder nur einen marginalen Beitrag zur wachstumshemmenden Eigenschaft von Mirtoselect leistet, da sonst unter Zusatz von Katalase der Extrakt einen potenteren Einfluss auf das Zellwachstum hätte zeigen müssen, im Gegensatz zu den Versuchen mit Inkubationsbedingungen ohne Katalasezusatz.

Um weitere artifizielle Effekte bei der Untersuchung der biologischen Wirkung der anthocyanreichen Extrakte durch gebildetes Wasserstoffperoxid auszuschließen, werden alle

Untersuchung unter Zellkulturbedingungen mit einem Zusatz von 100 U/ml Katalase im Inkubationsmedium durchgeführt.

### **Wirkung der Extrakte auf humane Topoisomerasen**

Viele Polyphenole können die Aktivität humaner Topoisomerasen hemmen und so einen Einfluss auf die DNA-Integrität nehmen (Bandeletto und Osheroff 2007). Einige dieser Polyphenole wirken dabei als Topoisomerasegifte und manche auch als Interkalatoren (Austin et al. 1992, Constantinou et al. 1995, Lopez-Lazaro et al. 2002). Um die Wirkung der Extrakte auf die Topoisomeraseaktivität zu bestimmen, wird zunächst in zellfreien Testsystemen die katalytische Topoisomeraseaktivität untersucht und im Anschluss die Beeinflussung der Enzyme in HT29-Zellen. Auch die Fähigkeiten der Extraktinhaltsstoffe an die DNA zu binden wird ebenso wie die Induktion von DNA-Strangbrüchen durch die Extrakte und die Zellzyklusverteilung nach Inkubation mit den Extrakten getestet.

### **Hemmung der katalytischen Topoisomerase I-Aktivität**

Mit dem Relaxationsassay kann die Fähigkeit der Extrakte untersucht werden, die Topoisomerase I zu hemmen. In Abbildung 65 sind die Ergebnisse der Topoisomerase I-Hemmung durch die anthocyanreichen Extrakte Mirtoselect und Oenocyanine dargestellt. Die Extrakte wurden für die Versuche immer frisch eingewogen und in DMSO gelöst und verdünnt, damit ein Einfluss durch Oxidation ausgeschlossen werden kann.

Es werden 250 ng superspiralisierte Plasmid-DNA (Abb. 59, Spalte 1) mit einem aus MCF-7-Zellen gewonnenen Kernextrakt versetzt. Der Kernextrakt enthält die Topoisomerasen. In Abwesenheit von ATP im Testpuffer ist nur die Topoisomerase I aktiv, so dass nach Inkubation mit dem Kernextrakt die Plasmid-DNA durch die Topoisomerase I-Aktivität relaxiert wird. Als Negativkontrolle dient das Lösungsmittel DMSO (Abb. 59, Spalte 2). Als Positivkontrolle dient das Topoisomerase I-Gift Camptothecin (100  $\mu$ M), welches die Aktivität des Enzyms durch Stabilisierung des DNA-Enzym-Komplexes hemmt (Abb. 59, Spalte 11).

+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	pUC-18
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Kernextrakt, MCF-7
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	3,3 % DMSO
		10	25	50	100						Oenocyanine [ $\mu\text{g/ml}$ ]
						10	25	50	100		Mirtoselect [ $\mu\text{g/ml}$ ]
										100	Camptothecin [ $\mu\text{M}$ ]
											← relaxiert
											← superspiralisiert
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	Spalte

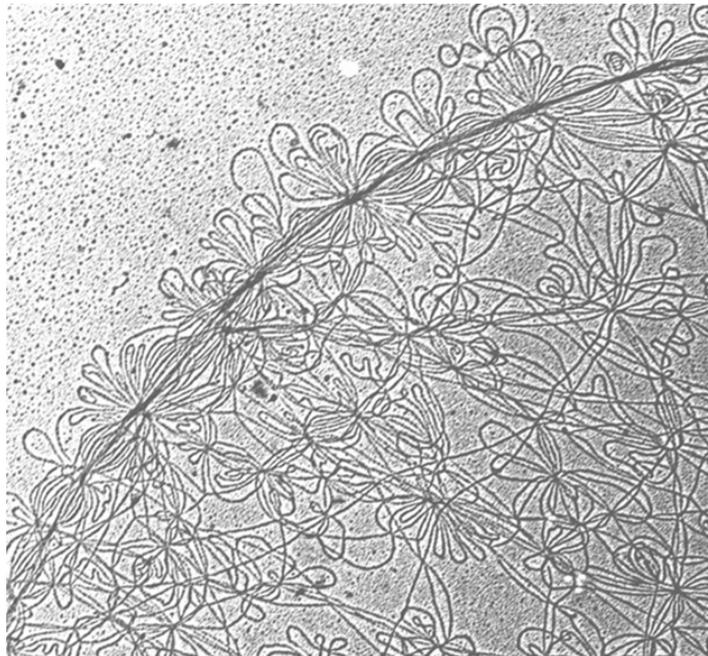
**Abb. 65:** Hemmung der katalytischen Topoisomerase I-Aktivität durch Oenocyanine (Spalten 3 - 6) und Mirtoselect (Spalten 7 - 10), untersucht im Relaxationsassay. Nach Inkubation der superspiralisierten pUC18-DNA mit dem Kernextrakt und dem Lösungsmittel DMSO wird die DNA relaxiert (Spalte 2), als Positivkontrolle dient 100  $\mu\text{M}$  Camptothecin (Spalte 11), abgebildet ist ein repräsentatives Gel aus drei unabhängig Experimenten mit vergleichbaren Ergebnissen

Oenocyanine (Spalten 3 - 6) und Mirtoselect (Spalten 7 - 10) hemmen die katalytische Aktivität der Topoisomerase I ab einer Konzentration von 25  $\mu\text{g/ml}$  (Spalte 4 bzw. 8). Ab einer Extraktkonzentration von 50  $\mu\text{g/ml}$  (Spalte 5 bzw. 9) ist die Topoisomerase I-Aktivität vollständig durch die beiden Extrakte gehemmt.

Die beiden Extrakte wirken ab der gleichen Konzentration hemmend auf die Aktivität der humanen Topoisomerase I, obwohl sie vermutlich unterschiedliche Konzentrationen an verschiedenen Anthocyanen enthalten. Eine Konzentration von 50  $\mu\text{g/ml}$  entspräche unter der Annahme, dass die Extrakte nur reines Delphinidin enthielten einer Konzentration von etwa 150  $\mu\text{M}$ . Delphinidin hemmt die Aktivität der Topoisomerase I jedoch bereits ab einer Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  vollständig. Die Extrakte enthalten demnach Verbindungen, die die Topoisomerase I-Aktivität weniger potent hemmen als Delphinidin. Wir konnten bereits zeigen, dass die Glykoside von Delphinidin und Cyanidin, die Hauptanthocyane der getesteten Extrakte, die Aktivität der Topoisomerase I nicht hemmen (Roikaew 2003). Die beiden Extrakte enthalten also weitere nicht identifizierte Substanzen, die als Topoisomerase-I-Hemmstoffe wirken.

### Hemmung der katalytischen Topoisomerase II-Aktivität

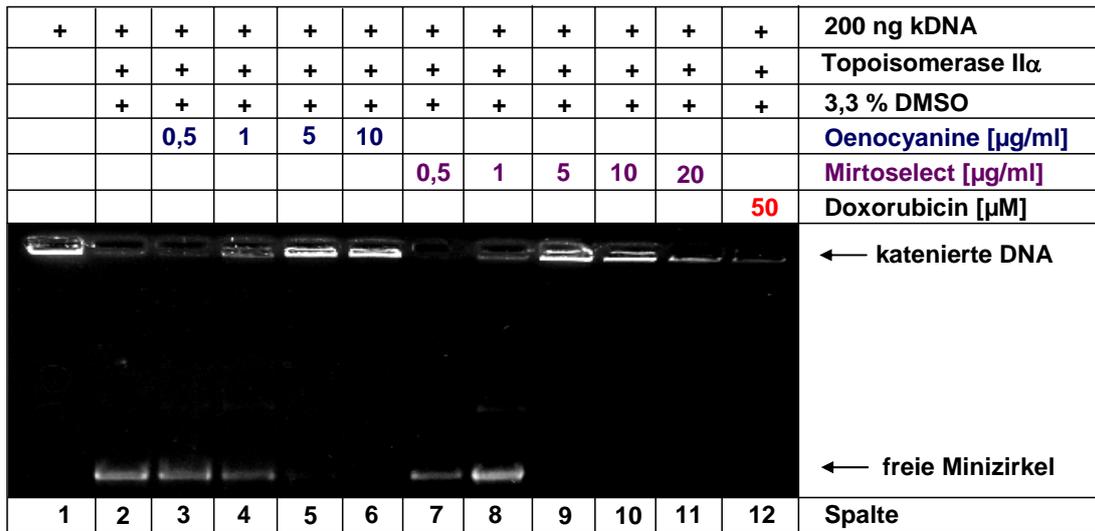
Der Einfluss auf die Topoisomerase II-Aktivität kann mit dem Dekatenierungsassay bestimmt werden. Die eingesetzte Kinetoplasten-DNA (kDNA) zeichnet sich dadurch aus, dass sie aus einem Netzwerk aus doppelsträngigen Minizirkeln mit einer Größe 2,5 kDa besteht (Abb. 66).



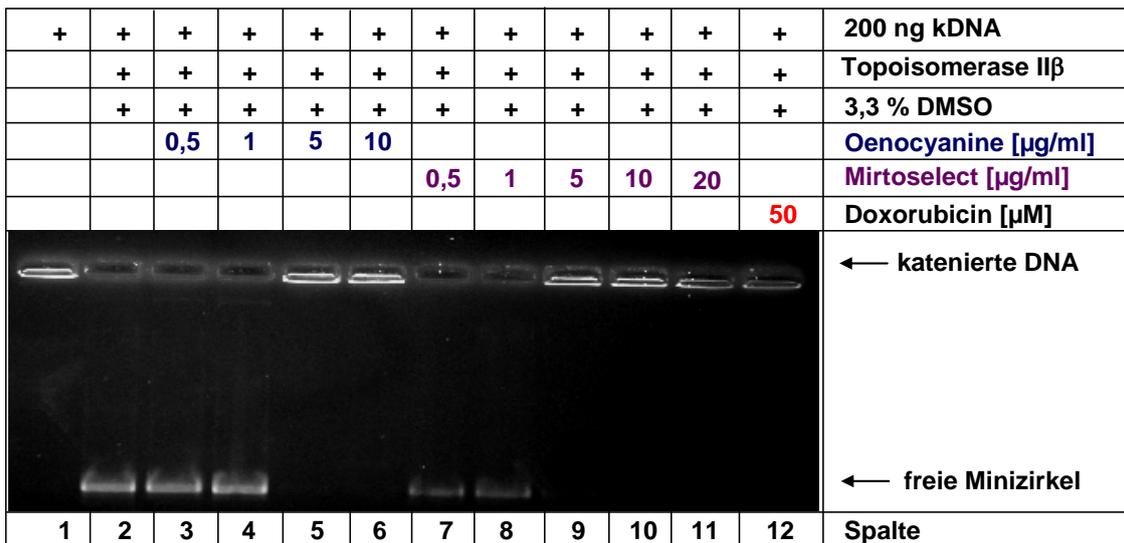
**Abb. 66:** Katenierte Kinetoplasten-DNA, ein Netzwerk ineinander verketteter DNA-Minizirkel einer Größe von 2,5 kDa (Klingbeil und Englund 2004).

Topoisomerase II kann zwei ineinander verkettete DNA-Doppelstränge voneinander trennen und so das Netzwerk der kDNA dekatenerieren. Diese Eigenschaft wird sich zu Nutze gemacht, um die Wirkung von Substanzen auf die Aktivität der Topoisomerase II zu untersuchen. Im Dekatenierungsassay wird die kDNA mit rekombinanter Topoisomerase II inkubiert und die DNA-Formen kDNA und die freien Minizirkel anschließend gelelektrophoretisch getrennt.

A



B



**Abb. 67:** Hemmung der katalytischen Aktivität von Topoisomerase II $\alpha$  (A) und Topoisomerase II $\beta$  (B) durch Oenocyanine (Spalten 3 - 6) und Mirtoselect (Spalten 7 - 11), untersucht im Dekatenierungsassay. Nach Inkubation der kDNA mit der entsprechenden Topoisomerase-II-Isoform und dem Lösungsmittel DMSO wird das katenierte Netzwerk vollständig in die einzelnen Minizirkel getrennt (Spalte 2), als Positivkontrolle dient 50  $\mu\text{M}$  Doxorubicin (Spalte 13), abgebildet ist ein repräsentatives Gel aus drei identischen Experimenten mit vergleichbaren Ergebnissen

Die Abbildungen 67 A und B zeigen zwei repräsentative Gele von je drei unabhängigen Experimenten für die Untersuchung zur Hemmung der Topoisomerase-II-Isoenzyme durch Oenocyanine und Mirtoselect. Das hochmolekulare Netzwerk der kDNA kann nicht in das Agarosegel eindringen und verbleibt in der Geltasche (Spalte 1). Topoisomerase II löst die

Minizirkel aus dem Netz und diese können im elektrischen Feld wandern (Spalte 2). Durch die Positivkontrolle Doxorubicin (50  $\mu\text{M}$ ) wird die Aktivität des Enzyms vollständig gehemmt (Spalte 12) und es können keine freien Minizirkel mehr detektiert werden. Die Extrakte können die Aktivität der Topoisomerase II $\alpha$  ab einer Konzentration 1  $\mu\text{g/ml}$  hemmen (A, Spalte 4 bzw. 8) und ab 5  $\mu\text{g/ml}$  ist die Aktivität der Topoisomerase II $\alpha$  vollständig gehemmt (A, Spalte 5 bzw. 9). Auch die Aktivität der Topoisomerase II $\beta$  wird durch 5  $\mu\text{g/ml}$  Oenocyanine (B, Spalte 5) bzw. Mirtoselect (B, Spalte 9) vollständig gehemmt. Mirtoselect und Oenocyanine hemmen effektiv die katalytische Aktivität der Topoisomerasen I, II $\alpha$  und II $\beta$ . Die Hemmung der Topoisomerase I erfolgt erst nach Inkubation mit 50  $\mu\text{g/ml}$  Oenocyanine bzw. Mirtoselect wohingegen die Aktivität der Topoisomerase II bereits durch Inkubation mit 5  $\mu\text{g/ml}$  Extrakt gehemmt wird, dabei diskriminieren die Extrakte keine der beiden Isoformen. Beide Extrakte wirken, trotz unterschiedlicher Anthocyanmuster gleich aktiv bei der Hemmung der Topoisomerase II-Aktivität. Dies lässt vermuten, dass möglicherweise bisher nicht identifizierte Substanzen für die gezeigten Effekte der beiden Extrakte auf die Topoisomeraseaktivität verantwortlich sind.

Die Extrakte enthalten demnach hoch potente Hemmstoffe der Topoisomerasen. Dazu zählen neben den Anthocyanidinen auch möglicherweise enthaltene Procyanidine, die sich als potente Hemmstoffe dieser Enzyme erwiesen haben und auch in Beerenfrüchten enthalten sind (Fridrich et al. 2007). In einem Traubenextrakt konnten neben Anthocyanen auch Procyanidine, Catechine, Stilbene und weitere Polyphenole bestimmt werden. Der Traubenextrakt wurde in sechs Fraktionen unterteilt:

- TP-1: die hydrophilsten Substanzen (Epigallocatechin, Catechin, Procyanidin B2)
- TP-2: anthocyanreiche Fraktion (Delphinidin-, Cyanidin-, Päonidin-3-glukosid, Pelargonidin-3,5-diglukosid)
- TP-3: nur Gallocatechin
- TP-4: eine polyphenolreiche Fraktion (Catechin, Procyanidine B1 und B2, Resveratrol, Epicatechin)
- TP-5: Epigallocatechin, Catechin, Epicatechin, Myricetin und Resveratrol
- TP-6: eine Fraktion reich an oligomeren und polymeren Procyanidinen.

Sowohl das komplexe Gemisch aller Substanzen, wie auch die einzelnen Fraktionen konnten die Aktivität der Topoisomerase II hemmen. Für den Traubenextrakt wurde ein IC<sub>50</sub>-Wert von 1,2  $\mu\text{g/ml}$  ermittelt, die IC<sub>50</sub>-Werte der Fraktionen TP-4 und TP-6 liegen bei 0,29  $\mu\text{g/ml}$  bzw.

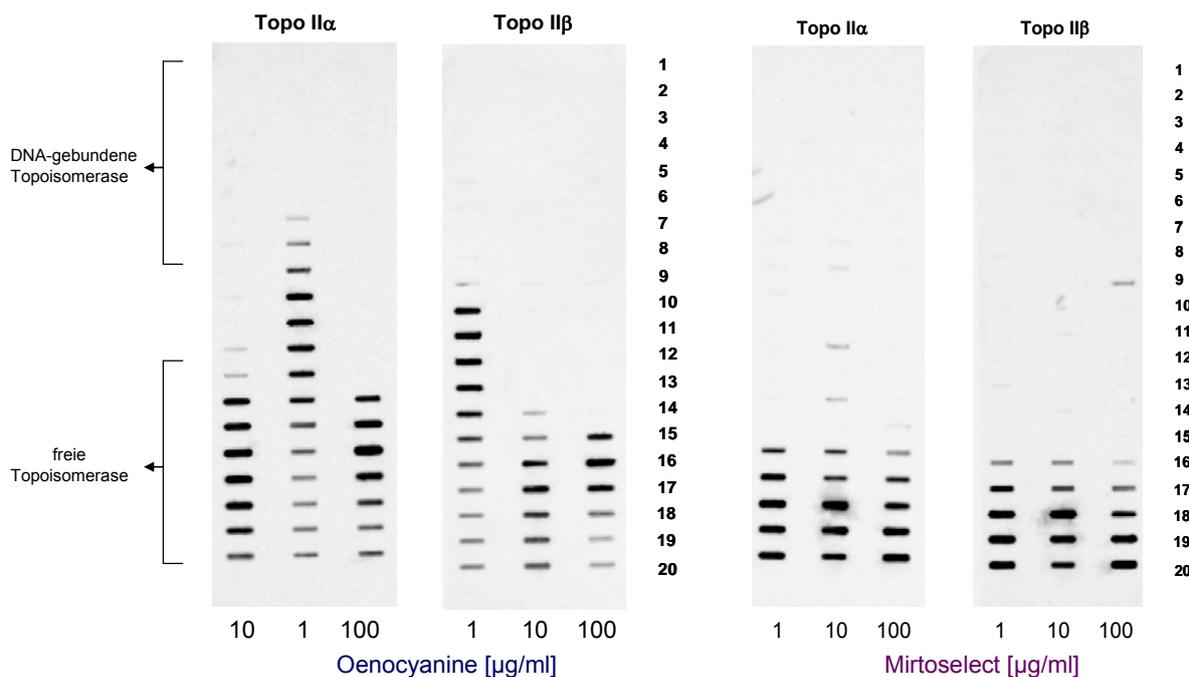
0,28 µg/ml (Jo et al. 2005). Diese Ergebnisse für einen Traubenextrakt lassen vermuten, dass auch in dem getesteten Weintraubenextrakt Oenocyanine Procyanidine enthalten sind, die für die potente Hemmwirkung des Extrakts gegenüber der Topoisomeraseaktivität mitverantwortlich sind.

Anhand der generierten Ergebnisse zur Hemmung der katalytischen Aktivität der Topoisomerasen kann noch keine Unterscheidung der Wirkung der Inhaltsstoffe als katalytische Inhibitoren oder Topoisomerasegifte gemacht werden. Um diese Wirkqualität zu unterscheiden wurde ein ICE-Bioassay durchgeführt.

### **Einfluss der anthocyanreichen Extrakte auf die Topoisomerase II-Aktivität in HT29-Zellen**

Mit dem ICE-Bioassay kann in intakten Zellen bestimmt werden, ob eine Substanz die Bindung der Topoisomerase an die DNA beeinflussen kann. Wirkt eine Substanz als Topoisomerasegift wird das Topoisomerase-DNA-Intermediat stabilisiert. Mit dem ICE-Bioassay werden die Zellbestandteile in Fraktionen und so die DNA von freien Proteinen getrennt. Der Gehalt an Topoisomerase in den verschiedenen Fraktionen kann mit Hilfe spezifischer Antikörper chemoluminometrisch bestimmt werden. So kann der Anteil DNA-gebundener Topoisomerase ermittelt werden.

Da die HT29-Zellen nur wenig Topoisomerase I enthalten wird darauf verzichtet einen Einfluss der Extrakte auf dieses Enzym zu untersuchen.



**Abb. 68:** ICE-Bioassay: Bestimmung der freien und DNA-gebundenen Topoisomerase II $\alpha$ / $\beta$  nach Inkubation von HT29-Zellen (1h, serumfrei, 100 U/ml Katalase) mit 1  $\mu$ g/ml, 10  $\mu$ g/ml und 100  $\mu$ g/ml Oenocyanine und Mirtoselect, Abgebildet sind repräsentative Membranen aus mind. zwei Versuchen mit identischem Ergebnis, n = 2-3

Wie bereits gezeigt (Abb. 46) kann in Gegenwart des Lösungsmittels DMSO keine DNA-gebundene Topoisomerase II in HT29-Zellen detektiert werden.

Abbildung 68 zeigt repräsentative Membranen nach chemoluminometrischer Detektion der Topoisomerase-II-Isoformen nach Inkubation von HT29-Zellen mit den anthocyanreichen Extrakten Mirtoselect und Oenocyanine. Nach einstündiger serumfreier Inkubation mit 1 – 100  $\mu$ g/ml Oenocyanine kann keine DNA-gebundene Topoisomerase II $\alpha$  und auch keine DNA-gebundene Topoisomerase II $\beta$  in den HT29-Zellen bestimmt werden. Bei der Inkubation mit 1  $\mu$ g/ml Oenocyanine werden bereits in den Fraktionen 7 bis 9 Topoisomerasen gefunden. Dies ist durch einen Verlust an Gradientenlösung bei der Fraktionierung zu erklären. Mit dem Nanodrop<sup>®</sup>-Spektrophotometer wurde der Gehalt an DNA in den einzelnen Fraktionen bestimmt und es zeigte sich, dass die Fraktionen 7 – 9 bei der Inkubation mit 1  $\mu$ g/ml Oenocyanine nur einen geringen Gehalt an DNA aufweisen.

Auch Mirtoselect bewirkt keine Stabilisierung des Topoisomerasen II $\alpha$ / $\beta$ -DNA-Komplexes in HT29-Zellen nach einstündiger serumfreier Inkubation mit 1 – 100  $\mu$ g/ml des Extrakts. Hier ist deutlich zu erkennen, dass der Gehalt an freier Topoisomerase II kaum beeinflusst wird. Die geringere Menge freier Topoisomerase in den Zellen nach Inkubation mit 100  $\mu$ g/ml

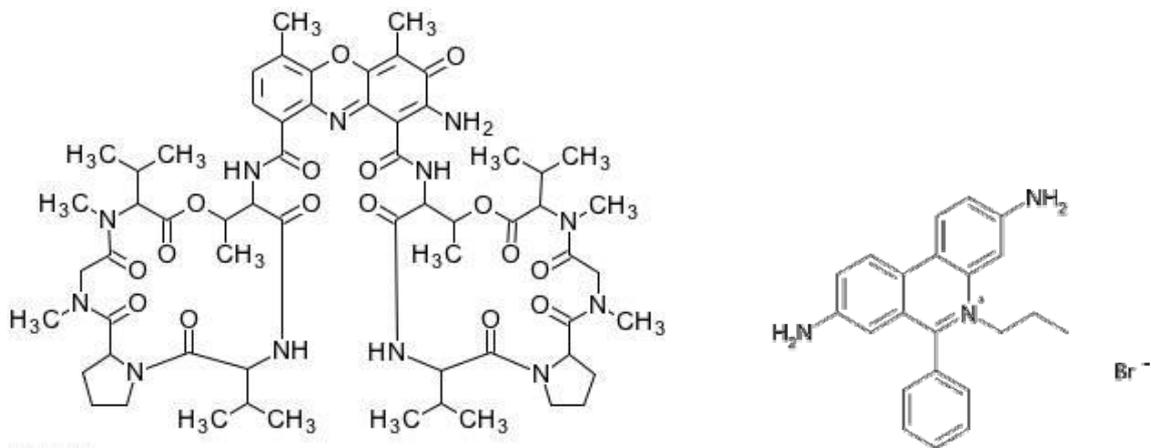
Mirtoselect könnte durch einen Verlust an Zellen bei der Aufarbeitung oder bei der Fraktionierung erklärt werden. Nur in Fraktion 9 (100 µg/ml Mirtoselect, Topoisomerase IIβ) wird eine schwache Bande detektiert. Da jedoch nur eine geringe Konzentration an DNA für diese Fraktion bestimmt wurde, kann davon ausgegangen werden, dass es sich hierbei um ein Artefakt handelt und Mirtoselect in den eingesetzten Konzentrationen keine wirksamen Topoisomerasegifte enthält.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die in den Extrakten enthaltenen Polyphenole als reine katalytische Hemmstoffe der Topoisomerasen agieren und nicht den DNA-Enzym-Komplex stabilisieren können. Es kann jedoch auch nicht ausgeschlossen werden, dass die Inhaltsstoffe gar nicht in den Zellkern gelangen. Auch wenn die Substanzen ins Zytosol der Zellen gelangen muss dies nicht bedeuten, dass eine Aufnahme in den Zellkern auch geschieht. Doch die Substanzen müssen in den Zellkern gelangen um als Topoisomerasegifte in intakten Zellen wirken zu können.

## Beeinflussung der DNA-Integrität durch Mirtoselect und Oenocyanine

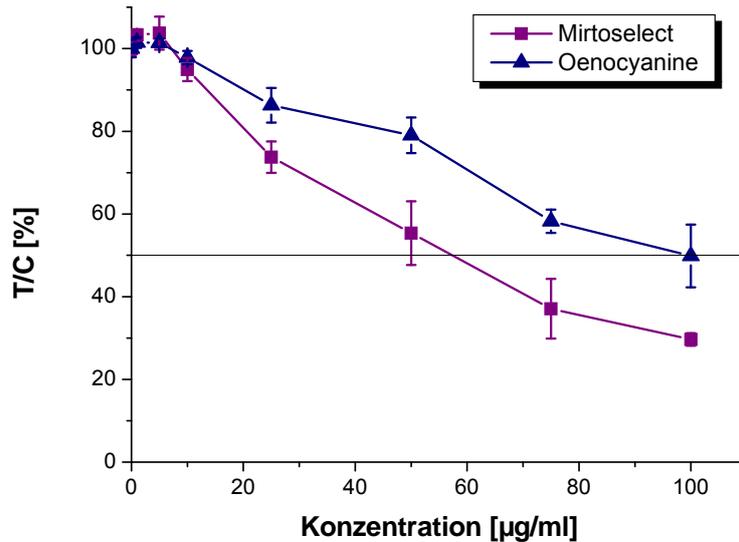
Die Anthocyanaglyka sind in bei einem neutralen pH positiv geladen und interagieren mit der DNA. M. Habermeyer konnte im Rahmen seiner Dissertation zeigen, dass alle getesteten Aglyka (Delphinidin, Cyanidin, Pelargonidin, Päonidin und Malvidin) eine Affinität zu DNA haben. Die Aglyka können den Interkalator Ethidiumbromid aus doppelsträngiger Kalbsthymus-DNA verdrängen und so mit dem Farbstoff um die Interkalation konkurrieren. Des Weiteren konkurrieren die getesteten Aglyka ebenfalls mit dem Hoechstfarbstoff H33258 um die Bindung an die kleine Furche der DNA.

Die Fähigkeit der Inhaltsstoffe der polyphenolreichen Extrakte zwischen die DNA-Basen zu interkalieren oder an die kleine Furche der DNA zu binden, wird mit Fluoreszenzverdrängungstests an Kalbsthymus-DNA geprüft. Ethidiumbromid (Abb. 68) besitzt eine planare Struktur und interkaliert zwischen die DNA-Basen und fluoresziert dabei. Konkurriert eine weitere interkalierende Substanz mit Ethidiumbromid kann eine Reduktion der Fluoreszenz detektiert werden. Als Positivkontrolle wurde das interkalierende Actinomycin D (Abb. 68) eingesetzt, welches einen  $EC_{50}$ -Wert von etwa 2  $\mu$ M aufwies (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 69:** Strukturen zweier Interkalatoren: Actinomycin D (links) und Ethidiumbromid (rechts)

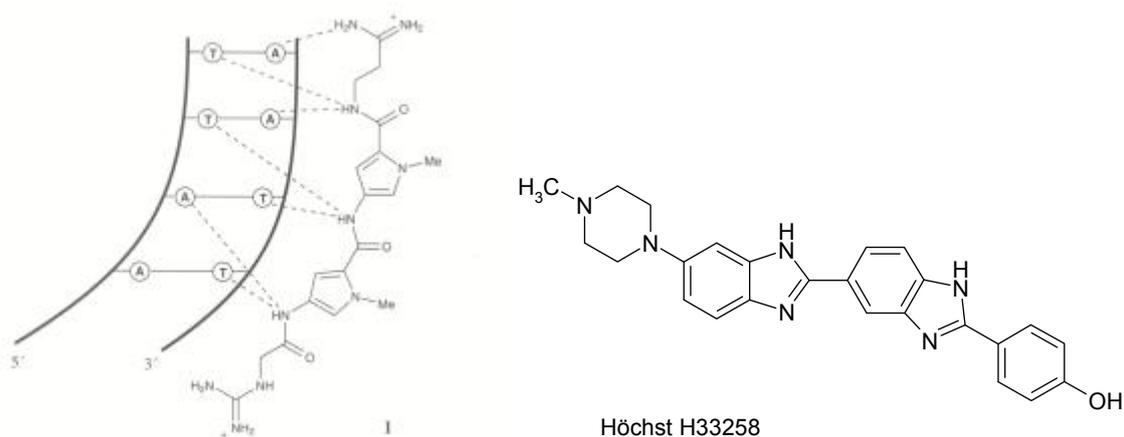
Die Ergebnisse für den Ethidiumbromidverdrängungstest mit den Extrakten sind in Abbildung 70 dargestellt.



**Abb. 70:** Fluoreszenzverdrängungstest mit Kalbsthymus-DNA zur Bestimmung der Konkurrenz der Extraktinhaltsstoffe mit dem Interkalator Ethidiumbromid. Die Absorption nach Inkubation mit den Extrakten wird als Prozent der DMSO-Kontrolle (T/C [%]) angegeben. Abgebildet sind die Mittelwerte  $\pm$  Stabw.,  $n = 3-5$

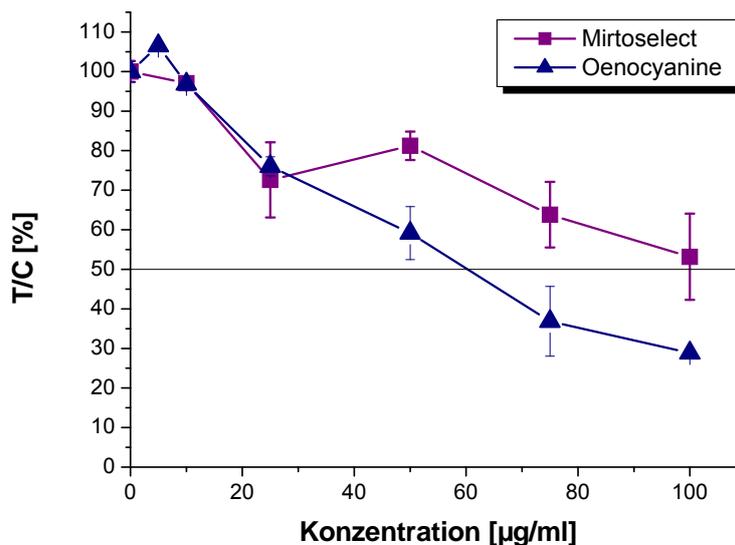
Es konnte eine konzentrationsabhängige Abnahme der Fluoreszenzintensität bei Inkubation der DNA mit Ethidiumbromid und den anthocyanreichen Extrakten gemessen werden. Die Extrakte enthalten demnach beide eine gewisse Konzentration an Inhaltsstoffen, die mit Ethidiumbromid um die Interkalation in die DNA konkurrieren, dabei zeigte sich Mirtoselect potenter als Oenocyanine. Es wurde ein  $EC_{50}$ -Wert von  $63,4 \pm 11,2 \mu\text{g/ml}$  für Mirtoselect bestimmt. Die Extrakte konnten in diesem Testsystem nur bis zu einer Konzentration von  $100 \mu\text{g/ml}$  eingesetzt werden, da es in höheren Konzentrationen zu Löslichkeitsproblemen in dem verwendeten Puffer kam. Dadurch konnte für Oenocyanine kein  $EC_{50}$ -Wert ermittelt werden. Andere in den Extrakten enthaltene Flavonoide spielen bei diesem Effekt vermutlich eine untergeordnete Rolle. Für Quercetin und einige Catechine wurde keine Aktivität als Konkurrenten des Ethidiumbromids um die Interkalation bestimmt (Fritz 2004).

Der Hoechst Farbstoff H33258 (Abb. 71) bindet unter Fluoreszenz an die kleine Furche der DNA. Wie bereits beschrieben kommt es bei Konkurrenz mit einem weiteren „minor groove binder“ zu einer Minderung der Fluoreszenz. Für diesen Test dient Netropsin, ein bekannter „minor groove binder“ als Positivkontrolle. Der  $EC_{50}$ -Wert liegt für Netropsin (Abb. 71) bei  $0,8 \mu\text{M}$  (Daten nicht gezeigt). Die ermittelten Fluoreszenzwerte werden auf die DMSO-Kontrolle des jeweiligen Tests bezogen und als Prozent der Kontrolle (% T/C, „test over control“) angegeben.



**Abb. 71:** Bindung von Netropsin an die kleine Furche der DNA, Struktur des Fluoreszenzfarbstoffs Hoechst H33258

In Abbildung 72 sind die Ergebnisse des Hoechstverdrängungstests dargestellt. Auch in diesem Test wurde die eine konzentrationsabhängige Reduktion der Fluoreszenzintensität nach Inkubation mit den Extrakten ermittelt. Im Hoechst-Verdrängungstest zeigt sich vergleichbar mit dem EtBr-Verdrängungstest Mirtoselect als der aktivere der beiden Extrakte mit einem  $EC_{50}$ -Wert von  $64,7 \pm 9,8 \mu\text{g/ml}$  Mirtoselect. Der  $EC_{50}$ -Wert von Oenocyanine liegt außerhalb des gemessenen Konzentrationsbereichs. Für die Aktivität als „minor groove binder“ können die Anthocyane verantwortlich sein, da sie eine positive Ladung tragen und so eine wahrscheinlich hohe Affinität zur Bindung an die negativgeladene DNA besitzen. Ein Einfluss anderer im Extrakt enthaltener Polyphenole kann jedoch nicht völlig ausgeschlossen werden.



**Abb. 72:** Fluoreszenzverdrängungstest mit Kalbsthymus-DNA zur Bestimmung der Konkurrenz der Extraktinhaltsstoffe mit dem „minor groove binder“ H33258. Die Absorption nach Inkubation mit den Extrakten wird als Prozent der DMSO-Kontrolle (T/C [%]) angegeben. Abgebildet sind die Mittelwerte  $\pm$  Stabw., n = 3-5

Der Vergleich der beiden Extrakte lässt vermuten, dass der Anteil und die Komposition der enthaltenen Anthocyane eine Rolle bei der Wirkung der Extrakte auf zelluläre Strukturen spielt. Da Mirtoselect mit dem vermutlich höheren Gesamtgehalt an Anthocyanen aktiver ist als Oenocyanine kann angenommen werden, dass v.a. die Anthocyane zu den gezeigten Wirkungen auf die DNA-Integrität beitragen. Jedoch kann das Mitwirken weiterer aktiver polyphenolischer Inhaltsstoffe des Extrakts, wie z.B. der Procyanidine oder auch der Ellagsäure nicht ausgeschlossen werden.

Für viele DNA-Interkalatoren konnte gezeigt werden, dass sie die Aktivität humaner Topoisomerasen hemmen, so beispielsweise Amsacrin (m-AMSA) oder Derivate von Doxorubicin und Daunorubicin (Brana et al. 2001). Die Extrakte hemmen humane Topoisomerasen in niedrigen Konzentrationen (ca. 1 µg/ml). Eine effektive Interaktion mit der DNA durch Interkalation oder Bindung an die kleine Furche wird jedoch erst Konzentrationen  $\geq 30$  µg/ml. Daher kann ausgeschlossen werden, dass diese Mechanismen der Interaktion mit der DNA die potente Topoisomerasehemmung durch die Extrakte bedingen.

### **Einfluss der anthocyanreichen Extrakte auf die Zellzyklusverteilung**

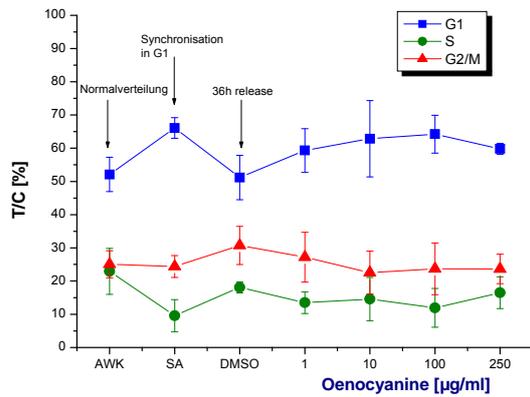
Die anthocyanreichen Extrakte zeigten keine Wachstumshemmung bis 500 µg/ml, können jedoch die Topoisomeraseaktivität in niedrigen Konzentrationen (5 – 50 µg/ml) hemmen und wirken in HT29-Zellen nicht als Topoisomerasegifte. Es wird überprüft ob die katalytische Hemmung der Topoisomeraseaktivität einen Einfluss auf die Zellzyklusverteilung der HT29-Zellen nach Synchronisation der Zellen in der G<sub>2</sub>/M-Phase des Zellzyklus und anschließender Inkubation mit den Extrakten untersucht. Gleichzeitig wird auch die Zellzyklusverteilung nach Synchronisation in der G<sub>1</sub>-Phase und anschließender Inkubation mit den Extrakten getestet, um weitere Effekte der Extrakte auf Proliferations-assoziierte Signalkaskaden zu bestimmen.

HT29-Zellen werden durch Serumdepletion in der G<sub>1</sub>-Phase bzw. durch Nocodazolinkubation in der G<sub>2</sub>/M-Phase des Zellzyklus synchronisiert. Anschließend wird mit 1 – 250 µM der Extrakte serumfrei inkubiert (Abb. 73).

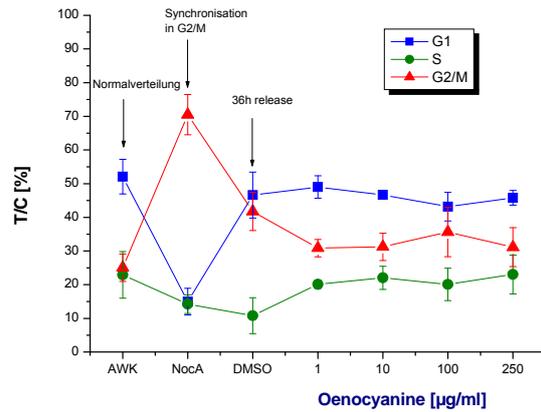
Normalerweise verteilen sich die HT29-Zellen über den Zellzyklus wie folgt: 52 % der Zellen in der G<sub>1</sub>-Phase, 23 % in der S-Phase und 25 % in der G<sub>2</sub>/M-Phase. Eine Arretierung in der G<sub>1</sub>-Phase durch Serumdepletion hat einen höheren Anteil an Zellen in der G<sub>1</sub>-Phase zur Folge (66 %), während der Anteil an Zellen in der S-Phase sinkt (10 %) und in der G<sub>2</sub>/M-Phase annähernd gleich bleibt (24 %) (Abb. 73 A,C). Die Synchronisation der Zellen in der G<sub>1</sub>-Phase bewirkt einen nicht signifikanten Anstieg der Zellzahl des in der G<sub>1</sub>-Phase im Vergleich zur Normalverteilung. So können auch Oenocyanine (A) und Mirtoselect (C) keinen signifikanten Arrest der HT29-Zellen in der G<sub>1</sub>-Phase des Zellzyklus bewirken. Die Extrakte zeigen beide eine Tendenz zur Arretierung der Zellen in der G<sub>1</sub>-Phase des Zellzyklus. Dies kann durch die Hemmung der Aktivität von Rezeptortyrosinkinasen der ErbB- und VEGFR-Familie, die am Beginn von Proliferations-assoziierten Signalkaskaden stehen, erklärt werden (Teller, persönliche Mitteilung).

Durch Nocodazolinkubation werden die HT29-Zellen in der G<sub>2</sub>/M-Phase des Zellzyklus arretiert und ein signifikanter Anstieg an Zellen in dieser Phase wird verzeichnet (auf 70 %). Der Anteil an Zellen in den anderen beiden Zellzyklusphasen ist dagegen stark reduziert (15 % je in G<sub>1</sub>- und S-Phase) (Abb. 73 B,D). Ein Arrest der Zellen in der G<sub>2</sub>/M-Phase kann nach Inkubation mit Oenocyanine (B) nicht beobachtet werden. Dieselben Ergebnisse werden nach Inkubation mit Mirtoselect (D) gefunden.

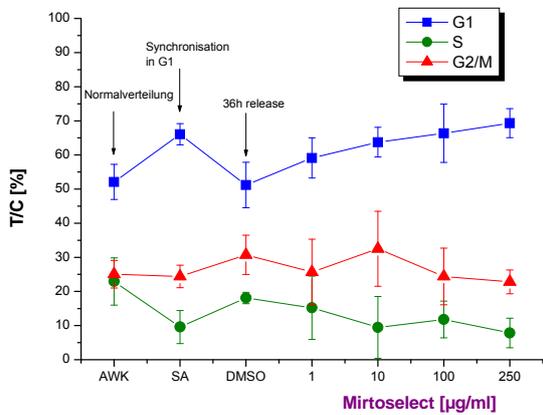
A



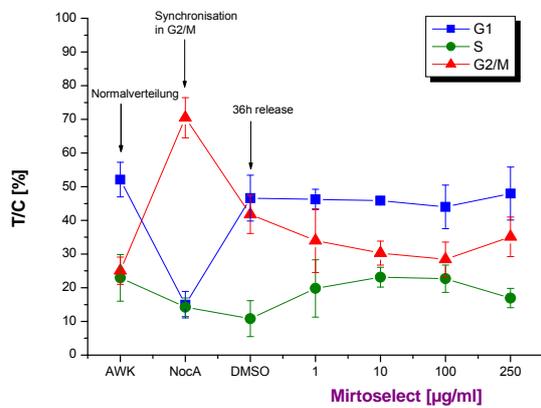
B



C



D



**Abb. 73:** Zellzyklusverteilung von HT29-Zellen (A) nach Synchronisation in der G<sub>1</sub>-Phase des Zellzyklus und anschließender Inkubation mit Oenocyanine (36 h, serumfrei, 100 U/ml Katalase) (B) nach Synchronisation in der G<sub>2</sub>/M-Phase und anschließender Inkubation mit Oenocyanine (36 h, serumfrei, 100 U/ml Katalase), (C) nach Synchronisation in der G<sub>1</sub>-Phase des Zellzyklus und anschließender Inkubation mit Mirtoselect (36 h, serumfrei, 100 U/ml Katalase) (D) nach Synchronisation in der G<sub>2</sub>/M-Phase und anschließender Inkubation mit Mirtoselect (36 h, serumfrei, 100 U/ml Katalase). Abgebildet sind die Mittelwerte ± Stabw. n = 3-4; T/C, „test over control“

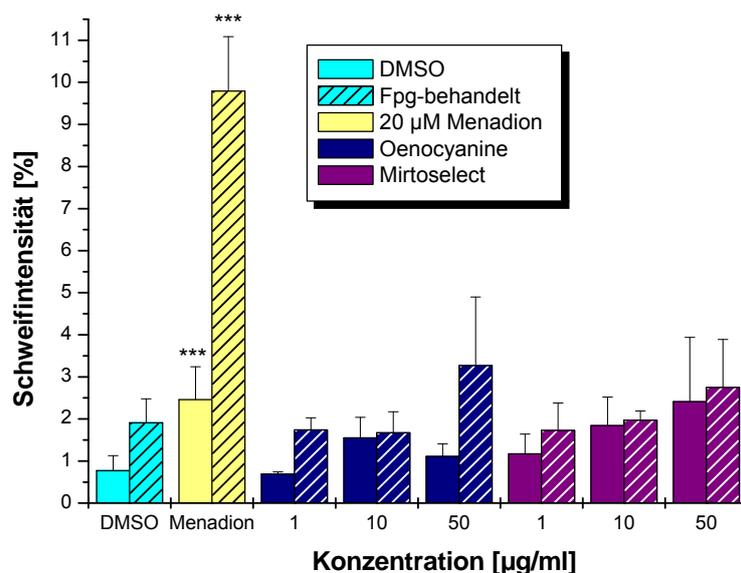
Substanzen, die die Aktivität humaner Topoisomerasen hemmen und so die Steuerung der Transkription und der Mitose, bewirken einen Arrest in der G<sub>2</sub>/M-Phase. Die Extrakte können keinen Arrest in der G<sub>2</sub>/M-Phase verursachen. Der Anstieg der Zellzahl in der S-Phase, der nach Arretierung in der G<sub>2</sub>/M-Phase und Inkubation mit den Testsubstanzen im Vergleich zur DMSO-Inkubation beobachtet wird (B und D), deutet auf einen Einfluss der Substanzen auf die DNA-Synthese hin. In Zukunft sollte dieser Effekt jedoch durch eine Synchronisation der Zellen in der S-Phase beispielsweise durch den Polymerasehemmstoff Aphidicolin näher untersucht werden. Im Vergleich zur Normalverteilung lässt sich nach Inkubation mit den

Extrakten kein Unterschied feststellen, im Gegensatz zur Inkubation mit DMSO. Die Zellzyklusverteilung nach Synchronisation der Zellen in der G<sub>2</sub>/M-Phase und anschließender 36-stündiger Inkubation mit DMSO sollte wiederholt werden, um sicherzugehen, dass der beobachtet Anstieg der Zellzahl in der S-Phase nach Substanzinkubation tatsächlich auf einen Effekt der Substanzen zurückzuführen ist. Die Topoisomerasehemmung durch die Extrakte, die in zellfreien Testsystemen bestimmt wurde, scheint demnach keinen Einfluss auf die DNA-Integrität in intakten Zellen zu haben. Um dies zu überprüfen, sollte auch die Fähigkeit der Extrakte getestet werden, DNA-Strangbrüche zu induzieren.

### Induktion von DNA-Strangbrüchen durch Oenocyanine und Mirtoselect

Da die Extrakte die katalytische Aktivität humaner Topoisomerasen hemmen und auch Polyphenole enthalten, die mit der DNA interagieren können, ist es möglich, dass sie DNA-Schäden verursachen. Die Induktion von DNA-Strangbrüchen und oxidativen DNA-Schäden wurde mittels Einzelzellgelelektrophorese (Cometassay) untersucht.

In Abbildung 74 sind die Ergebnisse der Untersuchung der DNA-Schädigung durch die anthocyanreichen Extrakte Mirtoselect und Oenocyanine dargestellt.



**Abb. 74:** Cometassay: Induktion von DNA-Strangbrüchen und oxidativen DNA-Schäden durch die anthocyanreichen Extrakte Oenocyanine (marineblau) und Mirtoselect (lila). Inkubation von HT29-Zellen mit den Extrakten (serumfrei, 1 % DMSO, 100 U/ml Katalase) Fpg-Behandlung zur Detektion oxidativer DNA-Schäden (gestreifte Balken). Abgebildet sind die Mittelwerte ± Stabw., n = 3

Die Lösungsmittelkontrolle DMSO (1 %) zeigt mit einer Schweifintensität von 0,77 % ohne und 1,91 % nach Fpg-Behandlung die geringe Grundschädigung der DNA. Durch Inkubation mit 1 bis 50 µg/ml Oenocyanine bzw. Mirtoselect wurde kein signifikanter Anstieg der Schweifintensität gemessen. Es konnte also keine Induktion von DNA-Strangbrüchen und auch keine oxidativen DNA-Schäden durch Oenocyanine und Mirtoselect bis zu einer Konzentration von 50 µg/ml des jeweiligen Extrakts gezeigt werden.

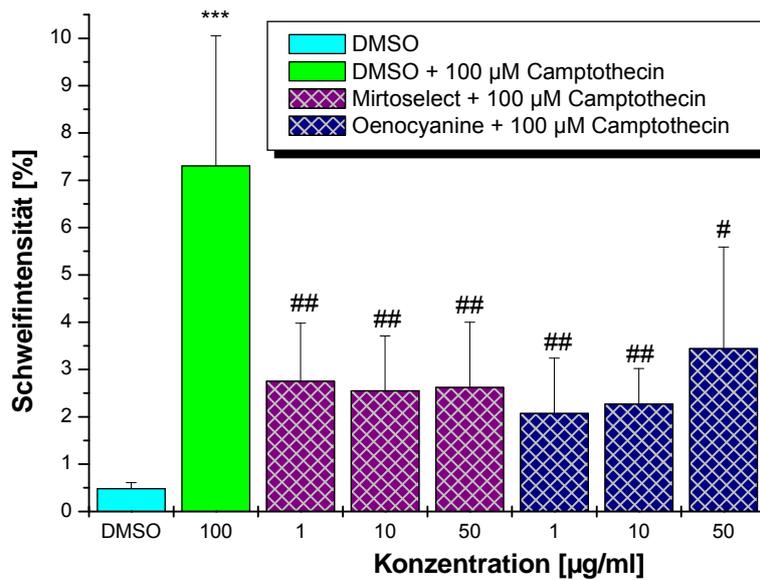
Die Extrakte induzieren keine DNA-Schäden und keine oxidativen DNA-Schäden in HT29-Zellen. Es konnte somit gezeigt werden, dass die auf dem Markt erhältlichen Extrakte keine DNA-schädigende Wirkung bis zu einer Konzentration von 50 µg/ml *in vitro* besitzen. Damit konnten die Ergebnisse, die die Zellzyklusuntersuchung lieferten bestätigt werden. Die Inhaltsstoffe der anthocyanreichen Extrakte können das Topoisomerase-DNA-Intermediat nicht stabilisieren. Sie wirken somit in HT29-Zellen nicht als Topoisomerasegifte.

Insgesamt zeigen diese Untersuchungen, dass die Extrakte an den untersuchten zellulären Zielstrukturen keine toxischen Effekte in humanen Kolonkarzinomzellen aufwiesen.

### **Protektion Topoisomerasegift-vermittelter DNA-Schäden durch anthocyanreiche Extrakte**

Die Extrakte können in niedrigen Konzentrationen (5 µg/ml) die Aktivität von Topoisomerasen hemmen und zeigen keine toxische Wirkung in den getesteten Konzentrationen (bis 50 oder 250 µg/ml). Da die Extrakte keine Stabilisierung des DNA-Topoisomerase-Intermediats bewirken werden folgend die modulierenden Eigenschaften der Extrakte auf die DNA-schädigende Wirkung von Topoisomerasegiften untersucht. Möglicherweise können die polyphenolischen Inhaltsstoffe der Extrakte, wie bereits für das Anthocyanidin Delphinidin gezeigt, Topoisomerasegift-vermittelte DNA-Schäden vermindern. Dazu werden HT29-Zellen mit den Extrakten serumfrei für 30 min vorinkubiert und anschließend mit dem Topoisomerase-I-Gift Camptothecin koinkubiert (Abb. 75).

Nach Vorinkubation der Zellen mit DMSO und Koinkubation mit DMSO und 100 µM Camptothecin liegt die Schweifintensität bei 7,3 % und damit signifikant höher als bei der DMSO-Kontrolle (0,48 %).



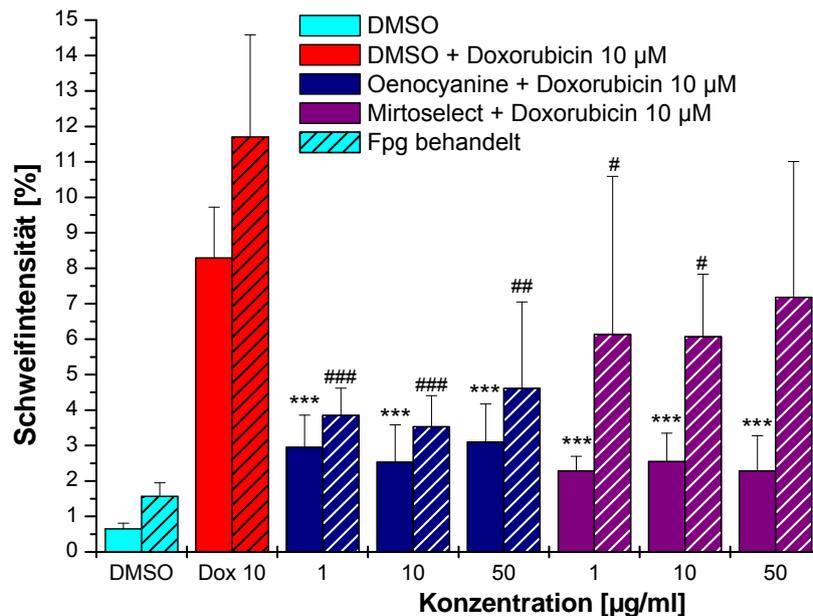
**Abb. 75:** Modulation der strangbrechenden Wirkung von Camptothecin durch Mirtoselect (lila) und Oenocyanine (marineblau), gemessen mittels Cometassay an HT29-Zellen. 30 min Vorinkubation mit den entsprechenden Konzentrationen an Extrakt und anschließend 1 h Koinkubation mit 100 µM Camptothecin (serumfrei, 0,2 % DMSO). Bestimmt wurde die Schweifintensität, Abgebildet sind die Mittelwerte ± Stabw., n = 3 – 4, \*Signifikanter Unterschied zur jeweiligen Kontrolle (\* = p < 0,05; \*\* = p < 0,01; \*\*\* = p < 0,001), # Signifikanter Unterschied zu Camptothecin mit (# = p < 0,05; ## = p < 0,01; ### = p < 0,001)

Durch Vor- und Koinkubation mit Mirtoselect als auch Oenocyanine wird schon in Konzentrationen ab 1 µg/ml signifikant die Schweifintensität reduziert (2 % bis 3,5 %). Die Extrakte können also vor den Camptothecin-induzierten DNA-Strangbrüchen schützen. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Konzentrationen eines Extrakts festgestellt werden. Die eingesetzten Konzentrationen wurden aufgrund der Vergleichbarkeit mit bestehenden Daten und aufgrund von Literaturangaben in ernährungsphysiologisch relevanten Konzentrationen gewählt. Die Bestimmung des „no effect levels“ steht noch aus. Auch zwischen den gleichen Konzentrationen der beiden Extrakte konnten keine Unterschiede beobachtet werden. Der Einfluss der beiden Extrakte auf die strangbrechende Wirkung von Camptothecin ist daher im gleichen Konzentrationsfenster anzusehen.

Die Extrakte zeigen also einen protektiven Effekt vor der Schädigung der DNA von HT29-Zellen durch das Topoisomerase-I-Gift Camptothecin. Dabei wirken die Extrakte schon in niedrigen Konzentrationen hoch potent.

Ein Cometassay mit dem Topoisomerase-II-Gift Doxorubicin wurde durchgeführt, um zu überprüfen, ob die Extrakte auch die strangbrechende Wirkung von Topoisomerase-II-Giften

beeinflussen. Die HT29-Zellen werden mit DMSO bzw. aufsteigenden Konzentrationen an Mirtoselect bzw. Oenocyanine für 30 min vor- und dann zusätzlich mit 10  $\mu\text{M}$  Doxorubicin koinkubiert (Abb. 76). Nach Koinkubation mit 10  $\mu\text{M}$  Doxorubicin und dem Lösungsmittel DMSO kann eine Schweifintensität von 8,3 % gemessen werden. Die Koinkubation mit 10  $\mu\text{M}$  Doxorubicin und Oenocyanine bzw. Mirtoselect bewirkt eine Reduktion der Strangbrüche. Schon ab 1  $\mu\text{g/ml}$  eingesetztem Extrakt bewirken sowohl Oenocyanine wie auch Mirtoselect eine signifikante Reduktion der DNA-Strangbruchrate. Es kann, wie schon bei der Untersuchung zur Modulation der Camptothecin-vermittelten DNA-Schäden gezeigt, keine konzentrationsabhängige Wirkung (1 – 50  $\mu\text{M}$ ) von Mirtoselect und Oenocyanine und auch keine signifikanten Unterschiede zwischen den Extrakten beobachtet werden. Die Schweifintensitäten liegen nach Koinkubation in einem Bereich von 2,3 bis 3,1 %. Die Schweifintensität wird demnach um etwa 5,6 % (8,3 % - 2,7 %) vermindert durch.



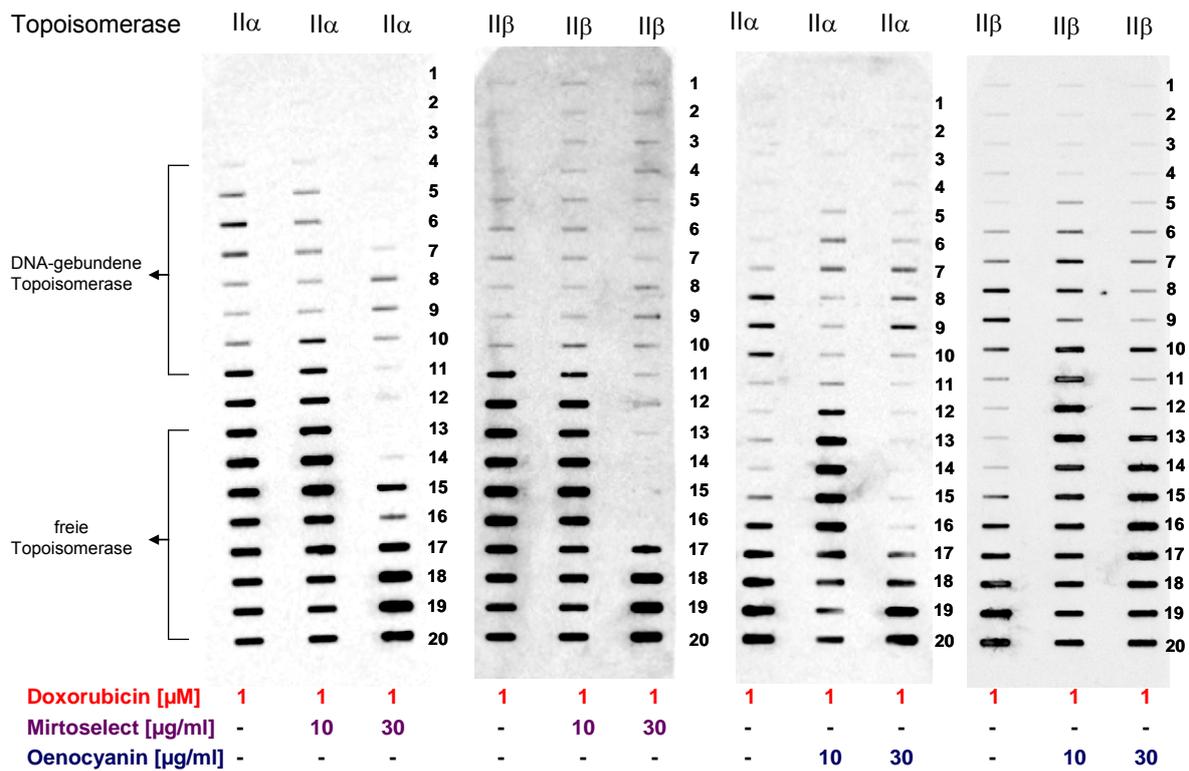
**Abb. 76:** Modulation der strangbrechenden Wirkung von Doxorubicin durch Oenocyanine (marineblau) und Mirtoselect (lila), gemessen mittels Cometassay an HT29-Zellen. 30 min Vorinkubation mit den entsprechenden Konzentrationen an dem jeweiligen Extrakt und anschließend 1 h Koinkubation mit 10  $\mu\text{M}$  Doxorubicin (serumfrei, 0,2 % DMSO). Bestimmt wurde die Schweifintensität (Intensität des Schweifes/Gesamtintensität des „Kometen“), Behandlung mit Fpg zur Detektion oxidativer DNA-Schäden. Abgebildet sind die Mittelwerte  $\pm$  Stabw.,  $n = 3 - 5$ , \*Signifikanter Unterschied zur jeweiligen Kontrolle (\* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ ), # Signifikanter Unterschied zu Doxorubicin mit (# =  $p < 0,05$ ; ## =  $p < 0,01$ ; ### =  $p < 0,001$ )

Gleichzeitig wurde auch getestet ob die Extrakte einen Einfluss auf die durch Doxorubicin-induzierten oxidativen DNA-Schäden haben. Die oxidative DNA-Schädigung spiegelt sich durch einen Anstieg der Schweifintensität nach Inkubation mit Fpg wider. Die oxidativen Grundschiäden für DMSO liegen bei 0,9 % SI (1,5 % SI - 0,6 % SI) in HT29-Zellen. Doxorubicin induziert oxidative DNA-Schäden in HT29-Zellen (3,5 % SI), die sich gegenüber den Grundschiäden aber nicht als signifikant erwiesen. Nach Abzug der Grundschiäden wird ein  $\Delta_{SI}$ -Wert von 2,4 % ermittelt (3,5 % - 0,9 % SI). Die oxidativen DNA-Schäden werden durch Oenocyanine konzentrationsunabhängig auf 1 bis 1,5 % reduziert und damit beinahe auf das Level der Grundschiäden (1,3 % - 0,9 % SI:  $\Delta_{SI} = 0,4$  %). Die eingesetzten Konzentrationen an Mirtoselect hingegen können nicht vor den durch Doxorubicin-verursachten oxidativen DNA-Schäden schützen (3,2 % - 0,9 % SI:  $\Delta_{SI} = 2,1$  %). Die Protektion vor Topoisomerasegift-induzierten DNA-Schäden durch Mirtoselect kann also nicht auf eine antioxidative Wirkung der Extraktinhaltsstoffe zurückgeführt werden. Mirtoselect enthält 36 % Anthocyane und davon sind mehr als ein Drittel Delphinidnglykoside. Die Glykoside können im zellfreien System die Aktivität der Topoisomerasen I und II jedoch nicht hemmen (Roikaew 2003). Demnach tragen die Anthocyane in Mirtoselect vermutlich nur marginal zur Modulation der DNA-schädigenden Wirkung von Doxorubicin bei. Andere, bisher nicht in dem Extrakt identifizierte Polyphenole, wie z.B. Procyanidine oder Tannine sind daher wesentlich wahrscheinlicher für die potente Hemmwirkung der Extrakte verantwortlich. Für einige Procyanidine konnte bereits eine potente Hemmung der Topoisomeraseaktivität gezeigt werden (Fridrich et al. 2007). Auch Ellagttannine wurden bereits als potente Hemmstoffe humaner Topoisomerasen beschrieben (Yamashita et al. 1990). *In vivo* könnten jedoch andere Hemmwirkungen auftreten, da dort möglicherweise das Anthocyanidin durch Hydrolyse aus den glykosidischen Verbindungen freigesetzt werden kann und so zu einer potenten Wirkung der Extrakte beitragen könnte. Jedoch ist dies aufgrund der limitierten Bioverfügbarkeit (Lapidot et al. 1998, Manach et al. 2005) nur lokal im Gastrointestinaltrakt zu erwarten.

Es wurde ein ICE-Bioassay durchgeführt, um zu prüfen ob die protektive Wirkung der Extrakte vor DNA-Schäden durch die Topoisomerasegifte Topoisomerase-vermittelt ist. Dazu werden die HT29-Zellen entsprechend den Bedingungen des Cometassays inkubiert, d.h. 0,5 h mit unterschiedlichen Konzentrationen an Mirtoselect bzw. Oenocyanine und anschließend 1 h mit Doxorubicin koinkubiert. Dann wurden die Topoisomerasen II $\alpha$  und II $\beta$  nach Trennung der Zellbestandteile über einen Dichtegradienten in den Fraktionen bestimmt

(Abb. 77). Wie bereits gezeigt (Abb. 46) kann nach Inkubation mit 10  $\mu\text{M}$  Doxorubicin Topoisomerase II in den DNA-haltigen Fraktionen detektiert werden (Abb. 46). Oenocyanine, sowie auch Mirtoselect, können die Menge an Topoisomerase II $\alpha$  und II $\beta$  in den DNA-haltigen Fraktionen in Konzentration von 10 und 30  $\mu\text{g/ml}$  konzentrationsabhängig reduzieren.

Die Bestimmung des DNA-Gehaltes der Fraktionen erwies sich als problematisch, da die stark gefärbten Extraktinhaltsstoffe die Absorptionsmessung (bei 260 nm) störten. Daher kann die gemessene Fluoreszenz in den DNA-haltigen Fraktionen nicht auf den DNA-Gehalt normalisiert werden. Es wurden jedoch immer gleiche Zellzahlen ausgestreut und die Viabilität der Zellen lag bei den gewählten Konzentrationen immer über 90 %, so dass von keinen großen Unterschieden in den DNA-Gehalten der Fraktionen der unterschiedlichen Gradienten ausgegangen werden kann.



**Abb. 77:** ICE-Bioassay: Bestimmung der DNA-gebundenen Topoisomerase II $\alpha/\beta$  nach Vorinkubation (30 min, serumfrei, 100 U/ml Katalase) mit DMSO, 10  $\mu\text{M}$  und 30  $\mu\text{M}$  Delphinidin und Koinkubation mit dem Topoisomerase-II-gift Doxorubicin (1  $\mu\text{M}$  und 10  $\mu\text{M}$ ) an HT29-Zellen, Abgebildet sind Beispielmembranen von mind. 3 Experimenten mit identischem Ergebnis.

Ab einer Konzentration von 10  $\mu\text{g/ml}$  Oenocyanine respektive Mirtoselect wird die Bindung der Topoisomerase an die DNA deutlich vermindert und die Doxorubicin-vermittelten DNA-

Schäden um etwa 70 % reduziert (Abb. 76). Die Bindung der Topoisomerase II an die DNA kann somit nicht komplett durch die Extrakte verhindert werden. Die in den Extrakten enthaltenen katalytischen Topoisomerasehemmstoffe können also die Stabilisierung des DNA-Topoisomerase-Komplexes durch die Topoisomerasegifte verringern aber in den getesteten Konzentrationen nicht komplett verhindern. Die Protektion vor topoisomerasegift-induzierten DNA-Strangbrüchen durch die Extrakte ist demnach zumindest zum Teil topoisomerasevermittelt. Andere DNA-protective Wirkungen können jedoch auch nicht ausgeschlossen werden. So kann auch eine antioxidative Wirkung für Oenocyanine beobachtet werden, da der Extrakt auch in der Lage ist die durch Doxorubicin entstandenen oxidativen Schäden zu reduzieren (Abb. 76). Möglich ist auch, dass neben den Topoisomerasen andere für die Replikation wichtige nukleare Enzyme, wie beispielsweise die Helicasen oder DNA-Polymerasen gehemmt werden.

Diese Ergebnisse zeigen, dass nicht nur die freien Aglyka wie Delphinidin, sondern auch komplexe anthocyanreiche Gemische wie Mirtoselect und Oenocyanine die strangbrechende Wirkung von Topoisomerasegiften modulieren können.

**Zusammenfassung und Diskussion – anthocyanreiche Extrakte**

In Tabelle 9 sind die Ergebnisse der Untersuchungen der biologischen Wirkungen von Mirtoselect und Oenocyanine zusammengefasst.

**Tab. 9:** Ergebnisse der Untersuchungen der biologischen Wirkungen von Mirtoselect und Oenocyanine

	<b>Oenocyanine</b>	<b>Mirtoselect</b>
<b>Bildung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in DMEM in Anwesenheit von HT29-Zellen, Inkubation: 500 µg/ml Extrakt</b>	Nach 15 min: 14,7 ± 4,0 µM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Nach 45 min: 12,9 ± 3,2 µM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Nach 15 min: 16,3 ± 0,2 µM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Nach 45 min: 5,6 ± 0,3 µM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
<b>Einfluss auf das Wachstum von HT29-Zellen</b>	<b>In Abwesenheit von Katalase:</b> IC <sub>50</sub> -Wert: 204,3 ± 8,6 µg/ml <b>In Anwesenheit von Katalase:</b> Kein signifikanter Einfluss bis 500 µg/ml	<b>In Abwesenheit von Katalase:</b> IC <sub>50</sub> -Wert: 176,9 ± 9,8 µg/ml <b>In Anwesenheit von Katalase:</b> Kein signifikanter Einfluss bis 500 µg/ml
<b>Hemmung der Aktivität von humanen Topoisomerasen im zellfreien System</b>	<b>Topo I:</b> ab 50 µg/ml <b>Topo IIα/β:</b> ab 5 µg/ml	<b>Topo I:</b> ab 50 µg/ml <b>Topo IIα/β:</b> ab 5 µg/ml
<b>Wirkung auf Topoisomerasen in HT29-Zellen</b>	keine Stabilisierung des DNA-Topoisomerase-IIα/β-Komplexes bis 100 µg/ml	keine Stabilisierung des DNA-Topoisomerase-IIα/β-Komplexes bis 100 µg/ml
<b>Beeinflussung der DNA-Integrität</b>	<b>EtBr-Verdrängung:</b> kein Effekt bis 100 µg/ml <b>H33258-Verdrängung:</b> kein Effekt bis 100 µg/ml	<b>EtBr-Verdrängung:</b> EC <sub>50</sub> -Wert: 63,4 ± 11,2 µg/ml <b>H33258-Verdrängung:</b> EC <sub>50</sub> -Wert: 64,7 ± 9,8 µg/ml
<b>Beeinflussung der Zellzyklusverteilung</b>	Tendenz zum Arrest in <b>G<sub>1</sub>-Phase</b> Kein Arrest in <b>G<sub>2</sub>/M-Phase</b> Anstieg der Zellzahl in <b>S-Phase</b>	Tendenz zum Arrest in <b>G<sub>1</sub>-Phase</b> Kein Arrest in <b>G<sub>2</sub>/M-Phase</b> Anstieg der Zellzahl in <b>S-Phase</b>
<b>Induktion von DNA-Strangbrüchen</b>	Keine Induktion von DNA-Strangbrüchen bis 50 µg/ml	Keine Induktion von DNA-Strangbrüchen bis 50 µg/ml
<b>Protektion vor Topoisomerasegift-induzierten DNA-Strangbrüchen</b>	<b>Cpt (100 µM):</b> Reduktion der DNA-Schäden um ca. 65 % <b>Dox (10 µM):</b> Reduktion der	<b>Cpt (100 µM):</b> Reduktion der DNA-Schäden um ca. 65 % <b>Dox (10 µM):</b> Reduktion der

## Ergebnisse und Diskussion

	DNA-Schäden um ca. 75 %	DNA-Schäden um ca. 75 %
<b>Verhinderung der Stabilisierung des Topo-II-DNA-Intermediats in HT29-Zellen</b>	Durch 10 und 30 µg/ml	Durch 10 und 30 µg/ml

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die beiden getesteten anthocyanreichen Extrakte unter Zellkulturbedingungen im Zellkulturmedium in Anwesenheit von HT29-Zellen Wasserstoffperoxid generieren. Das akkumulierte H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kann einen bedeutenden Einfluss auf die biologischen Wirkungen der Extrakte besitzen, wie anhand der Untersuchungen zur Beeinflussung des Zellwachstums deutlich wurde. Es konnte eine Verschiebung des wachstumshemmenden Potentials (ermittelt als IC<sub>50</sub>-Werte) der Extrakte von ca. 200 µg/ml Extrakt (ohne Katalasezusatz) zu Konzentrationen  $\geq$  500 µg/ml nach Dismutation des H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durch Katalasezusatz zum Inkubationsmedium bestimmt werden. Bei der Untersuchung der biologischen Wirkungen der beiden Extrakte an kultivierten Zellen sollte daher sichergegangen werden, dass nur die Wirkung des Extrakts und nicht die von entstandenem Wasserstoffperoxid gemessen werden. Dazu wird dem Medium 100 U/ml Katalase zugesetzt, so dass das entstandene H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> vollständig zu Wasser und Sauerstoff dismutiert wird.

Mirtoselect und Oenocyanine hemmen effektiv die Aktivität humaner Topoisomerasen I jeweils ab 50 µg/ml Extrakt und die Aktivität der Topoisomerase II ab einer Konzentration von 5 µg/ml Extrakt. Mirtoselect und Oenocyanine unterschieden sich nicht in der Beeinflussung humaner Topoisomerasen obwohl sie unterschiedliche Gehalte an verschiedenen Anthocyanen enthalten. Es konnte bereits gezeigt werden, dass einige Anthocyane (Cyanidin-3-glukosid, Delphinidin-3-rutinosid) in zellfreien Systemen die Aktivität humaner Topoisomerasen bis zu einer Konzentration von 100 µM nicht hemmen können (Roikaew 2003). Die Extrakte enthalten somit vermutlich Konzentrationen anderer, bisher nicht charakterisierter Substanzen, die die Aktivität der Topoisomerasen potent hemmen. Zu diesen Substanzen zählen vermutlich auch Procyanidine, die in Beerenfrüchten enthalten sind (Hellström et al. 2006). Für einige Vertreter dieser Substanzklasse konnte eine Aktivität als Hemmstoffe humaner Topoisomerasen beschrieben werden (Fridrich et al. 2007).

Die Wirkung von Oenocyanine und Mirtoselect auf die Aktivität von Topoisomerasen in HT29-Zellen wurde mittels ICE-Bioassays getestet. Bis zu einer Konzentration von 100 µg/ml können die Extraktinhaltsstoffe nicht das Topoisomerase-II-DNA-Intermediat in

HT29-Zellen stabilisieren. Für Einzelsubstanzen, wie das Anthocyanaglykon Delphinidin konnte bereits gezeigt werden, dass es die Topoisomeraseaktivität in zellfreien Systemen hemmt und im zellulären System nicht das Topoisomerase-DNA-Intermediat stabilisieren kann. Damit scheint Delphinidin auf zellulärer Ebene nicht als Topoisomerasegift zu wirken. Jedoch handelt es sich den eingesetzten Extrakten um komplexe Gemische, natürlich vorkommender glykosidischer Verbindungen, der Anthocyane und weiterer nicht identifizierter Polyphenole sowie anderer sekundärer Pflanzenstoffe. Der Beitrag der Anthocyane an der Hemmwirkung der Extrakte scheint gering. Diese Ergebnisse lassen mutmaßen, dass die anderen im Extrakte enthaltenen, bisher nicht identifizierten, Topoisomerase-hemmenden Substanzen in HT29-Zellen nicht als Topoisomerasegifte wirken. Möglich ist aber auch, dass die Topoisomerase-hemmenden Polyphenole nicht in den Zellkern gelangen und so die Enzyme gar nicht beeinflussen können.

Viele Polyphenole sind bisher als Hemmstoffe humaner Topoisomerasen beschrieben und wirken dabei überwiegend als Topoisomerasegifte. Jedoch wurden die meisten Untersuchungen an isolierten Topoisomerasen durchgeführt. Die Verifizierung dieser Ergebnisse in intakten Zellen steht meist noch aus. Die Wirkung der Extrakte auf humane Topoisomerasen sollte jedoch auch *in vivo* überprüft werden, da durch Metabolisierung der Polyphenole eine Vielzahl weiterer Verbindungen entstehen, die möglicherweise andere biologische Wirkungen aufweisen als die Ausgangssubstanzen.

Beide Extrakte enthalten Substanzen, die an die kleine Furche der DNA binden können und auch Substanzen, die zwischen die Basenpaare der DNA interkalieren. Mirtoselect enthält höhere Konzentrationen an in diesen Testsystemen aktiven Substanzen als Oenocyanine. Bisher konnten nur die Anthocyanidine als aktiv in diesen Testsystemen beschrieben werden (Habermeyer et al. 2005). Andere Flavonoide, wie Quercetin, Epigallocatechin-3-gallat oder Genistein zeigen kein interkalierendes Potential in diesen Testsystemen. Eine planare Struktur ist die Voraussetzung zur Fähigkeit einer Substanz zwischen die Basenpaare der DNA zu interkalieren. Ellagsäure, die in vielen Früchten enthalten ist erfüllt diese Voraussetzung ist bereits als potentes Interkalanz beschrieben (Teel 1986, Thulstrup et al. 1999). Die Interkalation kann zur Topoisomerasehemmung beitragen (Brana et al. 2001). Die gezeigten Interaktionen der Extraktinhaltsstoffe mit der DNA sind jedoch aufgrund von doch recht hohen Konzentrationen ( $\geq 50 \mu\text{g/ml}$ ) nicht allein verantwortlich für die potente Hemmung der Aktivität von Topoisomerase I sowie Topoisomerase II ( $\geq 5 \mu\text{g/ml}$ ).

Bis zu einer Konzentration von  $50 \mu\text{g/ml}$  kann weder Mirtoselect noch Oenocyanine DNA-Strangbrüche oder oxidative DNA-Schäden verursachen. Es kann auch kein Zellzyklusarrest

in der G<sub>2</sub>/M-Phase bis zu einer Extraktkonzentration von 250 µg/ml detektiert werden. In intakten Zellen konnte demnach kein Effekt der Extrakte auf die DNA-Integrität beobachtet werden.

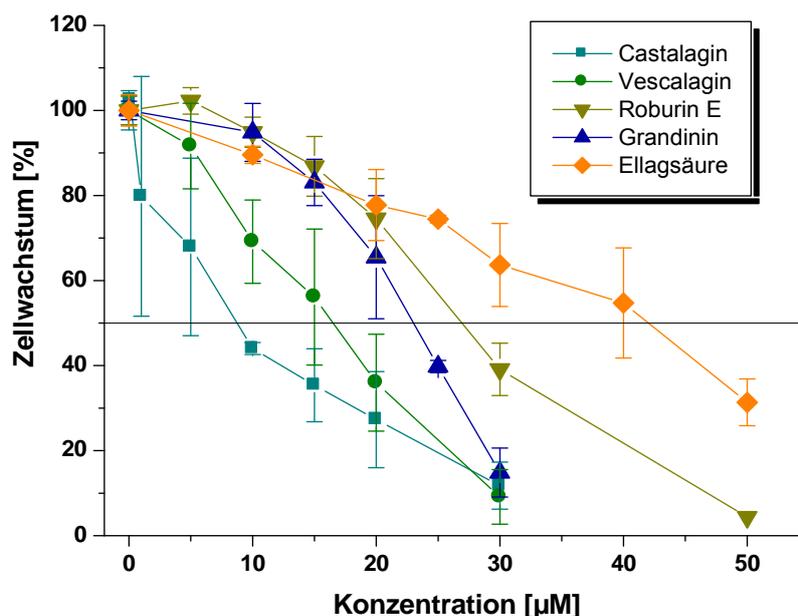
Die Inhaltsstoffe der beiden polyphenolreichen Extrakte können, vergleichbar mit der Wirkung der Einzelsubstanz Delphinidin, die Konzentration an durch Topoisomerasegifte stabilisierten DNA-Enzymkomplexen verringern und die strangbrechende Wirkung von Topoisomerasegiften (Camptothecin, Doxorubicin) modulieren. Verglichen mit Delphinidin wirken die Extrakte potenter als die Einzelsubstanz.

### **Einfluss von Ellagtanninen und Ellagsäure auf das Wachstum von HT29-Zellen, die DNA-Integrität und die Aktivität humaner Topoisomerasen**

Eine weitere Gruppe von Polyphenolen, Ellagtannine kommen ebenfalls in Beeren vor. Der Einfluss der Ellagtannine Castalagin, Vescalagin, Roburin E und Grandinin auf die Wirkung humaner Topoisomerasen und die DNA-Integrität soll ebenfalls getestet werden. Ellagtannine kommen außer in einigen Beeren und auch in Getränken, die in Eichenholzfässern gelagert werden, wie Whiskey oder Rotwein, vor. Daher wird auch ein Eichenholzextrakt getestet, der durch Extraktion mit Ethanol aus dem Holz der amerikanischen Eiche (*Quercus alba*) extrahiert wurde. Das Hydrolyseprodukt der Ellagtannine, die Ellagsäure wird ebenfalls in die Untersuchung einbezogen.

### **Einfluss der Ellagtannine und der Ellagsäure auf das Wachstum von HT29-Zellen**

Der Einfluss der Ellagtannine, der Ellagsäure und des Eichenholzextrakts auf das Wachstum von Kolonkarzinomzellen wurde mit dem Sulforhodamin B-Test untersucht. Nach Blindwertkorrektur kann die Fluoreszenz der Proben in Bezug zur Kontrolle gesetzt werden (% T/C).



**Abb. 77:** Einfluss der Ellagtannine und der Ellagsäure auf das Wachstum von HT29-Zellen (SRB-Test). Inkubation für 72 h (1 % DMSO, 10 % FKS, ohne Katalasezusatz). Abgebildet sind die Mittelwerte  $\pm$  Stabw., n = 3-5 in einer Vierfachbestimmung

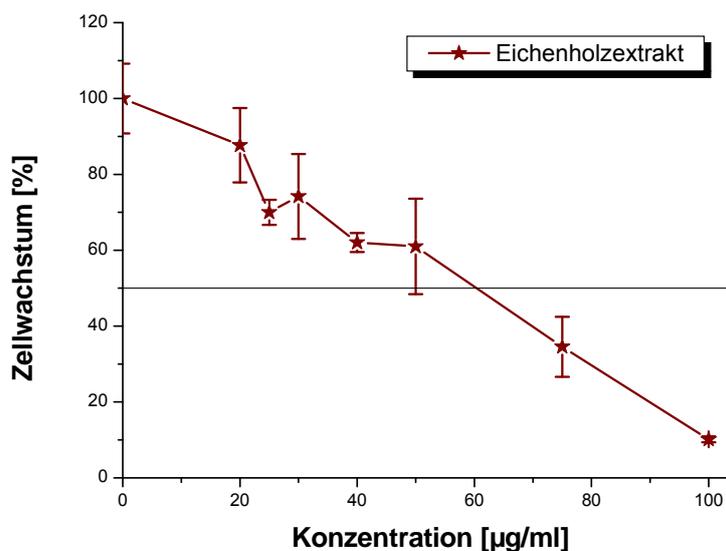
Alle getesteten Ellagtannine sowie die Ellagsäure hemmen potent das Wachstum der humanen Kolonkarzinomzelllinie HT29 hemmen mit  $IC_{50}$ -Werten im niedrig mikromolaren Bereich (Abb. 77, Tab. 10). Castalagin erwies sich als potentestes wachstumshemmendes Ellagtannin, gefolgt von seinem Stereoisomer Vescalagin und den glykosylierten Ellagtanninen Grandinin und Roburin E. Die Stereoisomerie und die Substitution an der Position 1 des Zuckers haben demnach einen Einfluss auf die Wirkqualität der Substanzen. Im Vergleich zu den Tanninen ist ihr Hydrolyseprodukt mit einem  $IC_{50}$ -Wert von  $39,8 \pm 5,7 \mu M$  weniger effektiv.

**Tab. 10:** Einfluss der Ellagtannine und Ellagsäure auf das Wachstum von HT29-Zellen:  $IC_{50}$ -Werte, die anhand der Graphen (Abb. 70) bestimmt wurden

Substanz	$IC_{50}$ -Wert [ $\mu M$ ]
Castalagin	$10,1 \pm 2,4$
Vescalagin	$16,7 \pm 1,4$
Roburin E	$27,1 \pm 3,9$
Grandinin	$22,7 \pm 1,9$

Ellagsäure	$39,8 \pm 5,7$
------------	----------------

Ein komplexes Gemisch aus Ellagtanninen und weiteren Gerbstoffen, der in dieser Arbeit untersuchte Eichenholzextrakt, hemmt ebenfalls das Wachstum der Kolonkarzinomzelllinie HT29 (Abb. 78).



**Abb. 78:** Einfluss des Eichenholzextrakts auf das Wachstum von (HT29-Zellen). Inkubation für 72 h (1 % DMSO, 10 % FKS). Abgebildet sind die Mittelwerte  $\pm$  Stabw.,  $n = 3-5$  in einer Vierfachbestimmung

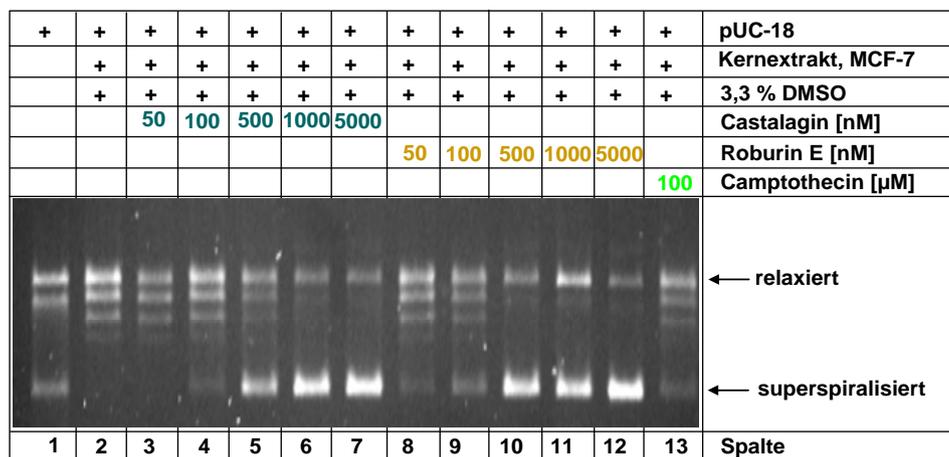
Dabei liegt der ermittelte  $IC_{50}$ -Wert des Extrakts für die Wachstumshemmung bei  $60,47 \pm 2,28 \mu\text{g/ml}$ . Unter der Annahme, dass der Extrakt nur Castalagin enthielte müsste das Zellwachstum durch  $9,8 \mu\text{g/ml}$  Eichenholzextrakt auf 50 % gehemmt sein. Der ermittelte  $IC_{50}$ -Wert des Extrakts liegt somit deutlich höher als der für das Ellagtannin Castalagin ermittelte Wert. Der Extrakt muss weitere weniger wachstumshemmende Substanzen enthalten oder die Wirkungen der Ellagtannine müssen sich gegenseitig aufheben. Solche möglichen inhibitorischen Effekte oder aber additive oder synergistische Wirkungen könnten in weiterführenden Arbeiten mit bekannten Ellagtanninmischungen untersucht werden.

## Beeinflussung humaner Topoisomerasen durch die Ellagtannine

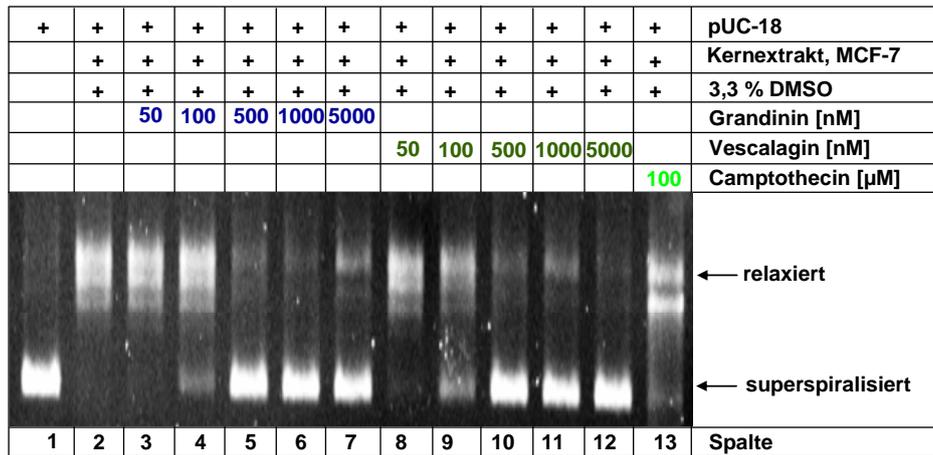
### Topoisomerase I

Die Wirkung der Ellagtannine auf die Aktivität humaner Topoisomerasen wird in zellfreien Testsystemen bestimmt. Im Relaxationsassay kann der Einfluss der Verbindungen auf die Aktivität der Topoisomerase I getestet werden. Als Positivkontrolle wurde das Topoisomerasegift Camptothecin in einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  eingesetzt.

Der Einfluss der Ellagtannine Castalagin, Vescalagin, Roburin E und Grandinin auf die Aktivität der humanen Topoisomerase I ist durch repräsentative Gele in Abbildung 79 und 80 gezeigt.



**Abb. 79:** Hemmung der katalytischen Topoisomerase I-Aktivität durch Castalagin (Spalten 3 - 7) und Roburin E (Spalten 8 - 12), untersucht im Relaxationsassay. Nach Inkubation der superspiralisierten pUC18-DNA mit dem Kernextrakt und dem Lösungsmittel DMSO wird die DNA relaxiert (Spalte 2), als Positivkontrolle dient 100  $\mu\text{M}$  Camptothecin (Spalte 13), abgebildet ist ein repräsentatives Gel aus drei identischen Experimenten mit vergleichbaren Ergebnissen



**Abb. 80:** Hemmung der katalytischen Topoisomerase I-Aktivität durch Grandinin (Spalten 3 - 7) und Vescalagin (Spalten 8 - 12), untersucht im Relaxationsassay. Nach Inkubation der superspiralisierten pUC18-DNA mit dem Kernextrakt und dem Lösungsmittel DMSO wird die DNA relaxiert (Spalte 2), als Positivkontrolle dient 100 µM Camptothecin (Spalte 13), abgebildet ist ein repräsentatives Gel aus drei identischen Experimenten mit vergleichbaren Ergebnissen

Schon ab einer Konzentration von 100 nM Castalagin (Abb. 79, Spalte 4), Roburin E (Abb. 79, Spalte 9), Grandinin (Abb. 80, Spalte 4) und Vescalagin (Abb. 80, Spalte 9) wird die Aktivität der Topoisomerase I gehemmt und ab 500 nM können alle getesteten Ellagttannine die Enzymaktivität vollständig inhibieren.

Die Stereoisomerie und auch die glykosidische Substitution mit den Zuckern an der Position 1 des Zuckergerüsts der Ellagttannine haben keinen Einfluss auf die Hemmung der Topoisomerase I-Aktivität.

## Topoisomerase II

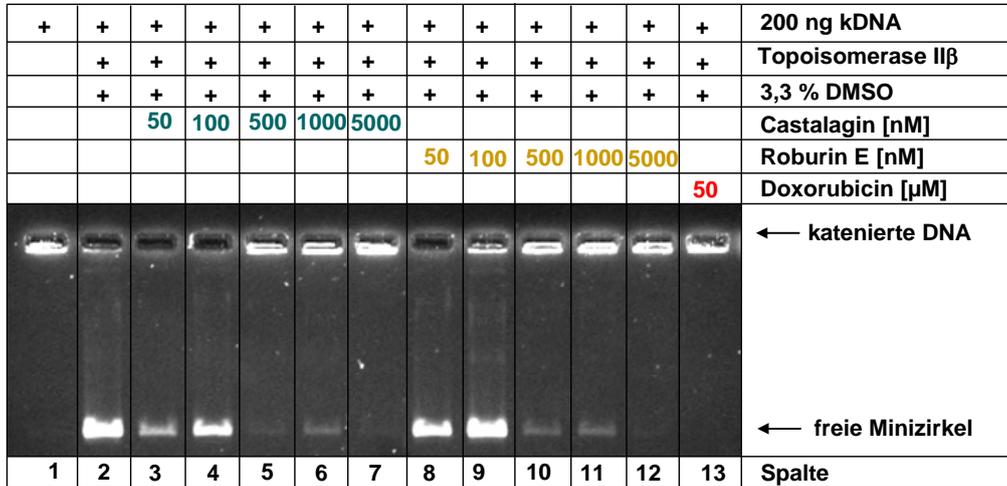
Die Modulation der Topoisomerase II-Aktivität wird im Dekatenierungsassay bestimmt. Als Positivkontrolle dient in diesem Test 50 µM Doxorubicin.

Der Einfluss der Ellagttannine auf die Aktivität der Topoisomerase II $\alpha$  ist in Abbildung 74 dargestellt. Die einzelnen DNA-Formen (katenierte kDNA und freie Minizirkel) werden gelelektrophoretisch von einander getrennt. Die katenierte kDNA ist zu groß um in das Agarosegel einzudringen und verbleibt in der Geltasche (Abb. 81, Spalte 1). Durch Inkubation mit humaner Topoisomerase II $\alpha$  werden die Minizirkel frei und wandern während der Elektrophorese in das Gel (Spalte 2).

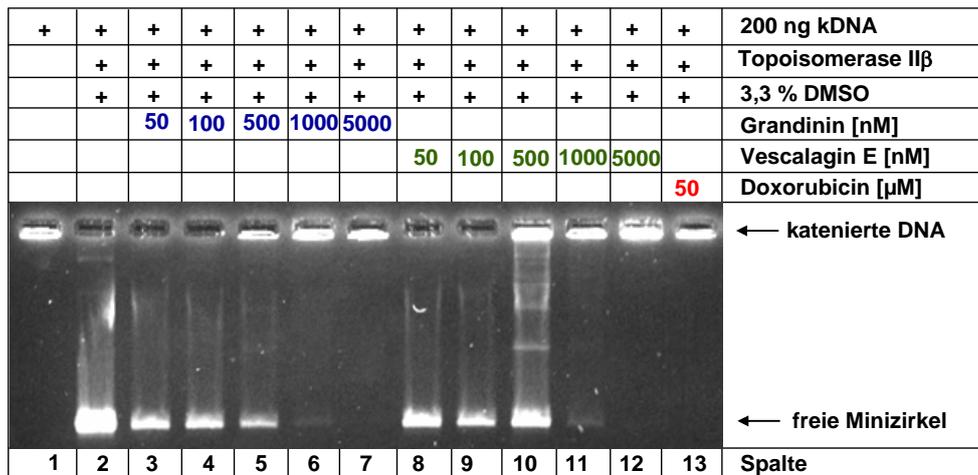


In Abbildung 82 sind die Untersuchungen zur Hemmung der Topoisomerase II $\beta$  durch die Ellagantanine auf zwei repräsentativen Gelen gezeigt.

**A**



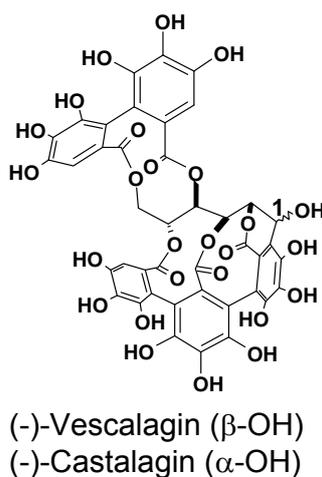
**B**



**Abb. 82:** Hemmung der katalytischen Aktivität von Topoisomerase II $\beta$  durch (A) Castalagin (Spalten 3 - 7) und Roburin E (Spalten 8 - 12), (B) Grandinin (Spalten 3 - 7) und Vescalagin (Spalten 8 - 12), untersucht mittels Dekatenierungsassays. Nach Inkubation der kDNA mit Topoisomerase II $\beta$  und dem Lösungsmittel DMSO wird das katenierte Netzwerk vollständig in die einzelnen Minizirkel getrennt (Spalte 2), als Positivkontrolle dient 50  $\mu$ M Doxorubicin (Spalte 13), abgebildet ist ein repräsentatives Gel aus drei identischen Experimenten mit vergleichbaren Ergebnissen

Castalagin hemmt ab einer Konzentration von 500 nM die Aktivität von der Topoisomerase II $\beta$  vollständig (Abb. 82A, Spalte 5). Durch 100 nM Roburin E kann dieses Isoenzym bereits teilweise gehemmt werden (A, Spalte 9). Die vollständige Hemmung der Enzymaktivität ist

ab einer Konzentration von 500 nM Roburin E erreicht (A, Spalte 10). Grandinin und Vescalagin hingegen hemmen bei einer eingesetzten Konzentration von 500 nM die Topoisomerase-II $\beta$ -Aktivität nur zum Teil und erst ab jeweils 1  $\mu\text{g/ml}$  eingesetztem Ellagatannin vollständig (Abb. 82B). Bei der Hemmung des  $\beta$ -Isoenzym zeigt sich im Gegensatz zur Hemmung der Topoisomerase I und II $\alpha$  ein leichter Einfluss der Stereoisomerie (Abb. 83) und der Substitution an Position 1 des Zuckers auf die Enzymhemmung. Castalagin wirkt etwas potenter als die Vescalagin.



**Abb. 83:** Strukturen von Castalagin und Vescalagin

Kashiwada et al. zeigten mit dieser Arbeit vergleichbare Ergebnisse zur Topoisomerasehemmung durch Ellagatannine. Die Gruppe bestimmte  $\text{IC}_{50}$ -Werte von 200 – 500 nM für die Topoisomerase II-Hemmung durch Vescalagin, Castalagin und andere Ellagatannine im zellfreien System (Kashiwada et al. 1993). Auch ein Reaktionsprodukt von Vescalagin und Catechin, das Acutissimin, welches in Rotwein identifiziert werden konnte, wirkt 250fach potenter als das bekannte Topoisomerase-II-Gift Etoposid. Des Weiteren zeigte die Gruppe um Quideau eine effektive Hemmung der Topoisomerase II ab 1  $\mu\text{M}$  Vescalagin bzw. Castalagin (Quideau et al. 2005).

Ellagatannine stellen bezüglich der Topoisomerase II-Hemmung eine hochpotente Substanzklasse dar, was durch den Vergleich mit anderen sekundären Pflanzenstoffen deutlich wird. Castalagin und Roburin E wirken potenter als die bisher effektivsten Polyphenole in diesem Testsystem, die Procyanidine C1 und A2 (1  $\mu\text{M}$ ), sowie das Grüntee catechin Epigallocatechin-3-gallat (1  $\mu\text{M}$ ) (Fridrich et al. 2007, Fritz 2004). Alle getesteten Ellagatannine hemmen die Topoisomerase-II $\beta$ -Aktivität in bedeutend niedrigeren

Konzentrationen als die Anthocyanidine Delphinidin und Cyanidin (Habermeyer et al. 2005). Auch das komplexe Gemisch an Ellagttanninen und weiteren nicht charakterisierten Polyphenolen, der Eichenholzextrakt weist eine potente Hemmung der Topoisomeraseaktivität auf (Daten nicht gezeigt). Da die Ellagttannine aufgrund ihrer Wirkungsweise als Gerbstoffe unspezifisch eine Vielzahl von Enzymaktivitäten im isolierten Zellsystem durch Bindung hemmen, bedarf es weiterführender Untersuchungen in zellulären Testsystemen, zur Bestimmung des Wirkmechanismus.

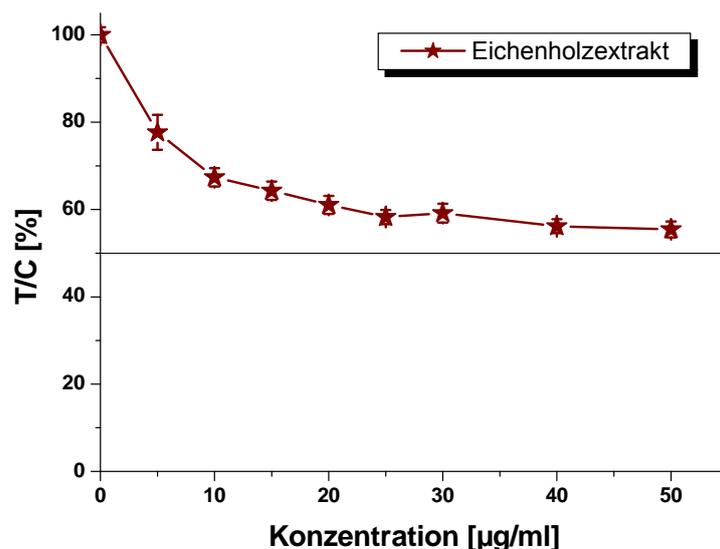
### **Beeinflussung der DNA-Integrität**

Viele Topoisomerasehemmstoffe wirken als Interkalatoren oder können an die kleine Furche der DNA binden. Die Fähigkeit der Ellagttannine mit der DNA zu interagieren wird mit Hilfe von Verdrängungstest durchgeführt.

### **Interkalation**

Mittels Ethidiumbromidverdrängungstest wird überprüft, ob die Substanz das Interkalanz aus der DNA verdrängen kann. Die Untersuchung zur Kompetition der Ellagttannine und des Eichenholzextrakts mit dem Fluoreszenzfarbstoff EtBr sind in Abbildung 84 dargestellt. Die Ellagttannine Castalagin, Vescalagin, Roburin E und Grandinin können bis zu einer Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  Ellagttannin Ethidiumbromid nicht aus der DNA verdrängen (Daten nicht gezeigt). Es kann also ausgeschlossen werden, dass die potente Hemmung der Topoisomerasen durch die Tannine auf interkalative Effekte zurückzuführen ist. Aufgrund ihrer unplanaren Struktur sind die Ellagttannine vermutlich nicht in der Lage zwischen die DNA-Basen zu interkalieren.

Da der Eichenholzextrakt neben den Ellagttanninen auch andere Substanzen enthält, die möglicherweise zwischen die Basenpaare der DNA interkalieren können wird auch die Modulation der Interkalation von EtBr durch den Extrakt bestimmt (Abb. 84).



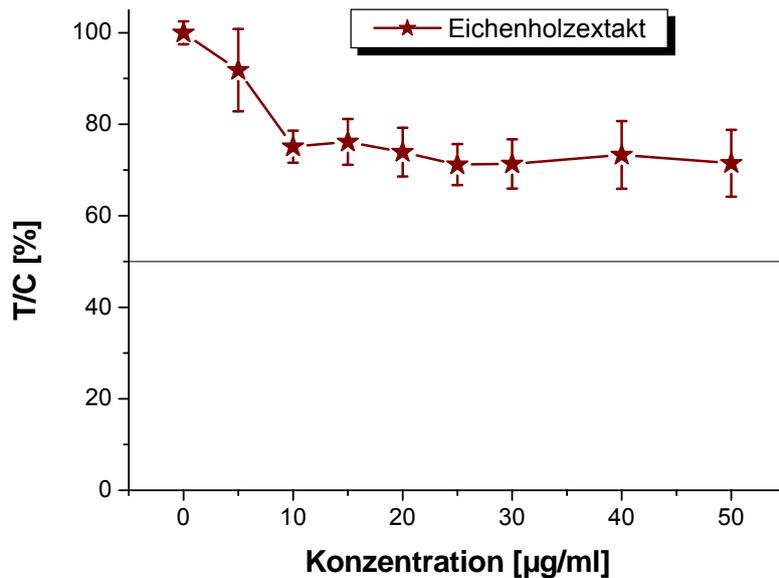
**Abb. 84:** EtBr-Verdrängungstest mit Kalbsthymus-DNA zur Bestimmung der Konkurrenz des Eichenholzextrakts mit dem Interkalator Ethidiumbromid. Die Absorption nach Inkubation mit den Extrakten wird als Prozent der DMSO-Kontrolle (T/C [%]) angegeben. Abgebildet sind die Mittelwerte  $\pm$  Stabw., n = 3-5

Der Eichenholzextrakt enthält Substanzen, die Ethidiumbromid aus der DNA verdrängen können. Es kann jedoch bis zu einer Konzentration von 50 µg/ml kein  $EC_{50}$ -Wert ermittelt werden. Ab einer Konzentration von 25 µg/ml eingesetztem Extrakt wird ein Plateau erreicht.

### Bindung an die kleine Furche der DNA

Mittels Hoechst-Verdrängungsassay kann geprüft werden, ob die Ellagtannine den Fluoreszenzfarbstoff Hoechst H33258 von der kleinen Furche der DNA verdrängen und so mit der DNA interagieren. Dazu wird die Kalbsthymus-DNA mit dem Farbstoff und den Substanzen inkubiert und die Fluoreszenz im Vergleich zur DMSO-Kontrolle bestimmt.

Abbildung 85 zeigt die Ergebnisse des Hoechstkompetitionstests der Ellagtannine (Daten nicht gezeigt) und des Eichenholzextrakts. Über den gemessenen Konzentrationsbereich von 1 µM bis 50 µM kann keine Fluoreszenzminderung durch die getesteten Ellagtannine bewirkt werden. Castalagin, Vescalagin, Grandinin und Roburin E können bis zu einer maximal eingesetzten Konzentration von 50 µM den Farbstoff H33258 nicht von der kleinen Furche der DNA verdrängen.



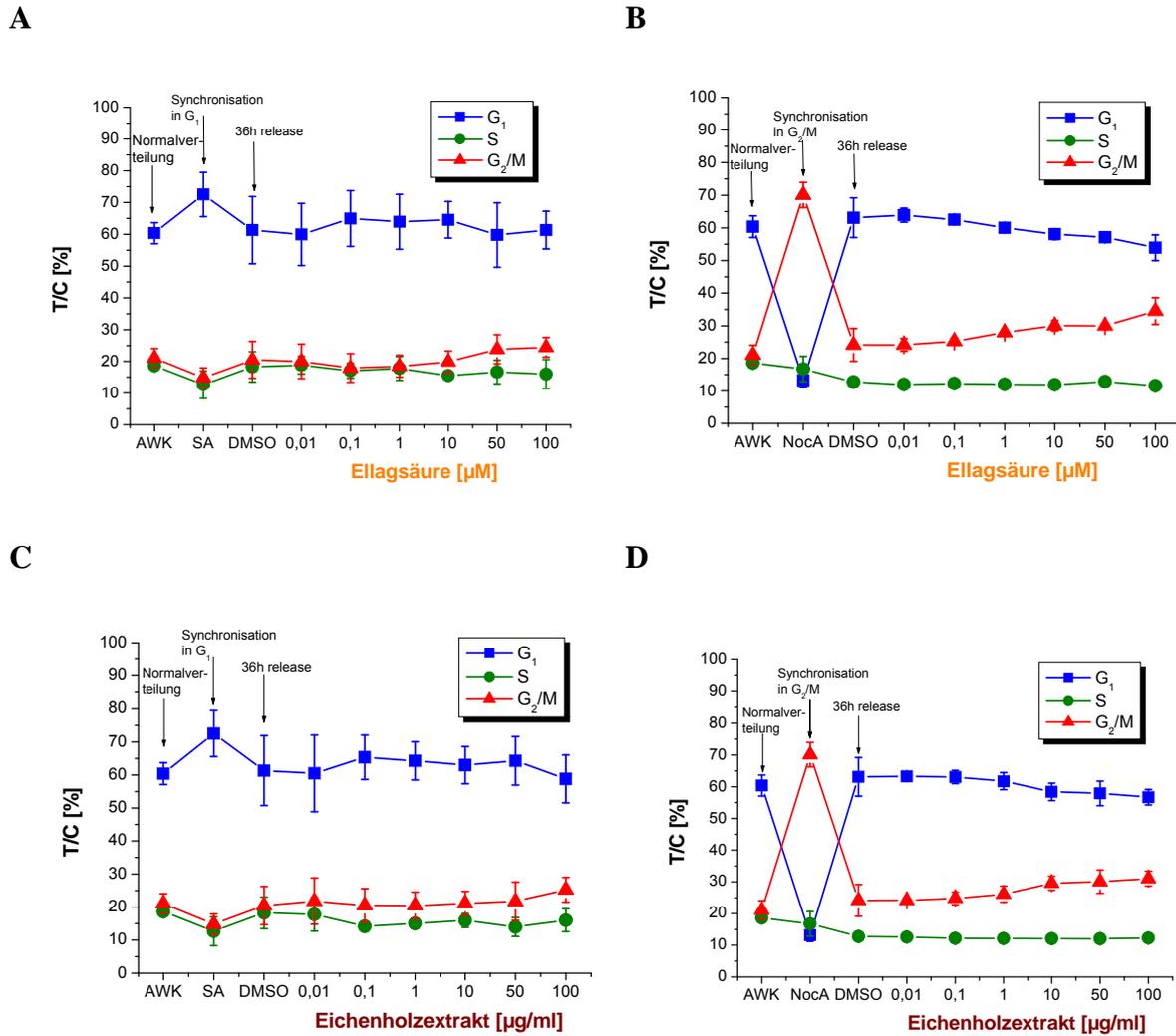
**Abb. 85:** H33258-Verdrängungstest mit Kalbsthymus-DNA zur Bestimmung der Konkurrenz der Ellagttannine (A) und des Eichenholzextrakts (B) mit dem „minor groove binder“ H33258. Die Absorption nach Inkubation mit den Extrakten wird als Prozent der DMSO-Kontrolle (T/C [%]) angeben. Abgebildet sind die Mittelwerte  $\pm$  Stabw., n = 3-5

Durch Inkubation der DNA mit dem Eichenholzextrakt kann eine Fluoreszenzreduktion gemessen werden. Bis zu einer maximal eingesetzten Konzentration von 50  $\mu\text{g/ml}$  wird jedoch keine Reduktion auf 50 % im Vergleich zur Kontrolle erreicht. Ähnlich zu den Ergebnissen der interkalativen Effekte des Eichenholzextrakts (Abb. 77) kann auch in diesem Test erkannt werden, dass der Eichenholzextrakt eine gewisse Menge an aktiven Substanzen enthält. Ab einer Konzentration von 15  $\mu\text{g/ml}$  wird jedoch die maximale Wirkung erreicht, die sich auch in hohen Konzentrationen nicht mehr verändert.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass der Eichenholzextrakt in geringen Konzentrationen Substanzen enthält, welche die DNA-Integrität durch Bindung an die kleine Furche der DNA oder Interkalation gefährden kann. Die getesteten Ellagttannine spielen dabei jedoch keine Rolle, da sie weder Ethidiumbromid aus den Basen der DNA noch den Farbstoff Hoechst H33258 von der kleinen Furche der DNA verdrängen können. Der Extrakt enthält demnach weitere Substanzen, die diesen Effekt hervorrufen. Möglicherweise ist die Ellagsäure für die gefundenen Effekte verantwortlich, da sie an die DNA binden und auch interkalieren kann (Teel 1986, Thulstrup et al. 1999).

**Zellzyklusverteilung**

Der Einfluss der Ellagsäure und des Eichenholzextrakts auf die Verteilung der Zellen über die Zellzyklusphasen wird untersucht. Die Zellzyklusverteilung wird durchflusszytometrisch bestimmt (Abb. 86). Aufgrund der begrenzten Menge an vorhandenen Ellagtanninen konnten diese Substanzen nicht in die Testung mit einbezogen werden.



**Abb. 86:** Zellzyklusverteilung von 50.000 HT29-Zellen nach Synchronisation in der G<sub>1</sub>-Phase des Zellzyklus und anschließender Inkubation mit (A) Ellagsäure (36 h, 10 % FKS) und (C) Eichenholzextrakt bzw. nach Synchronisation in der G<sub>2</sub>/M-Phase und anschließender Inkubation (36 h, 10 % FKS) mit (B) Ellagsäure und (D) Eichenholzextrakt. Abgebildet sind die Mittelwerte ± Stabw. n = 3-4;

Die HT29-Zellen wurden hierzu zuerst in einer bestimmten Phase synchronisiert um auszuschließen, dass sich ein möglicher Effekt durch Beeinflussung der G<sub>1</sub>-Phase als auch der G<sub>2</sub>/M-Phase aufhebt. Durch 24-stündige Serumdepletion werden die Zellen in der G<sub>1</sub>-Phase

arretiert und durch Inkubation mit Nocodazol (16 h, 40  $\mu$ M) in der G<sub>2</sub>/M-Phase arretiert. Anschließend folgt die 36-stündige Inkubation (10 % FKS) mit DMSO (1 %) bzw. mit den Testsubstanzen. Die HT29-Zellen verteilen sich über die Phasen des Zellzyklus normalerweise wie folgt (Abb. 79): 60 % in der G<sub>1</sub>-Phase, 19 % in der S-Phase und 21 % in der G<sub>2</sub>/M-Phase. Nach Synchronisation in der G<sub>1</sub>-Phase befinden sich 72,5 % in der G<sub>1</sub>-Phase, 12,5 % in der S-Phase und 15 % G<sub>2</sub>/M-Phase. Nach Inkubation mit DMSO ist die Normalverteilung wieder erreicht. Abbildung 78 zeigt die Effekte der Ellagsäure (A und B) und des Eichenholzextrakts (C und D) auf die Zellzyklusverteilung von HT29-Zellen nach Synchronisation in der G<sub>1</sub>- (A und C) bzw. G<sub>2</sub>/M-Phase (B und D).

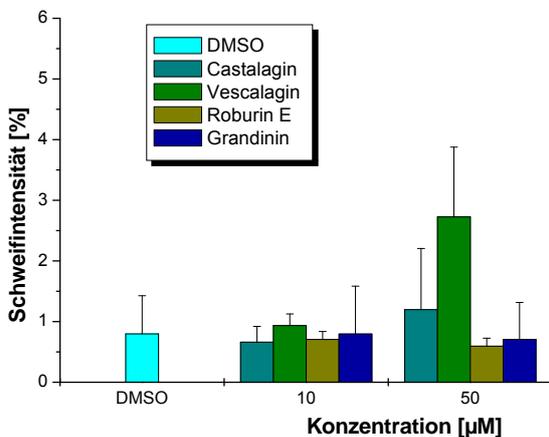
Ellagsäure und der Eichenholzextrakt können die Zellen nicht in der G<sub>1</sub>-Phase arretieren. Dies steht im Widerspruch zu Ergebnissen, die die Gruppe um Narayanan in CaSki-Zellen (epitheliale Zellen einer Cervix Karzinommetastase) bestimmen konnten. Die Arbeitsgruppe zeigten konnte einen Arrest der Zellen in der G<sub>1</sub>-Phase nach 24- und 48-stündiger Inkubation mit 10  $\mu$ M Ellagsäure. Nach 72 Stunden konnte auch ein für Apoptose typischer Sub-G<sub>1</sub>-Peak detektiert werden (Narayanan et al. 1999). Die Untersuchung der Arretierung in der G<sub>1</sub>-Phase erwies sich als äußerst schwierig, da sich auch in der Normalverteilung sehr viele Zellen in der G<sub>1</sub>-Phase des Zellzyklus befinden und eine Synchronisation durch Serumreduktion zu einem nicht signifikanten Anstieg an Zellen in dieser Zellzyklusphase führte. Somit ist es auch schwierig eine Aussage über die Arretierung der Zellen in der G<sub>1</sub>-Phase durch eine Substanz zu machen. Außerdem ist es möglich, dass der beobachtet Arrest der CaSki-Zellen über zelluläre Mechanismen verursacht wird, die bei der Proliferation der HT29-Zellen weniger von Bedeutung sind. Arbeiten in unserem Arbeitskreis zeigten, dass die Ellagtannine und die Ellagsäure die Aktivität der Proteintyrosinkinase des isolierten EGFR potent hemmen. Jedoch modulieren nur Castalagin und Grandinin und nicht das Hydrolyseprodukt die Ellagsäure den Phosphorylierungsstatus des EGFR in HT29-Zellen (Fridrich et al. 2008, angenommen). Diese Ergebnisse würden für einen Arrest in der G<sub>1</sub>-Phase nach Inkubation mit Ellagtanninen und auch ellagtanninreichen Eichenholzextrakt sprechen, was aber nicht bestätigt werden konnte. Die geringe Wirkqualität der Ellagsäure auf Elemente der MAPK-Kaskade (Fridrich et al. 2008, angenommen) steht im Einklang mit den Ergebnissen der Zellzyklusuntersuchung. Wird davon ausgegangen, dass der Eichenholzextrakt aus 100 % Castalagin besteht entsprechen 100  $\mu$ g/ml Eichenholzextrakte ca. 16  $\mu$ M Castalagin. In dieser Konzentration ist die Aktivität des EGFR in HT29-Zellen um über 50 % reduziert, was dafür spricht, dass der Eichenholzextrakt Substanzen erhält, die die Wirkung auf Elemente Proliferations-assoziierte Signalkaskaden aufhebt bzw. mindert.

Nach Synchronisation der Zellen in der G<sub>2</sub>/M-Phase verteilen sich die Zellen über die Phasen wie folgt: 13 % in der G<sub>1</sub>-Phase, 17 % S-Phase und 70 % G<sub>2</sub>/M-Phase. Durch 36-stündige Inkubation mit DMSO wird die Normalverteilung wieder annähernd erreicht. Die Ellagsäure kann konzentrationsabhängig die Zellen leicht in der G<sub>2</sub>/M-Phase arretieren. Der Effekt ist jedoch nicht signifikant. Ein noch schwächerer Effekt kann durch den Eichenholzextrakt beobachtet werden. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die Topoisomerase-hemmende Wirkung der Ellagsäure und der Ellagtannine auf zellulärer Ebene eine marginale Rolle spielt.

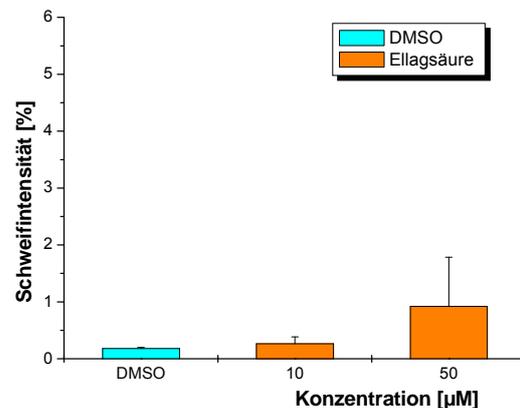
### Induktion von DNA-Strangbrüchen

Die Ellagtannine und ihr Hydrolyseprodukt Ellagsäure zeigen nur einen marginalen Einfluss auf die Zellzyklusverteilung. Deshalb wird in einem weiteren Testsystem, dem Cometassay getestet, ob die Substanzen in der Lage sind DNA-Strangbrüche zu induzieren und so möglicherweise die gezeigte hoch potente Wirkung der Ellagtannine auf die Aktivität isolierter Topoisomerasen auch in der intakten Zelle zum Tragen kommt (Abb. 87).

**A**



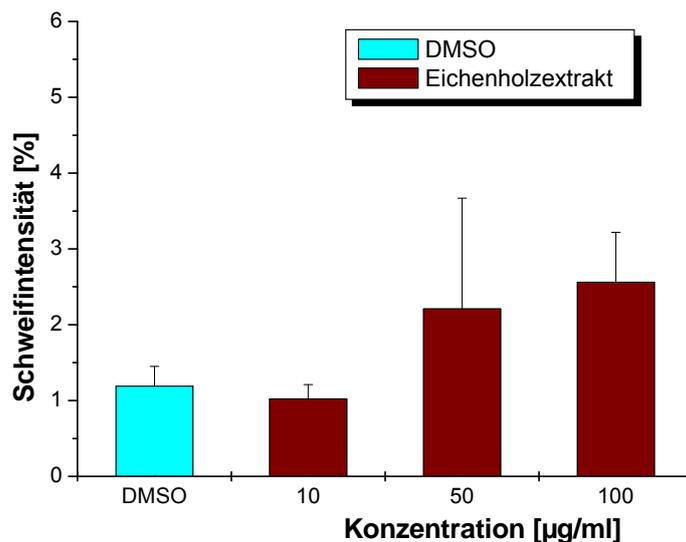
**B**



**Abb. 87:** Cometassay: Induktion von DNA-Strangbrüchen und oxidativen DNA-Schäden durch (A) die Ellagtannine und (B) die Ellagsäure. Inkubation von HT29-Zellen unterschiedlichen Substanzkonzentrationen (1 % DMSO, 1 h, serumfrei). Abgebildet sind die Mittelwerte ± Stabw.

Die Zellen wurden für eine Stunde serumfrei mit den Substanzen inkubiert und ein alkalischer Cometassay durchgeführt. Bis zu einer Konzentration von 50 µM können Castalagin, Roburin E und Grandinin keine DNA-Strangbrüche in HT29-Zellen induzieren (Abb. 87A). Einen

marginalen Anstieg an Schweifintensität im Vergleich zur Kontrolle kann nach Inkubation mit 50  $\mu\text{M}$  Vescalagin beobachtet werden. Mit einer Schweifintensität von 2,7 % ist jedoch nur eine geringe Menge an DNA geschädigt. Auch das Hydrolyseprodukt der Ellagtannine, die Ellagsäure kann bis zu einer Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  keine DNA-Strangbrüche im DNA-Rückgrat der HT29-Zellen induzieren (Abb. 87B).

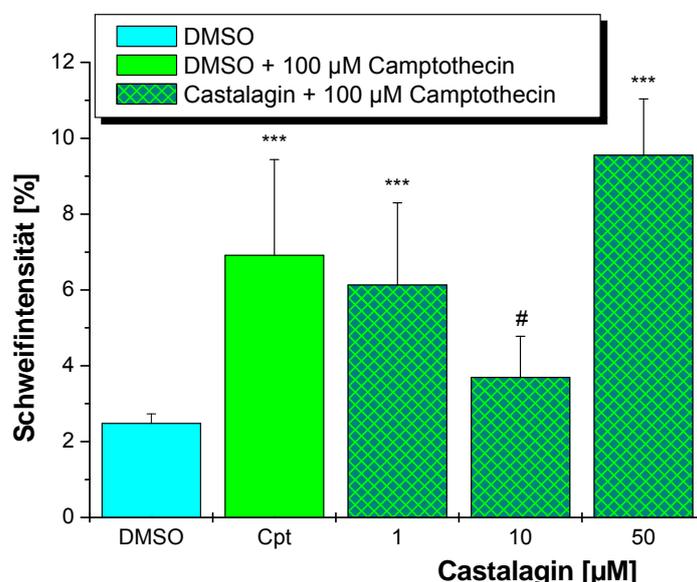


**Abb. 88:** Cometassay: Induktion von DNA-Strangbrüchen und oxidativen DNA-Schäden durch den Eichenholzextrakt. Inkubation von HT29-Zellen unterschiedlichen Extraktkonzentrationen (1 % DMSO, 1 h, serumfrei). Abgebildet sind die Mittelwerte  $\pm$  Stabw.

Auch die Induktion von DNA-Strangbrüchen durch das komplexe Gemisch an Ellagtanninen, der Eichenholzextrakt wurde getestet (Abb. 88). Bis zu einer Konzentration von 50  $\mu\text{g/ml}$  kann keine signifikante Erhöhung der Strangbruchrate beobachtet werden und die Schweifintensität von 2,56 %, die nach Inkubation mit 100  $\mu\text{g/ml}$  gemessen werden ist nur gering.

## Protektion der DNA vor Topoisomerasegift-vermittelten Strangbrüchen durch Ellagtannine

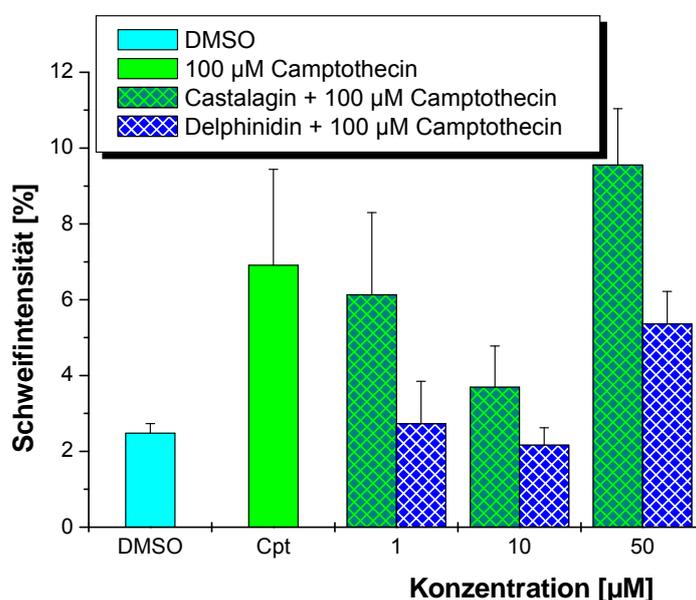
Die Tannine und die Ellagsäure können weder als Einzelsubstanzen, noch als komplexes Gemisch in Form eines Eichenholzextrakts DNA-Schäden in HT29-Zellen verursachen. Im Zusammenhang mit den Ergebnissen an isolierten Topoisomerasen scheinen die Ellagtannine in HT29-Zellen nicht als Topoisomerasegifte zu wirken. In weiterführenden Versuchen soll nun getestet werden, ob Ellagtannine, exemplarisch gezeigt an Castalagin, die DNA-strangbrechende Wirkung von Camptothecin modulieren und somit wie die Anthocyanidine als rein katalytischer Topoisomerasehemmstoffe wirken.



**Abb. 89:** Modulation der strangbrechenden Wirkung von Camptothecin durch Castalagin, gemessen mittels Cometassay. 30 min Vorinkubation mit den entsprechenden Konzentrationen an Castalagin und anschließend 1 h Koinkubation mit 100 µM Camptothecin (serumfrei, 0,2 % DMSO). Bestimmt wurde die Schweifintensität, Abgebildet sind die Mittelwerte  $\pm$  Stabw.,  $n = 3 - 4$ , \*Signifikanter Unterschied zur jeweiligen Kontrolle (\* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ ), # Signifikanter Unterschied zu Camptothecin mit (# =  $p < 0,05$ ; ## =  $p < 0,01$ ; ### =  $p < 0,001$ )

Dazu werden die HT29-Zellen 30 min serumfrei mit Castalagin vorinkubiert und anschließend mit dem Topoisomerase-I-gift Camptothecin (100 µM) koinkubiert. Die Schweifintensität nach Koinkubation mit dem Lösungsmittel DMSO (0,2 %) und Camptothecin liegt bei 6,9 % und kann durch Koinkubation mit 10 µM Castalagin und Camptothecin auf 3,7 % reduziert werden. Ab einer Konzentration von 50 µM Castalagin

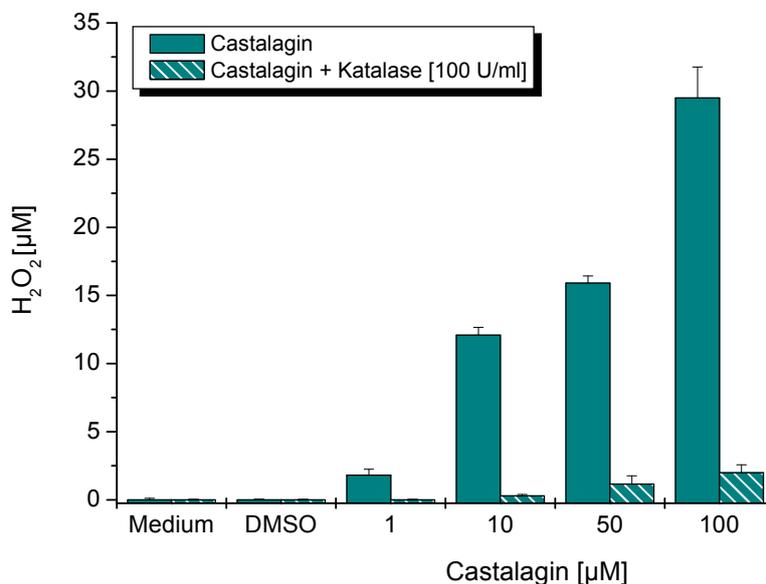
kann die Schutzwirkung von Castalagin gegenüber dem Topoisomerase-I-Gift nicht mehr beobachtet werden. Dementsprechend scheint Castalagin in den Kolonkarzinomzellen als Hemmstoff der katalytischen Aktivität von Topoisomerase I zu wirken. Aufgrund der limitierten Menge an Ellagantanninen, die zur Verfügung stand konnten keine weiteren Untersuchungen zum Einfluss weiterer Ellagantanine auf die Camptothecin-vermittelten DNA-Schäden durchgeführt werden. Auch die Ermittlung der Modulation der DNA-schädigenden Wirkung von Topoisomerase-II-Giften konnte im Rahmen dieser Dissertation nicht ermittelt werden.



**Abb. 90:** Modulation der strangbrechenden Wirkung von Doxorubicin durch Castalagin, verglichen mit Delphinidin, gemessen mittels Cometassay. 30 min Vorinkubation mit den entsprechenden Konzentrationen an Castalagin bzw. Delphinidin und anschließend 1 h Koinkubation mit 10 µM Doxorubicin (serumfrei, 0,2 % DMSO). Bestimmt wurde die Schweifintensität (Intensität des Schweifes/Gesamtintensität des „Kometen“), Abgebildet sind die Mittelwerte ± Stabw., n = 3 – 5,

Verglichen mit den Ergebnissen, die für die Schutzwirkung von Delphinidin vor camptothecin-induzierten DNA-Strangbrüchen ermittelt wurde, liegt der Effekt von Castalagin in den gleichen Konzentrationen in einer ähnlichen Größenordnung, ist jedoch etwas weniger potent (Abb. 90). Auch der Anstieg der DNA-Schädigung bei Koinkubation von Camptothecin und Konzentrationen  $\geq 50$  µM konnte auch bei Castalagin, wie bei

Delphinidin beobachtet werden. Möglicherweise sind diese Ergebnisse durch einen DNA-schädigenden Effekt von im Zellkulturmedium gebildetem Wasserstoffperoxid im Inkubationsmedium zurückzuführen. Castalagin (100  $\mu\text{M}$ ) bildet bei Inkubation von HT29-Zellen (45 min, 10 % FKS, 1 % DMSO) bis zu 29,5  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  (Abb. 91).



**Abb. 91:** Amplexrot<sup>®</sup>-Test zu Bestimmung des  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Gehalts im Zellkulturmedium nach Inkubation von HT29-Zellen mit verschiedenen Konzentrationen an Castalagin nach 45 min in Abwesenheit (ausgefüllte Balken) und Anwesenheit (gestreifte Balken) von 100 U/ml Katalase,  $n = 2$  in einer Doppelbestimmung, abgebildet sind die Mittelwerte  $\pm$  Stabw.

Es konnte für Delphinidin gezeigt werden, dass das gebildete Wasserstoffperoxid einen Einfluss auf die biologischen Wirkungen des Anthocyanidins hat. Die Induktion von DNA-Strangbrüchen durch Delphinidin ist in Anwesenheit von 100 U/ml Katalase deutlich verringert im Vergleich zur Inkubation ohne das Enzym. Verglichen mit Delphinidin (75  $\mu\text{M}$ ), welches bis zu 11,5  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  im Kulturmedium unter den gleichen Inkubationsbedingungen akkumuliert (Kern et al. 2007), entstehen bei der Inkubation mit Castalagin deutlich höhere Konzentrationen an dieser reaktiven Sauerstoffspezies (Abb. 91). Daher sollten unbedingt die Ergebnisse dieser Arbeit, die an zellulären Testsystemen durchgeführt wurden mit Zusatz von Katalase zum Inkubationsmedium verifiziert werden. Zudem sollten weiterführende Untersuchungen zum Wirkmechanismus der Ellagatannine auch in Anwesenheit von Katalase durchgeführt werden. Möglicherweise könnte dadurch auch eine Modulation der DNA-strangbrechenden Wirkungen der Topoisomerasegifte in Castalagin-konzentrationen  $\geq 50$   $\mu\text{M}$  detektiert werden. Dies konnte für Delphinidin bereits exemplarisch

für die Modulation der DNA-strangbrechenden Wirkung von Doxorubicin gezeigt werden (Abb. 60).

### Zusammenfassung und Diskussion - Ellagtannine

In Tabelle 11 sind die biologischen Wirkungen der Ellagtannine, der Ellagsäure und des Eichenholzextrakts zusammengefasst.

**Tab. 11:** Zusammenfassung der Ergebnisse der Untersuchungen der biologischen Wirkungen der Ellagtannine, der Ellagsäure und des Eichenholzextrakts. n.g., nicht getestet; 1, Castalagin; 2, Vescalagin; 3, Roburin E; 4, Grandinin; Cpt, Camptothecin; Topo, Topoisomerase; k.E., kein Effekt

	<b>Ellagtannine</b>	<b>Ellagsäure</b>	<b>Eichenholzextrakt</b>
<b>Einfluss auf das Wachstum von HT29-Zellen</b>	<b>1:</b> IC <sub>50</sub> -Wert: 10,1 ± 2,4 µM <b>2:</b> IC <sub>50</sub> -Wert: 16,8 ± 1,4 µM <b>3:</b> IC <sub>50</sub> -Wert: 27,1 ± 3,9 µM <b>4:</b> IC <sub>50</sub> -Wert: 22,7 ± 1,9 µM	IC <sub>50</sub> -Wert: 39,8 ± 5,7 µM	IC <sub>50</sub> -Wert: 60,5 ± 2,3 µg/ml
<b>Wirkung auf humane Topoisomerasen</b>	Vollständige Hemmung der Topoisomeraseaktivität ab: <b>Topo I:</b> 500 nM (1-4) <b>Topo IIα:</b> 50 nM (1-4) <b>Topo IIβ:</b> 500 nM (1 + 3) 1 µM (2 + 4)	n.g.	Vollständige Hemmung der Aktivität von: <b>Topo I:</b> ab 1 µg/ml <b>Topo IIα/β:</b> 500 ng/ml
<b>Beeinflussung der DNA-Integrität</b>	<b>Interkalation:</b> kein Effekt bis 50 µM <b>Bindung an die kleine Furche:</b> kein Effekt bis 50 µM	n.g.	<b>Interkalation:</b> Marginaler Effekt, Plateau ab 25 µg/ml <b>Bindung an die kleine Furche:</b> Marginaler Effekt, Plateau ab 10 µg/ml
<b>Untersuchungen zur Zellzyklusverteilung</b>	n.g.	<b>G<sub>1</sub>-Phase:</b> kein Arrest bis 100 µM <b>G<sub>2</sub>/M-Phase:</b> kein	<b>G<sub>1</sub>-Phase:</b> kein Arrest bis 100 µg/ml <b>G<sub>2</sub>/M-Phase:</b> kein Arrest

## Ergebnisse und Diskussion

		Arrest bis 100 $\mu$ M	bis 100 $\mu$ g/ml
<b>Induktion von DNA-Strangbrüchen</b>	k.E. bis 50 $\mu$ M (1-4)	k.E. bis 50 $\mu$ M	k.E. bis 100 $\mu$ g/ml
<b>Protektion vor Topoisomerasegift-induzierten</b>	<b>I:</b> Modulation der strangbrechenden Wirkung von Cpt (100 $\mu$ M), Maximum: 10 $\mu$ M	n.g.	n.g.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Ellagtannine als Einzelsubstanzen oder in Form des Eichenholzextrakts die Integrität der DNA nur marginal beeinflussen. Sie wirken als hochpotente Topoisomerasehemmstoffe ( $EC_{100} = 500$  nM Ellagtannin,  $EC_{100} = 1$   $\mu$ g/ml Extrakt) aber induzieren bis zu einer Konzentration von 50  $\mu$ M keine DNA-Strangbrüche. Auch eine direkte Interaktion der Substanzen mit der DNA, als Interkalatoren oder „minor groove binder“ kann ausgeschlossen werden. Aufgrund dieser Ergebnisse lässt sich mutmaßen, dass die Substanzen das Topoisomerase-DNA-Intermediat nicht stabilisieren können und so als rein katalytische Hemmstoffe der Topoisomerasen wirken. Allerdings besteht auch die Möglichkeit, dass die Substanzen aufgrund ihrer hohen molaren Masse gar nicht in die Zelle aufgenommen werden und damit in intakten Zellen keinen Einfluss auf die Topoisomerasen besitzen. Dem entgegen steht jedoch, dass für Castalagin gezeigt werden konnte, dass diese Substanz die strangbrechende Wirkung des Topoisomerase-I-Gifts Camptothecin vermindern kann. Dies spricht dafür, dass Castalagin als katalytischer Hemmstoff der Topoisomerase I, das Enzym hemmt bevor dieses an die DNA binden kann und so die Induktion von DNA-Strangbrüchen und die Stabilisierung des Strangbruchs durch ein Topoisomerasegift verhindert. Die potente Hemmung des Wachstums der HT29-Zellen ist demnach nicht Topoisomerase-vermittelt.

Auch Ellagsäure besitzt keine DNA-schädigende Wirkung bis zu einer maximal eingesetzten Konzentration von 50  $\mu$ M. Die Substanz bewirkt auch keinen signifikanten Arrest in der G<sub>2</sub>/M-Phase des Zellzykluses nach 36-stündiger Inkubation von HT29-Zellen. Die für Ellagsäure beschriebene Wirkung als Interkalanz (Teel 1986, Thulstrup et al. 1999) hat somit keinen Einfluss auf die DNA-Integrität von HT29-Zellen. Am isolierten EGF-Rezeptor konnte eine potente Hemmung der Phosphotyrosinkinaseaktivität durch nanomolaren Konzentrationen an Ellagsäure bestimmt werden. Im zellulären Testsystem (HT29-Zellen) konnte jedoch kein Einfluss auf Autophosphorylierung des Rezeptors, welche ein Maß für die Rezeptortyrosinkinaseaktivität darstellt, bestimmt werden (Fridrich et al., im Druck). Dieses Ergebnis spiegelt sich ebenfalls bei den Untersuchungen der Zellzyklusverteilung wieder, da die Substanz nicht in der Lage ist die Zellen in der G<sub>1</sub>-Phase des Zellzyklus zu arretieren. Der hemmende Effekt

der Ellagsäure auf das Wachstum der HT29-Zellen kann demnach nicht durch eine Beeinflussung Proliferation-assoziiertes Signalkaskaden erklärt werden. Auch ein artifizieller Einfluss von  $\text{H}_2\text{O}_2$  kann ausgeschlossen werden, da in Anwesenheit von Ellagsäure ( $\leq 100 \mu\text{M}$ ) im Zellkulturmedium keine Bildung der reaktiven Sauerstoffspezies gemessen wurde (Esselen, unveröffentlichte Daten). Somit sind andere, als die in dieser Arbeit untersuchten, Wirkmechanismen für das wachstumshemmende Potential der Ellagsäure verantwortlich, wie beispielsweise die Induktion von Apoptose. Es konnte bereits gezeigt werden, dass Ellagsäure an Osteosarkomzellen Apoptose induziert (Han et al. 2006).

Der Eichenholzextrakt, das komplexe Gemisch aus Ellagtanninen und anderen Polyphenolen, wirkt ebenfalls hemmend auf das Wachstum der humanen Kolonkarzinomzellen (HT29). Der Extrakt wirkt dabei weniger potent als die bislang identifizierten Einzelsubstanzen, so dass er neben den getesteten Ellagtanninen weitere weniger potente Substanzen enthalten muss. Allerdings sollte beachtet werden, dass bisherige Untersuchungen zur Beeinflussung des Zellwachstums durch den Eichenholzextrakt nur in Abwesenheit von Katalase durchgeführt wurden. Das Ergebnis sollte daher unbedingt in Anwesenheit einer ausreichenden Konzentration an Katalase wiederholt werden, um einen artifiziellen Effekt durch  $\text{H}_2\text{O}_2$  auszuschließen.

Durch Konzentrationen  $\geq 1 \mu\text{g/ml}$  Eichenholzextrakt lassen sich die Aktivitäten der Topoisomerasen I und II vollständig hemmen, was dafür spricht, dass die Ellagtannine auch als komplexes Gemisch potente Topoisomerasehemmstoffe darstellen. Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, dass andere bisher nicht identifizierte Extraktinhaltsstoffe an der Hemmwirkung des Eichenholzextrakts beteiligt sind. Ein Beitrag von Interkalatoren oder „minor groove binder“ an der Topoisomerasehemmung durch den Eichenholzextrakt kann ausgeschlossen werden, da die Extraktinhaltsstoffe in den verwendeten Testsystemen nur einen marginalen Effekt aufwiesen.

Die Hemmung der Topoisomerasen durch den Eichenholzextrakt hat keinen Einfluss auf die DNA-Integrität in humanen Kolonkarzinomzellen, da weder DNA-Strangbrüche noch ein Arrest des Zellzykluses in der  $\text{G}_2/\text{M}$ -Phase nach Inkubation mit Eichenholzextrakt ( $\leq 100 \mu\text{g/ml}$ ) gemessen werden konnte. Die potente Hemmung des Wachstums von HT29-Zellen durch die getesteten Ellagtannine oder auch den Eichenholzextrakt kann nicht durch die ermittelten Ergebnisse zum Einfluss der Substanzen auf die DNA-Integrität erklärt werden. Allerdings könnte die potente Wachstumshemmung durch die Testsubstanzen und den Eichenholzextrakt durch im Zellkulturmedium akkumuliertes Wasserstoffperoxid

verursacht worden sein. Daher ist es von großer Bedeutung die bisher ermittelten Ergebnisse durch den Einsatz von Katalase und Dismutation des Wasserstoffperoxids zu verifizieren.

Eine Aussage über die ernährungsphysiologische Relevanz der ermittelten Ergebnisse zur Untersuchung der Topoisomerasehemmung und DNA-Schädigung durch Ellagtannine ist schwer zu treffen. Die bisherigen Ergebnisse deuten darauf hin, dass diese Gruppe an Polyphenolen keinen toxischen Einfluss auf die DNA-Integrität besitzt. Allerdings wurde bisher nur eine geringe Anzahl an Ellagtanninen getestet, so dass eine Wirkung als Topoisomerasegifte und auch die Induktion von DNA-Strangbrüchen durch einige bisher nicht getestete Ellagtannine nicht ausgeschlossen werden kann. Auch die Ergebnisse, dass der Eichenholzextrakt keinen Einfluss auf die DNA-Integrität besitzt, lassen nicht den Schluss zu, dass Polyphenole aus Eichenholz allgemein keinen Einfluss auf die DNA-Integrität besitzen. Bisher wurde nur ein Eichenholzextrakt (*Quercus alba*) untersucht, doch unterschiedliche Eichenarten enthalten unterschiedliche Ellagtanninmuster (Cadahía et al. 2001). Daher sollten auch andere Eichenholzextrakte und weitere Ellagtannine auf ihr Potential zur Hemmung humaner Topoisomerasen, Wirkung als Topoisomerasegift in humanen Kolonkarzinomzellen und die Beeinflussung der DNA-Integrität untersucht werden.

## Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit war es zur Aufklärung der Beeinflussung von humanen Topoisomerasen und der DNA-Integrität durch polyphenolische Substanzen und polyphenolreiche Extrakte beizutragen.

Der Einfluss des akkumulierten  $H_2O_2$  auf die wachstumshemmende Wirkung des Anthocyanidins Delphinidin ist bereits beschrieben (Kern et al. 2007). Die vorliegende Dissertation zeigt auf, dass auch die beschriebene DNA-schädigende Wirkung von Delphinidin (Habermeier et al. 2005), sowie das Ausbleiben einer antioxidativen Wirkung des Anthocyanidins unter Zellkulturbedingungen (Pool-Zobel et al. 1999, Lazzé et al. 2003) teilweise auf das gebildete  $H_2O_2$  zurückzuführen ist. Die Inkubation mit polyphenol-/anthocyanreichen Extrakten führt ebenfalls zur Bildung von  $H_2O_2$ . Der Einfluss des gebildeten  $H_2O_2$  auf die biologischen Wirkungen der anthocyan-/polyphenolreichen Extrakte wurde im Hinblick auf ihre wachstumshemmenden Eigenschaften an HT29-Zellen gezeigt. Des Weiteren wurde auch für die Ellagtannine Castalagin und Grandinin sowie den ellagtanninreichen Eichenholzextrakt eine starke Akkumulation von  $H_2O_2$  im Zellkulturmedium *in vitro* nachgewiesen (Esselen, persönliche Mitteilung). Insgesamt zeigen diese Daten, dass alle in dieser Arbeit untersuchten Polyphenole oder polyphenolreichen Extrakte mit Ausnahme der Ellagsäure Wasserstoffperoxid im Zellkulturmedium generieren. Die  $H_2O_2$ -bildende Wirkung kann wie folgt zusammengefasst werden:

Castalagin  $\approx$  Grandinin  $>$  Delphinidin  $\gg$  Malvidin  $\approx$  Ellagsäure

Durch Zusatz von 100 U/ml Katalase zum Inkubationsmedium wird das akkumulierte  $H_2O_2$  nahezu vollständig dismutiert. Daher sollten *in vitro*-Untersuchungen mit polyphenolischen Substanzen oder Substanzgemischen zumindest auch im Vergleich mit Katalase durchgeführt werden, um auszuschließen, dass die beobachteten biologischen Wirkungen nicht durch gebildetes  $H_2O_2$  hervorgerufen werden.

Diese Arbeit zeigt, dass die in Abwesenheit von Katalase bestimmten Delphinidin-vermittelten DNA-Strangbrüche (Habermeier et al. 2005) zum größten Teil durch akkumuliertes Wasserstoffperoxid verursacht wurden. Delphinidin selbst ( $\leq 100 \mu M$ ) weist nur eine marginale DNA-strangbrechende Wirkung auf. Diese Strangbrüche können indirekt durch die Hemmung der katalytischen Aktivität der Topoisomerasen und damit verbundenem topologischen Stress begründet werden (Deming et al 2001, Larsen et al. 2003).

Auch die Untersuchungen zur Zellzyklusverteilung bestätigen, dass Delphinidin nur einen marginalen Einfluss auf die DNA-Integrität von HT29-Zellen besitzt, da Delphinidin ( $\leq 100 \mu\text{M}$ ) keinen Zellzyklusarrest in der  $G_2/M$ -Phase bewirkt. Unerwarteterweise erhöht Malvidin die Anzahl an HT29-Zellen in der  $G_2/M$ -Phase des Zellzyklus bereits in einer sehr niedrigen Konzentration von  $1 \mu\text{M}$  signifikant. Der zugrunde liegende Mechanismus konnte bisher nicht aufgeklärt werden. Malvidin hemmt weder die Aktivität humaner Topoisomerasen (Habermeyer et al. 2005), noch die Tubulinpolymerisation (Roth 2006). Auch die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zur Beeinflussung der Gentranskription einer Vielzahl von Zellzyklus-assoziierten Genen mittels eines Oligoarrays lieferten keine Erkenntnisse, die zur Aufklärung des Wirkmechanismus von Malvidin beitragen.

Delphinidin hemmt potent die Aktivität von humanen Topoisomerasen (Habermeyer et al. 2005). Im Gegensatz zu anderen Flavonoiden stabilisiert Delphinidin auch in humanen Kolonkarzinomzellen nicht das Topoisomerase-DNA-Intermediat. Es wirkt somit als rein katalytischer Hemmstoff und nicht als Topoisomerasegift. Des Weiteren moduliert Delphinidin die DNA-strangbrechende Wirkung der, in der Chemotherapie eingesetzten Topoisomerasegifte Camptothecin, Etoposid und Doxorubicin in HT29-Zellen. Jedoch zeigte sich hierbei ein Wirkoptimum bei einer Konzentration von  $10 \mu\text{M}$  Delphinidin. Zusätzlich ist Delphinidin in der Lage die Stabilisierung des Topoisomerase-II-DNA-Intermediats durch Doxorubicin zu vermindern. Basierend auf diesen Ergebnissen lässt sich für Delphinidin folgender Wirkmechanismus postulieren: Delphinidin wirkt als katalytischer Hemmstoff der Topoisomeraseaktivität, der die Enzyme inaktiviert bevor diese an die DNA binden und einen Strangbruch induzieren.

Bisherige Untersuchungen beschränkten sich auf die Aufklärung des Wirkmechanismus der Aglyka, die jedoch in Nahrungsmitteln als Glykoside (Anthocyane) vorliegen. Den Anthocyanen wurden bislang weniger potente zelluläre Effekte als den Aglyka zugesprochen (Meiers et al. 2001, Cooke et al. 2005). Daher stellte sich die Frage, ob auch anthocyanreiche Extrakte die Topoisomeraseaktivität im Hinblick auf die DNA-Integrität beeinflussen.

Die in dieser Arbeit untersuchten anthocyanreichen Extrakte hemmen potent die Aktivität humaner Topoisomerasen. Des Weiteren stabilisieren sie bis zu einer Konzentration von  $100 \mu\text{g/ml}$  nicht das kovalente Enzym-DNA-Intermediat in HT29-Zellen, so dass davon ausgegangen werden kann, dass die Extraktinhaltsstoffe, vergleichbar mit Delphinidin, als rein katalytische Topoisomerasehemmstoffe agieren. Eine Bindung an die DNA-Furchen wie sie für Delphinidin gezeigt wurde (Habermeyer et al. 2005), wiesen die Extraktinhaltsstoffe nicht auf. Zudem induzieren die Extrakte keine DNA-Strangbrüche ( $\leq 50 \mu\text{g/ml}$ ) und

bewirken keinen Zellzyklusarrest in der G<sub>2</sub>/M-Phase ( $\leq 250 \mu\text{g/ml}$ ), so dass der Einfluss der polyphenolischen Extraktinhaltsstoffe auf die DNA-Integrität als gering einzustufen ist. Vergleichbar mit Delphinidin modulieren auch die Extrakte die DNA-strangbrechende Wirkung von Topoisomerasegiften. Basierend auf diesen Ergebnissen lässt sich sagen, dass neben den Aglyka auch anthocyanreiche Extrakte in ernährungsphysiologisch relevanten Konzentrationen die Aktivität von humanen Topoisomerasen beeinflussen und die strangbrechende Wirkung von Topoisomerasegiften modulieren. Es ist daher erforderlich diese Ergebnisse *in vivo* zu verifizieren, um so eine mögliche Schutzwirkung von Anthocyanen und anderen Polyphenolen vor Topoisomerasegiften lokal im Gastrointestinaltrakt aufzuzeigen.

Weiterhin konnte im Rahmen diese Dissertation bestimmt werden, dass die getesteten Ellagttannine sowie die Ellagsäure die Aktivität humaner Topoisomerasen im zellfreien System hemmen. Dabei wirken nicht nur die Einzelsubstanzen als potente Topoisomerasehemmstoffe, sondern auch ein komplexes Gemisch an Tanninen in Form eines Eichenholzextraktes. Weiterführende Untersuchungen zur Wirkung der Ellagttannine als Topoisomerasegifte sollten an kultivierten Zellen durchgeführt werden, um die Relevanz einer potenten Topoisomerasehemmung für intakte Zellen zu erfassen.

Vergleichbar mit den anthocyanreichen Extrakten weisen die Ellagttannine und der Eichenholzextrakt keine Wirkung auf die DNA-Integrität in zellfreien und zellulären Testsystemen auf. Diese Ergebnisse legen nahe, dass die Ellagttannine keine Stabilisierung des Topoisomerase-DNA-Intermediats bewirken. Des Weiteren konnte für Castalagin, vergleichbar mit der Wirkung von Delphinidin eine Modulation der strangbrechenden Wirkung von Camptothecin ( $100 \mu\text{M}$ ) bestimmt werden. Dieses Ergebnis legt nahe, dass Castalagin in die Zelle gelangt und als katalytischer Hemmstoff die Topoisomerase hemmt bevor das Enzym an die DNA binden und einen Strangbruch im Zucker-Phosphat-Rückgrat induzieren kann.

Die bisherigen Ergebnisse der *in vitro*-Studien deuten darauf hin, dass Polyphenole aus Beerenfrüchten, roten Weintrauben und Eichenholz die Aktivität humaner Topoisomerasen hemmen und die strangbrechende Wirkung von Topoisomerasegiften modulieren. Jedoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass *in vivo* durch Metabolisierung Produkte entstehen, die andere Wirkungen aufweisen als die Ausgangsverbindungen. Deshalb sind im Rahmen einer Risikobewertung von anthocyan-/polyphenolreichen Nahrungsergänzungsmitteln *in vivo*-Untersuchungen unabdingbar.

## **Material und Methoden**

### **Material**

#### **Gebrauchs- und Bedarfsgegenstände**

<b>Zellkultur</b>	Petrischale Ø 5cm, 10cm	Nunc, Sarstedt
	Kulturflaschen	Nunc, Sarstedt
	24 – Lochplatte, steril	Greiner
<b>Pipetten</b>	Eppendorfpipetten, research (2,5; 10; 20; 100; 200; 1000; 5000 µl)	Eppendorf
	Pipettenspitzen (blau, gelb, klar)	Sarstedt
	Pipettenspitzen (5 ml)	Roth/VWR
	Multipette	Eppendorf
	Multipettenaufsätze (1, 5, 10 ml)	Eppendorf
	Glaspipetten	VWR
	Pasteurpipetten	Roth
<b>Zellaufarbeitung</b>	Zellschaber	Nunc
<b>Plastikgefäße</b>	Eppendorfreaktionsgefäße (1,5 ml; 2ml)	Roth
	5 ml Röhrchen	Sarstedt
	13 ml Röhrchen	Sarstedt
	15 ml Röhrchen	Sarstedt
	50 ml Röhrchen	Sarstedt
	96-Lochplatte	Greiner
	Polyallomerröhrchen (13 ml)	Beckmann Coulter
<b>Glasgefäße/-geräte</b>	Inkubationsgefäß für Objektträger	VWR
	Superfrost Objektträger	Menzel-Gläser
	Deckgläser	Menzel-Gläser
	Neubauer-Zählkammer	Roth
	Objektträger einseitig angerauht	Menzel-Gläser
<b>Boxen</b>	Papierbox für Eppendorfreaktionsgefäße	Sarstedt
	OT – Box, Plastik	VWR
<b>Elektrophorese</b>	1,5 mm Papiere	Whatman und
	Hybond-C Nitrozellulosemembran	Schleicher & Schuell

## Chemikalien

<b>A – C</b>	Agarose:		
	- peqGOLD Universal Agarose	Peqlab	
	- Low melting agarose	Biorad	
	- Normal melting agarose	Biorad	
	ATP	Sigma	
	BSA	Roth	
	Bromphenolblau	Serva	
	Cäsiumchlorid	Roth	
	CHAPS	Roth	
	<b>D – F</b>	DAPI/SR 101	Partec
Dimethylsulfoxid f. Molekularbiologie		Roth	
Dimethylsulfoxid p.a.		Roth	
Dithiothreitol (DTT)		Roth	
DMEM		Invitrogen	
EDTA		Roth	
EGTA		Roth	
Essigsäure		Roth	
Ethanol		Roth	
Ethidiumbromid		Roth	
<b>G – I</b>	Fötale Kälberserum (FKS)	Invitrogen	
	Glycerol	Roth	
	Glycin	Roth	
	Harnstoff	Roth	
	Hefe-Extrakt	Gibco	
	HEPES	Roth	
	Hoechst H33258	Fluka	
	Isopropanol	Roth	
	<b>J – L</b>	Kalbsthymus-DNA	Fluka
		Kaliumacetat	Roth
Kaliumchlorid		Merck	
Kaliumhydroxid		J.T. Baker	
kDNA		Topogen	

	Kupfersulfat	Merck
	Lumiglo®	Cell Signaling Technology
<b>M – O</b>	Magnesiumchlorid	Merck
	Methanol	Roth
	Menadion	Sigma Aldrich
	Milchpulver	Roth
	Mineralöl	Roth
	Natriumacetat	Roth
	Natriumchlorid	Roth
	Natriumhydrogenphosphat	Roth
	Natriumdihydrogenphosphat	Roth
	Natriumhydroxid	Roth
	Na-Lauroylsarcosine sodium salt	Sigma
	[N-Morpholino]propansulfonsäure (MOPS)	Roth
	Nocodazol	Sigma
<b>P – R</b>	Penicillin/Streptomycin	Invitrogen
	PMSF	Alexis
	Puromycin	Sigma
	RPMI 1640	Invitrogen
<b>S – Z</b>	Salzsäure	Roth
	Spermin	Sigma
	Spermidin	Sigma
	Sulforhodamin B	Sigma
	Tris	Roth
	Tris Base	Roche
	Trichloressigsäure (TCA)	Roth
	Triton X-100	Roth
	Trypanblau	Sigma
	Trypsin	Serva
	Trypton	Sigma
	Tween-20	Sigma

## Kits

<b>Wasserstoffperoxiddetektion</b>	Amplex <sup>®</sup> -Red-Assay-Kit	Sigma-Aldrich, Invitrogen
<b>RNA-Isolierung</b>	RNeasy Kit	Quiagen
<b>Plasmidpräparation</b>	DNA-Maxi-Präparation	Quiagen
<b>Mikrogelelektrophorese</b>	Agilent 6000 RNA Pico Kit	Agilent
<b>Array</b>	AMP-true-labeling	Superarray
	Array OHS-802	Superarray

## Antikörper

<b>Anti-Topo I</b>	Topo I (H-300), sc-10783	Santa Cruz
<b>Anti-Topo II</b>	Topo II $\alpha$ (H-231), sc-13058	Santa Cruz
	Topo II $\beta$ (H-286), sc-13059	Santa Cruz
<b>Zweitantikörper</b>	Goat anti-rabbit IgG-HRPconjugated	Santa Cruz

## Enzyme

<b>Restriktionsverdau</b>	Eco RI	MBI Fermentas
	Pvu II	MBI Fermentas
	Rsa I	MBI Fermentas
<b>Proteinase K</b>	Proteinase K	Sigma
<b>Topoisomerasen</b>	Topoisomerase I (2 mg/ml)	Prof. Boege, Düsseldorf
	Topoisomerase II $\alpha$ (4 mg/ml)	Prof. Boege, Düsseldorf
	Topoisomerase II $\beta$ (2 mg/ml)	Prof. Boege, Düsseldorf

## Feinchemikalien und Testsubstanzen

<b>Anthocyanidine</b>	Delphinidin	Extrasynthese, Denay, FRA
	Malvidin	Extrasynthese, Denay, FRA
<b>Anthocyanreiche Extrakte</b>	Mirtoselect	Prof. Gescher, Leicester, GB
	Oenocyanine	Prof. Gescher, Leicester, GB
<b>Ellagsäure</b>	Ellagsäure	Extrasynthese, Denay, FRA
<b>Ellagtannine</b>	Castalagin	Prof. T. Hofmann, München
	Grandinin	Prof. T. Hofmann, München
	Roburin E	Prof. T. Hofmann, München
	Vescalagin	Prof. T. Hofmann, München
<b>Topoisomeraseinhibitor</b>	ICRF-187	Prof. Boege, Düsseldorf
<b>Topoisomerasegifte</b>	Camptothecin	Sigma-Aldrich
	Etoposid	Sigma-Aldrich
	Doxorubicin	Sigma-Aldrich

## Verwendete Geräte

<b>Autoklav</b>	Systec D-150	Systec GmbH, Weitenberg
<b>Bakterienschüttler</b>	Unitron	INFORS AG, Bottmingen, CH
<b>Bioanalyzer</b>	Agilent 2100 Bioanalyzer G2939A	Agilent
<b>Blotting</b>	MINIFOLD <sup>®</sup> II Slot Blot System, Item # 104H7800	Whatman <sup>®</sup> , Schleicher & Schuell, Sanford, UK
<b>Brutschrank</b>	BINDER, CB210 #05-82825	BINDER, Tuttlingen
<b>Detektionsgerät</b>	LAS3000 FUJIFILM intelligent dark box, B 00001851	Raytest Isotopenmeßgeräte GmbH
	Software: Image Reader LAS 3000 V2.1; AIDA V3.52.046	

## Material und Methoden

---

	IDA Image Documentation & Analysis, B 00001852	Raytest Isotopenmeßgeräte GmbH
<b>Durchflusszytometer</b>	Partec PAII Partec Flow Max V 2.4b	Partec GmbH, Münster
<b>Elektrophoresekammer</b>	Modell 41-2025 (Comet Assay) Modell 40-1214 (Topo Assays)	Peqlab Biotechnologie GbmH, Erlangen
<b>Gasprofi</b>	Gasprofi 1 <sup>SCS</sup>	WCD-TEC GmbH, Göttingen
<b>Heizblock</b>	91D1200	Peqlab Biotechnologie GbmH, Erlangen
<b>Hybridisierungssofen</b>	HB-1000 Hybridizer	UVP Laboratory Products, Peqlab
<b>Kühl-/ Gefrierschränke</b>	Kühlschränke Kühl-/Gefrierkombination Gefrierschränke Ultra low temperature freezer Modell: U725-86 EU	Liebherr  New Brunswick Scientific
<b>Magnetrührer</b>	IKA <sup>®</sup> RH basic 2 Magnetic Stirrer HI 300N	IKA <sup>®</sup> - Werke, Staufen HANNA instruments
<b>Mikroskope</b>	Axiovert 40C Objektive: - A-Plan, 5x/0,12 Ph0 - CP-A Chromat 10x/0,25 Ph1 Okular: Pl 10x/18 Axioskop Objektiv: Plan-Neoflux 100x/1,3	Zeiss      Zeiss

	oil 440480	
	Okular: Pl 10x/20	
	Kamera: Pulnix PE2020P	
	Filter: 365 FT 395, LP 420	
	UV: BP 450-490, FT 510, LP 520	
	Software: Comet Assay III V3.0	Perceptive Instruments
<b>Nanodrop®</b>	ND-1000 Spectrophotometer,	NanoDrop Technologies Inc.,
	Software: ND-1000 V 3.2.1	Wilmington, DE, USA
<b>pH-Meter</b>	pH 211 Microprocessor pH Meter	HANNA instruments
	Elektrode: HI 1131	
<b>Pipettus</b>		Hirschmann Laborgeräte
<b>Plattenlesegerät</b>	Victor <sup>3</sup> V 1420 Multilable Counter	Perkin-Elmer
	Modell: 1420-040	
	Filter:	
	F 570/8 (1420-520)	
	F 355	
	F 595/10 (1420-5690)	
	F531/25 (1420-5680)	
	F 390/20 (1420-501)	
	F 595/60 (1420-5690)	
	F 460	
	F 520/10 (1420-549)	
<b>Schüttler</b>	Thriller, 1,5 ml	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
	Überkopfschüttler Roto-Shake- Genie	Scientific Industries
	Mini Rocker MR-1	Peqlab Biotechnologie

<b>Schweißgerät</b>	Severin Folio	
<b>Sterilbänke</b>	Kojair KR-170 BW	Kojair Tech Oy, Finland
	Heraeus HS12	Heraeus instruments, Hanau
<b>Stromgeber</b>	electrophoresis power supply, EV231	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
	Consort E835 power supply	
<b>Thermocycler</b>	MJ Research PTC-200	Peltier Thermal Cycler
<b>Trockenschränke</b>	Heraeus, Memmert	Heraeus
<b>Vakuumpumpe</b>	Vakuum-Sicherheits- Absaugsystem, AZ102/AZ104	HLC, Bovenden
<b>Vortex</b>	Vortex-Genie 2	Scientific Industries
	MS 1 Minishaker	IKA®
<b>Waagen</b>	Analysenwaage CP1245	Sartorius AG, Göttingen
	Grobwaage KERN 434	Gottl. Kern & Sohn GmbH, Albstadt
<b>Wasserbad</b>	SW-2004	VWR
	Regler Modell 1112A	
<b>Zentrifugen</b>	Zytofuge: Megafuge 1.0R	Heraeus, Thieme Labortechnik GmbH
	Eppendorf Centrifuge 5417R	Eppendorf AG, Hamburg
	Eppendorf Centrifuge 5415D	Eppendorf AG, Hamburg
	Ultrazentrifuge Centrikon T-1080	Kontron Instruments
	Mit Rotor TST 41.14 – 41000rpm	

## **Zellkultur**

### **verwendete Zelllinien**

#### **MCF-7-Zellen**

Die MCF-7-Zellen wurden 1970 aus einem pleuralen Erguss einer 69-jährigen Frau kaukasischen Typs mit einem metastasierenden Mammakarzinoms etabliert. Die Zellen besitzen die Fähigkeit Polylayer zu formen.

Diese Zellen können in 70 % RPMI 1640, 20 % fötalem Kälberserum (FKS) und 10 % DMSO bei mindestens -80 °C gelagert werden. MCF-7-Zellen werden bei 37 °C, 95 % Luftfeuchte und 5 % CO<sub>2</sub> in RPMI mit 10 % FKS und 1 % Penicillin/Streptomycin (P/S) kultiviert. Die Verdopplungszeit dieser Zelllinie beträgt etwa 50 Stunden (Range: 30 bis 72 Stunden) unter den angegebenen Bedingungen.

#### **HT29-Zellen**

Die Kolonkarzinomzelllinie HT29 wurde aus einem primären Adenokarzinom einer 44 Jahre alten Frau kaukasischen Typs etabliert. Die Zelllinie zeichnet sich durch ein adhärentes Wachstum sowohl in großen Kolonien mit epithelialen Zellen als auch in Monolayern aus.

Diese Zellen können in 70 % DMEM, 20 % FKS und 10 % DMSO bei mindestens -80 °C gelagert werden. HT29-Zellen werden bei 37 °C, 95 % Luftfeuchte und 5 % CO<sub>2</sub> in DMEM mit 10 % FKS und 1 % P/S kultiviert. Die Verdopplungszeit dieser Zelllinie beträgt etwa 40 bis 60 Stunden unter den angegebenen Bedingungen.

#### ***Mediumwechsel***

Um gleichmäßiges Wachstum zu gewährleisten sollte das Medium bei Bedarf gewechselt werden. Zur Erkennung ist dem Medium der Farbstoff Phenolrot zugesetzt, welcher im sauren Milieu von rot nach gelb umschlägt. Die Zellen verbrauchen die Nährstoffe aus dem Serum und dem Medium und setzen Abfallprodukte frei, was zur Absenkung des pH-Wertes führt. Das verbrauchte Medium wird abgesaugt und durch auf 37 °C vorgewärmtes Kulturmedium ersetzt.

## *Passagieren*

### **Benötigte Materialien und Puffer**

<b>PBS</b>	10 x PBS: 1710 mM NaCl 100 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 34 mM KCl 18 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 7,4, mit H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> auffüllen 1 x PBS autoklavieren	50 ml
<b>Trypsin</b>	500 mg Trypsin (Rinderpankreas, 3,6 U/mg) 250 mg EDTA 100 ml 10 x PBS mit H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> auffüllen, über Nacht auf Eis rühren, pH-Wert überprüfen (7,0 bis 7,4), steril filtrieren (Porengröße: 0,22 µm) und aliquotieren (5 ml), Lagerung bei -20 °C	5 – 10 ml

Wird ein konfluentes Wachstum erreicht ist es nötig die Zellen zu passagieren, das bedeutet sie in niedriger Zelldichte wieder neu zu kultivieren. Wenn die Zellen in Poly Layern zu wachsen beginnen sinkt die Proliferationsrate, Zellen können absterben und auch eine komplette Ablösung des Zellrasens ist möglich.

Zum Passagieren wird das alte Medium abgesaugt und die Zellen werden mit vorgewärmtem sterilen 1 x PBS gewaschen um Mediumreste und tote Zellen zu entfernen. Um die verwendeten Zellen (HT29, MCF-7) vom Kulturflaschenboden zu lösen werden diese mit Trypsinlösung bei 37 °C für ca. 2,5 min angedaut. Damit die Zellen nicht zu stark durch das proteinverdauende Trypsin geschädigt werden wird die Wirkung des Trypsins durch die Zugabe von proteinreichem FKS-haltigem Medium gestoppt. Es werden 10 ml Kulturmedium auf die Zellen gegeben und diese gut resuspendiert. Etwa 0,5 ml Zellsuspension werden zur Weiterkultivierung eingesetzt.

## Zellzahlbestimmung

Um gleiche Bedingungen bei den Versuchswiederholungen zu gewährleisten sollte immer die gleiche Anzahl an Zellen eingesetzt werden. Dazu muss die Zellzahl der Zellsuspension nach Trypanblaufärbung lichtmikroskopisch mit der Neubauerzählkammer bestimmt werden. Lebende Zellen zeichnen sich durch die Fähigkeit aus den Farbstoff aus der Zelle wieder herauszutransportieren.

Es werden 4 x 4 Felder der Kammer (s. Abb) ausgezählt. Aus den ermittelten Werten wird der Mittelwert bestimmt, der mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor und mit 10.000 (Faktor der Zählkammer) multipliziert um die Anzahl der Zellen pro Milliliter zu bestimmen.

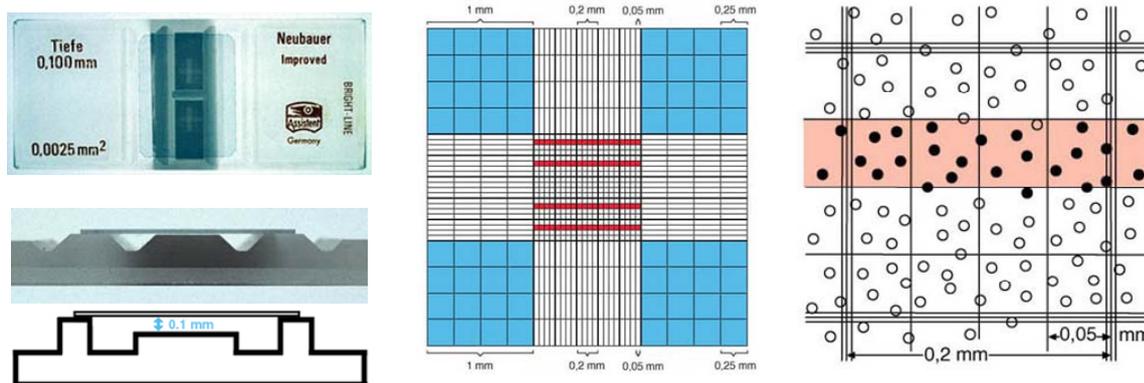


Abb. : Die Neubauerzählkammer

## Mykoplasmentest

Mykoplasmen sind die kleinsten sich selbst vermehrenden Prokaryonten. Sie können den Sterilfilter ungehindert passieren und so die Zellkultur verunreinigen. Daher ist es wichtig, dass regelmäßig auf Mykoplasmenverunreinigung überprüft wird. Dazu werden Zellen auf einem Superfrostobjektträger ausgestreut und mit Methanol fixiert. Durch DAPI-Färbung können nun die Mykoplasmen detektiert werden, welche als kleine blaugefärbte runde Körperchen unter dem Fluoreszenzmikroskop erscheinen.

## Benötigte Materialien und Puffer

<b>Materialien</b>	Superfrost-Objektträger (OT, steril)
<b>DAPI/SR 101-Lösung</b>	200 mM Tris 200 mM NaCl 8 $\mu$ M DAPI (4',6'-Diamidino-2-phenylindol- dihydrochlorid) 50 $\mu$ M SR 101 (Sulforhodamin 101) In H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> lösen und pH 7,6 einstellen
<b>Methanol</b>	p.A., -20 °C

## Durchführung

- Der OT wird in eine Petrischale ( $\varnothing$  10 cm) mit 10 ml Kulturmedium gegeben und wenige Tropfen Zellsuspension werden darauf pipettiert
- Ablegen der Zellen auf dem OT, bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>, und 95 % rel. Luftfeuchte für ca. 48 h
- Das Medium wird abgesaugt und der OT wird mit Methanol (-20 °C) abgespült
- Die Zellen werden auf dem OT fixiert: mind. 30 min bei -20 °C in Methanol
- Es werden zwei bis drei Tropfen DAPI/SR 101-Lösung auf den OT pipettiert und mit einem Deckglas bedeckt
- Die Detektion erfolgt am Fluoreszenzmikroskop:
  - Zellkern und DNA: blau (DAPI)
  - Proteine: rot (SR 101)
  - Mycoplasmen: blau (DAPI), klein, gleichmäßig rund, leuchtend

## *Einfrieren von Zellen*

Die Zellsuspension wird in Aliquote á 1 ml aufgeteilt und diesen werden je 100  $\mu$ l DMSO p.A. zugegeben. Diese Mischung wird nun bei -20 °C gefroren und kann nach 24 h für mehrer Wochen bei -80 °C gelagert werden. Für längere Lagerzeiten sollten die Zellen in flüssigem Stickstoff aufbewahrt oder alternativ mit Styropor und Kunststoffolie gut isoliert bei -80 °C direkt eingefroren werden.

### *Auftauen von Zellen*

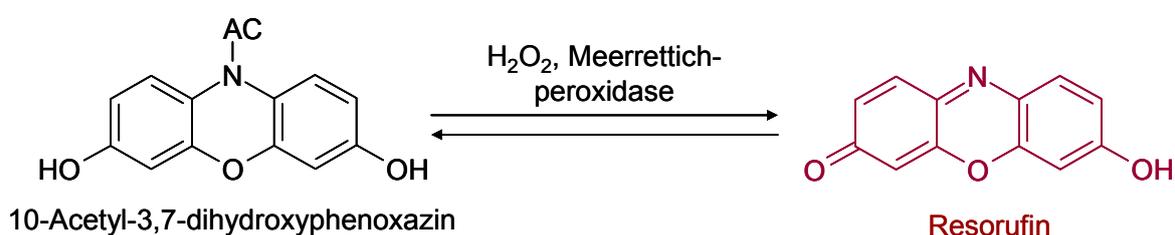
Die gefrorenen Zellen werden vorsichtig und zügig im Wasserbad (37 °C) aufgetaut und sofort in 9 ml Medium (20 % FKS) gegeben um die toxische DMSO-Konzentration von 10 % auf 1 % zu senken. Die Zellsuspension wird bei maximal 300 g für 5 min bei RT zentrifugiert und der Überstand abdekantiert. Die Zellen werden in Medium (20 % FKS) resuspendiert und in einer kleinen Kulturflasche (25 cm<sup>2</sup>) kultiviert. Wenn die Zellen ihre reguläre Verdopplungszeit erreicht haben kann der FKS-Gehalt im Medium auf 10 % heruntersetzt und die Zellen in großen Kulturflaschen kultiviert werden.

### **H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – Akkumulation im Zellkulturmedium (Amplex<sup>®</sup> Red Kit)**

Polyphenole bilden im Zellkulturmedium unter bestimmten Voraussetzungen Wasserstoffperoxid. Das akkumulierte H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> beeinträchtigt möglicherweise die Wirkung der Substanz und um die Substanzwirkung zu untersuchen sollte das gebildete Wasserstoffperoxid durch Katalase dismutiert werden.

Es werden 40.000 HT29-Zellen pro Loch in einer 24-Lochplatte ausgestreut und für 48 h anwachsen gelassen. Die Inkubation erfolgt in serumhaltigen (10 % FKS) Medium mit einem Lösungsmittelanteil von 1 %. Die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Bildung im Medium wird mittels Amplex<sup>®</sup>-Red-Assay-Kit nach 15 min, 45 min und 72 h bestimmt. Dazu werden je 2 x 50 µl Medium pro Inkubationsansatz aus dem Inkubationsloch entnommen.

Der Test beruht darauf, dass das Amplexrotreagenz in Gegenwart von Peroxidase mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in einem Verhältnis von 1 : 1 zu Resorufin, einem fluoreszierenden Oxidationsprodukt reagiert (s. Abb.).



**Abb. :** Peroxidase-katalysierte Reaktion von Amplexrot (10-Acetyl-3,7-dihydroxyphenoxzin) und Wasserstoffperoxid zu fluoreszierendem Resorufin

### Benötigte Materialien und Puffer

<b>Materialien</b>	24-Lochplatte, 96-Lochplatte
<b>Amplex<sup>®</sup>-Red-Assay Kit:</b>	
<b>10 mM Amplexrotlösung</b>	1 Röhrchen Amplexrot (A) und DMSO (B) langsam auf RT bringen und das Amplexrot direkt vor Gebrauch in 60 µl DMSO lösen
<b>1 x Reaktionspuffer</b>	4 ml 5 x Reaktionspuffer (C) in 16 ml H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>
<b>10 U/ml Peroxidase</b>	Komponente D in 1 ml 1 x Reaktionspuffer
<b>20 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Arbeitslösung</b>	3 %ige H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Lösung (E) in entsprechendem Volumen an 1 x Reaktionspuffer

### Eichreihe

- Herstellung einer 20 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Arbeitslösung (20 mM, 1 : 10 und dann 1 : 100)
- Herstellen der Eichreihe

Endkonzentration [µM]	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Lösung [20 µM]	1 x Reaktionspuffer
0		60
1	6	54

## Material und Methoden

---

2	12	48
3	18	42
4	24	36
5	30	30

- Im Assay wird noch einmal 1 : 1 verdünnt!
- 50 µl jeder Eichkonzentration in ein Loch einer 96-Lochplatte geben.
- Herstellen der Reaktionslösung
  - 50 µl 10 mM Amplexrot-Lösung
  - 100 µl HRP-Stammlösung (10 U/ml)
  - 4,85 ml 1 x Reaktionspuffer
- 50 µl Reaktionslösung in jedes Loch zu den Eichlösungen geben (Reaktionsstart)
- Inkubation für 30 min bei RT im Dunkeln
- Messung der Absorption bei 570 nm

## Durchführung

- Plattenbefüllung:
  - Positivkontrolle: 50 µl einer 10 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung
  - Negativkontrolle: 50 µl 1 x Reaktionspuffer
  - Probe: 50 µl Probe (evtl. verdünnen, da Eichreihe nur bis 5 µM)
- Herstellen der Reaktionslösung
  - 50 µl 10 mM Amplexrot-Lösung
  - 100 µl HRP-Stammlösung (10 U/ml)
  - 4,85 ml 1 x Reaktionspuffer
- 50 µl Reaktionslösung in jedes Loch zu den Proben geben (Reaktionsstart)
- Inkubation für 30 min bei RT im Dunkeln
- Messung der Absorption bei 570 nm

## Wachstumshemmung (Sulforhodamin B (SRB) – Test)

Zur Detektion der Wachstumshemmung wird der sogenannte SRB-Test mit HT29-Zellen durchgeführt. Hierbei werden in 24-Lochplatten 4.500 HT29-Zellen/pro Loch ausgestreut und für 48 Stunden anwachsen gelassen. Die Inkubation der Zellen für 72 Stunden erfolgt in einem Milliliter serumhaltigem Medium mit der entsprechenden Substanzkonzentration mit einer Lösungsmittelkonzentration von 1 %. Es wird je eine Spalte der Platte mit der gleichen Konzentration (vierfach Bestimmung) an Substanz inkubiert.

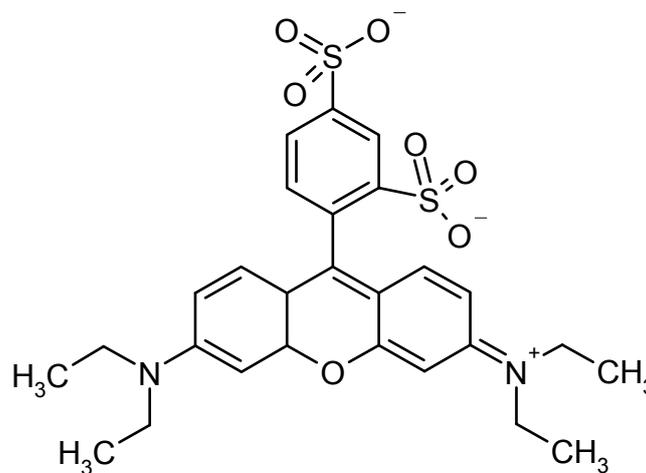


Abb. : Sulforhodamin B (SRB)

## Benötigte Materialien und Puffer

<b>Materialien</b>	Multipette mit Aufsätzen (5 ml und 10 ml)	
<b>Fixierreagenz</b>	50 %ige (w/v) Trichloressigsäure (TCA)	250 ml
<b>Färbereagenz</b>	0,1 %ige (w/v) Sulforhodamin-B-Lösung in 1 %iger (v/v) Essigsäure	1 l
<b>Waschlösung I</b>	H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub> oder H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	-
<b>Waschlösung II</b>	1 %ige (v/v) Essigsäure	2 l
<b>Detektionslösung</b>	10 M Tris Base, pH 10	2 l

### Durchführung

- Durch Zugabe von je 100 µl Fixierreagenz pro Loch für 1 h bei 4 °C werden die noch lebenden Zellen am Plattenboden fixiert.
- Viermal vorsichtig mit Waschlösung I waschen und im Dunkeln trocknen lassen
- Mit 250 µl Färbereagenz für mindestens 30 min. im Dunklen anfärben
- Zweimal mit Waschlösung II vorsichtig waschen
- Zweimal mit Waschlösung I vorsichtig waschen und im Dunkeln trocknen
- Herauslösen des Farbstoffs aus den Zellen mit der entsprechenden Menge an Detektionslösung, Absorptionswert für DMSO-Kontrolle bei 0,8 - 1,5 (mind. 300 µl)
- Detektion durch Absorptionsmessung bei 570 nm mit dem Plattenlesegerät Viktor V<sup>5</sup>

### Auswertung

Die vier Absorptionswerte der Probe bzw. der DMSO-Kontrolle werden gemittelt. Die Eigenfluoreszenz der Detektionslösung wird von allen Werte abgezogen und die Probenwerte werden in Bezug zur Kontrolle (100 % Wachstum) gesetzt.

## Zellzyklusuntersuchung mittels Durchflusszytometrie

Beim Durchlaufen des Zellzyklus gibt es verschiedene Kontrollpunkte, an denen die Zelle kontrolliert, ob sie in die nächste Phase eintreten kann. Ein Kontrollpunkt befindet sich am Ende der G<sub>1</sub>-Phase, wo überprüft wird ob die Zelle in die S-Phase eintreten kann. Substanzen, die beispielsweise Signalwege wie die MAPK-Kaskade hemmen bewirken einen G<sub>1</sub>-Arrest. Eine weitere Kontrolle erfolgt am Übergang von der G<sub>2</sub>-Phase in die Mitosephase und dort wird überprüft, ob die DNA vollständig und ganz vorliegt und ob die Zelle sich teilen kann. Substanzen, die mit der DNA interagieren oder Enzyme der DNA-Replikation, z.B. Topoisomerasen, hemmen bewirken einen G<sub>2</sub>/M-Arrest.

### Benötigte Materialien und Puffer

<b>Materialien</b>	3,5 ml + 15 ml Röhrchen, Zellschaber	
<b>Nocodazol</b>	10 mg/ml Stammlösung in H <sub>2</sub> O Endkonzentration im Medium: 20 µg/ml	
<b>Medium, serumfrei</b>	DMEM mit 1 % Penicillin/Streptomycin	500 ml
<b>PBS</b>	10 x PBS 1710 mM NaCl 100 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 34 mM KCl 18 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 7,4, mit H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> auffüllen 1 x PBS autoklavieren	50 ml
<b>Trypsin</b>	500 mg Trypsin (Rinderpankreas, 3,6 U/mg) 250 mg EDTA 100 ml 10 x PBS mit H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> auffüllen, über Nacht auf Eis rühren, pH-Wert überprüfen (7,0 bis 7,4), steril filtrieren (Porengröße: 0,22 µm) und aliquotieren (5 ml), Lagerung bei -20 °C	5 – 10 ml
<b>Kulturmedium</b>	DMEM mit 10 % FKS und 1 % Pen./Strep.	50 ml
<b>Ethanol</b>	70 % (v/v) in H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> , 4 °C	100 ml

Es werden 500.000 HT29-Zellen in 5 ml Kulturmedium ausgestreut und für 72 h anwachsen gelassen.

### **Synchronisation der Zellen in der G<sub>1</sub>-Phase**

- Das Kulturmedium wird abgesaugt.
- Die Zellen werden vorsichtig mit sterilem 1 x PBS gewaschen.
- Es wird mit 5 ml serumfreien Medium für 48 h inkubiert.

### **Synchronisation der Zellen in der G<sub>2</sub>/M-Phase**

- Das Kulturmedium wird abgesaugt.
- Die Zellen werden vorsichtig mit sterilem PBS gewaschen.
- Es wird mit 5 ml serumhaltigem (10 % FKS) Medium mit 0,5 µg/ml Nocodazol für 16 h inkubiert.

### **Inkubation und Aufarbeitung**

- Die Inkubation erfolgt für 36 h in serumhaltigem (10 %) Medium mit der entsprechenden Substanzkonzentration (1 % Lösungsmittel im Medium).
- Am Ende der Inkubationszeit wird das Inkubationsmedium in ein 15 ml Röhrchen gegeben.
- Es wird zweimal mit 1 ml 1 x PBS gewaschen und die Waschlösung wird ebenfalls in das Röhrchen gegeben.
- Die Zellen werden vom Plattenboden gelöst indem sie mit 0,5 ml Trypsinlösung für 2 min im Brutschank inkubiert werden.
- Die Trypsinaktivität wird durch Zugabe eines Milliliters Kulturmediums gestoppt.
- Die Zellsuspension wird ebenfalls in das Röhrchen gegeben.
- Es wird noch zweimal mit je einem Milliliter Kulturmedium gewaschen.
- Die Zellsuspension wird bei 20 °C und 800 rpm (200 g) für 10 min zentrifugiert.
- Der Überstand wird verworfen und das Pellet trocknen gelassen.
- Die Zellen werden in einem Milliliter kaltem 70 %igem Ethanol gut resuspendiert und für mindestens eine Stunde bei 4 °C gelagert.

## Messung der Zellzyklusverteilung

- Es werden 100 µl bis 300 µl alkoholische Zellsuspension entnommen.
- Der Alkohol wird bei 4 °C und 800 rpm (200 g) für 10 min abzentrifugiert und abdekantiert.
- Das Pellet wird trocken gelassen und die Zellen werden in 1 ml Cystain-Lösung aufgenommen und über Nacht bei 4 °C inkubiert.
- Am Durchflusszytometer (Partec II) können die Proben nun vermessen werden.
- Geräteparameter:
  - Einstellungen: FL3 – 350, FL4 – 300 bis 500, Anzahl der Zellen – 50.000, Flow – 3
- Probenmessung:
  - Mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> oder Spüllösung spülen
  - Gefäß abziehen, CLEAN, CLEAR
  - Nachdem die Pumpe fertig ist kann die Probe angehängt werden.
  - Speichern und Zellzyklus analysieren
  - Gefäß abziehen und CLEAN
  - Mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> spülen und CLEAR

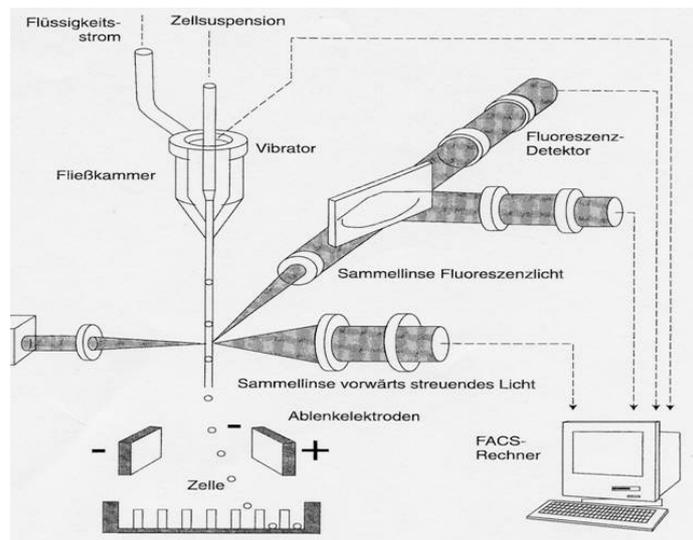


Abb. : Schematischer Aufbau eines Durchflusszytometers

## Auswertung

Die Auswertung erfolgt mit der Software Flowmax und die erhaltenen Werte werden nach mind. 3 Wiederholungen gemittelt.

## Interaktion mit doppelsträngiger DNA

### Interkalation in doppelsträngige DNA (Verdrängung von Ethidiumbromid)

Ethidiumbromid interkaliert in doppelsträngige DNA, fluoresziert dabei und dient als Referenz für dieses Testsystem, bei dem die Fähigkeit einer Substanz untersucht wird zwischen die Basenpaare der DNA zu interkalieren.

#### Benötigte Materialien und Puffer

<b>Materialien</b>	15 ml und 13 ml-Röhrchen, 96-Lochplatten	
<b>Pufferlösung</b>	9,3 mM NaCl	2 l
	2 mM Na-Acetat	
	0,1 mM EDTA	
	in H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> lösen und auf pH 7 einstellen, mit H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> auffüllen	
<b>EtBr-Puffer</b>	1 µM EtBr mit Pufferlösung ansetzen	nach Bedarf
<b>Kalbsthymus-DNA</b>	2 mg/ml Kalbsthymus-DNA in Pufferlösung	1 ml

#### Durchführung

- Pufferlösungen frisch ansetzen:
  - 1x EtBr-Puffer (1 µl/ml), ohne DNA
  - 2x EtBr-Puffer (2 µl/ml), ohne DNA
  - 2x EtBr-Puffer (2 µl/ml), mit 2x DNA (4,8 µl/ml)
- Die Substanzen und DMSO werden 1%ig in Puffer angesetzt
- Eine 96-Lochplatte wird leer vermessen (531 nm Extinktion und 595 nm Emmision) und befüllt:
  - EtBr-Puffer (1 µg/ml) ohne DNA: je 200 µl in A-H/1
  - EtBr-Puffer 2x ohne DNA: je 100 µl in F-H/2-10
  - Substanzen in Puffer: je 100 µl in A-H/2-10 (1 Spalte pro Konzentration)
  - EtBr-Puffer 2x mit 2x DNA: je 100 µl in A-E/2-10
- Platte vermessen.

- Die Leerwerte (leere Platte), Kontrollwerte (DMSO) und Eigenabsorption (Messwerte ohne DNA) werden zur Korrektur von den Messwerten abgezogen
- Die Auftragung der gemessenen Fluoreszenz gegen die Substanzkonzentration ergibt eine Kurve, aus welcher sich der EC<sub>50</sub>-Wert ermitteln lässt.

### **Bindung an die kleine Furche der DNA (Verdrängung von Hoechst H33258)**

Mit diesem Test kann die Fähigkeit einer Substanz bestimmt werden an die kleine Furche doppelsträngiger DNA zu binden. Der Fluoreszenzfarbstoff Hoechst H33258 bindet an die kleine Furche der DNA mit einer speziellen Affinität zu A/T-reichen Regionen und fluoresziert dabei und dient somit als Referenz.

#### **Benötigte Materialien und Puffer**

<b>Materialien</b>	15 ml und 13 ml-Röhrchen, 96-Lochplatten	
<b>Pufferlösung</b>	9,3 mM NaCl	2 l
	2 mM Na-Acetat	
	0,1 mM EDTA	
	in H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> lösen und auf pH 7 einstellen, mit H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> auffüllen	
<b>H33258-Puffer</b>	1 µM Hoechst H33258-Farbstoff mit Puffer- lösung ansetzen	nach Bedarf
<b>Kalbsthymus-DNA</b>	2 mg/ml Kalbsthymus-DNA in Pufferlösung	1 ml

#### **Durchführung**

- Pufferlösungen frisch ansetzen:
  - 1x H33258-Puffer (1 µl/ml), ohne DNA
  - 2x H33258-Puffer (2 µl/ml), ohne DNA
  - 2x H33258-Puffer (2 µl/ml), mit 2x DNA (4,8 µl/ml)
- Die Substanzen und DMSO werden 1%ig in Puffer angesetzt

- Eine 96-Lochplatte wird leer vermessen (355 nm Extinktion und 460 nm Emmission) und befüllt
  - H33258-Puffer (1x) ohne DNA: je 200 µl in A-H/1
  - H33258-Puffer (2x) ohne DNA: je 100 µl in F-H/2-10
  - Substanzen in Puffer: je 100 µl in A-H/2-10 (1 Spalte pro Konzentration)
  - H33258-Puffer (2x) mit 2x DNA: je 100 µl in A-E/2-10
- Platte vermessen.
- Die Leerwerte (leere Platte), Kontrollwerte (DMSO) und Eigenabsorption (Messwerte ohne DNA) werden zur Korrektur von den Messwerten abgezogen
- Die Auftragung der gemessenen Fluoreszenz gegen die Substanzkonzentration ergibt eine Kurve, aus welcher sich der EC<sub>50</sub>-Wert ermitteln lässt.

## Hemmung humaner Topoisomerasen

### Plasmidpräparation

Die Isolierung der Plasmide aus transformierten E.coli DH5α erfolgt mittels einem QIAGEN Plasmid Maxi Kit. Die Plasmide werden durch alkalische Lyse und Aufreinigung unter Verwendung von Anionentauscher-Harz (QIAGEN-Säule) bis zu 500 µg/Säule gewonnen.

### Benötigte Materialien und Puffer

<b>Materialien</b>	15 ml Röhrchen, 96-Lochplatten	
<b>LB-Medium</b>	10 g Trypton	1 l
<b>(Luria-Bertani-Medium)</b>	5 g Hefe-Extrakt	
	10 g NaCl	
	in H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> lösen und auf pH 7 einstellen, mit H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> auffüllen, autoklavieren	
<b>Resuspensionspuffer P1</b>	50 mM Tris/HCl, pH 8,0	
	10 mM EDTA	
	100 µg/ml RNase A	
<b>Lysepuffer P2</b>	200 mM NaOH	
	1 % SDS (w/v)	
<b>Neutralisationspuffer P3</b>	3 M Kaliumacetat, pH 5,5	

<b>Equilibrierungspuffer</b>	750 mM NaCl	
<b>QBT</b>	30 mM 3-[N-Morpholino]propansulfonsäure (MOPS), pH 7,0 15 % (v/v) Isopropanol 0,15 % Triton X-100	
<b>Waschpuffer QC</b>	1,0 M NaCl 50 mM MOPS, pH 7,0 15 % (v/v) Isopropanol	
<b>Elutionspuffer QF</b>	1,25 M NaCl 50 mM Tris/HCl, pH 8,5 15 % (v/v) Isopropanol	
<b>Cut-Puffer</b>	Eco RI+ Puffer (MBI Fermentas) G+ Puffer (Pvu II) (MBI Fermentas) Y+/Tango-Puffer (Rsa I) (MBI Fermentas)	
<b>TAE-Puffer 50x</b>	242 g Tris 57,1 ml Eisessig 100 ml 0,5 M EDTA, pH 8,0 pH 8,5 einstellen, mit H <sub>2</sub> O <sub>bideest</sub> auffüllen vor Gebrauch 1:50 mit H <sub>2</sub> O <sub>bideest</sub> verdünnen	11
<b>Agarosegel-Ladepuffer</b>	0,25 % (w/v) Bromphenolblau 30 % (v/v) Glycerol	10 ml
<b>Marker</b>	1 kb DNA-Leiter (New England Biolabs) 100 bp DNA-Leiter (New England Biolabs)	

### Durchführung

- In ein steriles Röhrchen werden 5 ml LB-Medium und 5 µl Ampillicin (50 mg/ml) gegeben und mit einigen Mikroliter eines Glycerolstockes von E.coli DH5α-pUC18-beimpft.
- Die Lösung wird für etwa 8 h bei 37°C und ca. 160 U/min im Schüttelinkubator inkubiert.
- 200 ml LB-Medium werden mit 200 µl Ampillicin (50 mg/ml) und 1 – 2,5 ml der Bakteriensuspension aus der Vorkultur versetzt und über Nacht (14-16 h) bei 37°C

und 160 U/min im Schüttelinkubator inkubiert. Die Kultur sollte dabei eine Zelldichte von  $3\text{-}4 \cdot 10^9$  Zellen pro ml erreichen (= Pelletgewicht von 3 g/l Medium)

- Die Bakterien werden zentrifugiert (15 Minuten, 6000 U/min, 4°C) und in einem sterilen Zentrifugengefäß geerntet.
- Der Überstand wird abgeschüttet und das Pellet wird in 10 ml Puffer P1 aufgenommen.
- 10 ml Puffer P2 werden zugegeben, vorsichtig gemischt und 5 min bei RT inkubiert
- 10 ml Puffer P3 zugeben und inkubiert 15 - 20 min auf Eis.
- Zentrifugation bei 20.000 g für 30 min bei 4°C
- QIAGEN-Säule wird mit 10 ml Puffer QBT äquilibriert.
- Der Überstand wird auf die Säule gegeben und 2 mal mit 30 ml Puffer QC gewaschen und anschließend die gebundene DNA mit 15 ml Puffer QF eluiert.
- Die DNA wird mit 10,5 ml Isopropanol präzipitiert
- Mischen und zentrifugieren bei 15.000 g für 30 min bei 4°C
- Das Pellet wird mit 5 ml 70 %igem Ethanol gewaschen und bei 15.000 g für 10 min zentrifugiert.
- Es wird 5 - 10 min getrocknet und anschließend in 500 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> resuspendiert.
- Die DNA wird bei 4°C gelagert.

### **Bestimmung der DNA-Konzentration**

Durch Messung der Absorption der Proben bei 260 und 280 nm mittels eines Nanodrop®-Spektrophotometers wird die DNA-Konzentration bestimmt. Dabei wird zunächst das Grundrauschen bei 340 nm bestimmt.

### **Durchführung**

- Es wird 1 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> auf das Gerät gegeben und als Blank gemessen (Software: ND-1000 V 3.2.1)
- Es wird 1 µl Probe auf das Gerät gegeben und gemessen

### Auswertung

Die Menge der in der Probe enthaltenen DNA wird mit Hilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes bestimmt, für das gilt:

$$c = A * e / b$$

c: Konzentration

A: Absorption in AU

e: wellenlängenabhängiger Extinktionskoeffizient in ng\*cm/ml

b: Strecklänge, die das Licht zurücklegt in cm

Gegeben sind:

A: gemessene Absorption

e bei 260 nm für doppelsträngige DNA: 50 ng\*cm/ml

b für das Nanodrop<sup>®</sup>-Spektrometer: 1,0 mm (Werte normalisiert auf 1,0 cm)

Daraus ergibt sich folgende Gleichung zu Bestimmung des DNA-Gehalts:

$$A_{260} * 50 \text{ ng/ml} = \text{DNA-Gehalt in ng/ml}$$

Der Quotient  $A_{260} / A_{280}$  gibt Auskunft über die Reinheit. Ist er 1,7 oder größer ist die Probe rein.

Überprüfung des amplifizierten Plasmids durch Restriktionsverdau und Auftrennung

### Restriktionsverdau

Mittels Restriktionsverdau wird überprüft, ob das amplifizierte Plasmid tatsächlich isoliert werden konnte. Dazu werden drei verschiedene Restriktionsenzyme eingesetzt, die das Plasmid an unterschiedlichen Stellen schneiden.

Menge [in µl]	Unverdaut	Pvu II	Eco RI	Rsa I
Wasser	9,7	11,5	12,2	11,5
Cut-Puffer	-	1,5	1,5	1,5
Plasmid	0,3	1	0,3	1
Enzym	-	1	1	1
6 x Ladep.	2	3	3	3

- Der Restriktionsverdau erfolgt 60 min bei 37°C im Wasserbad.
- 6 µl Gelladepuffer hinzufügen, gut mischen und anschließend 15 µl je Geltasche auftragen.

### Das Gel

- 1,3 g Agarose werden in 100 ml TAE (1x) erhitzt
- Abkühlen auf ca. 60 °C
- 1,5 µg/ml Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml) hinzugeben
- Das Gel wird in die Kammer gegossen.
- Nach Auftrennung erfolgt die Detektion im UV-Licht (560 nm, 1/100 sec).

### RNA Detektion mit Agilent 6000 Pico Kit

Alternativ zur Trennung der RNA mittels Agarosegelelektrophorese kann auch eine Mikrogelelektrophorese mit dem Agilent 6000 durchgeführt werden.

### Durchführung

- Alle Reagenzien 30 min bei RT äquilibrieren
- Gel ansetzen
  - 550 µl (rot) Gel auf den Filter geben
  - Zentrifugation: 1.500 xg, 10 min, RT
  - 65 µl in ein Reaktionsröhrchen geben
  - Pico dye Konzentrat (blau) 10 sec vortexen und runterzentrifugieren

- 1  $\mu\text{l}$  zu den 65  $\mu\text{l}$  Gel geben
- Gut vortexen
- Zentrifugation: 13.000  $\times g$ , 10 min, RT
- Chip in Ladestation spannen und beladen (s.a. Abb. ):
  - 9  $\mu\text{l}$  Gelmix in (G), schließen, herunterdrücken, 30 sec warten, lösen
  - 9  $\mu\text{l}$  Gelmix in [G]
  - Rest verwerfen
  - 9  $\mu\text{l}$  Angleichlösung (weiß) in CS
  - 5  $\mu\text{l}$  Marker (**grün**) in alle 11 Probenlöcher und in das Loch für die Leiter
  - Proben und Leiter 2 min bei 70 °C denaturieren und anschließend auf Eis abkühlen
  - 1  $\mu\text{l}$  Leiter in das Loch für die Leiter
  - Je 1  $\mu\text{l}$  Probe in die Probenlöcher. Falls weniger als 11 Proben vorhanden sind 1  $\mu\text{l}$  Marker in die entsprechenden Löcher geben
- Chip 1 min bei 2.400 rpm auf dem Vortex mit Aufsatz für die Mikrotiterplatte vortexen.
- Chip in das Gerät legen und messen
- Die Auswertung erfolgt durch die Gerätesoftware

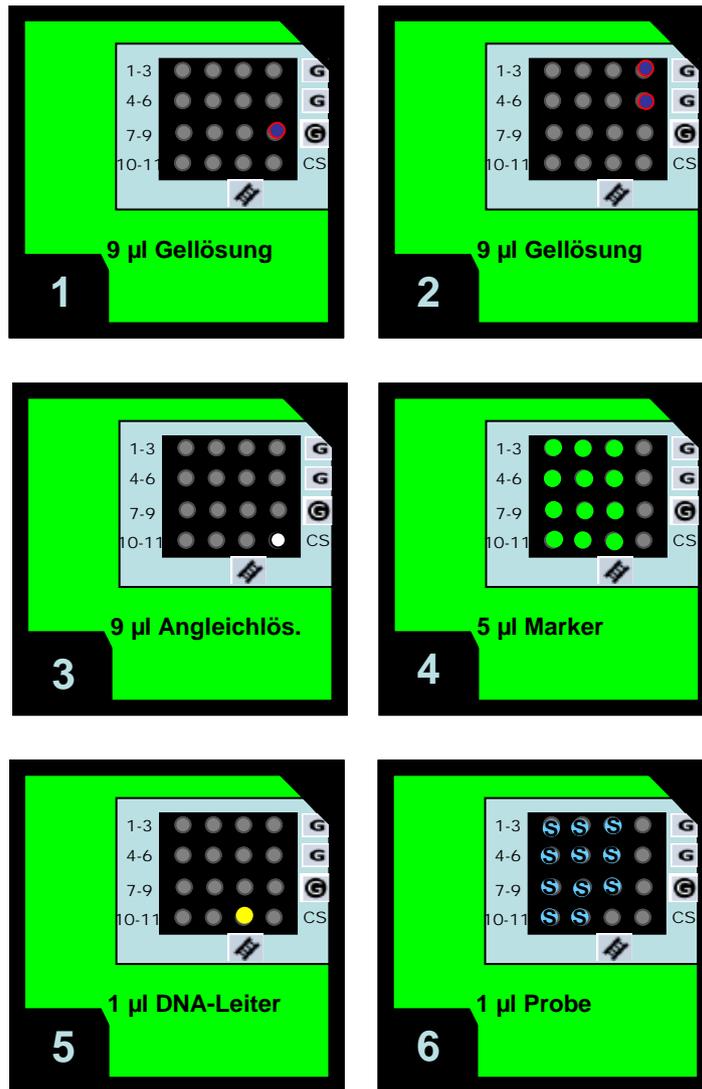


Abb.: Chipbefüllung des Agilent 6000 RNA Pico Kits

## Herstellung eines Kernextraktes aus MCF-7 Zellen

Im Zellkern ist der größte Anteil an Topoisomerasen in der Zelle lokalisiert. Durch die Gewinnung von Zellkernextrakt kann kostengünstig ein topoisomerasereicher Extrakt gewonnen werden, welcher zur Bestimmung der Modulation der Topoisomerase I-Aktivität eingesetzt werden kann.

### Benötigte Materialien und Puffer

<b>Materialien</b>	15 ml Röhrchen (für Zentrifugation)	
<b>PBS</b>	10 x PBS	10 ml
	1710 mM NaCl	
	100 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	
	34 mM KCl	
	18 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	
	pH 7,4, mit H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> auffüllen	
	1 x PBS autoklavieren	
<b>Lysepuffer</b>	0,3 M Saccharose	100 ml
	0,5 mM EGTA pH 8 (5 M - Stammlösung)	
	60 mM KCl (1 M KCl - Stammlösung)	
	15 mM NaCl (5 M - Stammlösung)	
	15 mM HEPES pH 7,5 (60 mM - Lösung)	
	150 µM Spermin (15 mM - Stammlösung)	
	50 µM Spermidin (10 mM - Stammlösung)	
	mit H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> auf 100 ml auffüllen	
<b>Lysepuffer mit Triton</b>	Lysepuffer : Triton X-100	ca. 15ml
	13,5 : 1	
<b>Extraktionslösung</b>	5 mM Kaliumphosphat pH 7,5 (50 mM)	20 ml
	10 mM NaCl (5 M - Stammlösung)	
	1 µl/ml β-Mercaptoethanol	
	10 µl/ml 100mM PMSF in DMSO	
	mit H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> auf 100 ml auffüllen	

### Durchführung

- Zwischen  $10^6$  und maximal  $3 \times 10^8$  MCF-7-Zellen werden aus der Zellkultur entnommen und die genaue Zellzahl wird mittels Trypanblaufärbung bestimmt.
- Die Zellsuspension wird bei 150 – 200 g für 5 min bei 20 °C zentrifugiert
- Das Pellet wird mit unsterilem 1 x PBS gewaschen und unter den oben genannten Bedingungen werden die Zellen wieder abzentrifugiert.
- Das Pellet wird in 7,5 ml eiskaltem Lysepuffer resuspendiert
- Es werden 500 µl Lysepuffer mit Triton X-100 zugegeben.
- Es folgt die Lyse: 15 min bei 4 °C.
- Zentrifugation bei 300 g für 5 min bei 4 °C
- Das Pellet wird in 500 µl Lysepuffer resuspendiert.
- Mittels Trypanblaufärbung wird die Anzahl der Zellkerne bestimmt.
- Die Kerne werden 5 min bei 3.000 rpm bei 4 °C abzentrifugiert
- Das Pellet wird in Extraktionspuffer resuspendiert und auf eine Kernzahl von  $3 \times 10^7$  Kerne/ml eingestellt.
- Zur Lyse der Kerne wird langsam 10 % (v) 5 M NaCl zugegeben und 15 – 20 min bei 4 °C präzipitieren gelassen.
- Der Rohextrakt wird 10 min bei 14.000 rpm zentrifugiert und der Überstand in ein neues Gefäß überführt.
- Lagerung des Extraktes bei -20 °C im 1,5 fachen Volumen an Glycerol (86 %)
- Aliquotieren (20 µl je Aliquot)

## Hemmung der katalytischen Aktivität der Topoisomerase I (Relaxationsassay)

Mit dem Relaxationsassay kann die Fähigkeit einer Substanz oder eines Substanzgemischs getestet werden die Topoisomerase I zu hemmen. Das Enzym hat die Fähigkeit durch Einführung eines Einzelstrangbruchs im Zuckerphosphat-Rückgrat der DNA superspiralisierte Plasmid-DNA zu entspannen. Mittels Agarosegelelektrophorese können die beiden DNA-Formen von einander getrennt werden.

### Benötigte Materialien und Puffer

<b>Materialien</b>	Gelkammer, Kämme	
<b>pUC 18</b>	15 µl Aliquot + 45 µl H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	60 µl
<b>Kernextrakt</b>	20 µl Aliquot + 180 µl H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	200 µl
<b>Salzmix I</b>	100 mM MgCl	1 ml Aliquote
	5 mM DTT (1,4 Dithiotreitol)	
	5 mM EDTA	
	0,3 mg/ml BSA	
<b>Trispuffer</b>	100 mM Tris/HCl, pH 7,9	2 ml
<b>Kaliumchloridlösung</b>	1 M KCl in H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	10 ml
<b>Proteinase K</b>	10 mg PK pro 1 ml H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	60 µl Aliquote
<b>SDS – Lösung</b>	5 % SDS (w/v) in H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	1 ml Aliquote
<b>TAE – Puffer (50x)</b>	242 g Tris	1 l
	57,1 ml Eisessig	
	100 ml 0,5 M EDTA, pH 8,0	
	pH 8,5 einstellen, mit H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> auffüllen	
	vor Gebrauch 1:50 mit H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> verdünnen	
<b>Agarosegel</b>	1 % (w/v) Agarose in 1 x TAE – Puffer	100 ml
<b>Ladepuffer</b>	0,25 % (w/v) Bromphenolblau	10 ml
	30 % (v/v) Glycerol	
<b>EtBr-Bad</b>	1 µg/ml EtBr H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	400 ml

### Pipettierschema

	Kontrolle	Substanz
H <sub>2</sub> O	17 µl	13 µl
Salzmix*	3 µl	3 µl
KCl*	3 µl	3 µl
Trispuffer*	3 µl	3 µl
pUC	3 µl	3 µl
DMSO/Substanzlösung	1 µl	1 µl
Kernextrakt	-	4 µl

\* Es wird ein 1:1:1 Gemisch hergestellt und dann 9 µl davon in die Probe pipettiert

### Inkubation und Detektion

- Die Proben werden bei 37 °C für 30 min inkubiert.
- Durch Zugabe von je 3 µl SDS-Lösung und Proteinase K – Lösung sowie wiederholter Inkubation für 30 min bei 37 °C wird das Enzym denaturiert.
- Die Proben werden mit 6 µl Ladepuffer versetzt.
- 17 µl jeder Probe werden auf das Gel aufgetragen.
- Die Elektrophorese erfolgt bei 60 V für 3 h.
- Das Gel wird im Ethidiumbromidbad 20 min gefärbt.
- Dann wird 5 min. im Wasserbad gewaschen.
- Die Detektion erfolgt mit der LAS 3000 durch Fluoreszenzmessung bei 560 nm (1/60 sec).

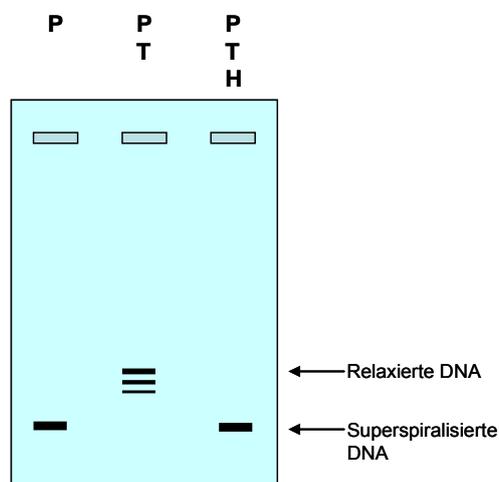


Abb.: Relaxationsassay. P, Plasmid-DNA; T, Topoisomerase I; H, Hemmstoff der Topoisomerase I

## Hemmung der katalytischen Aktivität der Topoisomerase II (Decatenierungsassay)

Die verwendete Kinetoplasten DNA zeichnet sich dadurch aus, dass sich die Minizirkel ausschließlich durch Topoisomerase II in Anwesenheit von ATP trennen lassen.

### Benötigte Materialien und Puffer

<b>Materialien</b>	Gelkammer, Kämme	
<b>kDNA</b>	s. Chemikalienliste	
<b>Topoisomerase II</b>	1 : 50 in Verdünnungslösung	200 µl
<b>Topoisomerase- Verdünnungslösung</b>	50 mM Tris/HCl, pH 7,5 400 mM NaCl 1 mM DTT 50 % (v/v) Glycerol	10 ml
<b>Salzmix II</b>	50 mM MgCl 5 mM DTT (1,4 Dithiotreitol) 5 mM EDTA 10 mM ATP 0,3 mg/ml BSA	1 ml Aliquots
<b>Trispuffer</b>	500 mM Tris/HCl, pH 7,9	2 ml
<b>Kaliumchloridlösung</b>	1 M KCl in H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	10 ml
<b>Proteinase K</b>	1 mg PK pro 1 ml 10 % (w/v) SDS-Lösung	80 µl Aliquote
<b>TAE – Puffer (50x)</b>	242 g Tris 57,1 ml Eisessig 100 ml 0,5 M EDTA, pH 8,0 pH 8,5 einstellen, mit H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> auffüllen vor Gebrauch 1:50 mit H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> verdünnen	1l
<b>Agarosegel</b>	1 % (w/v) Agarose in 1 x TAE – Puffer	100 ml
<b>Ladepuffer</b>	0,25 % (w/v) Bromphenolblau 30 % (v/v) Glycerol	10 ml
<b>EtBr-Bad</b>	1 µg/ml EtBr in H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	

### Pipettierschema

<b>Lösungen [µl]</b>	<b>kDNA</b>	<b>KDNA + Topo II + Hemmstoff</b>
<b>H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub></b>	19,4	15,4
<b>Saltmix II*</b>	3	3
<b>Tris HCl*</b>	3	3
<b>KCl (1M)</b>	3,6	3,6
<b>kDNA (191 ng/µl)</b>	1	1
<b>Hemmstoff/DMSO</b>	-	1
<b>Topo II α oder β</b>	-	1
<b>PK (10% SDS)</b>	3	3
<b>Ladepuffer</b>	5	5

\*es wird ein 1:1 Gemisch hergestellt und davon 6 µl in die Probe gegeben.

### Inkubation und Detektion

- Die Proben werden bei 37 °C für 60 min inkubiert.
- Durch Zugabe von 3 µl Proteinase K – Lösung und wiederholter Inkubation für 30 min bei 37 °C wird das Enzym denaturiert.
- Die Proben werden mit 5 µl Ladepuffer versetzt und 19 µl jeder Probe werden auf das Gel aufgetragen.
- Die Elektrophorese erfolgt bei 60 V für 3 h.
- Das Gel wird im Ethidiumbromidbad 20 min gefärbt.
- Dann wird 5 min im Wasserbad gewaschen.
- Die Detektion erfolgt mit der LAS 3000 durch Fluoreszenzmessung bei 560 nm.

## Unterscheidung zwischen Topoisomerase-II-gift und katalytischem Inhibitor der Topoisomerase II (Cleavage Assay)

*Mit dem Cleavage Assay können die linearisierte Form der DNA und die genickte Form, sowie superspiralisierte und verdrillte Form von einander getrennt werden.*

### Benötigte Materialien und Puffer

<b>Materialien</b>	Gelkammer, Kämme	
<b>10 nM pUC 18 (7 ng/μl)</b>	15 μl Aliquot + 60 μl 1 x Assaypuffer → 3,6 μl = 10 nM	45 μl
<b>Topoisomerase II</b>	1 : 5 Verdünnung	
<b>Kaliumchloridlösung</b>	1 M KCl in H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	10 ml
<b>5 x Assaypuffer</b>	50 mM Tris/HCl, pH 7,9 250 mM NaCl 0,5 mM EDTA 250 mM MgCl <sub>2</sub> 12,5 % (v/v) Glycerol Lagerung bei 4 °C Vor Gebrauch 1 : 5 verdünnen	5 ml
<b>ATP</b>	20 mM ATP-Stammlösung, vor Gebrauch 1 : 5 mit 1 x Assaypuffer verdünnen	2 ml
<b>Na<sub>2</sub>-EDTA</b>	375 mM Na <sub>2</sub> -EDTA (pH 8,0)	10 ml
<b>SDS</b>	10 % (w/v) SDS-Lösung	10 ml
<b>Proteinase K</b>	1 mg/ml PK in 10 % SDS	60 μl Aliquote
<b>TAE – Puffer (50x)</b>	242 g Tris 57,1 ml Eisessig 100 ml 0,5 M EDTA, pH 8,0 pH 8,5 einstellen, mit H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> auffüllen vor Gebrauch 1:50 mit H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> verdünnen	1 l
<b>Agarosegel</b>	1 % (w/v) Agarose in 1 x TAE – Puffer Mit 0,5 μg/ml EtBr	100 ml

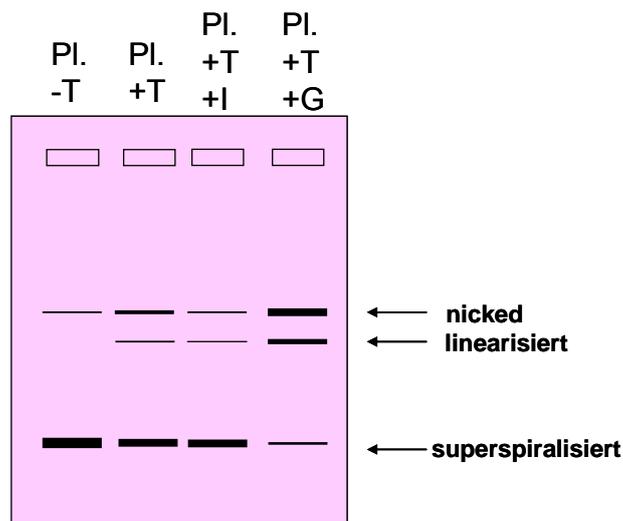
<b>Ladepuffer</b>	0,25 % (w/v) Bromphenolblau 30 % (v/v) Glycerol	10 ml
-------------------	--	-------

**Pipettierschema**

	<b>Kontrolle</b>	<b>Substanz</b>
<b>1 x Assaypuffer</b>	8 µl	7 µl
<b>1 x Assaypuffer mit ATP</b>	4 µl	4 µl
<b>1 M KCl</b>	1 µl	1 µl
<b>pUC 18 (ca. 200 ng)</b>	3,6 µl	3,6 µl
<b>DMSO/Substanzlösung</b>	-	1 µl
<b>Topoisomerase II</b>	3,4 µl	3,4 µl

**Inkubation und Detektion**

- Die Proben werden bei 37 °C für 6 min inkubiert.
- Durch Zugabe von 1 µl EDTA-Lösung und 4 µl Proteinase K – Lösung und Inkubation für 30 min bei 45 °C wird das Enzym denaturiert.
- Die Proben werden mit 2 µl Ladepuffer versetzt und 20 µl jeder Probe werden auf das Gel aufgetragen.
- Die Elektrophorese erfolgt bei 60 V für 3 h.
- Die Detektion erfolgt mit der LAS 3000 durch Fluoreszenzmessung bei 560 nm.



**Abb.:** Relaxationsassay. PI, Plasmid-DNA; T, Topoisomerase II; I, katalytischer Inhibitor der Topoisomerase II; G, Topoisomerase-II-gift

## Immunodetektion von Komplexen zwischen DNA und Enzymen (ICE – Bioassay)

Mit dem ICE-Bioassay können sowohl *in vitro* als auch *in vivo* Komplexe zwischen DNA und Topoisomerasen detektiert werden. Mit diesem Testsystem kann so festgestellt werden, ob eine Substanz in HT29-Zellen als Topoisomerasegift oder katalytischer Topoisomerasehemmstoff ist. Außerdem kann gezeigt werden, ob eine Substanz, die als katalytischer Hemmstoff die Stabilisierung von DNA-Topoisomerase-Intermediaten verhindern oder vermindern kann indem ein Koinkubationsexperiment durchgeführt wird. Dafür werden die behandelten Zellen lysiert und über einen Cäsiumchloridgradienten wird die DNA von den leichteren Zellbestandteilen (z.B. freie Proteine) getrennt. Die Gradienten werden fraktioniert und auf eine Nitrozellulosemembran gegeben (slot blot). Anschließend können die Topoisomerasen immunochemisch gemessen werden.

Es werden zweimal 1,2 Mio. HT29 – Zellen/pro Konzentration in 10 ml Kulturmedium ausgestreut und für 72 Stunden anwachsen gelassen. Die Inkubation geschieht in serumfreien Medium für 1 h (1 % Lösungsmittel) , bzw. 1,5 h (0,1 % Lösungsmittel) bei Kombinationsversuchen.

### Benötigte Materialien und Puffer

<b>Materialien</b>	Polyallomerröhrchen, Insulinspritzen, Kanülen, Whatmanpapiere, Membran	
<b>Lysepuffer</b>	1 % Sarcosylat in TE-Puffer	100 ml
<b>1-basischer Posphatpuffer</b>	1 M Stammlösung: einbasisches Na <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	100 ml
<b>2-basischer Phosphatpuffer</b>	1 M Stammlösung: zweibasisches Na <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	100 ml
<b>1 M Phosphatpuffer</b>	1 : 1 – Mischung von 1- und 2-basischem Phosphat- puffer;	100 ml 400 ml
<b>25 mM Phosphatpuffer</b>	1 : 40 verdünnen	
<b>TE – Puffer</b>	10 mM Tris/HCl, pH 8,0 1 mM EDTA	2 l

	Mit H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> auffüllen	
<b>Cäsiumchloridlösung</b>	120 g CsCl + 70 ml TE – Puffer	70 ml
	Für einen Gradienten :	
	A: 1850 µl CsCl + 150 µl TE-Puffer	
	B: 1600 µl CsCl + 400 µl TE-Puffer	
	C: 1100 µl CsCl + 900 µl TE-Puffer	
	D: 900 µl CsCl + 1100 µl TE-Puffer	
<b>10 x TBST – Puffer</b>	200 mM Tris/HCl, pH 7,5 1,37 M NaCl 1 % (v/v) Tween-20 Lagerung bei 4 °C	2 l
<b>Blockierreagenz</b>	5 % (w/v) Milchpulver in 1 x TBST	250 ml
<b>Erstantikörper</b>	1 : 500 in Blockierreagenz	5 ml/Memb.
<b>Anti-Topoisomerase II</b>		
<b>Zweitantikörper</b>	1 : 2000 in Blockierreagenz	5 ml/Memb.
<b>Anti-Rabbit-HRP-IgG</b>		

### Zellyse und Ultrazentrifugation

- Das Inkubationsmedium wird verworfen und die Zellen mit 2 ml 1 x PBS gewaschen.
- 3 ml Lysepuffer werden auf jede Platte pipettiert, die Zellsuspension in ein 15 ml – Röhrcchen überführt und die zusammengehörenden Zellsuspensionen (2 Petrischalen) vereinigt.
- Die hochviskose Zellsuspension wird durch eine Kanüle (Ø 13nm) gezogen bis sie nicht mehr viskos ist.
- 4 ml Zellsuspension werden auf den vorbereiteten Cäsiumchloridgradienten (2 ml jeder Lösung, A-D) pipettiert.
- Die Röhrcchen werden mit Mineralöl überschichtet und ausgewogen.
- Die Ultrazentrifugation mit dem Schwingrotor TST 41.14 erfolgt für 22 bis 24 Stunden bei 23.000 rpm (100.000 g) und 20 °C.

### Fraktionierung, Blotten und Blockieren

- Die Whatmanpapiere und die Membran werden in 25 mM Phosphatpuffer bei 4 °C äquilibriert.
- Die Polyallomerröhrchen werden in eine Halterung geklemmt und an der Unterseite mit einer Kanüle angestochen.
- Es werden mit Insulinspritzen 20 Fraktionen á ca. 300 µl entnommen.
- Von jeder Fraktion werden 100 µl mit 100 µl 25 mM Phosphatpuffer gemischt.
- Diese 200 µl werden mit Hilfe einer Slot-Blot-Apparatur auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und mit Vakuum werden die Zellbestandteile auf die Membran geblottet.

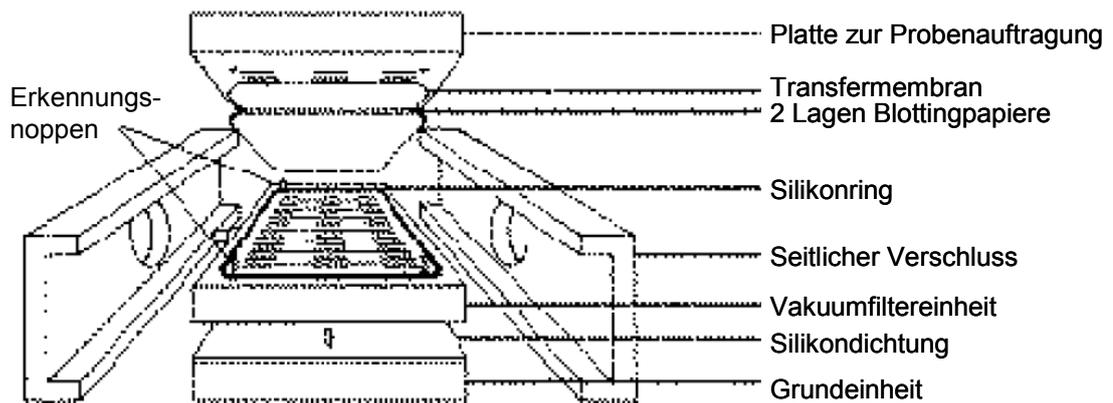


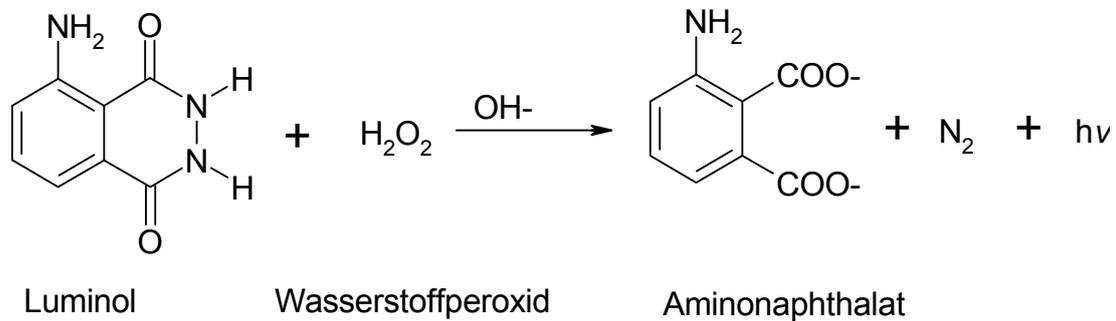
Abb. : Aufbau der Slot-Blot-Apparatur:

- Die Membran wird zunächst in 1 x TBST – Puffer 10 min. bei RT äquilibriert.
- Anschließend wird sie für 3 h in Blockierreagenz bei RT geschwenkt.

### Antikörperinkubation und Chemolumineszenzdetektion

- Die Membran wird in Folie unter Zugabe von 5 ml Erstantikörperlösung eingeschweißt und bei 4 °C über Nacht inkubiert.
- Die Membran wird dreimal 5 min mit 1 x TBST – Puffer gewaschen.
- Anschließend erfolgt die Zweitantikörperinkubation bei RT für 2 Stunden.
- Es wird wieder dreimal 5 min mit 1 x TBST – Puffer gewaschen.

- Durch Zugabe von  $\text{H}_2\text{O}_2$  und Luminol wird die Chemolumineszenzreaktion gestartet und die Chemolumineszenz wird mit der LAS 3000 detektiert.



**Abb. :** Chemolumineszenzreaktion. Luminol reagiert mit Wasserstoffperoxid zu Aminonaphthalat, Stickstoff und Licht

### Bestimmung des DNA-Gehalts der DNA-reichen Fraktionen

Die DNA ist ein sehr großes und schweres Molekül und sollte daher in den ersten Fraktionen (1-10) enthalten sein. Um die Messwerte für die Topoisomerase auf den DNA-Gehalt der Probe normalisieren zu können muss der DNA-Gehalt bestimmt werden. Dies geschieht am Nanodrop<sup>®</sup>-Spektrophotometer. Die Durchführung ist in Kapitel xy beschrieben.

### Auswertung

- Die erhaltenen Chemolumineszenzwerte für das Topoisomerasegift in den DNA-reichen Fraktionen werden auf den DNA-Gehalt bezogen und gemittelt. Dies ergibt den Kontrollwert (100 % Giftung)
- Die Chemolumineszenzwerte der Co-inkubierten Proben in den DNA-reichen Fraktionen werden ebenfalls auf den DNA-Gehalt bezogen, gemittelt und in Bezug zur Kontrolle gesetzt.

## Einzelzellgelelektrophorese (Cometassay)

Mittels Einzelzellgelelektrophorese können DNA-Schäden gemessen werden. Die Methode ermöglicht die Messung von DNA-Strangbrüchen durch Einbetten der Zellen in Agarose auf Objektträgern, Gelelektrophorese und Anfärben der DNA mit Ethidiumbromid. Die DNA-Fragmente wandern im elektrischen Feld, während die intakte DNA zu groß ist und nicht wandern kann. So entsteht das Bild eines Kometen unter dem Fluoreszenzmikroskop und mit entsprechender Software kann die Schweifintensität ermittelt werden, welche direkt proportional zu Strangbruchrate ist. Durch Behandlung der Zellen mit dem Enzym Formamidopyrimidin-DNA-Glykosylase (FPG) kann auch ein Teil der oxidativ entstanden DNA-Schäden gemessen werden, die sogenannten „FPG-sensitiven Stellen“, wie 8-OH-dG und Formamidopyrimidine.

Es werden 300.000 HT29-Zellen in 5 ml DMEM-Kulturmedium ausgestreut und für 48 Stunden anwachsen gelassen. Die Inkubation erfolgt serumfrei für eine bzw. bei Kombinationsversuchen für 1,5 Stunden.

### Benötigte Materialien und Puffer

<b>Material</b>	Objektträger (einseitig ganz mattiert), Deckgläser (24x24), Zellschaber, OT-Inkubationskammer, OT-Box, Elektrophoresekammer	
<b>PBS für Agarose</b>	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 8,1 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1 l
<b>Normal melting agarose (NMA)</b>	0,5 % (w/v) in PBS für Agarose	50 ml
<b>Low melting agarose (LMA)</b>	0,8 % (w/v) in PBS für Agarose	50 ml
<b>PBS</b>	10 x PBS 1710 mM NaCl 100 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 34 mM KCl 18 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 7,4, mit H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> auffüllen 1 x PBS autoklavieren	50 ml

## Material und Methoden

---

<b>Trypsin</b>	500 mg Trypsin (Rinderpankreas, 3,6 U/mg) 250 mg EDTA 100 ml 10 x PBS mit H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> auffüllen, über Nacht auf Eis rühren, pH-Wert überprüfen (7,0 bis 7,4), steril filtrieren (Porengröße: 0,22 µm) und aliquotieren (5 ml), Lagerung bei -20 °C	5 –20 ml
<b>DMEM</b>	10 % FKS, 1 % Penicillin/Streptomycin	50 ml
<b>Trypanblaulösung</b>	0,4 % Trypanblau 0,81 % NaCl 0,06 % KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	
<b>Lysepuffer-Stammlösung</b>	2,5 M NaCl 0,1 M EDTA 10 mM Tris pH 10 mit NaOH einstellen und auffüllen	2 l
<b>Lysepuffer</b>	89 % (v/v) Lysepuffer-Stammlösung 1 % (v/v) Triton-X 100 10 % (v/v) DMSO (p.a.)	100 ml
<b>FPG-Puffer</b>	10 x Puffer: 400 mM HEPES 1 M KCl 5 M EDTA 2 mg/ml BSA pH 8,0 einstellen mit KOH und 50 ml-Aliquots bei -20 °C lagern vor Gebrauch 1:10 mit H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> verdünnen	50 ml          500 ml
<b>FPG-Lösung</b>	Enzym 1:3000 mit FPG-Puffer verdünnen	10 µl Al.
<b>Elektrophoresepuffer</b>	60 ml 10 M NaOH 10 ml 200 mM EDTA Mit H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub> auffüllen	2 l
<b>Neutralisationspuffer</b>	0,4 M Tris pH 7,5 mit HCl einstellen	2 l
<b>EtBr-Lösung</b>	10 mg/ml Stammlösung Gebrauchslösung: 20 µg/ml	10 ml 1 – 3 ml

### Vorbereiten der Objektträger und des Lysepuffers

- 40 µl NMA-Lösung auf einem OT mit einem zweiten OT glatt ausstreichen und aushärten (auf Heizplatte).
- Zweimal 65 µl NMA-Lösung auf den OT pipettieren und je ein Deckglas luftblasenfrei drauflegen.
- Bei 4 °C aushärten lassen und bis zum Gebrauch in die OT-Box stellen.
- 100 ml Lysepuffergebrauchslösung nach Rezept herstellen und in OT-Inkubationskammer füllen, Lagerung bei 4 °C bis zum Gebrauch

### Zellaufarbeitung

- Das Medium wird verworfen und die Zellen mit 2 ml PBS gewaschen.
- Mit 0,5 ml Trypsin werden die Zellen für 1,5 min bei 37 °C im Brutschrank vom Plattenboden abgelöst.
- Durch Zugabe von 0,5 ml serumhaltigem Medium wird der Trypsinverdau gestoppt.
- Die Zellen werden mit einem Zellschaber vom Plattenboden abgelöst und die Zellsuspension wird in ein 2 ml Eppendorfreaktionsgefäß überführt (auf Eis!).
- Die Petrischale wird nochmals mit 0,5 ml serumhaltigen Medium abgespült.
- Die Zellzahl und Viabilität jeder Probe wird mittels Trypanblautest bestimmt. Viabilität = Anzahl der lebenden Zellen/Gesamtzahl der Zellen [%] ( muss immer  $\geq 80$  % sein)
- Zweimal 75.000 Zellen jeder Zellsuspension werden bei 4 °C für 10 min bei 2.000 rpm abzentrifugiert. (Bei FPG-Behandlung doppelter Ansatz, d.h. viermal 75.000 Zellen abzentrifugieren für je zwei OT pro Probe)
- Die OT werden kodiert (Blindversuch) und die Deckgläser vorsichtig entfernt.
- Die Zellen werden in 65 µl LMA (2-3 Hübe) resuspendiert und auf die NMA gegeben.
- Die Schicht wird mit einem Deckglas luftblasenfrei abgedeckt und bei 4 °C aushärten gelassen.

### **Zellyse**

- Die Deckgläser werden von den OT entfernt.
- Die OT werden in die vorbereitete Inkubationskammer mit Lysepuffer gestellt und die Zellen werden für mind. 1 h bei 4 °C lysiert.

### **Enzymbehandlung**

- Ein 50 ml Aliquot des 10 x Enzypuffers wird aufgetaut und verdünnt.
- 3 ml des Puffers werden zur Fpg-inkubation entnommen.
- Mit dem restlichen Puffer werden die OT dreimal 5 min bei 4 °C äquibriert.
- Die benötigte Menge an Enzym wird aufgetaut und mit Enzypuffer 30fach verdünnt.
- Die eine Hälfte der Proben wird mit 50 µl FPG-Lösung (pro Agaroseauflage), die andere Hälfte mit 50 µl Enzypuffer im Brutschrank für 30 min. inkubiert.

### **Alkalisierung, Elektrophorese, Neutralisation und Färbung**

- Die OT werden in die Elektrophoresekammer gelegt und es wird 20 min mit Elektrophoresepuffer auf Eis alkalisiert.
- Anschließend wird die Elektrophorese bei 25 V (konstant) und 300 mA (Einstellen der Stromstärke durch Zugabe oder Abnahme des Puffers) für 20 min auf Eis durchgeführt.
- Die OT werden dreimal 5min mit Neutralisationspuffer in der Inkubationskammer neutralisiert.
- Die Proben werden mit je 40 µl EtBr-Lösung/Agaroseauflage angefärbt und mit einem Deckglas abgedeckt.
- Die Proben können in einer OT-Box bei 4 °C zwei bis drei Tage gelagert werden bis sie am Fluoreszenzmikroskop mit der Software COMET III ausgewertet werden.

### *Wirkung einer Substanz auf die Genexpression (Mikroarray)*

Mit Hilfe eines Mikroarrays kann der Einfluss einer Substanz auf die Genexpression vieler Proteine gleichzeitig bestimmt werden.

#### **Benötigte Materialien und Puffer**

<b>Material</b>	Objektträger (einseitig ganz matriert), Deckgläser (24x24), Zellschaber, OT-Inkubationskammer, OT-Box, Elektrophoresekammer	
<b>RLT-Arbeitslösung</b>	600 µl RLT-Puffer pro Ansatz	3 ml
	10 µl β-Mercaptoethanol pro ml Ethanol	
<b>70 % Ethanol</b>	70 µl EtOH + 30 µl RNase freies Wasser	3,5 ml
<b>Array-Kit</b>	Oligo-GeArray-OHS-802, 440 Gene	
	Pufferkomponenten:	
	RLT-Puffer	
	RW1-Puffer	
	RPE-Puffer	

#### **RNA-Präparation**

- Zellen behandeln und inkubieren analog zur Untersuchung der Zellzyklusverteilung.
- Medium absaugen.
- 600 µl RLT-Arbeitslösung auf die Zellen geben.
- Lysat sammeln und in ein steriles Gefäß (Kit) geben und mischen.
- 600 µl 70 % EtOH dazugeben und mischen.
- 700 µl auf die Säule in einem 2 ml-Gefäß (Kit) geben.
- 15 sec bei 8.000 g und RT zentrifugieren.
- 700 µl RW1-Puffer auf die Säule geben.
- 15 sec bei 8000 g und RT zentrifugieren.
- Säule auf ein neues 2 ml-Gefäß geben.
- 500 µl RPE-Puffer auf die Säule geben.
- 15 sec bei 8.000 g und RT zentrifugieren.

- 500 µl RPE-Puffer auf die Säule geben.
- 2 min bei 8.000 g und RT zentrifugieren.
- Säule auf ein neues 2 ml-Gefäß geben.
- 1 min bei Höchstgeschwindigkeit und RT zentrifugieren.
- Säule auf ein 1,5 ml-Gefäß geben.
- 30 – 50 µl RNase-freies Wasser direkt auf die Membran geben.
- 1 min bei 8.000 g und RT zentrifugieren.
- Die letzten beiden Schritte einmal wiederholen.
- Probe auf Eis geben.
- RNA-Gehalt der Probe am Nanodrop<sup>®</sup>-Spektrophotometer bestimmen.

### **Bestimmung des RNA-Gehalts**

Durch Messung der Absorption der Proben bei 260 und 280 nm mittels eines Nanodrop<sup>®</sup>-Spektrophotometers wird die RNA-Konzentration bestimmt. Dabei wird zunächst das Grundrauschen bei 340 nm bestimmt.

### **Durchführung**

- Es wird 1 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> auf das Gerät gegeben und als Blank gemessen (Software: ND-1000 V 3.2.1)
- Es wird 1 µl Probe auf das Gerät gegeben und gemessen

### **Auswertung**

Die Menge der in der Probe enthaltenen RNA wird mit Hilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes bestimmt, für das gilt:

$$c = A * e / b$$

c: Konzentration

A: Absorption in AU

e: wellenlängenabhängiger Extinktionskoeffizient in ng\*cm/ml

b: Strecklänge, die das Licht zurücklegt in cm

Gegeben sind:

A: gemessene Absorbtion

e bei 260 nm für RNA: 40 ng\*cm/ml

b für das Nanodrop®-Spektrometer: 1,0 mm (Werte normalisiert auf 1,0 cm)

Daraus ergibt sich folgende Gleichung zu Bestimmung des RNA-Gehalts:

$$A_{260} * 40 \text{ ng/ml} = \text{RNA-Gehalt in ng/ml}$$

Der Quotient  $A_{260} / A_{280}$  gibt Auskunft über die Reinheit. Ist er 2,0 oder größer ist die Probe rein.

### cDNA-Synthese

Annealing Mix	DMSO	Probe
RNA	3 µg	3 µg
G1	1 µl	1 µl
H <sub>2</sub> O <sub>RNAsefrei</sub>	Auf 10 µl auffüllen	Auf 10 µl auffüllen

- Gut mischen.
- Inkubation bei 70 °C für 10 min.
- Schnell und vorsichtig (2 sec) zentrifugieren.
- Auf Eis stellen.
- Mastermix herstellen (für einen Ansatz):

RNAse freies Wasser	4 µl
5x cDNA Synthese Puffer (G3)	4 µl
RNAse Inhibitor (R1)	1 µl
cDNA Synthese Enzym Mix (G2)	1 µl

- Mischen und auf Eis lagern.

- 10 µl cDNA Master Mix + 10 µl Annealing Mix.
- Mit Pipette mischen.
- Inkubation:
  - 42 °C für 50 min
  - 75 °C für 5 min
  - Abkühlen auf 37 °C

### Amplifikation

Amplifikation Master Mix	1 Ansatz
2,5x RNA Polymerase P (G24)	16 µl
Biotinyliertes UTP, 10 mM	2 µl
RNA Polymerase (G 25)	2 µl

- 20 µl Amplifikation Master Mix + 20 µl cDNA Synthesereaktion.
- Mischen.
- 4 h Inkubation.

### Vorhybridisierung

- Membranröhrchen mit 5 ml H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> befüllen, gut verschließen und 5 min auf den Deckel stellen.
- Wasser abkippen.
- 2 ml vorgewärmte (60 °C) Hybridisierungslösung auf die Membran geben und 1-2 h bei 60 °C hybridisieren.

### cRNA-Aufreinigung

- 60 µl RNase freies Wasser zu jedem Reaktionsansatz geben.
- Das gesamte Volumen in ein steriles 1,5 ml Eppendorfreaktionsgefäß überführen.
- 350 µl Lyse- und Bindepuffer (G6) zugeben, mischen (2 bis 3 mal).
- 350 µl ACS-grade 100 % EtOH zugeben, mischen (5 bis 6 mal).

- Jede Probe auf die Mitte einer Säule (Kit) auftragen.
- Zentrifugation: ca. 30 sec bei 8.000 g.
- Eluat verwerfen.
- 600 µl Waschpuffer (G17 mit EtOH) auf die Säule geben.
- Zentrifugation: 30 sec bei 8.000 g.
- Eluat verwerfen.
- Zentrifugation: 3 min bei 11.000 g.
- Säule auf ein neues Gefäß setzen.
- 50 µl Elutionspuffer (G26) auf die Säule geben.
- Inkubation für 2 min bei RT.
- Zentrifugation: 1 min bei 8.000 g.
- Auf Eis lagern und RNA-Gehalt am Nanodrop®-Spektrophotometer messen.

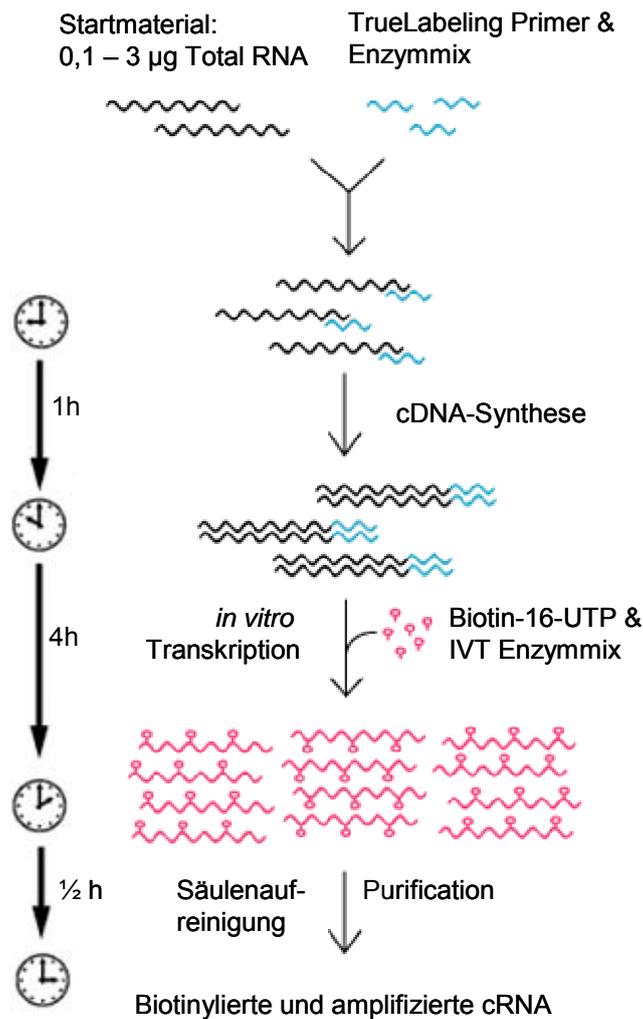


Abb. : Umschreiben der DNA in biotinylierte cDNA

### Hybridisierung

- 3 µg cRNA werden zur Hybridisierung eingesetzt.
- cRNA-Lösung + 750 µl Hybridisierungslösung bei 60 °C erwärmen.
- Die Vorhybridisierungslösung abdekantieren.
- Hybridisierungslösung auf die Membran geben und für mind. 15 h hybridisieren.

### Waschen

- Waschlösungen I und II bei 60 °C erwärmen.
- Die Hybridisierungslösung in ein Eppendorfreaktionsgefäß überführen und bei -20 °C aufbewahren.
- 5 ml Waschlösung I auf die Membran geben, bei Höchstgeschwindigkeit und 60 °C für 15 min im Hybridisierungsofen waschen.
- Mit 5 ml Waschlösung II, bei Höchstgeschwindigkeit und 60 °C für exakt 15 min im Hybridisierungsofen waschen.
- Waschlösung abkippen, Gefäß verschließen und im Hybridisierungsofen auf RT abkühlen lassen.

### Detektion

- 2 ml Blockinglösung Q auf die Membran geben, vorsichtig schütteln und 40 min bei höchster Umdrehung inkubieren.
- Puffer 1xF: 10 ml 5xF + 40 ml H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub>
- Puffer AP-SA: 2 µl AP-SA in 16 ml 1xF .
- Blockinglösung abdekantieren und mit 2 ml AP-SA-Puffer für exakt 10 min bei niedriger Umdrehung im Hybridisierungsofen inkubieren.
- Die Membran 4 mal mit 4 ml 1xF-Puffer für 5 min bei niedriger Umdrehung waschen.
- Waschlösung entfernen.
- Rinsing: 3 ml Puffer G auf die Membran geben, dreimal umdrehen und wiederholen

- 1 ml CDP-Star-Reagenz für 2 – 5 min bei RT im Hybridisierungsofen inkubieren.
- Die Membran mit einer Pinzette aus dem Gefäß holen und mit der LAS 3000 detektieren.

## Literatur

- Afaq, F.**, Syed, D.N., Malik, A., Hadi, N., Sarfaraz, S., Kweon, M.-H., Kahn, N., Abu Zaid, M., Mukhtar, H. (2007): Delphinidin, an Anthocyanidin in Pigmented Fruits and Vegetables, Protects Human HaCat Keratinocytes and Mouse Skin Against UVB-Mediated Oxidative Stress and Apoptosis. *Journal of Investigative Dermatology*, 127, 222-232
- Aherne, S.A.** and O'Brien, N.M. (2002): Dietary Flavonols: Chemistry, Food Content, and Metabolism. *Nutrition*, 18, 75-81
- Alberts, B.** (2003): DNA replication and recombination. *Nature*, 421, 431-435
- Anderson, R.D.** and Berger, N.A. (1994): Mutagenicity and carcinogenicity of Topoisomerase-interactive agents, *Mutation Research*, 309, 109-142
- Andreassen, P.R.**, Ho, G.P.H.H., Andrea, A.D.D. (2006): DNA damage response and their many interactions with the replication fork. *Carcinogenesis*, 27 (5), 883-892
- Aratani, Y.**, Andoh, T., Koyama, H. (1996): Effects of DNA topoisomerase inhibitors on nonhomologous and homologous recombination in mammalian cells. *Mutation Research*, 362, 181-191
- Austin, C.A.**, Patel, S., Ono, K., Nakane, H., Fisher, L.M. (1992): Site-specific DNA cleavage by mammalian DNA Topoisomerase II induced by novel flavone and catechin derivatives. *Biochem. J.*, 282, 883-889
- Austin, C.A.**, and Marsh, K.L. (1998): Eukaryotic DNA Topoisomerase II $\beta$ . *BioEssays*, 20, 215-226
- Azarova, A.M.**, Lyu, Y. L., Tsai, Y.-C., Lau, J. Y.-N., Wang, J.C. (2007): Roles of DNA topoisomerase II isoenzymes in chemotherapy and secondary malignancies. *PNAS*, 104 (26), 11014-11019

- Azevedo, L.,** Gomes, J.C., Stringheta, P.C., Gontijo, Á.M.M.C., Padovani, C.R., Ribeiro, L.R., Salvadori, D.M.F. (2003): Black Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) as a protective agent against DNA damage in mice. *Food and Chemical Toxicology*, 41, 1671-1676
- Bandeled, O.J.** and Osheroff, N. (2007): Bioflavonoids as poisons of human Topoisomerase II alpha and II beta. *Biochemistry*, 46 (20), 6097-6108
- Bailey, C.** (2000): Topoisomerase I poisons and suppressors as anticancer drugs. *Curr. Med. Chem.*, 7 (1), 39-58
- Baldwin, E.L.** and Osheroff, N. (2005): Etoposide, Topoisomerase II and Cancer, *Curr. Med. Chem.-Anti Cancer Agents*, 5, 363-372
- Barker, C.R.,** Hamlett, J., Pennington, S.R., Burrows, F., Lundgren, K., Lough, R., Watson, A.J., Jenkins, J.R. (2006a): The topoisomerase II-Hsp90 complex: a new chemotherapeutic target. *Int. J. Cancer*, 118 (11), 2685-2693
- Barker, C.R.,** McNamara, A.V., Backstraw, S.A., Nelson, D.E., White, M.R., Watson, A.J., Jenkins, J.R. (2006b): Inhibition of Hsp90 acts synergistically with topoisomerase II poisons to increase the apoptotic killing of cells due to an increase in topoisomerase II mediated DNA damage. *Nucleic Acids Res.*, 34 (4), 1148-1157
- Barthelmes, H.U.,** Niederberger, E. Roth, T., Schulte, K., Tang, W.C., Boege, F., Fiebig, H.H. Eisenbrand, G., Marko, D. (2001): Lycobetaine acts as a selective topoisomerase II $\beta$  poison and inhibits the growth of human tumour cells. *British Journal of Cancer*, 85 (10), 1565-1591
- Bell, A.,** Kittler, L., Löber, G., Zimmer, C. (1997): DNA Binding Properties of Minor Groove Binders and their Influence on the Topoisomerase II Cleavage Reaction. *Journal of Molecular Recognition*, 10, 245-255
- Berg, J.M.,** Tymoczko, J.L., Stryer, L. (2003): Biochemie, 5. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg

- Berger, J.M. (1998):** Structure of DNA topoisomerases. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1400, 3-18
- Binaschi, M.,** Farinosi, R., Austin, C.A., Fisher, M., Zumino, F., Capranico, G. (1998): Human DNA Topoisomerase II $\alpha$ -dependent DNA Cleavage and Yeast Cell Killing by Anthracycline Analogues. *Cancer Research*, 58, 1886-1892
- Birt, D.F.,** Hendrich, S., Wang, W. (2001): Dietary agents in cancer prevention: flavonoids and isoflavonoids. *Pharmacology & Therapeutics*, 90, 157-177
- Boege, F. (1996):** Analysis of Eukaryotic DNA Topoisomerases and Topoisomerase-Directed Drug Effects. *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, 34, 873-888
- Boege, F.,** Straub, T., Kehr, A., Boesenberg, C., Christiansen, K., Andersen, A., Jakob, F., Köhrle, J. (1996): Selected Novel Flavones Inhibit the DNA Binding or the DNA Religation Step of Eukaryotic Topoisomerase I. *The Journal of Biological Chemistry*. 271 (4), 2262-2270
- Boyle, S.P.,** Dobson, V.L., Duthie, S.J., Kyle, J.A.M., Collins, A.R. (2000): Absorption and DNA protective effects of flavonoid glycosides from an onion meal. *Eur. J. Nutr.*, 39, 213-223
- Borges, G.,** Roowi, S., Rounanet, J.-M., Duthie, G.G., Lean, M.E.J., Crozier, A. (2007): The bioavailability of raspberry anthocyanins and ellagitannins in rats. *Mol. Nutr. Food Res.*, 51, 714-725
- Borkowski, T.,** Szymusiak, H., Gliszczynska-Swiglo, A., Rietjens, I.M.C.M., Tyrakowska, B. (2005): Radical Scavenging Capacity of Wine Anthocyanins Is Strongly pH-Dependent. *J. Agric. Food Chem.*, 53, 5526-5534
- Brana, M.F.,** Cacho, M., Gradilas, A., de Pascual-Teresa, B., Ramos, A. (2001): Intercalators as Anticancer Drugs. *Current Pharmaceutical Designs*, 7, 1745-1780

- Burden, D.A.** and Osheroff, N. (1998): Mechanism of action of eukaryotic topoisomerase II and drugs targeted to the enzyme. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1400, 139-154
- Capranico, G.**, Binaschi, M., Borgnetto, M.E., Zimino, F., Palumbo, M. (1997): A protein-mediated mechanism for the DNA sequence-specific action of Topoisomerase II poisons. *TiPS*, 18, 323-329
- Cadahía, E.**, Varea, S., Munoz, L., Fernández de Simon, B., Vallejo, M.C.G. (2001): Evolution of Ellagitannins in Spanish, French, and American Oak Wood during Natural Seasoning and Toasting. *J. Agric. Food Chem.*, 49, 3677-3684
- Cantoni, O.**, Cattabeni, F., Stocchi, V., Meyn, R.E., Cerutti, P., Murray, D. (1989): Hydrogen peroxide insult in cultured mammalian cells: relationships between DNA single-strand breakage, poly(ADP-ribose) metabolism and cell killing. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1014, 1-7
- Cerdá, B.**, Espin, J.C., Parra, S., Martínez, P., Tomás-Barberán, F.A. (2004): The potent *in vitro* antioxidant ellagitannins from pomegranate juice are metabolised into bioavailability but poor antioxidant hydroxyl-6-dibenzopyran-6-one derivatives by the colonic microflora of healthy humans. *Eur. J. Nutr.*, 43, 205-220
- Cérda, B.**, Tomás-Barberán, F.A., Espín, J.C. (2005): Metabolism of Antioxidant and Chemopreventive Ellagitannins from Strawberries, Raspberries, Walnuts, and Oak-Aged Wine in Humans: Identification of Biomarkers and Individual Variability. *J. Agric. Food Chem.*, 53, 227-235
- Champoux, J.J.** (2001): DNA Topoisomerases: Structure, Function, and Mechanism. *Annu. Rev. Biochem.*, 70, 369-413
- Chen, A.Y.**, Yu, C., Gatto, B., Liu, L.F. (1993): DNA minor groove-binding ligands: a different class of mammalian DNA topoisomerase I inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90 (17), 8131-8135

- Cho, K.H.**, Pezzuto, J.M., Bolton, J.L., Steele, V.E., Kelloff, G.J., Lee, S.K., Constantinou, A. (2000): Selection of cancer chemopreventive agents based on inhibition of topoisomerase II activity. *European Journal of Cancer*, 36, 2146-2156
- Chowdhury, A.R.**, Sharma, S., Mandal, S., Goswami, A., Mukhopadhyay, S., Majumder, H.K. (2002): Luteolin, an emerging anti-cancer flavonoid, poisons eukaryotic DNA topoisomerase I. *Biochem. J.*, 366, 653-661
- Cimino, F.**, Ambra, R., Canali, R., Saija, A., Virgili, F. (2006): Effect of cyaniding-3-O-glucoside on UVB-induced response in human keratinocytes. *J. Agric. Food Chem.*, 54 (11), 4041-4047
- Christensen, M.O.**, Barthelmes, H.U., Boege, F., Mielke, C. (2003): Residues 190-210 of human topoisomerase I are required for enzyme activity in vivo but not in vitro. *Nucleic Acids Res.*, 31 (24), 7255-7263
- Christensen, M.O.**, Krokowski, R.M., Barthelmes, H.U., Hock, R., Boege, F., Mielke, C. (2004): Distinct effects of topoisomerase I and RNA polymerase I inhibitors suggest a dual mechanism of nucleolar/nucleoplasmic partitioning of Topoisomerase I. *J. Biol. Chem.*, 279 (21), 21873-21882
- Christmann, M.**, Tomicic, M.T., Roos, W.P., Kaina, B. (2003): Mechanisms of human DNA repair: an update. *Toxicology*, 193, 3-34
- Chang, R.L.**, Huang, M.T., Wood, A.W., Wong, C.Q., Newmark, H.L., Yagi, H., Sayer, J.M., Jerina, D.M., Conney, A.H. (1985): Effect of ellagic acid and hydroxylated flavonoids on the tumorigenicity of benzo[a]pyrene and (+/-)-7 beta, 8 alpha-dihydroxy-9 alpha, 10 alpha-epoxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo[a]pyrene on mouse skin and in the newborn mouse. *Carcinogenesis*, 6 (8), 1127-1133
- Chung, K.-T.**, Wong, T.Y., Wei, C.-I., Huang, Y.-W., Lin, Y. (1998): Tannins and Human Health: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 38 (6), 421-464

- Clifford, M.N** and Scalbert, A. (2000): Ellagitannins – nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 1118-1125
- Collins, A.R.** (2004): The Comet Assay for DNA Damage and Repair, *Molecular Biotechnology*, 26, 249-261
- Collins, A.R.** (2005): Assays for oxidative stress and antioxidant status: applications to research into the biological effectiveness of polyphenols, *Am. J. Clin. Nutr.*, 81, 261-267
- Constantinou, A.,** Mehta, R., Runyan, C. (1995): Flavonoids as DNA Topoisomerase Antagonists and Poisons: Structure-Activity Relationships. *Journal of Natural Products*, 58 (2), 217-225
- Clapp, J.M.** and Hande, K.R. (2002): Topoisomerase II inhibitors. *Cancer Chemotherapy and Biological Response Modifiers*, 20, 125-149
- Coates, E.M.,** Popa, G., Gill, C.I.R., McCann, M.J., McDougall, G.J., Stewart, D., Rowland, I. (2007): Colon-available raspberry polyphenols exhibit anti-cancer effects on *in vitro* models of colon cancer. *Journal of Carcinogenesis*, 6 (4), 1-13
- Conti, C.,** Seiler, J.A., Pommier, Y. (2007): The mammalian DNA Replication Elongation Checkpoint. *Cell Cycle*, 6 (22), 2760-2767
- Cooke, D.N.,** Thomasset, S., Boocock, D.J., Schwarz, M., Winterhalter, P., Steward., W.P., Gescher, A.J., Marczylo, T.H. (2006a): Development of Analyses by High-Performance Liquid Chromatography and Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry of Bilberry Anthocyanins in Human Plasma and Urine. *J. Agric. Food Chem.*, 54, 7009-7013
- Cooke, D.N.,** Schwarz, M., Boocock, D.J., Winterhalter, P., Steward., W.P., Gescher, A.J., Marczylo, T.H. (2006b): Effects of cyanidin-3-glucoside and an anthocyanin mixture from bilberry on adenoma development in the APC<sup>Min</sup> mouse model of intestinal carcinogenesis – Relationship with tissue anthocyanin level. *Int. J. Cancer*, 119, 2213-2220

- Corbett, A.H.**, Hong, D., Osheroff, N. (1993a): Exploiting Mechanistic Differences between Drug Classes to Define Functional Drug Interaction Domains on Topoisomerase II. *The Journal of Biological Chemistry*, 268 (19), 14394-14398
- Corbett, A.H.** and Osheroff, N. (1993b): When Good Enzymes Go Bad: Conversion of Topoisomerase II to a Cellular Toxin by Antineoplastic Drugs, *Chemical Research in Toxicology*, 6 (5), 585-597
- Cortell, J.M.**, Halbleib, M., Gallagher, A.V., Righetti, T.L., Kennedy, J.A. (2007): Influence of Vine Vigor Anthocyanins. 2. Anthocyanins and Pigmented Polymers in Wine. *J. Agric. Food Chem.*, 55, 6585-6595
- Cutts, S.M.**, Nudelman, A., Rephaeli, A., Phillips, D.R. (2005): The Power and Potential of Doxorubicin-DNA Adducts. *Life*, 57 (2), 73-81
- Critchlow, S.E.** and Jackson S.P. (1998): DNA end-joining: from yeast to man. *Trends Biochem. Sci.*, 23 (10), 394-398
- Degrassi, F.**, De Salvia, R., Tanzarella, C., Palitti, F. (1989): Induction of chromosomal aberrations and SCE by camptothecin, an inhibitor of mammalian topoisomerase I. *Mutation Research*, 211, 125-130
- Deming, P.B.**, Cistulli, C.A., Zhao, H., Graves, P.R., Plwnica-Worms, H., Paules, R.S., Downes, C.S., Kaufmann, W.K. (2001): The human decatenation checkpoint. *PNAS*, 98 (21), 12044-12049
- Depeint, F.**, Gee, J.M., Williamson, G., Johnson, I.T. (2002): Evidence for consistent patterns between flavonoid structures and cellular activities. *Proc. Nutr. Soc.*, 61 (1), 97-103
- DeVita, M.A.** (2001): The death watch: certifying death using cardiac criteria. *Prog. Transplant.*, 11 (1), 58-66
- Di Marco, A.**, Cassinelli, G., Arcamone, F. (1981): The discovery of daunorubicin. *Cancer Treat. Rep.*, 65 (4), 3-8

- Durrieu, F.,** Samejima, K., Fortune, J.M., Kandels-Lewis, S., Osheroff, N., Earnshaw, W.C. (2000): DNA topoisomerase II $\alpha$  interacts with CAD nuclease and is involved in chromatin condensation during apoptotic execution. *Current Biology*, 10, 923-926
- Duthie, S.J. (2007):** Berry phytochemicals, genomic stability and cancer: Evidence for chemoprotection at several stages in the carcinogenic process. *Mol. Nutr. Food Res.*, 51, 665-674
- Earnshaw, W.C.,** Martins, L.M., Kaufmann, S.H. (1999): Mammalian Caspases: Structure, Activation, Substrates, and Functions During Apoptosis. *Annu. Rev. Biochem.*, 68, 383-424
- Earnshaw, W.C. (1999):** A cellular poison cupboard. *Nature*, 397, 387-389
- El Mohsen, M.A.,** Marks, J., Kuhnle, G., Moore, K., Debnam, F., Kaila Srari, S., Rice-Evans, C., Spencer, J.P. (2006): Absorption, tissue distribution and excretion of pelargonidin and its metabolites following oral administration to rats. *Br. J. Nutr.*, 95 (1), 51-58
- Elmore, S. (2007):** Apoptosis: A review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology*, 35, 495-516
- Eisenbrand, G.,** Hippe, F., Jakobs, S., Mühlbeyer, S. (2004): Molecular mechanisms of indirubin and its derivatives: novel anticancer molecules with their origin in traditional Chinese phytochemistry. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 130, 627-635
- Errington, F.,** Willmore, E., Leontiou, C., Tilby, M.J., Austin, C.A. (2004): Differences in the longevity of topo II $\alpha$  and topo II $\beta$  drug-stabilized cleavable complexes and the relationship to drug sensitivity. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 53 (2), 155-162
- Felgines, C.,** Talavera, S., Texier, O., Gil-Izquierdo, A., Lamaison, J.L., Remesy, C. (2005): Blackberry Anthocyanins are Mainly Recovered from Urine as Methylated and Glucuronidated Conjugates in Humans. *J. Agric. Food Chem.*, 53, 7721-7727

- Felix, C.A. (1998):** Secondary leukemias induced by topoisomerase-targeted drugs. *Biochim. Biophys. Acta*, 1400, 233-255
- Felsenfeld, G. und Groudine, M. (2003):** Controlling the double helix. *Nature*, 421, 448-453
- Fergusson, L.R. (2001):** Role of plant polyphenols in genomic stability, *Mutation Research*, 475, 89-111
- Fimognari, C., Berti, F., Nüsse, M., Cantelli-Forti, G., Hrelia, P. (2004):** Induction of apoptosis in two human leukemia cell lines as well as differentiation in human promyelocytic cells by cyanidin-3-O-beta-glucopyranoside. *J. Biomed. Biotechnol.*, 2004 (5), 321-325
- Fleschhut, J., Kratz, F., Reschkemmer, G., Kulling, S.E. (2006):** Stability and biotransformation of various dietary anthocyanins *in vitro*. *Eur J. Nutr.*, 45 (1), 7-18
- Frank, T., Netzel, M., Strass, G., Bitsch, R., Bitsch I. (2003):** Bioavailability of anthocyanidin-3-glucosides following consumption of red wine and red grape juice. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 81 (5), 423-435
- Fridrich, D., Kern, M., Fritz, J., Pahlke, G., Köhler, N., Winterhalter, P., Marko, D. (2007):** The epidermal growth factor receptor and human topoisomerases represent potential cellular targets of oligomeric procyanidins. *MNF*, 51, 192-200
- Fridrich, D., Teller, N., Esselen, M., Pahlke, G., Marko, D.:** Comparison of delphinidin, quercetin and (-)-epigallocatechin-3-gallate as inhibitors of the EGFR and the ErbB2 receptor phosphorylation. *MNF*, **eingereicht**
- Friedberg, E.C. (2003):** DNA damage and repair. *Nature*, 421, 436-439
- Fritz, J. (2004):** Biologische Wirkungen von Flavonoiden: Anthocyanidine im Vergleich zu anderen Flavonoidklassen und Isoflavonmetabolite im Vergleich zu den Ausgangsverbindungen. *Diplomarbeit*, TU Kaiserslautern

- Fritz, J.,** Kern, M., Pahlke, G., Vatter, S., Marko, D. (2006): Biological activities of malvidin, a red wine anthocyanidin. *Mol. Nutr. Food Res.*, 50, 390-395
- Froelich-Ammon, S.J.,** Burden, D.A., Patchan, M.W., Elsea, S.H., Thompson, R.B., Osheroff, N. (1995): Increased drug affinity as the mechanistic basis for drug hypersensitivity of a mutant type II topoisomerase. *J. Biol. Chem.*, 270 (47), 28018-28021
- Funk, R.S.** and Krise, J.P. (2006): Exposure of Cells to Hydrogen Peroxide Can Increase the Intracellular Accumulation of Drugs. *Molecular Pharmaceutics*, 4 (1), 154-159
- Ghobrial, I.M.,** Witzig, T.E., Adjic, A.A. (2005): Targeting Apoptosis Pathways in Cancer Therapy, *CA Cancer J. Clin.*, 55, 178-194
- Galati, G.** and O'Brien, P.J. (2004): Potential Toxicity of Flavonoids and other Dietary Phenolics: Significance for their Chemopreventive and Anticancer Properties. *Free Radical Biology & Medicine*, 37 (3), 287-303
- Giaccone, G.** (1994): DNA topoisomerases and topoisomerase inhibitors. *Path Biol.*, 42 (4), 346-352
- González de Meija, E.,** Chandra, S., Ramírez-Mares, M.V., Wang, W. (2006): Catalytic inhibition of human DNA topoisomerase by phenolic compounds in *Ardisia compressa* extracts and their effect on human colon cancer cells. *Food and Chemical Toxicology*,
- Grady, W.M.** (2004): Genomic instability and colon cancer. *Cancer Metastasis Rev.*, 23 (1-2), 11-27
- Green, K.A.,** Naylor, M.J., Lowe, E.T., Wang, P., Marshman, E., Streuli, C.H. (2004): Caspase-mediated Cleavage of Insulin Receptor Substrate. *J. Biol. Chem.*, 279 (24), 25149-25156
- Gunter, M.J.** and Leitzmann, M.F. (2006): Obesity and colorectal cancer: epidemiology, mechanisms and candidate genes, *Journal of Nutritional Biochemistry*, 17, 145-156

- Gupta, M.,** Fujimori, A., Pommier, Y. (1995): Eukaryotic DNA Topoisomerase I. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1262, 1-14
- Habermeyer, M.,** Fritz, J., Barthelmes, H.U., Christensen, M.O., Larsen, M.K., Boege, F., Marko, D. (2005): Anthocyanidins modulate the activity of human DNA topoisomerases I and II and affect cellular DNA integrity. *Chem. Res. Toxicol.*, 18 (9), 1395-1404
- Halliwell, B.** (2007): Dietary polyphenols: Good, bad, or indifferent for your health? *Cardiovascular Research*, 73, 341–347
- Han, D.H.,** Lee, M., J., Kim, J.H. (2006): Antioxidant and apoptosis-inducing activities of ellagic acid. *Anticancer Res.*, 26 (5A), 3061-3606
- Hande, K.R.** (1998a): Etoposide: four decades of development of a topoisomerase II inhibitor. *Eur. J. Cancer*, 34, 1514-1521
- Hande, K.R.** (1998b): Clinical applications of anticancer drugs targeted to topoisomerase II. *Biochimica et Biosphica Acta*, 1400, 173-184
- Hardy, C.D.,** Crisona, N.J., Stone, M.D., Cozzarelli, N.R. (2004): Distentagling DNA during replication: a tale of two strands. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*, 359, 39-47
- Hefferin, M.L.** and Tomkinson, A.E. (2005): Mechanism of DNA double-strand break repair by non-homologous end joining. *DNA repair*, 4, 639-648
- Helleday, T.,** Lo, J., van Gent, D.C., Engelward, B.P. (2007): DNA double-strand break repair: From mechanistic understanding to cancer treatment. *DNA repair*, 6, 923-935
- Hellström, J.,** Sinkkonen, J., Karkonen, M., Mattila, P. (2007): Isolation and Structure Elucidation of Procyanidin Oligomers from Saskatoon Berries. *J. Agric. Food Chem.*, 55 (1), 157-164

- He, J.,** Magnuson, B.A., Giusti, M.M. (2005): Analysis of Anthocyanins in Rat Intestinal Contents – Impact of Anthocyanin Chemical Structure on Fecal Excretion. *J. Agric. Food Chem.*, 53, 2859-2866
- Hengartner, M.G. (2000):** The biochemistry of apoptosis. *Nature*, 407, 770-776
- Hengstler, J.G.,** Heimerdinger, C.K., Schiffer, I.B., Gebhard, S., Sagemüller, J., Tanner, B., Bolt, H.M., Oesch, F. (2002): Dietary topoisomerase II-poisons: contribution of soy products to infant leukemia? *EXCLI J.*, 1, 8-14
- Hertzberg, R.P.,** Caranfa, M.J., Hecht, S.M. (1989): On the mechanism of topoisomerase I inhibition by camptothecin: evidence for binding to an enzyme-DNA complex. *Biochemistry*, 28 (11), 4629-4638
- Hochster, H.,** Liebes, L., Wadler, S., Oratz, R., Wernz, J.C., Meyers, M., Green, M., Blum, R.H., Speyer, J.L. (1992): Pharmacokinetics of the cardioprotector ADR-529 (ICRF-187) in escalating doses combined with fixed-dose doxorubicin. *J. Natl. Cancer Inst.*, 84 (22), 1725-1730
- Holbach, P. (2005):** Untersuchungen zur Bedeutung der Topoisomerasehemmung für die DNA-schädigende Wirkung von Anthocyanidinen. *Diplomarbeit*, TU Kaiserslautern
- Hou, D.-X.,** Fujii, M., Terahara, N., Yoshimoto, M. (2004): Molecular Mechanisms Behind the Chemopreventive Effects of Anthocyanidins, *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 5, 321-325
- Hsiang, Y.-H.,** Hertzberg, R., Hecht, S., Liu, L.F. (1985): Camptothecin Induces Protein-linked DNA Breaks via Mammalian DNA Topoisomerase I. *The Journal of Biological Chemistry*, 260 (27), 14873-14878
- Hsieh, T. (1990):** DNA topoisomerases. *Current Opinion in Cell Biology*, 2, 461-463
- Hukkanen, A.T.,** Pölönen, S.S., Kärenlampi, S.O., Kokko, H.I. (2005): Antioxidant Capacity and Phenolic Content of Sweet Rowanberries. *J. Agric. Food Chem.*, 54 (1), 112-119

- Huyn, J.W.** and Chung, H. S. (2004): Cyanidin and Malvidin from *Oryza sativa* cv. Heugjinjubyeo Mediate Cytotoxicity against Human Monocytic Leukemia Cells by Arrest of G<sub>2</sub>/M Phase and Induction of Apoptosis. *J. Agric. Food Chem.*, 52, 2213-2217
- Ichiyanagi, T.**, Rahman, M.M., Kashiwada, Y., Ikeshiro, Y., Shida, Y., Hatano, Y., Matsumoto, H., Hirayama, M., Konishi, T. (2004): Absorption and metabolism of delphinidin 3-O-beta-D-glucoside in rats. *Biofactors*, 21 (1-4), 411-413
- Interthal, H.**, Quigley, P.M., Hol, W.G., Champoux, J.J. (2003): The role of lysine 532 in the catalytic mechanism of human topoisomerase I. *J. Biol. Chem.*, 279 (4), 2984-2992
- Isaacs, R.J.**, Davies, S.L., Sandri, M.I., Redwood, C., Wells, N.J., Hickson, I.D. (1998): Physiological regulation of eukaryotic topoisomerase II. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1400, 121-137
- Ishida, R.**, Iwai, M., Hara, A., Andoh, T. (1996): The combination of different types of antitumor topoisomerase II inhibitors, ICRF-193 and VP-16, has synergistic and antagonistic effects on cell survival, depending on treatment schedule. *Anticancer Res.*, 16 (5A), 2735-2740
- Issa, A.Y.**, Volate, S.R., Wargovish, M.J. (2006): The role of phytochemicals in inhibition of cancer and inflammation: New directions and perspectives. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19, 405-419
- Izumi, T.**, Wiederhold, L.R., Roy, G., Roy, R., Jaiswal, A., Bhakat, K.K., Mitra, S., Hazra, T.K. (2003): Mammalian DNA base excision repair proteins: their interactions and role in repair of oxidative DNA damage. *Toxicology*, 193, 43-65
- Jin, Z.** and El-Deiry, W.S. (2005): Overview of Cell Death. *Cancer Biology and Therapy*, 4 (2), 139-163

- Jo, J.-Y.**, Gonzalez de Mejia, E., Lila, M.A. (2005): Effects of Grape Cell Culture Extracts on Human Topoisomerase II Catalytic Activity and Characterization of Active Fractions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53 (7), 2489-2498
- Kahle, K.**, Kraus, M., Scheppach, W., Ackermann, M., Ridder, F., Richling, E. (2006): Studies on apple and blueberry fruit constituents: Do the polyphenols reach the colon after ingestion? *Mol. Nutr. Food Res.*, 50, 418-423
- Katsube, N.**, Iwashita, K., Tsushida, T., Yamaki, K., Kobori, M. (2003): Induction of Apoptosis in Cancer Cells by Bilberry and the Anthocyanins. *J. Agric. Food Chem.*, 51, 68-75
- Kaufmann, W.K.** and Paules, R.S. (1996): DNA damage and cell cycle checkpoints. *FASEB J.*, 10, 238-247
- Kaufmann, S.H.** and Hengartner, M.O. (2001): Programmed cell death: alive and well in the new millennium. *Trends in Cell Biology*, 11 (12), 526-534
- Keppler, K.** and Humpf, H.U. (2005): Metabolism of anthocyanins and their phenolic degradation products by the intestinal microflora. *Bioorg. Med. Chem.*, 13 (17), 5195-5205
- Kerrigan, J.E.** and Pilch, D.S. (2001): A structural model for the ternary cleavable complex formed between human Topoisomerase I, DNA, and camptothecin. *Biochemistry*, 40 (33), 9792-9798
- Kim, R.**, Erni, M., Tanabe, K., Murakami, S., Uchida, Y., Arihiro, K. (2006): Regulation and interplay of apoptotic and non-apoptotic cell death. *J. Pathol.*, 208, 319-329
- Kim, Y.S.** and Milner, J.A. (2007): Dietary Modulation of Colon Cancer Risk. *The Journal of Nutrition*, 137, 2576-2579

- Kingma, P.S.,** Burden, D.A., Osheroff, N. (1999): Binding of etoposide to topoisomerase II in the absence of DNA: decreased affinity as a mechanism of drug resistance. *Biochemistry*, 38 (12), 3457-3461
- Kirkland, J.B.** (1991): Lipid peroxidation, protein thiol oxidation and DNA damage in hydrogen peroxide-induced injury to endothelial cells: role of activation of poly(ADP-ribose)polymerase. *Biochim. Biophys. Acta*, 1092 (3), 319-325
- Klingbeil, M.M.,** Englund, P.T. (2004): Closing the gaps in kinetoplast DNA network replication, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 101, 4333-4334
- Konczak-Islam, I.,** Yoshimoto, M., Hou, D.-X., Terahara, N., Yamakawa, O. (2003): Potential Chemopreventive Properties of Anthocyanin-Rich Aqueous Extracts from In Vitro Produced Tissue of Sweetpotato (*Ipomoea batatas* L.). *J. Agric. Food Chem.*, 51, 5916-5922
- König, M.** and Scholz, E. (1994): Ellagitannins and Complex Tannins from *Quercus Petraea* Bark. *J. Nat. Prod.*, 57 (10), 1411-1415
- Kong, J.-M.,** Chia, L.-S., Goh, N.-K., Chia, T.-F., Brouillard, R. (2003): Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry*, 64, 923-933
- Koponen, J.M.,** Happonen, A.M., Mattila, P.H., Törrönen, A.R. (2007): Contents of Anthocyanins and Ellagitannins in Selected Foods Consumed in Finland. *J. Agric. Food Chem.*, 55, 1612-1619
- Koushik, A.,** Hunter, D.J., Spiegelman, D., Beeson, W.L., van den Brandt, P.W., Buring, J.E., Calle, E.E., Cho, E., Fraser, G.E., Freudenheim, J.L., Fuchs, C.S., Giovannucci, E.L., Goldbohm, R.A., Harnack, L., Jacobs, D.R. Jr, Kato, I., Krogh, V., Larsson, S.C., Leitzmann, M.F., Marshall, J.R., McCullough, M.L., Miller, A.B., Pietinen, P., Rohan, T.E., Schatzkin, A., Sieri, S., Virtanen, M.J., Wolk, A., Zeleniuch-Jacquotte, A., Zhang, S.M., Smith-Warner, S.A. (2007): Fruits, Vegetables, and Colon Cancer Risk in a Pooled Analysis of 14 Cohort Studies. *J. Natl. Cancer Inst.*, 99, 1471-1483

- Labrecque, L.,** Lamy, S., Chapus, A., Mihoubi, S., Durocher, Y., Cass, B., Bojanowski, M.W., Gingras, D., Béliveau, R. (2005): Combined inhibition of PDGF and VEGF receptors by ellagic acid, a dietary-derived phenolic compound. *Carcinogenesis*, 26 (4), 821-826
- Lake, A.N.** und Bedford, M.T. (2007): Protein methylation and DNA repair. *Mutation Research*, 618, 91-101
- Lapidot, T.,** Walker, M.D., Kanner, J. (2002a): Antioxidant and Prooxidant Effects of Phenolics on Pancreatic  $\beta$ -Cells in Vitro. *J. Agric. Food Chem.*, 50, 7220-7225
- Lapidot, T.,** Walker, M.D., Kanner, J. (2002b): Can Apple Antioxidants Inhibit Tumor Cell Proliferation? Generation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> during Interaction of Phenolic Compounds with Cell Culture Media. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 3156-3160
- Larsen, A.K.,** Skaldanowski, A., Bojanowski, K. (1996): The roles of DNA topoisomerase II during the cell cycle. *Progress in Cell Cycle Research*, 2, 229-239
- Larsen, A.K.** and Gobert, C. (1999): DNA Topoisomerase I in Oncology: Dr Jekyll or Mr Hyde? *Pathology Oncology Research*, 5 (3), 171-178
- Larsen, A.K.,** Escarguiel, A.E., Skaldanowski, A. (2003a): From DNA damage to G<sub>2</sub> arrest: the many roles of topoisomerase II. *Progress in Cell Cycle*, 5, 295-300
- Larsen, A.K.,** Escarguiel, A.E., Skaldanowski, A. (2003b): Catalytic topoisomerase II inhibitors in cancer therapy. *Pharmacology and Therapeutics*, 99, 167-181
- Leppard, J.B.** and Champoux, J.J. (2005): Human DNA topoisomerase I: relaxation, roles, and DNA damage. *Chromosoma*, 114, 75-85
- Laco, G.S.,** Collins, J.R., Luke, B.T., Kroth, H., Sayer, J.M., Jerina, D.M., Pommier, Y. (2002): Human topoisomerase I inhibition: docking camptothecin and derivatives into a structure-based active site model. *Biochemistry*, 41 (5), 1428-1435

- Leland, H.**, Hartwell, R., Timothy, H., Nurse, P.M. (2001): Key regulators of the cell cycle. *Press release*, The Nobel Assembly at Karolinska Institutet
- Lesca, P.** (1983): Protective effects of ellagic acid and other plant phenols on benzo[a]pyrene-induced neoplasia in mice. *Carcinogenesis*, 4 (12), 1651-1653
- Li, W.**, Lam, M.S., Birkeland, A., Riffel, A., Montana, L., Sullivan, M.E., Post, J.M. (2006): Cell-based assays for profiling activity and safety properties of cancer drugs. *J. of Pharmacological and Toxicological Methods*, 54, 313-319
- Lila, M.A.** (2004): Anthocyanins and Human Health: An In Vitro Investigative Approach. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 5, 306-313
- Liu, L.F.**, Desai, S.D., Li, T.K., Mao, Y., Sun, M., Sim, S.P. (2000): Mechanisms of action of camptothecin. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 922, 1-10
- Liu, R.H.** and Sun, J. (2003): Antiproliferative Activity of Apples Is Not Due to Phenolic-Induced Hydrogen Peroxide Formation. *J. Agric. Food Chem.*, 51, 1718-1723
- Long, L.H.**, Clement, M.V., Halliwell, B. (2000): Artifacts in Cell Culture: Rapid Generation of Hydrogen Peroxide on Addition of (-)-Epigallocatechin, (-)-Epigallocatechin Gallate, (+)-Catechin, and Quercetin to Commonly Used Cell Culture Media. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 273, 50-53
- López-Lázaro, M.**, Martín-Cordero, C., Toro, M.V., Ayuso, M.J. (2002): Flavonoids As DNA Topoisomerase I Poisons. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. 17 (1), 25-29
- López-Lázaro, M.**, Martín-Cordero, C., Ayuso, M.J. (2000): Two New Flavonol Glycosides as DNA Topoisomerase I Poisons. *Z. Naturforsch.*, 55c, 898-902
- Manach, C.**, Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., Jiménez, L. (2004): Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.*, 79, 727-747

- Manach, C.,** Williamson, G., Morand, C., Scalbert, A., Rémésy C. (2005): Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailable studies. *Am. J. Clin. Nutr.*, 81, 230-242
- Mandraju, R.K.,** Kannapiran, P., Kondapi, A.K. (2007): Distinct roles of Topoisomerase II isoforms: DNA damage accelerating  $\alpha$ , double strand break repair promoting  $\beta$ . *Archives of Biochemistry and Biophysics*, Epub ahead of print
- Mao, Y.,** Desai, S.D., Ting, C.Y., Hwang, J., Liu, L.F. (2001): 26 S proteasome-mediated degradation of Topoisomerase II cleavable complexes. *J. Biol. Chem.*, 276 (44), 40652-40658
- Marko, D.,** Puppel, N., Tjaden, Z., Jakobs, S., Pahlke, G. (2004): The substitution pattern of anthocyanidins affects different cellular signaling cascades regulating cell proliferation, *Mol. Nutr. Food Res.*, 48, 318-325
- Martin, K.R.** (2006): Targeting Apoptosis with Dietary Bioactive Agents. *Exp. Biol. Med.*, 231, 117-129
- Martín-Cordero, C.,** López-Lazaro, M., Pinero, J., Ortiz, T., Cortéz, F., Ayuso, M.J. (2000): Glucosylated isoflavones as DNA topoisomerase II poisons. *J. Enzyme Inhibition*, 15, 455-460
- Matsumoto, H.,** Ichiyanagi, T., Iida, H., Ito, K., Tsuda, T., Hirayama, M., Konishi, T. (2006): Ingested Delphinidin-3-rutinoside Is Primarily Excreted to Urine as the Intact Form and to Bile as the Methylated Form in Rats. *J. Agric. Food Chem.*, 54 (2), 578-582
- Mattivi, F.,** Guzzon, R., Vrhovsek, U., Stefanini, Velasco, R. (2006): Metabolic Profiling of Grape: Flavonols and Anthocyanins. *J. Agric. Food Chem.*, 54, 7692-7702
- McDougall, G.J.,** Fyffe, S., Dobson, P., Stewart, D. (2005): Anthocyanins from red wine – Their stability under simulated gastrointestinal digestion. *Phytochemistry*, 66, 2540-2548

- McGhie, T.K.** and Walton, M.C. (2007): The bioavailability and absorption of anthocyanins: Towards a better understanding. *Mol. Nutr. Food Res.*, 51, 702-713
- Meiers, S.**, Kemény, M., Weyand, U., Gastpar, R., von Angerer, E., Marko, D. (2001): The anthocyanidins cyanidin and delphinidin are potent inhibitors of the epidermal growth-factor receptor. *J. Agric. Food Chem.*, 49 (2), 958-962
- Melo, J.** and Toczyski (2002): A unified view of the DNA-damage checkpoint. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 14 (2), 237-245
- Mennen, L.I.**, Walker, R., Bennetau-Pelissero, C., Scalbert, A. (2005): Risks and safety of polyphenol consumption. *Am. J. Clin. Nutr.*, 82 (6), 326-329
- Meyer, K.N.**, Kjeldsen, E., Straub, T., Knudsen, B.R., Hickson, I.D., Kikuchi, A., Kreipe, H., Boege, F. (1997): Cell Cycle-coupled Relocation of Types I and II Topoisomerases and Modulation of Catalytic Enzyme Activities. *The Journal of Cell Biology*, 136 (4), 775-788
- Mi, Z.**, Malak, H., Burke, T.G. (1995): Reduced albumin binding promotes the stability and activity of topotecan in human blood. *Biochemistry*, 34 (42), 13722-13728
- Mielke, C.**, Kalfahal, F.M., Christensen, M.O., Boege, F. (2007): Rapid and prolonged stalling of human DNA topoisomerase I in UVA-irradiated genomic areas. *DNA repair*, 6, 1757-1763
- Mittra, B.**, Saha, A., Chowdhury, A.R., Pal, S.M., Mukhopadhyay, S., Bandhopadhyay, S., Majumder, H.K. (2000): Luteolin, an Abundant Dietary Component is a Potent Anti-Leishmanial Agent that Acts by Inducing Topoisomerase II-mediated Kinetoplast DNA Cleavage Leading to Apoptosis. *Molecular Medicine*, 6 (6), 527-541
- Miyazawa, T.**, Nakagawa, K., Kudo, M., Muraishi, K., Someya, K. (1999): Direct intestinal absorption of red fruit anthocyanins, cyaniding-3-glucoside and cyaniding-3,5-diglucoside, into rats and humans. *J. Agric. Food Chem.*, 47 (3), 1083-1091

- Mizutani, H.**, Tada-Oikawa, S., Hiraku, Y., Kojima, M., Kawanishi, S. (2005): Mechanism of apoptosis induced by doxorubicin through the generation of hydrogen peroxide. *Life Science*, 76, 1439-1453
- Moertel, C.G.** (1984): Improving the efficiency of clinical trials: a medical perspective. *Stat. Med.*, 3 (4), 455-468
- Moharram, F.A.**, Marzouk, M.S., El-Toumy, S.A., Ahmed, A.A., Aboutabi, E.A. (2003): Polyphenols of *Melaleuca quinquenervia* leaves – pharmacological studies of grandinin. *Phytother. Res.*, 17 (7), 767-773
- Montecucco, A.** und Biamonti, G. (2007): Cellular response to etoposide treatment. *Cancer Letters*, 252, 9-18
- Moucheron, C.**, A. Kirsch-De Mesmaeker, A. (1998) *J. Physical Organic Chemistry*, 11, 577-583
- Mullen, W.**, McGinn, J., Lean, M.E.J., MacLean, M.R., Gardner, P., Duthie, G.G., Yokota, T., Crozier, A. (2002): Ellagitannins, Flavonoids, and Other Phenolics in Red Raspberries and Their Contribution to Antioxidant Capacity and Vasorelaxation Properties. *J. Agric. Food Chem.*, 50, 5191-5196
- Nakayama, T.** (1994): Suppression of Hydroperoxide-induced Cytotoxicity by Polyphenols. *Cancer Research*, 54, 1991-1993
- Nakagawa, H.**, Hasumi, K., Woo, J.-T., Nagai, K., Wachi, M. (2004): Generation of hydrogen peroxide primarily contributes to the induction of Fe(II)-dependent apoptosis in Jurkat cells by (-)-epigallocatechin gallate. *Carcinogenesis*, 25 (9), 1567-1574
- Nasmyth, K.** (1996): Viewpoint: putting the cell cycle in order. *Science*, 274 (5293), 1643-1645
- Neto, C.C.** (2007a): Cranberry and Its Phytochemicals: A Review of In Vitro Anticancer Studies. *The Journal of Nutrition*, 137, 186-193

- Neto, C.C. (2007b):** Cranberry and blueberry: Evidence for protective effects against cancer and vascular diseases. *Mol. Nutr. Food Res.*, 51, 652-664
- Nielsen, D.,** Maare, C., Skovsgaard, T. (1996): Cellular Resistance to Anthracyclines. *Gen. Pharmac.*, 27 (2), 251-255
- Nielsen, I.L.,** Dragsted, L.O., Ryan-Haren, G., Freese, R., Rasmussen, S.E. (2003): Absorption and excretion of black currant anthocyanins in humans and watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. *J. Agric. Food Chem.*, 51 (9), 2813-2820
- Nitiss, J.L. (1998):** Investigating the biological functions of DNA topoisomerases in eukaryotic cells, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1400, 63-81
- Noé, V.,** Penequelas, S., Lamuela-Raventós, R.M., Permanyer, J., Ciudad, C.J., Izquierdo-Pulido, M. (2004): Epicatechin and a Cocoa Polyphenolic Extract Modulate Gene Expression in Human Caco-2 Cells. *Nutrient-Gene Interactions*, 2509-2516
- Okuda, K.,** Fujimoto, I., Hanai, A., Urano, Y. (1987): Changing incidence of hepatocellular carcinoma in Japan. *Cancer Res.*, 47 (18), 4967-4972
- Okuda, K. (1993):** New trends in hepatocellular carcinoma. *Int. J. Clin. Lab. Res.*, 23 (4), 173-178
- Omenn, G.S.,** Goodman, G.E., Thornquist, M.D., Balmes, J., Cullen, M.R., Glass, A., Keogh, J.P., Meyskens, F.L. Jr., Valanis, B., Williams, J.H. Jr., Barnhart, S., Cherniack, M.G., Brodtkin, C.A., Hammar, S. (1996): Effects of a combination of  $\beta$ -carotene and vitamin A on lung cancer and cardiovascular disease. *N. Engl. J. Med.*, 334, 1150 –1155
- Osheroff, N. (1986):** Eukaryotic topoisomerase II. Characterization of enzyme turnover. *J. Biol. Chem.*, 261 (21), 9944-9950
- Osheroff, N.,** Corbett, A.H., Robinson, M.J. (1994): Mechanism of Action of Topoisomerase II-Targeted Antineoplastic Drugs. *Advances in Pharmacology*, 29B, 105-126

- Osheroff, N. (1998):** DNA topoisomerases. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1400, 1-2
- Oestergaard, V.H.,** Knudsen, B.R., Andersen, A.H. (2004): Dissecting the Cell-killing Mechanism of Topoisomerase II-targeting Drug ICRF-193. *The Journal of Biological Chemistry*, 279 (27), 28100-28105
- Palumbo, M.,** Gatto, B., Moro, S., Sissi, C., Zagotto, G. (2002): Sequence-specific interactions of drugs interfering with the Topoisomerase-DNA cleavage complex. *Biochim. Biophys. Acta*, 1587 (2-3), 145-154
- Paoletti, C. (1993):** The Localization of Topoisomerase II Cleavage Sites on DNA in the Presence of Antitumor Drugs. *Pharmac. Ther.*, 60, 381-387
- Parker, B.S.,** Cullinane, C., Phillips, D.R. (1999): Formation of DNA adducts by formaldehyde-activated mitoxantrone. *Nucleic Acids Res.*, 27 (14), 2918-2923
- Parkin, D.M.,** Pisani, P., Ferlay, J. (1999): Global cancer statistics. *CA Cancer J. Clin.*, 49 (1), 33-64
- Perez-Prieto, L.J.,** De la Hera-Orts, M.L., López-Roca, J.M., Fernández-Fernández, J.I., Gómez-Plaza, E. (2003): Oak-matured wines: influence of the characteristics of the barrel on wine colour and sensory characteristics. *J. Sci. Food Agric.*, 83, 1445-1450
- Pommier, Y.,** Tanizawa, A., Kohn, K.W. (1994): Mechanisms of topoisomerase I inhibition by anticancer drugs. *Adv. Pharmacol.*, 29B, 73-92
- Pommier, Y.,** Kohlhagen, G., Kohn, K.W., Leteurte, F., Wani, M.C., Wall, M.E. (1995): Interaction of an alkylating camptothecin derivative with a DNA base at topoisomerase I-DNA cleavage sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92 (19), 8861-8865
- Pommier, Y.,** Jenkins, J., Kohlhagen, G., Leteurte, F (1995): DNA recombinase activity of eukaryotic DNA topoisomerase I: effects of camptothecin and other inhibitors. *Mutat. Res.*, 337 (2), 135-145

- Pommier, Y. (1998):** Diversity of DNA topoisomerase I and inhibitors. *Biochimie*, 80 (3), 255-270
- Pool-Zobel, B.L.,** Bub, A., Schröder, N., Rechkemmer, G. (1999): Anthocyanins are potent antioxidants in model systems but do not reduce endogenous oxidative DNA damage in human colon cells, *Eur. J. Nutr.*, 38, 227-234
- Poot, M.,** Hiller, K.-H., Heimpel, S., Hoehn, H. (1995): Distinct Patterns of Cell Cycle Disturbance Elicited by Compounds Interfering with DNA Topoisomerase I and II Activity. *Experimental Cell Research*, 218, 326-330
- Pourquier, P.** and Pommier, Y. (2001): Topoisomerase I-mediated DNA damage. *Adv. Cancer Res.*, 80, 189-216
- Prior, R.L.** and Wu, X. (2006): Anthocyanins: Structural characteristics that result in unique metabolic patterns and biological activities. *Free Radical Research*, 40 (10), 1014-1028
- Quideau, S.,** Jourdes, M., Saucier, C., Glories, Y., Pardon, P., Baudry, C. (2003): DNA Topoisomerase Inhibitor Acutissimin A and Other Flavano-Ellagitannins in Red Wine. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 42, 6012-6014
- Quideau, S.,** Jourdes, M., Lefevre, D., Montaudon, D., Saucier, C., Glories, Y., Pardon, P., Pourquier, P. (2005): The Chemistry of Wine Polyphenolic C-Glycosidic Ellagitannins Targeting Human Topoisomerase II. *Chem. Eur. J.*, 11, 6503-6513
- Ramirez-Tortosa, C.,** Andersen, O.M., Gardner, P.T., Morrice, P.C., Wood, S.G., Duthie, S.J., Collins, A.R., Duthie, G.G. (2001): Anthocyanin-rich Extract Decreases indices of Lipid Peroxidation and DNA damage in Vitamin E-depleted Rats. *Free Radical Biology & Medicine*, 31 (9), 1033-1037
- Rebindo, M.R.,** Stewart, L., Kuhn, P., Champoux, J.J., Hol, W.G. (1998): Crystal structures of human Topoisomerase I in covalent and non-covalent complexes with DNA. *Science*, 279 (5356), 1504-1513

- Rice-Evans, C.,** Spencer, J.P., Schroeter, H., Rechner, A.R. (2000): Bioavailability of flavonoids and potential bioactive forms in vivo. *Drug Metabol. Drug Interact.*, 17 (1-4), 291-310
- Robinson, M.J.,** Corbett, A.H., Osheroff, N. (1993): Effects of Topoisomerase II-Targeted Drugs on Enzyme-Mediated DNA Cleavage and ATP Hydrolysis: Evidence for Distinct Drug Interaction Domains on Topoisomerase II. *Biochemistry*, 32, 3638-3643
- Roikaew, W.** (2003): Untersuchungen zum Wirkmechanismus von Anthocyanidin-Glukosiden auf humane Tumorzellen. *Forschungspraktikum*, TU Kaiserslautern
- Ross, W.,** Rowe, T., Glisson, Yalowich, J., Liu, L. (1984): Role of Topoisomerase II in Mediating Epipodophyllotoxin-induced DNA Cleavage. *Cancer Research*, 44, 5657-5860
- Roth, M.** (2006): Untersuchungen zur oxidativen/antioxidativen Wirkung von Anthocyanidinen und zur Beeinflussung der Tubulinpolymerisation. *Diplomarbeit*, Universität Karlsruhe (TH)
- Russel, W.R.,** Labat, A., Scobbie, L., Duncan, S. H. (2007): Availability of blueberry phenolicx for microbial metabolism in the colon and the potential inflammatory implications. *Mol. Nutr. Food Res.*, 51, 726-731
- Ruiz, M.** (2007): DNA-Replikation, *online-Veröffentlichung*, Wikipedia, Replikation
- Sakagami, H.,** Jiang, Y., Kusama, K., Atsumi, T., Ueha, T., Toguchi, M., Iwakura, I., Satoh, K., Ito, H., Hatano, T., Yoshida, T. (2000): Cytotoxic activity of hydrolysable tannins against human oral tumor cell lines – a possible mechanism. *Phytomedicine*, 7 (1), 39-47
- Salti, G.I.,** Das Gupta, T.K., Constantinou, A.I. (2000): A Novel Use for the Comet Assay: Detection of Topoisomerase II Inhibitors. *Anticancer Research*, 20, 3189-3194
- Sancar, A.,** Lindsey-Boltz, L.A., Ünsal-Kacmaz, K., Linn, S. (2004): Molecular Mechansims of Mammalian DNA repair an the DNA Damage. *Annu. Rev. Biochem.*, 73, 39-85

- Sargent, J.M.**, Williamson, C.J., Maliepaard M., Elgie, A.W., Scheper, R.J., Taylor, C.G. (2001): Breast cancer resistance protein expression and resistance to daunorubicin in blast cells from patients with acute myeloid leukaemia. *Br. J. Haematol.*, 115 (2), 257-262
- Scalbert, A.** (1991): Antimicrobial Properties of Tannins. *Phytochemistry*, 30 (12), 3875-3883
- Scalbert, A.** and Williamson, G. (2000): Dietary Intake and Bioavailability of Polyphenols. *The Journal of Nutrition*, 130, 2073-2085
- Schmitt, E.**, Paquet, C., Beauchemin, M., Bertrand, R. (2007): DNA-damage response network at the crossroads of cell-cycle checkpoints, cellular senescence and apoptosis. *J. Zhejiang Univ. Sci. B.*, 8 (6), 377-397
- Seeram, N.P.**, Adams, L.S., Zhang, Y., Lee, R., Sand, D., Scheuller, Heber, D. (2006): Blackberry, Black Raspberry, Blueberry, Cranberry, Red Raspberry, and Strawberry Extracts Inhibit Growth and Stimulate Apoptosis of Human Cancer Cells In Vitro. *J. Agric. Food Chem.*, 54, 9329-9339
- Seeram, N. P.** (2006): Berries. In *Nutritional Oncology*, 2nd ed.; Heber, D., Blackburn, G., Go, V. L. W., Milner, J., Eds.; *Academic Press: London, U.K.*, 37, 615-625.
- Severini, A.** and Morgan, A.R. (1991): An assay for proteinases and their inhibitors based on DNA/ethidium bromide fluorescence. *Anal. Biochem.*, 193 (1), 83-89
- Shih, P.-H.**, Yeh, C.-T., Yen, G.-C. (2005): Effects of anthocyanidin on the inhibition of proliferation and induction of apoptosis in human gastric adenocarcinoma cells. *Food and Chemical Toxicology*, 43, 1557-1566
- Sinha, B.**, Haim, N., Dusre, L., Kerrigan, D., Pommier, Y. (1988): DNA Strand Breaks Produced by Etoposid (VP-16,213) in Sensitive and Resistant Human Breast Tumor Cells: Implications for the Mechanism of Action. *Cancer Research*, 48, 5096-5100

- Sinha, B.K.** and Elliot, H.M. (1991): Etoposid-induced DNA damage in human tumor cells: requirement for cellular activating factors. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1097, 111-116
- Slevin, M.L.** (1991): The clinical pharmacology of etoposide. *Cancer*, 67 (1), 319-329
- Spencer, D.M.S.**, Bilardi, R.A., Koch, T.H., Post, G.C., Nafie, J.W., Kimuri, K.-I., Cutts, S.M., Phillips, D.R. (2007): DNA repair in response to anthracycline-DNA adducts: A role for both homologous recombination and nucleotide excision repair. *Mutation Research*, Epub ahead of print
- Stagos, D.**, Kazantzoglou, G., Magiatis, P., Mitaku, S., Anagnostopoulos, K., Kouretas, D. (2005): Effects of plant phenolics and grape extracts from Greek varieties of *Vitis vinifera* on Mitomycin C and topoisomerase I-induced nicking of DNA. *International Journal of Molecular Medicine*, 15, 1013-1022
- Stewart, L.**, Ireton, G.C., Champoux, J.J. (1997): Reconstitution of human topoisomerase I by fragment complementation. *J. Mol. Biol.*, 269 (3), 355-372
- Susin, S.A.**, Dugas, E., Ravagnan, L., Sarnejima, K., Zamzami, N., Loeffler, M., Costantini, P., Ferri, K.F., Irinopoulou, T., Prevost, M.-C., Brothers, G., Mak, T.W., Penninger, J., Earnshaw, W.C., Kroemer, G. (2000): Two Distinct Pathways Leading to Nuclear Apoptosis, *J. Exp. Med.*, 192 (4), 571-579
- Sutton, M.D.** und Walker, G.C. (2001): Managing DNA polymerases: Coordinating DNA replication, DNA repair, and DNA recombination. *PNAS*, 98 (15), 8342-8349
- Swift, L.P.**, Rephaeli, A., Nudelman, A., Phillips, D.R., Cutts, S.M. (2006): Doxorubicin-DNA Adducts Induce a Non-Topoisomerase II-Mediated Form of Cell Death. *Cancer Res.*, 66 (9), 4863-4871
- Tapiero, H.**, Tew, K.D., Ba, G.N., Mathe, G. (2002): Polyphenols: do they play a role in the prevention of human pathologies? *Biomed. Pharmacother.*, 56, 200 –207

- Tarozzi, A.**, Marchesi, A., Hrelia, S., Angeloni, C., Andrisano, V., Fiori, J., Cantelli-Forti, G., Hrelia, P. (2005): Protective effects of cyaniding-3-O-beta-glucopyranoside against UVA-induced oxidative stress in human keratinocytes. *Photochem. Photobiol.*, 81 (3), 623-629
- Tao, W.**, South, V.J., Diehl, R.E., Davide, J.P., Sepp-Lorenzino, L., Fraley, M.E., Arrington, K.L., Lobell, R.B. (2007): An inhibitor of the kinesin spindle protein activates the intrinsic apoptotic pathway independently of p53 and de novo protein synthesis. *Mol. Cell Biol.*, 27 (2), 689-698
- Tao, Z.**, Goodisman, J., Penefsky, H.S., Souid, A.-K. (2007): Caspase Activation by Anticancer Drugs: The Caspase Strom. *Molecular Pharmaceutics*, 4 (4), 583-595
- Tewey, K.M.**, Rowe, T.C., Yang, L., Halligan, B.D., Liu, L.F. (1984): Intercalative antitumor drugs interfere with the breakage-reunion reaction of mammalian DNA topoisomerase II. *J. Biol. Chem.*, 259 (14), 9182-9187
- Thomas, C.J.**, Rahier, N.J., Hecht, S.M. (2004): Camptothecin: current perspectives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 12, 1585-1604
- Thress, K.**, Kornbluth, S., Smith, J.J. (1999): Mitochondria at the Crossroad of Apoptotic Cell Death, *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 31 (4), 321-326
- Thulstrup, P.W.**, Thormann, T., Spanget-Larsen, J., Bisgaard, H.C. (1999): Interaction between Ellagic Acid and Calf Thymus DNA Studied with Flow Linear Dichroism UV-VIS Spectroscopy. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 265,416-421
- Tian, G.**, Giusti, M.M., Stoner, G.D., Schwartz, S.J. (2006): Urinary excretion of Black Raspberry Anthocyanins and Their Metabolites. *J. Agric. Food Chem.*, 54 (4), 1467-1472
- Valko, M.**, Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M., Mazur, M. (2006): Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*, 160, 1-40

- Vanhoefler, U.,** Hastrick, A., Achterrath, W., Cao, S., Seeber, S., Rustum, Y.M. (2001): Irinotecan in the treatment of colorectal cancer: clinical overview. *J. Clin. Oncol.*, 19 (5), 1501-1518
- Vindigni, A. (2007):** Biochemical, biophysical, and proteomic approaches to study DNA helicases. *Mol. BioSyst.*, 3, 266-274
- Wall, M.E.,** Wani, M.C., Nicholas, A.W., Manikumar, G., Tele, C., Moore, L., Truesdale, A., Leitner, P., Besterman, J.M. (1993): Plant antitumor agents. 30. Synthesis and structure activity of novel camptothecin analogs. *J. Med. Chem.*, 36 (18), 2689-2700
- Walle, T. (2004):** Absorption and Metabolism of Flavonoids, *Free Radical Biology & Medicine*, 36 (7), 829-837
- Wang, X.W. and Harris C.C. (1997):** p53 tumor-suppressor gene: clues to molecular carcinogenesis. *J. Cell Physiol.*, 173 (2), 247-255
- Wang, X.,** Wang, L.-K., Kingsbury, W.D., Johnson, R.K., Hecht, S.M. (1998): Differential Effects of Camptothecin Derivates on Topoisomerase I-Mediated DNA Structure Modification. *Biochemistry*, 37, 9399-9408
- Watson, J.D. and Crick, F.H. (1993):** Genetical implications of the structure of deoxyribonucleic acid. 1953. *JAMA*, 269 (15), 105-110
- Webb, M.R. and Ebeler, S.E. (2003):** A gel electrophoresis assay for the simultaneous determination of topoisomerase I inhibition and DNA intercalation. *Analytical Biochemistry*, 321, 22-30
- Webb, M.R. and Ebeler, S.E. (2004):** Comparative analysis of Topoisomerase IB inhibition and DNA intercalation by flavonoids and similar compounds: structural determinates of activity. *Biochem. J.*, 384, 527-541
- Weinberg, R.A. (1996):** The molecular basis of carcinogenesis: understanding the cell cycle clock. *Cytokines Mol. Ther.*, 2 (2), 105-110

- Weisel, T.,** Baum, M., Eisenbrand, G., Dietrich, H., Will, F., Stockis, J.-P., Kulling, S., Rüfer, C., Johannes, C., Janzowski, C. (2006): An anthocyanin/polyphenolic-rich fruit juice reduces oxidative DNA damage and increase glutathione level in healthy probands. *Biotechnol. J.*, 1, 388-397
- Williams, G.M.** and Jeffrey, A.M. (2000): Oxidative DNA Damage: Endogenous and Chemically Induced. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 32, 283-292
- Wilstermann, A.M.** and Osheroff, N. (2001): Base Excision Repair Intermediates as Topoisomerase II Poisons. *The Journal of Biological Chemistry*, 276 (49), 46290-46296
- Wilstermann, A.M.** and Osheroff, N. (2003): Stabilization of Eukaryotic Topoisomerase II-DNA Cleavage Complexes, *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 3, 321-338
- Wilstermann, A.M.,** Bender, R.P., Godfrey, M., Choi, S., Anklin, C., Berkowitz, D.B., Osheroff, N., Graves, D.E. (2007): Topoisomerase II-Drug Interaction Domains: Identification of Substituents on Etoposide That Interact with the Enzyme, *Biochemistry*, 46, 8217-8225
- Woo, L.L.,** Onel, K., Ellis, N.A. (2007): The broken genome: Genetic and pharmacologic approaches to breaking DNA. *Annals of Medicine*, 39, 208-218
- Wu, X.,** Cao G., Prior, R.L. (2002): Absorption and metabolism of anthocyanins in elderly women after consumption of elderberry or blueberry. *J. Nutr.*, 132 (7), 1865-1875
- Wu, X.,** Pittman, H.E. 3<sup>rd</sup>, Prior, P.L. (2004a): Pelargonidin is absorbed and metabolized differently than cyaniding after marionberry consumption in pigs. *J. Nutr.*, 134 (10), 2603-2610
- Wu, X.,** Gu, L., Prior, R.L., McKay, S. (2004b): Characterization of anthocyanins and proanthocyanidins in some cultivars of Ribes, Aronia, and Sambucus and their antioxidant capacity. *J. Agric. Food Chem.*, 52 (26), 7846-7856

- Wu, X.,** Beecher, G.R., Holden, J.M., Haytowitz, D.B., Gebhardt, S.E., Prior, R.L. (2006): Concentrations of anthocyanins in common foods in the United States and estimation of normal consumption. *J. Agric. Food Chem.*, 54 (11), 4069-4075
- Yamada, M.,** Hayashi, K.-I., Ikeda, S., Tsutsui, K., Tsutsui, K., Ito, T., Inuma, M., Nozaki, H. (2006): Inhibitory Activity of Plant Stilbene Oligomers against DNA Topoisomerase II. *Biol. Pharm. Bull.*, 29 (7), 1504-1507
- Yamane, K.,** Kawabata, M., Tsuruo, T. (1997): A DNA-topoisomerase-II-binding protein with eighth repeating regions similar to DNA-repair enzymes and to a cell-cycle regulator. *Eur. J. Biochem.*, 250 (3), 794-799
- Yamane, K.** and Tsuruo, T. (1999): Conserved BRCT regions of TopBP1 and of the tumor suppressor BRCA1 bind strand breaks and termini of DNA. *Oncogene*, 18 (37), 5194-5203
- Yamane, K.,** Wu, X., Chen, J. (2002): A DNA damage-regulated BRCT-containing protein, TopBP1, is required for cell survival, *Mol. Cell Biol.*, 22 (2), 555-566
- Yamashita, Y.,** Kawada, S.-Z., Nakano, H. (1990): Induction of Mammalian Topoisomerase II Dependent DNA Cleavage by Nonintercalative Flavonoids, Genistein and Orobol. *Biochemical Pharmacology*, 39 (4), 737-744
- Yamashita, N.** and Kawanishi, S. (2000): Distinct Mechanisms of DNA Damage in Apoptosis Induced by Quercetin and Luteolin. *Free Rad. Res.*, 33, 623-633
- Yi, W.,** Fischer, J., Krewer, G., Akoh, C.C. (2005): Phenolic Compounds from Blueberries Can Inhibit Colon Cancer Cell Proliferation and Induced Apoptosis. *J. Agric. Food Chem.*, 53, 7320-7329
- Yeh, C.-T.** and Yen, G.-C. (2005): Induction of Apoptosis by the Anthocyanidins through Regulation of Bcl-2 Gene and Activation of c-Jun N-Terminal Kinase Cascade in Hepatoma Cells. *J. Agric. Food Chem.*, 53, 1740-1749

**Zahir, A.,** Jossang, A., Bodo, B. (1996): DNA Topoisomerase I Inhibitors: Cytotoxic Flavones from *Lethedon tannaensis*. *J. Nat. Prod.*, 59, 701-703

**Zafra-Stone, S.,** Yasmin, T., Bagchi, M., Chatterjee, A., Vinson, J.A., Bagchi, D. (2007): Berry anthocyanins as novel antioxidants in human health and disease prevention. *Mol. Nutr. Food Res.*, 51, 675-683

**Zhao, C.,** Giusti, M., Malik, M., Moyer, M.P., Magnuson, B.A. (2004): Effects of Commercial Anthocyanin-Rich Extracts on Colonic Cancer and Nontumorigenic Colonic Cell Growth. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52 (20), 6122-6128

## Anhang

### Anhangsverzeichnis

Verwendete Formeln .....	2
Daten zu Abb. 40.....	4
Daten zu Abb. 42.....	6
Daten zu Abb. 43.....	7
Daten zu Abb. 49.....	11
Daten zu Abb. 51.....	12
Daten zu Abb. 54.....	13
Daten zu Abb. 55.....	14
Daten zu Abb. 57.....	15
Daten zu Abb. 58.....	15
Daten zu Abb. 59.....	17
Daten zu Abb. 60.....	18
Daten zu Abb. 62.....	19
Daten zu Abb. 63.....	20
Daten zu Abb. 64.....	22
Daten zu Abb. 70.....	23
Daten zu Abb. 72.....	24
Daten zu Abb. 73.....	25
Daten zu Abb. 74.....	31
Daten zu Abb. 75.....	33
Daten zu Abb. 76.....	34
Daten zu Abb. 77.....	35
Daten zu Abb. 78.....	36
Daten zu Abb. 84.....	36
Daten zu Abb. 85.....	37
Daten zu Abb. 86.....	37
Daten zu Abb. 87.....	42
Daten zu Abb. 88.....	43
Daten zu Abb. 89.....	43
Daten zu Abb. 91.....	44
Veröffentlichungen.....	45
Dank .....	50
Lebenslauf .....	52

**Verwendete Formeln****Lineare Regression:  $y = A + B \cdot x$  nach Origin 6.0 mit Messpunkten (x/y):**

y-Achsenabschnitt (A):

$$A = \frac{\left( \sum_i y_i \right) \left( \sum_i x_i^2 \right) - \left( \sum_i x_i \right) \left( \sum_i (x_i \cdot y_i) \right)}{N}$$

Steigung (B):

$$B = \frac{n \sum_i (x_i \cdot y_i) - \left( \sum_i x_i \right) \left( \sum_i y_i \right)}{N}$$

Nenner (N):

$$N = n \sum_i x_i^2 - \left( \sum_i x_i \right)^2$$

Fehler der Steigung ( $m_B$ ):

$$m_B = \sqrt{\frac{nS}{(n-2)N}}$$

Fehler des y-Achsenabschnittes ( $m_A$ ):

$$m_A = \sqrt{\frac{S \sum_i x_i^2}{(n-2)N}}$$

Fehlerquadratsumme (S):

$$S = \sum_{i=1}^n (y_i - Bx_i - A)^2$$

**IC<sub>50</sub>-Wert:**

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

Fehler des IC<sub>50</sub>-Wertes (m<sub>IC50</sub>):

$$m_{IC50} = \sqrt{\left(-\frac{1}{B}\right)^2 \cdot (m_A)^2 + \left(\frac{A-50}{B^2}\right)^2 \cdot (m_B)^2}$$

**Arithmetischer Mittelwert ( $\bar{x}$ ):**

$$\bar{x} = \frac{\sum_i x_i}{n}$$

**Standardabweichung ( $\sigma_{n-1}$ ):**

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

**Ausreißertest nach Nalimov (r):**

$$r = \frac{|x^* - \bar{x}|}{\sigma_{n-1}} \cdot \sqrt{\frac{n}{n-1}}$$

**Daten zu Abb. 40**

Abb. 40: Cometassay: Einfluss von gebildeten Wasserstoffperoxid auf die DNA-schädigende Wirkung von Delphinidin in HT29-Zellen (1 h, serumfrei).

## 1. ohne Zusatz von Katalase, ohne Fpg-Behandlung

<b>Substanz</b>	<b>DMSO</b>	<b>Delphinidin 10 µM</b>	<b>Delphinidin 50 µM</b>	<b>Delphinidin 100 µM</b>	<b>Menadion 20 µM</b>
TI [%]	1,11	0,45	2,85	2,22	1,20
TI [%]	0,37	0,24	4,15	-	1,54
TI [%]	0,72	0,80	1,67	2,41	3,86
TI [%]	0,54	0,62	4,15	3,92	1,67
TI [%]	0,30	0,52	1,34	1,34	0,60
TI [%]	0,74	0,69	1,78	-	4,48
TI [%]	0,60	-	-	-	0,64
TI [%]	0,36	-	-	-	2,42
<b>Mittelwert</b>	<b>0,59</b>	<b>0,55</b>	<b>2,66</b>	<b>2,47</b>	<b>1,85</b>
<b>Standardabweichung</b>	<b>0,27</b>	<b>0,20</b>	<b>1,26</b>	<b>1,07</b>	<b>1,34</b>

## 2. ohne Zusatz von Katalase, Fpg-Behandlung

<b>Substanz</b>	<b>DMSO</b>	<b>Delphinidin 10 µM</b>	<b>Delphinidin 50 µM</b>	<b>Delphinidin 100 µM</b>
TI [%]	3,88	0,89	3,82	6,02
TI [%]	-	0,71	4,37	2,91
TI [%]	1,47	0,50	5,78	3,07
TI [%]	2,92	0,68	-	2,91
TI [%]	1,24	1,03	1,29	1,12
TI [%]	2,62	1,43	1,22	0,85
TI [%]	2,96	-	-	-
TI [%]	1,96	-	-	-
<b>Mittelwert</b>	<b>2,44</b>	<b>0,87</b>	<b>3,30</b>	<b>2,81</b>
<b>Standardabweichung</b>	<b>0,93</b>	<b>0,33</b>	<b>2,00</b>	<b>1,85</b>

## Anhang

### 3. mit Zusatz von 100 U/ml Katalase, ohne Fpg-Behandlung

<b>Substanz</b>	<b>DMSO</b>	<b>Delphinidin 10 µM</b>	<b>Delphinidin 50 µM</b>	<b>Delphinidin 100 µM</b>	<b>Menadion 20 µM</b>
TI [%]	0,46	0,99	2,85	1,59	8,56
TI [%]	0,57	0,45	4,15	2,22	9,14
TI [%]	0,50	0,24	4,15	-	10,18
TI [%]	0,49	0,80	-	2,41	9,56
TI [%]	0,50	0,62	-	3,92	7,71
TI [%]	0,45	-	-	-	10,66
TI [%]	2,01	-	-	-	6,88
TI [%]	0,60	-	-	-	16,34
<b>Mittelwert</b>	<b>0,66</b>	<b>0,62</b>	<b>3,72</b>	<b>2,54</b>	<b>10,08</b>
<b>Standardabweichung</b>	<b>0,48</b>	<b>0,29</b>	<b>0,75</b>	<b>0,99</b>	<b>2,74</b>

### 4. mit Zusatz von 100 U/ml Katalase, mit Fpg-Behandlung

<b>Substanz</b>	<b>DMSO</b>	<b>Delphinidin 10 µM</b>	<b>Delphinidin 50 µM</b>	<b>Delphinidin 100 µM</b>
TI [%]	1,25	1,07	3,82	2,91
TI [%]	1,16	0,89	4,37	3,07
TI [%]	0,81	0,71	5,78	2,00
TI [%]	1,02	0,50	-	-
TI [%]	1,72	0,68	-	-
TI [%]	1,20	-	-	-
TI [%]	2,55	-	-	-
TI [%]	-	-	-	-
<b>Mittelwert</b>	<b>1,58</b>	<b>0,77</b>	<b>4,66</b>	<b>2,66</b>
<b>Standardabweichung</b>	<b>0,65</b>	<b>0,22</b>	<b>1,01</b>	<b>0,58</b>

**Daten zu Abb. 42**

Abb. 42: Cometassay: Einfluss von gebildeten Wasserstoffperoxid auf die antioxidative Wirkung von Delphinidin in HT29-Zellen (1 h, serumfrei). Positivkontrolle 20  $\mu\text{M}$  Menadion, Zugabe von Katalase um das gebildete  $\text{H}_2\text{O}_2$  zu dismutieren (gestreifte Balken), Fpg-Behandlung zur Detektion oxidativer DNA-Schäden.

## 1. ohne Fpg-Behandlung

Substanz	DMSO	Delphinidin 1 $\mu\text{M}$ + Men	Delphinidin 10 $\mu\text{M}$ + Men	Delphinidin 50 $\mu\text{M}$ + Men	Delphinidin 100 $\mu\text{M}$ + Men	Menadion 20 $\mu\text{M}$
TI [%]	1,11	2,16	0,76	2,27	3,02	3,62
TI [%]	0,37	1,23	1,38	1,31	-	2,78
TI [%]	0,72	2,09	0,93	-	1,82	2,69
TI [%]	0,54	3,58	-	-	-	1,47
TI [%]	0,30	2,01	0,97	2,51	3,10	2,36
TI [%]	0,74	1,52	0,69	2,22	-	1,45
TI [%]	0,60	2,72	1,21	-	-	3,26
TI [%]	0,36	-	2,13	-	-	2,04
<b>Mittelwert</b>	<b>0,59</b>	<b>2,19</b>	<b>1,15</b>	<b>2,08</b>	<b>2,65</b>	<b>2,46</b>
<b>Standardabweichung</b>	<b>0,27</b>	<b>0,78</b>	<b>0,49</b>	<b>0,53</b>	<b>0,72</b>	<b>0,78</b>

## 2. Fpg-Behandlung während der Vorinkubation

Substanz	DMSO	Delphinidin 1 $\mu\text{M}$ + Men	Delphinidin 10 $\mu\text{M}$ + Men	Delphinidin 50 $\mu\text{M}$ + Men	Delphinidin 100 $\mu\text{M}$ + Men	Menadion 20 $\mu\text{M}$
TI [%]	1,20	-	4,70	1,37	2,99	7,66
TI [%]	-	-	3,63	1,70	6,16	9,73
TI [%]	0,76	6,43	2,89	5,47	5,15	9,92
TI [%]	0,70	5,55	2,77	5,57	-	10,27
TI [%]	1,43	5,81	1,28	2,21	-	9,78
TI [%]	1,33	5,87	1,98	3,37	-	9,12
TI [%]	1,21	-	4,20	-	5,70	12,02
TI [%]	-	7,69	2,53	-	-	-
<b>Mittelwert</b>	<b>1,11</b>	<b>6,27</b>	<b>3,00</b>	<b>3,28</b>	<b>5,00</b>	<b>9,79</b>
<b>Standardabweichung</b>	<b>0,30</b>	<b>0,86</b>	<b>1,13</b>	<b>1,86</b>	<b>1,40</b>	<b>1,30</b>

**Daten zu Abb. 43**

Abb. 43: Zellzyklusverteilung von HT29-Zellen nach Synchronisation in der G<sub>2</sub>/M-Phase und anschließender serumhaltiger Inkubation mit Delphinidin bzw. Malvidin für 36 Stunden.

1. Zellzyklusverteilung nach Synchronisation in der G<sub>2</sub>/M-Phase, Inkubation mit Delphinidin, Zellen in der G<sub>1</sub>-Phase

<b>Zellen in der G<sub>1</sub>-Phase [%]</b>	<b>Kontrolle</b>	<b>Arrest</b>	<b>DMSO</b>	<b>1 µM</b>	<b>10 µM</b>	<b>50 µM</b>	<b>100 µM</b>
	34,28	10,47	26,03	29,99	27,40	19,77	31,37
	51,43	7,40	20,72	30,64	21,17	15,07	23,71
	44,65	8,00	-	18,51	25,29	22,57	28,57
	46,16	9,38	-	28,24	25,06	-	-
	47,03	-	-	-	24,30	-	-
	44,55	-	-	-	23,08	-	-
	44,08	-	-	-	-	-	-
	42,02	-	-	-	-	-	-
	33,29	-	-	-	-	-	-
	36,75	-	-	-	-	-	-
<b>Mittelwert</b>	<b>42,42</b>	<b>8,81</b>	<b>23,80</b>	<b>26,85</b>	<b>24,38</b>	<b>19,14</b>	<b>27,88</b>
<b>Standardabweichung</b>	<b>5,87</b>	<b>1,38</b>	<b>3,75</b>	<b>5,65</b>	<b>2,12</b>	<b>3,79</b>	<b>3,88</b>

## Anhang

### 2. Zellzyklusverteilung nach Synchronisation in der G<sub>2</sub>/M-Phase, Inkubation mit Delphinidin, Zellen in der S-Phase

Zellen in der S-Phase [%]	Kontrolle	Arrest	DMSO	1 µM	10 µM	50 µM	100 µM
	37,83	14,84	26,34	28,21	16,64	24,12	26,02
	28,84	16,61	33,1	25,68	13,74	14,60	30,37
	40,35	22,30	-	23,09	27,91	35,40	15,17
	33,61	21,89	-	29,92	22,09	-	-
	33,90	-	-	-	30,67	-	-
	32,25	-	-	-	18,19	-	-
	31,09	-	-	-	-	-	-
	38,13	-	-	-	-	-	-
	37,69	-	-	-	-	-	-
	36,74	-	-	-	-	-	-
<b>Mittelwert</b>	<b>35,04</b>	<b>18,91</b>	<b>29,72</b>	<b>26,73</b>	<b>21,54</b>	<b>24,71</b>	<b>23,85</b>
<b>Standardabweichung</b>	<b>3,66</b>	<b>3,75</b>	<b>4,78</b>	<b>2,98</b>	<b>6,64</b>	<b>10,41</b>	<b>7,30</b>

### 3. Zellzyklusverteilung nach Synchronisation in der G<sub>2</sub>/M-Phase, Inkubation mit Delphinidin, Zellen in der G<sub>2</sub>/M-Phase

Zellen in der G <sub>2</sub> /M-Phase [%]	Kontrolle	Arrest	DMSO	1 µM	10 µM	50 µM	100 µM
	27,89	74,69	47,63	41,80	55,92	56,10	42,61
	19,73	75,99	46,18	43,68	64,86	53,30	45,93
	15,00	69,76	-	58,40	46,80	70,32	56,59
	20,23	68,73	-	41,83	52,86	42,64	-
	19,07	-	-	-	45,03	-	-
	23,20	-	-	-	58,08	-	-
	24,84	-	-	-	-	-	-
	19,86	-	-	-	-	-	-
	29,02	-	-	-	-	-	-
	26,51	-	-	-	-	-	-
<b>Mittelwert</b>	<b>22,54</b>	<b>72,29</b>	<b>46,91</b>	<b>46,43</b>	<b>53,93</b>	<b>55,59</b>	<b>48,38</b>
<b>Standardabweichung</b>	<b>4,49</b>	<b>3,58</b>	<b>1,03</b>	<b>8,03</b>	<b>7,37</b>	<b>11,40</b>	<b>7,30</b>

## Anhang

### 4. Zellzyklusverteilung nach Synchronisation in der G<sub>2</sub>/M-Phase, Inkubation mit Malvidin, Zellen in der G<sub>1</sub>-Phase

Zellen in der G <sub>1</sub> -Phase [%]	Kontrolle	Arrest	DMSO	1 µM	10 µM	50 µM	100 µM
	34,28	10,47	26,03	14,99	14,62	18,23	14,79
	51,43	7,40	20,72	18,82	14,37	10,77	18,44
	44,65	8,00	-	-	13,40	24,74	22,79
	46,16	9,38	-	-	33,42	20,42	-
	47,03	-	-	-	20,08	-	-
	44,55	-	-	-	-	-	-
	44,08	-	-	-	-	-	-
	42,02	-	-	-	-	-	-
	33,29	-	-	-	-	-	-
	36,75	-	-	-	-	-	-
<b>Mittelwert</b>	<b>42,42</b>	<b>8,81</b>	<b>23,80</b>	<b>16,90</b>	<b>19,18</b>	<b>18,54</b>	<b>18,61</b>
<b>Standardabweichung</b>	<b>5,87</b>	<b>1,38</b>	<b>3,75</b>	<b>2,70</b>	<b>8,38</b>	<b>5,84</b>	<b>4,00</b>

### 5. Zellzyklusverteilung nach Synchronisation in der G<sub>2</sub>/M-Phase, Inkubation mit Malvidin, Zellen in der S-Phase

Zellen in der S-Phase [%]	Kontrolle	Arrest	DMSO	1 µM	10 µM	50 µM	100 µM
	37,83	14,84	26,34	25,43	8,75	15,34	14,76
	28,84	16,61	33,1	14,47	15,67	12,35	14,97
	40,35	22,30	-	-	13,74	13,26	16,21
	33,61	21,89	-	-	14,08	22,65	-
	33,90	-	-	-	23,36	-	-
	32,25	-	-	-	-	-	-
	31,09	-	-	-	-	-	-
	38,13	-	-	-	-	-	-
	37,69	-	-	-	-	-	-
	36,74	-	-	-	-	-	-
<b>Mittelwert</b>	<b>35,04</b>	<b>18,91</b>	<b>29,72</b>	<b>19,95</b>	<b>15,12</b>	<b>15,90</b>	<b>15,30</b>
<b>Standardabweichung</b>	<b>3,66</b>	<b>3,75</b>	<b>4,78</b>	<b>7,75</b>	<b>5,28</b>	<b>4,67</b>	<b>0,78</b>

## Anhang

### 6. Zellzyklusverteilung nach Synchronisation in der G<sub>2</sub>/M-Phase, Inkubation mit Malvidin, Zellen in der G<sub>2</sub>/M-Phase

Zellen in der G <sub>2</sub> /M-Phase [%]	Kontrolle	Arrest	DMSO	1 µM	10 µM	50 µM	100 µM
	27,89	74,69	47,63	59,57	76,63	67,02	70,87
	19,73	75,99	46,18	61,04	70,58	77,25	66,89
	15,00	69,76	-	67,42	73,43	61,83	61,61
	20,23	68,73	-	-	53,07	56,92	-
	19,07	-	-	-	56,56	-	-
	23,20	-	-	-	-	-	-
	24,84	-	-	-	-	-	-
	19,86	-	-	-	-	-	-
	29,02	-	-	-	-	-	-
	26,51	-	-	-	-	-	-
<b>Mittelwert</b>	<b>22,54</b>	<b>72,29</b>	<b>46,91</b>	<b>62,68</b>	<b>66,05</b>	<b>65,76</b>	<b>66,46</b>
<b>Standardabweichung</b>	<b>4,49</b>	<b>3,58</b>	<b>1,03</b>	<b>4,17</b>	<b>10,55</b>	<b>8,70</b>	<b>4,65</b>

**Daten zu Abb. 49**

Abb. 49: Modulation der strangbrechenden Wirkung von Camptothecin durch Delphinidin, gemessen mittels Comet-Assay.

## 1. Delphinidin bzw. Camptothecin alleine

<b>Substanz</b>	<b>DMSO</b>	<b>Delphinidin 1 <math>\mu</math>M</b>	<b>Delphinidin 10 <math>\mu</math>M</b>	<b>Delphinidin 50 <math>\mu</math>M</b>	<b>Delphinidin 100 <math>\mu</math>M</b>	<b>Cpt 100 <math>\mu</math>M</b>
TI [%]	0,89	2,46	1,43	1,67	7,55	7,34
TI [%]	0,66	2,90	0,92	1,19	6,17	10,30
TI [%]	0,33	0,70	1,18	3,57	5,35	3,73
TI [%]	0,61	0,66	4,44	3,36	7,93	5,24
TI [%]	0,89	0,58	1,13	1,99	7,10	4,52
TI [%]	0,36	0,70	1,23	1,53	5,79	5,26
TI [%]	0,29	0,58	0,57	3,81	4,99	-
TI [%]	0,36	0,28	0,79	2,87	6,01	-
TI [%]	0,34	0,82	1,16	3,10	6,65	-
TI [%]	0,63	0,31	1,70	2,78	5,92	-
TI [%]	0,37	0,65	1,18	2,48	10,23	-
TI [%]	0,39	0,52	0,84	3,91	9,29	-
TI [%]	0,49	0,90	0,75	1,00	7,58	-
TI [%]	0,41	1,24	0,54	2,71	7,28	-
TI [%]	0,64	1,18	0,51	1,25	6,06	-
TI [%]	0,56	0,48	0,91	2,02	6,45	-
TI [%]	0,40	1,85	0,79	1,55	5,04	-
TI [%]	0,41	2,15	0,65	1,67	7,66	-
TI [%]	0,52	1,14	0,60	2,26	6,06	-
TI [%]	0,49	1,33	0,94	4,14	-	-
TI [%]	0,60	0,32	1,07	4,06	-	-
TI [%]	0,24	0,40	1,52	-	-	-
TI [%]	0,47	0,41	1,15	-	-	-
TI [%]	0,53	0,31	0,50	-	-	-
TI [%]	0,54	1,22	1,37	-	-	-
TI [%]	-	0,71	0,75	-	-	-
TI [%]	-	0,54	0,90	-	-	-
<b>Mittelwert</b>	<b>0,50</b>	<b>0,91</b>	<b>1,09</b>	<b>2,52</b>	<b>6,80</b>	<b>6,06</b>
<b>Standardabweichung</b>	<b>0,17</b>	<b>0,66</b>	<b>0,74</b>	<b>1,02</b>	<b>1,37</b>	<b>2,40</b>

## Anhang

### 2. Vor- und Koinkubation: Cpt mit Delphinidin

<b>Substanz</b>	<b>Delphinidin 1 µM + Cpt 100 µM</b>	<b>Delphinidin 10 µM + Cpt 100 µM</b>	<b>Delphinidin 50 µM + Cpt 100 µM</b>	<b>Delphinidin 100 µM + Cpt 100 µM</b>
TI [%]	1,64	2,34	4,13	10,20
TI [%]	1,59	1,39	3,12	11,03
TI [%]	-	-	6,53	13,46
TI [%]	8,84	6,72	5,12	10,97
TI [%]	4,05	2,58	6,11	10,29
TI [%]	3,63	2,34	4,90	11,42
<b>Mittelwert</b>	<b>3,95</b>	<b>3,08</b>	<b>4,99</b>	<b>11,23</b>
<b>Standardabweichung</b>	<b>2,96</b>	<b>2,09</b>	<b>1,26</b>	<b>1,19</b>

### Daten zu Abb. 51

Abb. 51: Modulation der strangbrechenden Wirkung von Camptothecin durch Malvidin, gemessen mittels Cometassay.

#### 1. Malvidin bzw. Camptothecin alleine

<b>Substanz</b>	<b>DMSO</b>	<b>Malvidin 1 µM</b>	<b>Malvidin 10 µM</b>	<b>Malvidin 50 µM</b>	<b>Malvidin 100 µM</b>	<b>Cpt 100 µM</b>
TI [%]	0,20	-	1,18	-	8,59	-
TI [%]	0,40	-	2,97	-	5,70	10,72
TI [%]	0,61	0,64	0,20	0,55	-	3,62
TI [%]	0,89	0,59	0,16	0,77	-	5,25
TI [%]	1,48	0,17	0,31	0,65	4,70	4,92
TI [%]	0,33	0,33	0,39	0,63	6,30	5,54
<b>Mittelwert</b>	<b>0,65</b>	<b>0,43</b>	<b>0,87</b>	<b>0,65</b>	<b>6,32</b>	<b>6,01</b>
<b>Standardabweichung</b>	<b>0,47</b>	<b>0,22</b>	<b>1,10</b>	<b>0,09</b>	<b>1,65</b>	<b>2,73</b>

## Anhang

### 2. Vor- und Koinkubation: Cpt mit Malvidin

<b>Substanz</b>	<b>Malvidin 1 µM + Cpt 100 µM</b>	<b>Malvidin 10 µM + Cpt 100 µM</b>	<b>Malvidin 50 µM + Cpt 100 µM</b>	<b>Malvidin 100 µM + Cpt 100 µM</b>
TI [%]	9,45	13,59	-	10,85
TI [%]	5,38	9,18	-	-
TI [%]	6,12	5,39	2,35	9,71
TI [%]	6,00	4,36	4,14	7,31
TI [%]	-	10,87	-	10,87
TI [%]	7,03	-	5,86	14,10
<b>Mittelwert</b>	<b>6,80</b>	<b>8,68</b>	<b>4,12</b>	<b>10,57</b>
<b>Standardabweichung</b>	<b>1,60</b>	<b>3,83</b>	<b>1,76</b>	<b>2,45</b>

### Daten zu Abb. 54

Abb. 54: Einfluss von Etoposid auf das Wachstum von HT29-Zellen (SRB-Test).

<b>Etoposid [µM]</b>	<b>0</b>	<b>10</b>	<b>25</b>	<b>50</b>	<b>75</b>	<b>100</b>
T/C [%]	100	68,01	67,95	61,57	63,61	56,75
T/C [%]	100	109,37	117,50	106,39	78,52	68,22
T/C [%]	100	107,82	106,77	110,27	98,93	46,24
T/C [%]	100	107,95	107,86	97,73	100,96	90,08
<b>Mittelwert</b>	<b>100,00</b>	<b>98,29</b>	<b>100,02</b>	<b>93,99</b>	<b>85,50</b>	<b>65,32</b>
<b>Standardabweichung</b>	<b>7,00</b>	<b>17,50</b>	<b>19,00</b>	<b>19,30</b>	<b>15,40</b>	<b>16,3</b>

**Daten zu Abb. 55**

Abb. 55: Modulation der strangbrechenden Wirkung von Etoposid durch Delphinidin, gemessen mittels Comet-Assay,

## 1. Delphinidin bzw. Etoposid alleine

Substanz	DMSO	Delphinidin 1 $\mu$ M	Delphinidin 10 $\mu$ M	Delphinidin 50 $\mu$ M	Delphinidin 100 $\mu$ M	Etoposid 10 $\mu$ M
TI [%]	0,36	0,65	1,16	3,81	-	9,75
TI [%]	0,34	0,52	1,70	2,87	-	8,82
TI [%]	1,47	0,90	1,18	1,15	-	17,76
TI [%]	0,63	1,24	0,84	-	6,01	-
TI [%]	0,37	1,18	0,75	3,10	6,65	12,96
TI [%]	0,39	0,48	0,54	2,78	5,92	8,93
TI [%]	0,49	1,85	0,51	2,48	10,23	14,64
TI [%]	0,41	-	0,91	3,91	9,29	10,34
TI [%]	0,64	1,14	0,34	1,00	7,58	11,99
TI [%]	0,88	1,33	0,79	2,71	7,28	9,84
<b>Mittelwert</b>	<b>0,60</b>	<b>1,03</b>	<b>0,87</b>	<b>2,65</b>	<b>7,57</b>	<b>11,67</b>
<b>Standardabweichung</b>	<b>0,35</b>	<b>0,44</b>	<b>0,40</b>	<b>1,01</b>	<b>1,64</b>	<b>3,00</b>

## 2. Vor- und Koinkubation: Etoposid mit Delphinidin

Substanz	Delphinidin 1 $\mu$ M + Eto 100 $\mu$ M	Delphinidin 10 $\mu$ M + Eto 100 $\mu$ M	Delphinidin 50 $\mu$ M + Eto 100 $\mu$ M	Delphinidin 100 $\mu$ M + Eto 100 $\mu$ M
TI [%]	7,76	3,81	13,55	19,82
TI [%]	8,67	5,06	12,33	21,87
TI [%]	17,19	-	20,97	-
TI [%]	-	-	20,00	-
TI [%]	14,60	5,76	9,57	23,06
TI [%]	15,19	5,30	10,05	20,44
TI [%]	17,89	-	18,68	-
TI [%]	10,03	-	10,85	26,78
TI [%]	-	2,71	9,01	20,55
TI [%]	-	3,91	10,76	14,30
<b>Mittelwert</b>	<b>13,05</b>	<b>4,43</b>	<b>13,58</b>	<b>20,97</b>
<b>Standardabweichung</b>	<b>4,16</b>	<b>1,14</b>	<b>4,57</b>	<b>3,77</b>

**Daten zu Abb. 57**

Abb. 57: Einfluss von Doxorubicin auf das Wachstum von HT29-Zellen (SRB).

Doxorubicin [ $\mu\text{M}$ ]	0	1	5	10	25	50
T/C [%]	100	-	-	40,66	39,28	32,62
T/C [%]	100	65,25	61,62	58,54	-	34,07
T/C [%]	100	93,74	76,34	-	54,23	-
T/C [%]	100	85,93	-	40,56	38,39	31,73
T/C [%]	100	75,87	55,00	40,94	-	31,43
<b>Mittelwert</b>	<b>100,00</b>	<b>80,20</b>	<b>64,32</b>	<b>45,18</b>	<b>43,97</b>	<b>32,46</b>
<b>Standardabweichung</b>	<b>7,45</b>	<b>10,70</b>	<b>8,90</b>	<b>7,70</b>	<b>7,30</b>	<b>1,00</b>

**Daten zu Abb. 58**

Abb. 58: Modulation der strangbrechenden Wirkung von Doxorubicin durch Delphinidin, gemessen mittels Cometassay.

## 1. Delphinidin bzw. Doxorubicin alleine

Substanz	DMSO	Delphinidin 1 $\mu\text{M}$	Delphinidin 10 $\mu\text{M}$	Delphinidin 50 $\mu\text{M}$	Delphinidin 100 $\mu\text{M}$	Dox 10 $\mu\text{M}$
TI [%]	0,56	0,32	0,65	1,25	3,53	-
TI [%]	0,40	0,40	0,60	0,59	-	4,29
TI [%]	0,41	0,41	0,94	2,02	3,32	4,86
TI [%]	0,52	0,31	1,07	1,55	3,43	-
TI [%]	0,49	1,22	1,52	1,67	-	10,38
TI [%]	0,60	0,71	1,15	2,26	6,06	14,11
TI [%]	0,24	0,54	0,50	1,08	6,45	-
TI [%]	0,47	0,57	1,37	0,89	5,04	9,34
TI [%]	0,53	0,55	0,75	4,14	7,66	6,40
TI [%]	0,54	0,72	0,90	4,06	6,06	7,12
<b>Mittelwert</b>	<b>0,48</b>	<b>0,58</b>	<b>0,95</b>	<b>1,95</b>	<b>5,19</b>	<b>8,07</b>
<b>Standardabweichung</b>	<b>0,10</b>	<b>0,27</b>	<b>0,34</b>	<b>1,24</b>	<b>1,63</b>	<b>3,46</b>

## Anhang

### 2. Vor- und Koinkubation: Doxorubicin mit Delphinidin

<b>Substanz</b>	<b>Delphinidin 1 µM + Eto 100 µM</b>	<b>Delphinidin 10 µM + Eto 100 µM</b>	<b>Delphinidin 50 µM + Eto 100 µM</b>	<b>Delphinidin 100 µM + Eto 100 µM</b>
TI [%]	3,42	1,56	6,35	-
TI [%]	-	0,88	5,32	-
TI [%]	-	1,14	4,96	-
TI [%]	-	0,76	4,48	6,97
TI [%]	8,72	1,57	-	18,16
TI [%]	9,39	1,52	-	22,06
TI [%]	5,53	1,06	4,70	13,32
TI [%]	5,98	-	4,67	
TI [%]	4,56	3,92	7,53	13,22
TI [%]	3,96	3,13	8,56	11,86
<b>Mittelwert</b>	<b>5,94</b>	<b>1,73</b>	<b>5,82</b>	<b>14,26</b>
<b>Standardabweichung</b>	<b>2,31</b>	<b>1,08</b>	<b>1,52</b>	<b>4,78</b>

### 2. Vor- und Koinkubation: Doxorubicin mit Delphinidin, mit Fpg-Behandlung

<b>Substanz</b>	<b>DMSO</b>	<b>Menadion 20 µM ohne Fpg</b>	<b>Menadion 20 µM mit Fpg</b>	<b>Dox + Del 1 µM</b>	<b>Dox + Del 10 µM</b>	<b>Dox + Del 50 µM</b>	<b>Dox 10 µM</b>
TI [%]	3,88	1,75	15,76	8,75	9,39	9,00	10,05
TI [%]	-	2,07	12,30	8,55	6,41	9,14	-
TI [%]	-	3,02	6,58	17,02	6,55	-	-
TI [%]	-	3,18	-	18,26	-	-	-
TI [%]	1,47	-	-	10,38	-	15,17	11,52
TI [%]	2,92	6,14	-	18,02	-	9,09	-
TI [%]	1,24	2,69	9,76	19,47	15,42	12,34	16,06
TI [%]	2,62	2,90	5,82	13,46	13,74	11,01	13,93
TI [%]	2,96	-	13,22	-	11,19	6,70	8,74
TI [%]	1,96	-	11,66	9,31	9,35	-	7,99
<b>Mittelwert</b>	<b>2,44</b>	<b>3,11</b>	<b>10,73</b>	<b>13,69</b>	<b>10,29</b>	<b>10,35</b>	<b>11,38</b>
<b>Standard- abweichung</b>	<b>0,93</b>	<b>1,43</b>	<b>3,58</b>	<b>4,54</b>	<b>3,41</b>	<b>2,76</b>	<b>3,12</b>

**Daten zu Abb. 59**

Abb. 59: Amplexrot<sup>®</sup>-Test zu Bestimmung des H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Gehalts im Zellkulturmedium nach Inkubation von HT29-Zellen mit verschiedenen Konzentrationen an Doxorubicin nach 1 h und nach 24 h (serumhaltig).

## 1. Doxorubicin, 1 h

	Medium	DMSO	50 µM	25 µM	10 µM	5 µM	1 µM
<b>1. Messung</b>	0,18	0,16	0,23	0,27	0,21	0,21	0,17
<b>2. Messung</b>	-0,01	-0,01	0,04	0,07	0,02	-0,01	-0,01
<b>Mittelwert</b>	<b>0,09</b>	<b>0,08</b>	<b>0,14</b>	<b>0,17</b>	<b>0,12</b>	<b>0,10</b>	<b>0,08</b>
<b>Standardabweichung</b>	<b>0,13</b>	<b>0,12</b>	<b>0,13</b>	<b>0,14</b>	<b>0,13</b>	<b>0,16</b>	<b>0,13</b>

## 2. Doxorubicin, 1 h, 100 U/ml Katalase

	Medium	DMSO	50 µM	25 µM	10 µM	5 µM	1 µM
<b>1. Messung</b>	-0,10	-0,11	0,07	0,01	-0,09	-0,08	-0,10
<b>2. Messung</b>	-0,14	-0,15	-0,14	-0,03	-0,11	-0,12	-0,15
<b>Mittelwert</b>	<b>-0,12</b>	<b>-0,13</b>	<b>-0,04</b>	<b>-0,01</b>	<b>-0,10</b>	<b>-0,10</b>	<b>-0,13</b>
<b>Standardabweichung</b>	<b>0,03</b>	<b>0,03</b>	<b>0,15</b>	<b>0,03</b>	<b>0,01</b>	<b>0,03</b>	<b>0,04</b>

## 3. Doxorubicin, 24 h

	Medium	DMSO	50 µM	25 µM	10 µM	5 µM	1 µM
<b>1. Messung</b>	0,53	0,49	0,35	0,35	0,31	0,32	0,34
<b>2. Messung</b>	0,25	0,20	0,23	0,18	0,13	0,10	0,14
<b>Mittelwert</b>	<b>0,39</b>	<b>0,35</b>	<b>0,29</b>	<b>0,27</b>	<b>0,22</b>	<b>0,21</b>	<b>0,24</b>
<b>Standardabweichung</b>	<b>0,20</b>	<b>0,21</b>	<b>0,08</b>	<b>0,12</b>	<b>0,13</b>	<b>0,16</b>	<b>0,14</b>

## 4. Doxorubicin, 24 h, 100 U/ml Katalase

	Medium	DMSO	50 µM	25 µM	10 µM	5 µM	1 µM
<b>1. Messung</b>	0,45	0,36	0,30	0,28	0,23	0,38	0,25
<b>2. Messung</b>	0,21	0,14	0,15	0,08	0,01	0,07	0,02
<b>Mittelwert</b>	<b>0,33</b>	<b>0,25</b>	<b>0,23</b>	<b>0,18</b>	<b>0,12</b>	<b>0,23</b>	<b>0,14</b>
<b>Standardabweichung</b>	<b>0,17</b>	<b>0,16</b>	<b>0,11</b>	<b>0,14</b>	<b>0,16</b>	<b>0,22</b>	<b>0,16</b>

**Daten zu Abb. 60**

Abb. 60: Modulation der strangbrechenden Wirkung von Doxorubicin durch Delphinidin in Anwesenheit von Katalase (100 U/ml), gemessen mittels Cometassay.

## 1. ohne Fpg-Behandlung

	<b>Dox 10 µM</b>	<b>Dox + Del 1</b>	<b>Dox + Del 10</b>	<b>Dox + Del 50</b>	<b>Dox + Del 100</b>
<b>TI [%]</b>	5,35	4,28	2,10	5,28	4,39
<b>TI [%]</b>	5,02	5,81	1,39	3,35	2,91
<b>TI [%]</b>	7,97	1,66	1,11	3,63	2,06
<b>TI [%]</b>	4,30	1,39	1,29	4,38	-
<b>TI [%]</b>	5,52	1,48	-	3,84	-
<b>TI [%]</b>	4,88	2,08	-	2,45	-
<b>TI [%]</b>	9,13	2,58	3,67	3,02	3,86
<b>TI [%]</b>	6,48	-	2,35	-	3,91
<b>TI [%]</b>	5,35	-	-	-	-
<b>Mittelwert</b>	<b>6,00</b>	<b>2,75</b>	<b>1,99</b>	<b>3,71</b>	<b>3,43</b>
<b>Standardabweichung</b>	<b>1,58</b>	<b>1,67</b>	<b>0,96</b>	<b>0,92</b>	<b>0,93</b>

## 2. mit Fpg-Behandlung

	<b>Dox 10 µM</b>	<b>Dox + Del 1</b>	<b>Dox + Del 10</b>	<b>Dox + Del 50</b>	<b>Dox + Del 100</b>
<b>TI [%]</b>	9,72	10,22	10,23	8,68	9,79
<b>TI [%]</b>	10,36	-	10,71	11,16	9,42
<b>TI [%]</b>	10,66	-	-	11,52	-
<b>TI [%]</b>	6,88	9,02	6,27	13,64	5,54
<b>TI [%]</b>	-	7,69	6,16	7,64	5,43
<b>TI [%]</b>	-	-	7,36	6,10	-
<b>TI [%]</b>	11,45	12,54	6,31	6,29	4,50
<b>TI [%]</b>	16,34	14,61	-	8,99	9,68
<b>TI [%]</b>	-	-	-	11,42	9,77
<b>Mittelwert</b>	<b>10,50</b>	<b>10,82</b>	<b>7,84</b>	<b>9,49</b>	<b>7,73</b>
<b>Standardabweichung</b>	<b>1,89</b>	<b>2,77</b>	<b>2,09</b>	<b>2,60</b>	<b>2,44</b>

**Daten zu Abb. 62**

Abb. 62: ICE-Bioassay: Bestimmung der DNA-gebundenen Topoisomerase II $\alpha$  nach Vorinkubation (30 min, serumfrei, 100 U/ml Katalase) mit DMSO, 10  $\mu$ M und 30  $\mu$ M Delphinidin und Koinkubation mit dem Topoisomerase-II-gift Doxorubicin.

1. Kombination: Doxorubicin 1  $\mu$ M mit Delphinidin 10 und 30  $\mu$ M

	<b>Dox 1 <math>\mu</math>M</b>	<b>Del 10 <math>\mu</math>M + Dox 1 <math>\mu</math>M</b>	<b>Del 30 <math>\mu</math>M + Dox 1 <math>\mu</math>M</b>
T/C [%]	100	89,48	49,57
T/C [%]	100	69,41	73,72
T/C [%]	100	85,55	-
T/C [%]	100	76,09	77,33
<b>Mittelwert</b>	<b>100</b>	<b>81,48</b>	<b>61,64</b>
<b>Standardabweichung</b>	<b>0</b>	<b>9,09</b>	<b>15,09</b>

2. Kombination: Doxorubicin 10  $\mu$ M mit Delphinidin 10 und 30  $\mu$ M

	<b>Dox 1 <math>\mu</math>M</b>	<b>Del 10 <math>\mu</math>M + Dox 10 <math>\mu</math>M</b>	<b>Del 30 <math>\mu</math>M + Dox 10 <math>\mu</math>M</b>
T/C [%]	100	94,89	70,53
T/C [%]	100	84,68	57,13
T/C [%]	100	80,15	69,14
T/C [%]	100	85,40	-
<b>Mittelwert</b>	<b>100</b>	<b>86,28</b>	<b>65,60</b>
<b>Standardabweichung</b>	<b>0</b>	<b>6,19</b>	<b>7,37</b>

**Daten zu Abb. 63**

Abb. 63: Amplexrot<sup>®</sup>-Test zu Bestimmung des H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Gehalts im Zellkulturmedium nach Inkubation von HT29-Zellen mit verschiedenen Konzentrationen an Mirtoselect (lila) und Oenocyanine (marineblau).

## 1. Mirtoselect, 15 min

	<b>DMSO</b>	<b>10 µg/ml</b>	<b>30 µg/ml</b>	<b>100 µg/ml</b>	<b>250 µg/ml</b>	<b>500 µg/ml</b>
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [µM]</b>	0,31	0,72	1,34	3,62	9,03	11,85
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [µM]</b>	0,21	0,63	1,34	3,48	8,19	17,44
<b>Mittelwert</b>	<b>0,26</b>	<b>0,68</b>	<b>1,34</b>	<b>3,55</b>	<b>8,61</b>	<b>14,65</b>
<b>Standardabweichung</b>	<b>0,07</b>	<b>0,06</b>	<b>0</b>	<b>0,10</b>	<b>0,59</b>	<b>3,95</b>

## 2. Mirtoselect, 15 min, 100 U/ml Katalase

	<b>DMSO</b>	<b>10 µg/ml</b>	<b>30 µg/ml</b>	<b>100 µg/ml</b>	<b>250 µg/ml</b>	<b>500 µg/ml</b>
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [µM]</b>	-0,30	-0,25	-0,03	0,12	0,14	0,12
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [µM]</b>	-0,32	-0,22	-0,04	0,15	0,13	0,19
<b>Mittelwert</b>	<b>-0,31</b>	<b>-0,24</b>	<b>-0,04</b>	<b>0,14</b>	<b>0,14</b>	<b>0,16</b>
<b>Standardabweichung</b>	<b>0,01</b>	<b>0,02</b>	<b>0,01</b>	<b>0,02</b>	<b>0,01</b>	<b>0,05</b>

## 3. Oenocyanine, 15 min

	<b>DMSO</b>	<b>10 µg/ml</b>	<b>30 µg/ml</b>	<b>100 µg/ml</b>	<b>250 µg/ml</b>	<b>500 µg/ml</b>
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [µM]</b>	-0,18	0,22	1,01	2,18	4,43	10,61
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [µM]</b>	-0,14	0,38	0,73	3,36	7,56	15,12
<b>Mittelwert</b>	<b>-0,16</b>	<b>0,30</b>	<b>0,87</b>	<b>2,77</b>	<b>6,00</b>	<b>12,87</b>
<b>Standardabweichung</b>	<b>0,03</b>	<b>0,11</b>	<b>0,20</b>	<b>0,83</b>	<b>2,21</b>	<b>3,19</b>

## 4. Oenocyanine, 15 min, 100 U/ml Katalase

	<b>DMSO</b>	<b>10 µg/ml</b>	<b>30 µg/ml</b>	<b>100 µg/ml</b>	<b>250 µg/ml</b>	<b>500 µg/ml</b>
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [µM]</b>	-0,27	-0,17	0,19	0,50	0,82	0,81
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [µM]</b>	-0,31	-0,24	-0,08	0,43	0,83	0,80
<b>Mittelwert</b>	<b>-0,29</b>	<b>-0,21</b>	<b>0,06</b>	<b>0,47</b>	<b>0,83</b>	<b>0,81</b>
<b>Standardabweichung</b>	<b>0,03</b>	<b>0,05</b>	<b>0,19</b>	<b>0,05</b>	<b>0,01</b>	<b>0,01</b>

## Anhang

### 5. Mirtoselect, 45 min

	<b>DMSO</b>	<b>10 µg/ml</b>	<b>30 µg/ml</b>	<b>100 µg/ml</b>	<b>250 µg/ml</b>	<b>500 µg/ml</b>
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [µM]</b>	0,23	0,69	1,23	3,98	8,61	16,19
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [µM]</b>	0,48	1,03	1,89	5,84	11,51	16,49
<b>Mittelwert</b>	<b>0,36</b>	<b>0,86</b>	<b>1,56</b>	<b>4,51</b>	<b>10,06</b>	<b>16,34</b>
<b>Standardabweichung</b>	<b>0,18</b>	<b>0,24</b>	<b>0,47</b>	<b>0,75</b>	<b>2,05</b>	<b>0,21</b>

### 6. Mirtoselect, 45 min, 100 U/ml Katalase

	<b>DMSO</b>	<b>10 µg/ml</b>	<b>30 µg/ml</b>	<b>100 µg/ml</b>	<b>250 µg/ml</b>	<b>500 µg/ml</b>
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [µM]</b>	-0,31	-0,21	-0,02	0,02	0,11	0,03
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [µM]</b>	-0,32	-0,23	-0,08	0,03	0,07	0,08
<b>Mittelwert</b>	<b>-0,32</b>	<b>-0,22</b>	<b>-0,05</b>	<b>0,03</b>	<b>0,09</b>	<b>0,06</b>
<b>Standardabweichung</b>	<b>0,01</b>	<b>0,01</b>	<b>0,04</b>	<b>0,01</b>	<b>0,03</b>	<b>0,04</b>

### 7. Oenocyanine, 45 min

	<b>DMSO</b>	<b>10 µg/ml</b>	<b>30 µg/ml</b>	<b>100 µg/ml</b>	<b>250 µg/ml</b>	<b>500 µg/ml</b>
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [µM]</b>	-0,20	0,17	0,81	1,41	2,65	5,83
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [µM]</b>	-0,09	0,02	0,58	1,89	2,85	5,35
<b>Mittelwert</b>	<b>-0,15</b>	<b>0,10</b>	<b>0,70</b>	<b>1,65</b>	<b>2,75</b>	<b>5,59</b>
<b>Standardabweichung</b>	<b>0,08</b>	<b>0,11</b>	<b>0,16</b>	<b>0,34</b>	<b>0,14</b>	<b>0,34</b>

### 8. Oenocyanine, 45 min, 100 U/ml Katalase

	<b>DMSO</b>	<b>10 µg/ml</b>	<b>30 µg/ml</b>	<b>100 µg/ml</b>	<b>250 µg/ml</b>	<b>500 µg/ml</b>
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [µM]</b>	-0,25	-0,15	0,06	0,41	0,72	1,09
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [µM]</b>	-0,24	-0,17	0,05	0,46	0,64	0,81
<b>Mittelwert</b>	<b>-0,25</b>	<b>-0,16</b>	<b>0,06</b>	<b>0,44</b>	<b>0,68</b>	<b>0,95</b>
<b>Standardabweichung</b>	<b>0,01</b>	<b>0,01</b>	<b>0,01</b>	<b>0,04</b>	<b>0,06</b>	<b>0,20</b>

**Daten zu Abb. 64**

Abb. 64: Einfluss von Mirtoselect (lila) und Oenocyanine (marineblau) auf das Wachstum von HT29-Zellen in Abwesenheit (durchgezogene Linie) und Anwesenheit (gestrichelte Linie) von 100 U/ml Katalase (SRB).

## 1. Oenocyanine

Oenocyanine [ $\mu\text{g/ml}$ ]	0	10	50	100	250	500
T/C [%]	100	109,82	106,46	91,33	36,77	8,35
T/C [%]	100	98,57	73,11	53,26	35,49	7,61
T/C [%]	100	108,19	95,11	94,36	28,57	12,15
T/C [%]	100	53,56	65,53	35,04	-	12,70
<b>Mittelwert</b>	<b>100,00</b>	<b>92,54</b>	<b>85,05</b>	<b>68,50</b>	<b>33,61</b>	<b>10,20</b>
<b>Standard-abweichung</b>	<b>1,33</b>	<b>22,9</b>	<b>16,5</b>	<b>25,2</b>	<b>3,6</b>	<b>2,2</b>

## 2. Mirtoselect

Mirtoselect [ $\mu\text{g/ml}$ ]	0	10	50	100	250	500
T/C [%]	100	114,36	85,16	84,66	5,95	6,39
T/C [%]	100	116,34	83,45	79,80	7,26	12,76
T/C [%]	100	-	88,08	81,97	14,06	19,63
T/C [%]	100	99,48	-	-	9,71	13,51
<b>Mittelwert</b>	<b>100,00</b>	<b>110,06</b>	<b>85,56</b>	<b>82,15</b>	<b>9,25</b>	<b>13,07</b>
<b>Standardabweichung</b>	<b>2,78</b>	<b>7,5</b>	<b>1,9</b>	<b>2,0</b>	<b>3,1</b>	<b>4,7</b>

## 3. Oenocyanine, 100 U/ml Katalase

Oeno [ $\mu\text{g/ml}$ ]	0	10	50	100	125	150	175	200	225
T/C [%]	100	64,71	51,01	55,18	64,71	51,01	55,18	44,62	40,95
T/C [%]	100	52,71	89,95	111,71	75,87	55,00	40,94	29,21	31,43
T/C [%]	100	-	-	-	64,71	51,01	55,18	44,62	40,95
<b>Mittelwert</b>	<b>100,00</b>	<b>58,71</b>	<b>70,48</b>	<b>83,44</b>	<b>68,43</b>	<b>52,34</b>	<b>50,43</b>	<b>39,49</b>	<b>37,77</b>
<b>Standard-abweichung</b>	<b>7,45</b>	<b>6,0</b>	<b>19,5</b>	<b>28,3</b>	<b>5,3</b>	<b>1,9</b>	<b>6,7</b>	<b>7,3</b>	<b>4,5</b>

## Anhang

### 4. Mirtoselect, 100 U/ml Katalase

Oenocyanine [ $\mu\text{g/ml}$ ]	0	1	5	10	25	50
T/C [%]	100	117,37	110,87	94,72	88,27	65,82
T/C [%]	100	84,97	52,66	54,18	40,00	32,07
T/C [%]	100					
T/C [%]	100					
T/C [%]	100					
<b>Mittelwert</b>	<b>100,00</b>	<b>101,17</b>	<b>81,76</b>	<b>74,45</b>	<b>64,14</b>	<b>48,95</b>
<b>Standardabweichung</b>	<b>7,45</b>	<b>16,2</b>	<b>29,1</b>	<b>20,3</b>	<b>24,1</b>	<b>16,9</b>

### Daten zu Abb. 70

Abb. 70: Fluoreszenzverdrangungstest mit Kalbsthymus-DNA zur Bestimmung der Konkurrenz der Extraktinhaltsstoffe mit dem Interkalator Ethidiumbromid.

#### 1. Oenocyanine

	DMSO	1 $\mu\text{g/ml}$	10 $\mu\text{g/ml}$	25 $\mu\text{g/ml}$	50 $\mu\text{g/ml}$	75 $\mu\text{g/ml}$	100 $\mu\text{g/ml}$
T/C [%]	100	89,61	-	-	62,39	58,54	54,47
T/C [%]	100	-	88,99	79,65	64,30	73,28	66,56
T/C [%]	100	101,57	100,12	89,90	89,42	72,35	62,20
T/C [%]	100	99,43	98,27	94,15	91,05	-	-
T/C [%]	100	-	-	-	59,98	58,50	53,87
<b>Mittelwert</b>	<b>100</b>	<b>95,79</b>	<b>95,79</b>	<b>87,90</b>	<b>73,43</b>	<b>65,67</b>	<b>59,27</b>
<b>Standardabweichung</b>	<b>8,5</b>	<b>4,9</b>	<b>5,0</b>	<b>6,1</b>	<b>13,8</b>	<b>7,2</b>	<b>5,3</b>

#### 2. Mirtoselect

	DMSO	1 $\mu\text{g/ml}$	5 $\mu\text{g/ml}$	10 $\mu\text{g/ml}$	25 $\mu\text{g/ml}$	50 $\mu\text{g/ml}$	75 $\mu\text{g/ml}$	100 $\mu\text{g/ml}$
T/C [%]	100	105,21	98,54	90,62	73,52	64,44	53,28	43,74
T/C [%]	100	92,05	87,48	79,22	73,64	62,33	-	44,86
T/C [%]	100	96,59	93,04	86,77	75,98	65,79	58,56	-
<b>Mittelwert</b>	<b>100</b>	<b>97,95</b>	<b>93,02</b>	<b>85,54</b>	<b>74,38</b>	<b>64,19</b>	<b>55,92</b>	<b>44,30</b>
<b>Standardabweichung</b>	<b>1,8</b>	<b>5,5</b>	<b>4,5</b>	<b>4,7</b>	<b>1,1</b>	<b>1,4</b>	<b>2,6</b>	<b>0,6</b>

**Daten zu Abb. 72**

Abb. 72: Fluoreszenzverdrängungstest mit Kalbsthymus-DNA zur Bestimmung der Konkurrenz der Extraktinhaltsstoffe mit dem „minor groove binder“ H33258.

## 1. Oenocyanine

	<b>DMSO</b>	<b>1</b> µg/ml	<b>10</b> µg/ml	<b>25</b> µg/ml	<b>50</b> µg/ml	<b>75</b> µg/ml	<b>100</b> µg/ml
T/C [%]	100	102,72	102,42	95,67	-	77,63	42,27
T/C [%]	100	100,15	100,36	98,44	82,14	84,83	57,43
T/C [%]	100	-	-	99,39	90,45	74,62	-
<b>Mittelwert</b>	<b>100</b>	<b>101,44</b>	<b>101,39</b>	<b>97,83</b>	<b>86,30</b>	<b>79,02</b>	<b>49,85</b>
<b>Standardabweichung</b>	<b>2,1</b>	<b>1,3</b>	<b>1,0</b>	<b>1,6</b>	<b>4,2</b>	<b>4,3</b>	<b>7,6</b>

## 2. Mirtoselect

	<b>DMSO</b>	<b>1</b> µg/ml	<b>10</b> µg/ml	<b>25</b> µg/ml	<b>50</b> µg/ml	<b>75</b> µg/ml	<b>100</b> µg/ml
T/C [%]	100	104,72	105,70	73,64	52,40	45,65	30,00
T/C [%]	100	101,88	107,30	78,49	65,90	28,08	27,72
T/C [%]	100	-	98,19	69,19	47,83	37,55	31,28
<b>Mittelwert</b>	<b>100</b>	<b>103,30</b>	<b>94,92</b>	<b>73,76</b>	<b>55,38</b>	<b>37,09</b>	<b>29,67</b>
<b>Standardabweichung</b>	<b>1,9</b>	<b>1,4</b>	<b>2,8</b>	<b>3,8</b>	<b>7,7</b>	<b>7,2</b>	<b>1,5</b>

**Daten zu Abb. 73**

Abb. 73: Zellzyklusverteilung von HT29-Zellen **(A)** nach Synchronisation in der G<sub>1</sub>-Phase des Zellzyklus und anschließender Inkubation mit Oenocyanine (36 h, serumfrei, 100 U/ml Katalase) **(B)** nach Synchronisation in der G<sub>2</sub>/M-Phase und anschließender Inkubation mit Oenocyanine (36 h, serumfrei, 100 U/ml Katalase), **(C)** nach Synchronisation in der G<sub>1</sub>-Phase des Zellzyklus und anschließender Inkubation mit Mirtoselect (36 h, serumfrei, 100 U/ml Katalase) **(D)** nach Synchronisation in der G<sub>2</sub>/M-Phase und anschließender Inkubation mit Mirtoselect (36 h, serumfrei, 100 U/ml Katalase).

1. Zellzyklusverteilung nach Synchronisation in der G<sub>1</sub>-Phase, Inkubation mit Oenocyanine, Zellen in der G<sub>1</sub>-Phase

Zellen in der G <sub>1</sub> -Phase [%]	Kontrolle	Arrest	DMSO	1 µg/ml	10 µg/ml	100 µg/ml	250 µg/ml
	53,50	66,47	43,76	54,76	56,41	64,58	60,07
	50,59	65,08	48,81	53,06	50,01	64,45	-
	43,56	62,67	52,55	62,36	73,19	56,98	61,32
	50,76	70,10	59,63	67,10	71,87	70,93	58,04
	55,7	-	-	-	-	-	-
	58,48	-	-	-	-	-	-
<b>Mittelwert</b>	<b>52,10</b>	<b>66,08</b>	<b>51,19</b>	<b>59,32</b>	<b>62,87</b>	<b>64,24</b>	<b>59,81</b>
<b>Standardabweichung</b>	<b>5,15</b>	<b>3,11</b>	<b>6,68</b>	<b>6,58</b>	<b>11,47</b>	<b>5,70</b>	<b>1,66</b>

## Anhang

### 2. Zellzyklusverteilung nach Synchronisation in der G<sub>1</sub>-Phase, Inkubation mit Oenocyanine, Zellen in der S-Phase

Zellen in der S-Phase [%]	Kontrolle	Arrest	DMSO	1 µg/ml	10 µg/ml	100 µg/ml	250 µg/ml
	26,51	11,44	19,03	10,11	15,53	6,27	11,15
	20,51	13,92	17,61	14,93	22,51	20,00	-
	32,93	10,30	19,72	17,33	6,64	11,64	18,03
	26,02	2,68	15,98	11,58	13,63	9,85	20,31
	13,72	-	-	-	-	-	-
	17,83	-	-	-	-	-	-
<b>Mittelwert</b>	<b>22,92</b>	<b>9,59</b>	<b>18,09</b>	<b>13,49</b>	<b>14,58</b>	<b>11,94</b>	<b>16,50</b>
<b>Standardabweichung</b>	<b>6,91</b>	<b>4,85</b>	<b>1,66</b>	<b>3,26</b>	<b>6,53</b>	<b>5,28</b>	<b>4,77</b>

### 3. Zellzyklusverteilung nach Synchronisation in der G<sub>1</sub>-Phase, Inkubation mit Oenocyanine, Zellen in der G<sub>2</sub>/M-Phase

Zellen in der G <sub>2</sub> /M-Phase [%]	Kontrolle	Arrest	DMSO	1 µg/ml	10 µg/ml	100 µg/ml	250 µg/ml
	19,99	22,09	37,22	35,13	28,06	29,15	28,78
	29,31	21,00	33,58	32,02	27,48	15,05	-
	23,51	27,02	27,72	20,31	20,17	31,28	20,58
	23,22	27,39	24,39	21,32	14,50	19,22	21,65
	30,58	-	-	-	-	-	-
	23,68	-	-	-	-	-	-
<b>Mittelwert</b>	<b>25,05</b>	<b>24,38</b>	<b>30,73</b>	<b>27,20</b>	<b>22,55</b>	<b>23,68</b>	<b>23,67</b>
<b>Standardabweichung</b>	<b>4,05</b>	<b>3,30</b>	<b>5,76</b>	<b>7,49</b>	<b>6,46</b>	<b>7,79</b>	<b>4,46</b>

## Anhang

### 4. Zellzyklusverteilung nach Synchronisation in der G<sub>2</sub>/M-Phase, Inkubation mit Oenocyanine, Zellen in der G<sub>1</sub>-Phase

Zellen in der G <sub>1</sub> -Phase [%]	Kontrolle	Arrest	DMSO	1 µg/ml	10 µg/ml	100 µg/ml	250 µg/ml
	53,50	13,82	43,93	46,49	45,85	41,86	44,71
	50,59	11,22	46,75	48,67	45,86	39,76	43,38
	43,56	14,32	39,88	47,05	47,70	49,38	48,19
	50,76	20,51	55,95	53,84	53,84	41,74	46,96
	55,7	-	-	-	-	-	-
	58,48	-	-	-	-	-	-
<b>Mittelwert</b>	<b>52,10</b>	<b>14,97</b>	<b>46,63</b>	<b>49,01</b>	<b>46,63</b>	<b>43,19</b>	<b>45,81</b>
<b>Standardabweichung</b>	<b>5,15</b>	<b>3,94</b>	<b>6,82</b>	<b>3,35</b>	<b>0,97</b>	<b>4,24</b>	<b>2,17</b>

### 5. Zellzyklusverteilung nach Synchronisation in der G<sub>2</sub>/M-Phase, Inkubation mit Oenocyanine, Zellen in der S-Phase

Zellen in der S-Phase [%]	Kontrolle	Arrest	DMSO	1 µg/ml	10 µg/ml	100 µg/ml	250 µg/ml
	26,51	12,90	15,45	20,82	18,76	25,46	30,71
	20,51	14,58	4,09	19,03	22,77	14,60	20,35
	32,93	11,49	14,71	21,55	26,57	17,81	23,76
	26,02	17,92	8,96	19,12	20,11	22,50	17,28
	13,72	-	-	-	-	-	-
	17,83	-	-	-	-	-	-
<b>Mittelwert</b>	<b>22,92</b>	<b>14,22</b>	<b>10,80</b>	<b>20,13</b>	<b>22,05</b>	<b>20,09</b>	<b>23,03</b>
<b>Standardabweichung</b>	<b>6,91</b>	<b>2,77</b>	<b>5,33</b>	<b>1,25</b>	<b>3,44</b>	<b>4,83</b>	<b>5,77</b>

## Anhang

### 6. Zellzyklusverteilung nach Synchronisation in der G<sub>2</sub>/M-Phase, Inkubation mit Oenocyanine, Zellen in der G<sub>2</sub>/M-Phase

Zellen in der G <sub>2</sub> /M-Phase [%]	Kontrolle	Arrest	DMSO	1 µg/ml	10 µg/ml	100 µg/ml	250 µg/ml
	19,99	73,28	40,61	32,69	35,38	32,68	24,58
	29,31	74,14	48,87	32,29	31,37	45,64	36,26
	23,51	72,94	42,44	31,40	25,72	28,46	28,04
	23,22	61,57	35,10	27,04	32,58	35,76	35,76
	30,58	-	-	-	-	-	-
	23,68	-	-	-	-	-	-
<b>Mittelwert</b>	<b>25,05</b>	<b>70,48</b>	<b>41,76</b>	<b>30,86</b>	<b>31,26</b>	<b>35,64</b>	<b>31,16</b>
<b>Standardabweichung</b>	<b>4,05</b>	<b>5,96</b>	<b>5,68</b>	<b>2,60</b>	<b>4,06</b>	<b>7,31</b>	<b>5,78</b>

### 7. Zellzyklusverteilung nach Synchronisation in der G<sub>1</sub>-Phase, Inkubation mit Mirtoselect, Zellen in der G<sub>1</sub>-Phase

Zellen in der G <sub>1</sub> -Phase [%]	Kontrolle	Arrest	DMSO	1 µg/ml	10 µg/ml	100 µg/ml	250 µg/ml
	53,50	66,47	43,76	58,85	-	54,53	72,27
	50,59	65,08	48,81	-	-	66,68	63,86
	43,56	62,67	52,55	53,38	60,68	69,54	73,07
	50,76	70,10	59,63	65,13	66,82	74,65	68,06
	55,7	-	-	-	-	-	-
	58,48	-	-	-	-	-	-
<b>Mittelwert</b>	<b>52,10</b>	<b>66,08</b>	<b>51,19</b>	<b>59,12</b>	<b>63,75</b>	<b>66,35</b>	<b>69,32</b>
<b>Standardabweichung</b>	<b>5,15</b>	<b>3,11</b>	<b>6,68</b>	<b>5,88</b>	<b>4,34</b>	<b>8,54</b>	<b>4,25</b>

## Anhang

### 8. Zellzyklusverteilung nach Synchronisation in der G<sub>1</sub>-Phase, Inkubation mit Mirtoselect, Zellen in der S-Phase

Zellen in der S-Phase [%]	Kontrolle	Arrest	DMSO	1 µg/ml	10 µg/ml	100 µg/ml	250 µg/ml
	26,51	11,44	19,03	25,68	-	19,01	5,90
	20,51	13,92	17,61	-	10,27	10,18	13,96
	32,93	10,30	19,72	12,01	18,10	11,83	7,43
	26,02	2,68	15,98	7,93	0,05	6,09	4,02
	13,72	-	-	-	-	-	-
	17,83	-	-	-	-	-	-
<b>Mittelwert</b>	<b>22,92</b>	<b>9,59</b>	<b>18,09</b>	<b>15,21</b>	<b>9,47</b>	<b>11,78</b>	<b>7,83</b>
<b>Standardabweichung</b>	<b>6,91</b>	<b>4,85</b>	<b>1,66</b>	<b>9,30</b>	<b>9,05</b>	<b>5,39</b>	<b>4,23</b>

### 9. Zellzyklusverteilung nach Synchronisation in der G<sub>1</sub>-Phase, Inkubation mit Mirtoselect, Zellen in der G<sub>2</sub>/M-Phase

Zellen in der G <sub>2</sub> /M-Phase [%]	Kontrolle	Arrest	DMSO	1 µg/ml	10 µg/ml	100 µg/ml	250 µg/ml
	19,99	22,09	37,22	15,47	-	36,46	21,83
	29,31	21,00	33,58	-	43,29	23,19	22,18
	23,51	27,02	27,72	34,60	21,22	28,62	19,49
	23,22	27,39	24,39	26,94	33,13	19,29	27,73
	30,58	-	-	-	-	-	-
	23,68	-	-	-	-	-	-
<b>Mittelwert</b>	<b>25,05</b>	<b>24,38</b>	<b>30,73</b>	<b>25,67</b>	<b>32,51</b>	<b>24,39</b>	<b>22,81</b>
<b>Standardabweichung</b>	<b>4,05</b>	<b>3,30</b>	<b>5,76</b>	<b>9,63</b>	<b>11,00</b>	<b>8,30</b>	<b>3,49</b>

## Anhang

### 10. Zellzyklusverteilung nach Synchronisation in der G<sub>2</sub>/M-Phase, Inkubation mit Mirtoselect, Zellen in der G<sub>1</sub>-Phase

Zellen in der G <sub>1</sub> -Phase [%]	Kontrolle	Arrest	DMSO	1 µg/ml	10 µg/ml	100 µg/ml	250 µg/ml
	53,50	13,82	43,93	44,56	45,03	34,66	51,56
	50,59	11,22	46,75	48,78	45,19	47,24	37,66
	43,56	14,32	39,88	48,77	47,22	49,13	55,97
	50,76	20,51	55,95	42,82	45,97	44,97	46,65
	55,7	-	-	-	-	-	-
	58,48	-	-	-	-	-	-
<b>Mittelwert</b>	<b>52,10</b>	<b>14,97</b>	<b>46,63</b>	<b>46,23</b>	<b>45,85</b>	<b>4,00</b>	<b>47,96</b>
<b>Standardabweichung</b>	<b>5,15</b>	<b>3,94</b>	<b>6,82</b>	<b>3,02</b>	<b>1,00</b>	<b>6,45</b>	<b>7,85</b>

### 11. Zellzyklusverteilung nach Synchronisation in der G<sub>2</sub>/M-Phase, Inkubation mit Mirtoselect, Zellen in der S-Phase

Zellen in der S-Phase [%]	Kontrolle	Arrest	DMSO	1 µg/ml	10 µg/ml	100 µg/ml	250 µg/ml
	26,51	12,90	15,45	7,48	19,64	-	16,58
	20,51	14,58	4,09	20,92	24,71	19,82	18,61
	32,93	11,49	14,71	24,35	21,90	-	13,04
	26,02	17,92	8,96	26,39	26,23	25,55	19,48
	13,72	-	-	-	-	-	-
	17,83	-	-	-	-	-	-
<b>Mittelwert</b>	<b>22,92</b>	<b>14,22</b>	<b>10,80</b>	<b>19,79</b>	<b>23,12</b>	<b>22,69</b>	<b>16,93</b>
<b>Standardabweichung</b>	<b>6,91</b>	<b>2,77</b>	<b>5,33</b>	<b>8,51</b>	<b>2,93</b>	<b>4,05</b>	<b>2,86</b>

## Anhang

### 12. Zellzyklusverteilung nach Synchronisation in der G<sub>2</sub>/M-Phase, Inkubation mit Oenocyanine, Zellen in der G<sub>2</sub>/M-Phase

Zellen in der G <sub>2</sub> /M-Phase [%]	Kontrolle	Arrest	DMSO	1 µg/ml	10 µg/ml	100 µg/ml	250 µg/ml
	19,99	73,28	40,61	47,96	35,34	22,84	31,87
	29,31	74,14	48,87	30,31	30,10	32,92	43,72
	23,51	72,94	42,44	26,88	27,91	-	30,99
	23,22	61,57	35,10	30,79	27,80	29,56	33,87
	30,58	-	-	-	-	-	-
	23,68	-	-	-	-	-	-
<b>Mittelwert</b>	<b>25,05</b>	<b>70,48</b>	<b>41,76</b>	<b>33,99</b>	<b>30,29</b>	<b>28,44</b>	<b>35,11</b>
<b>Standardabweichung</b>	<b>4,05</b>	<b>5,96</b>	<b>5,68</b>	<b>9,48</b>	<b>3,53</b>	<b>5,13</b>	<b>5,86</b>

### Daten zu Abb. 74

Abb. 74: Cometassay: Induktion von DNA-Strangbrüchen und oxidativen DNA-Schäden durch die anthocyanreichen Extrakte Oenocyanine (marineblau) und Mirtoselect (lila).

#### 1. ohne Fpg-Behandlung

Oenocyanine	DMSO	Oeno 1 µg/ml	Oeno 10 µg/ml	Oeno 50 µg/ml	Oeno 100 µg/ml	Menadion 20 µM
TI [%]	0,72	0,52	1,06	0,94	1,30	0,72
TI [%]	0,79	1,18	1,85	1,28	1,94	0,64
TI [%]	0,42	0,75	1,11	0,90	1,00	1,91
TI [%]	1,27	0,65	-	0,98	0,94	0,78
TI [%]	0,72	0,52	1,06	0,94	1,30	0,72
TI [%]	0,79	1,18	1,85	1,28	1,94	0,64
TI [%]	0,79	0,65	1,30	0,88	1,14	6,58
TI [%]	0,62	0,72	1,55	1,18	1,76	-
<b>Mittelwert</b>	<b>0,77</b>	<b>0,77</b>	<b>1,40</b>	<b>1,05</b>	<b>1,42</b>	<b>1,71</b>
<b>Standardabweichung</b>	<b>0,24</b>	<b>0,27</b>	<b>0,35</b>	<b>0,17</b>	<b>0,41</b>	<b>2,19</b>

## Anhang

### 2. ohne Fpg-Behandlung

<b>Mirtoselect</b>	<b>DMSO</b>	<b>Mirto 1 µg/ml</b>	<b>Mirto 10 µg/ml</b>	<b>Mirto 50 µg/ml</b>	<b>Mirto 100 µg/ml</b>	<b>Menadion 20 µM</b>
TI [%]	0,72	0,68	0,60	3,11	0,70	0,72
TI [%]	0,79	1,43	1,10	4,99	0,96	0,64
TI [%]	0,42	1,07	2,58	2,38	1,34	1,91
TI [%]	1,27	1,94	1,91	1,06	1,00	0,78
TI [%]	0,72	0,68	0,60	3,11	0,70	0,72
TI [%]	0,79	1,43	1,10	4,99	0,96	0,64
TI [%]	0,79	0,79	0,76	1,02	2,39	6,58
TI [%]	0,62	1,27	1,17	1,60	1,55	-
<b>Mittelwert</b>	<b>0,77</b>	<b>1,16</b>	<b>1,23</b>	<b>2,78</b>	<b>1,20</b>	<b>1,71</b>
<b>Standardabweichung</b>	<b>0,24</b>	<b>0,44</b>	<b>0,69</b>	<b>1,59</b>	<b>0,56</b>	<b>2,19</b>

### 3. mit Fpg-Behandlung

<b>Oenocyanine</b>	<b>DMSO</b>	<b>Oeno 1 µM</b>	<b>Oeno 10 µM</b>	<b>Oeno 50 µM</b>	<b>Oeno 100 µM</b>	<b>Menadion 20 µM</b>
TI [%]	1,06	1,48	2,31	1,68	2,03	8,87
TI [%]	1,91	1,86	1,85	1,88	2,07	-
TI [%]	1,51	1,28	1,25	5,65	2,16	9,42
TI [%]	1,39	1,64	1,12	4,16	3,45	9,67
TI [%]	1,06	1,48	2,31	1,68	2,03	8,87
TI [%]	1,91	1,86	1,85	1,88	2,07	-
TI [%]	1,88	1,99	1,54	7,87	2,21	-
TI [%]	1,99	3,58	1,81	2,77	3,29	-
<b>Mittelwert</b>	<b>1,58</b>	<b>1,90</b>	<b>1,76</b>	<b>3,45</b>	<b>2,41</b>	<b>9,21</b>
<b>Standardabweichung</b>	<b>0,38</b>	<b>0,72</b>	<b>0,44</b>	<b>2,28</b>	<b>0,60</b>	<b>0,40</b>

## Anhang

### 4. mit Fpg-Behandlung

Mirtoselect	DMSO	Mirto 1 µg/ml	Mirto 10 µg/ml	Mirto 50 µg/ml	Mirto 100 µg/ml	Menadion 20 µM
TI [%]	1,06	1,54	1,59	1,38	3,68	8,87
TI [%]	1,91	1,06	1,28	2,07	3,55	-
TI [%]	1,51	-	1,82	1,98	4,12	9,42
TI [%]	1,39	-	2,20	3,92	3,92	9,67
TI [%]	1,06	1,54	1,59	1,38	3,68	8,87
TI [%]	1,91	1,06	1,28	2,07	3,55	-
TI [%]	1,88	1,71	1,83	1,56	1,70	-
TI [%]	1,99	1,41	1,99	2,02	1,68	-
<b>Mittelwert</b>	<b>1,58</b>	<b>1,39</b>	<b>1,70</b>	<b>2,05</b>	<b>3,24</b>	<b>9,21</b>
<b>Standardabweichung</b>	<b>0,38</b>	<b>0,27</b>	<b>0,33</b>	<b>0,81</b>	<b>0,97</b>	<b>0,40</b>

### Daten zu Abb. 75

Abb. 75: Modulation der strangbrechenden Wirkung von Camptothecin (100 µM) durch Mirtoselect (lila) und Oenocyanine (marineblau), gemessen mittels Cometassay an HT29-Zellen.

	DMSO	Cpt + O1	Cpt + O10	Cpt + O50	Cpt + M1	Cpt + M10	Cpt + M100	Cpt + DMSO
SI [%]	0,53	2,39	2,57	3,67	3,29	3,56	5,31	3,80
SI [%]	0,30	4,17	4,59	3,91	3,43	1,89	2,93	3,37
SI [%]	0,71	3,67	2,82	1,49	3,13	-	1,20	8,57
SI [%]	0,42	3,55	3,43	3,96	-	-	1,74	7,42
SI [%]	0,42	-	1,12	1,83	1,16	2,05	-	9,58
SI [%]	0,62	-	1,07	-	1,69	1,67	-	10,56
SI [%]	0,47	1,50	2,71	0,87	0,99	2,18	6,04	7,80
SI [%]	0,40	1,20	2,07	-	0,78	-	-	-
<b>Mittelwert</b>	<b>0,48</b>	<b>2,75</b>	<b>2,55</b>	<b>2,62</b>	<b>2,07</b>	<b>2,27</b>	<b>3,44</b>	<b>7,30</b>
<b>Standardabweichung</b>	<b>0,13</b>	<b>1,23</b>	<b>1,16</b>	<b>1,38</b>	<b>1,17</b>	<b>0,75</b>	<b>2,15</b>	<b>2,75</b>

## Anhang

### Daten zu Abb. 76

Abb. 76: Modulation der strangbrechenden Wirkung von Doxorubicin (10  $\mu$ M) durch Oenocyanine (marineblau) und Mirtoselect (lila), gemessen mittels Cometassay an HT29-Zellen. Menadion siehe Abbildung 40.

#### 1. ohne Fpg-Behandlung

	<b>DMSO</b>	<b>Dox + O1</b>	<b>Dox + O10</b>	<b>Dox + O50</b>	<b>Dox + M1</b>	<b>Dox + M10</b>	<b>Dox + M100</b>	<b>Dox + DMSO</b>
<b>SI [%]</b>	0,56	3,21	3,40	4,75	2,00	2,95	3,37	9,48
<b>SI [%]</b>	0,57	2,28	2,55	-	2,49	-	2,97	8,47
<b>SI [%]</b>	0,78	3,09	3,87	3,09	2,47	3,09	-	8,88
<b>SI [%]</b>	0,86	4,53	3,02	-	2,12	3,60	3,23	8,06
<b>SI [%]</b>	0,50	2,58	1,17	2,51	1,82	1,20	0,97	6,11
<b>SI [%]</b>	0,47	1,98	1,91	2,36	1,75	2,50	0,97	6,23
<b>SI [%]</b>	0,79	-	1,06	1,93	2,83	2,61	2,38	9,96
<b>SI [%]</b>	-	-	3,23	3,95	2,79	1,88	2,08	9,13
<b>Mittelwert</b>	<b>0,65</b>	<b>2,95</b>	<b>2,53</b>	<b>3,10</b>	<b>2,28</b>	<b>2,55</b>	<b>2,28</b>	<b>8,29</b>
<b>Standardabweichung</b>	<b>0,16</b>	<b>0,91</b>	<b>1,05</b>	<b>1,07</b>	<b>0,42</b>	<b>0,80</b>	<b>1,00</b>	<b>1,43</b>

#### 2. mit Fpg-Behandlung

	<b>DMSO</b>	<b>Dox + O1</b>	<b>Dox + O10</b>	<b>Dox + O50</b>	<b>Dox + M1</b>	<b>Dox + M10</b>	<b>Dox + M100</b>	<b>Dox + DMSO</b>
<b>SI [%]</b>	1,93	3,72	4,26	4,43	13,02	4,43	10,54	8,02
<b>SI [%]</b>	2,12	4,52	3,22	3,91	10,51	3,91	13,31	14,76
<b>SI [%]</b>	1,43	2,58	2,42	8,19	2,85	7,35	4,79	12,04
<b>SI [%]</b>	1,42	-	4,21	6,76	4,19	7,30	5,63	14,09
<b>SI [%]</b>	1,15	4,35	-	2,52	3,40	5,26	3,72	9,61
<b>SI [%]</b>	1,34	4,07	-	1,87	2,83	8,16	5,10	-
<b>Mittelwert</b>	<b>1,57</b>	<b>3,85</b>	<b>3,53</b>	<b>4,61</b>	<b>6,13</b>	<b>6,07</b>	<b>7,18</b>	<b>11,70</b>
<b>Standardabweichung</b>	<b>0,38</b>	<b>0,77</b>	<b>0,88</b>	<b>2,44</b>	<b>4,46</b>	<b>1,76</b>	<b>3,83</b>	<b>2,88</b>

**Daten zu Abb. 77**

Abb. 77: Einfluss der Ellagatannine und der Ellagsäure auf das Wachstum von HT29-Zellen (SRB-Test).

<b>Castalagin [<math>\mu\text{M}</math>]</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>5</b>	<b>10</b>	<b>15</b>	<b>20</b>	<b>30</b>
T/C [%]	100	107,95	-	-	-	-	-
T/C [%]	100	-	-	43,06	23,92	12,02	6,23
T/C [%]	100	-	88,77	42,98	37,73	39,01	17,31
T/C [%]	100	51,63	47,02	45,99	44,49	30,87	-
<b>Mittelwert</b>	<b>100,00</b>	<b>79,79</b>	<b>67,89</b>	<b>44,01</b>	<b>35,38</b>	<b>27,30</b>	<b>11,77</b>
<b>Standardabweichung</b>	<b>6,2</b>	<b>28,2</b>	<b>20,9</b>	<b>1,4</b>	<b>8,6</b>	<b>11,3</b>	<b>5,5</b>

<b>Roburin E [<math>\mu\text{M}</math>]</b>	<b>0</b>	<b>5</b>	<b>10</b>	<b>15</b>	<b>20</b>	<b>30</b>
T/C [%]	100	-	54,34	-	-	-
T/C [%]	100	96,50	73,48	70,20	21,85	2,86
T/C [%]	100	77,63	67,67	33,77	36,36	6,56
T/C [%]	100	100,75	81,09	64,36	49,74	17,96
<b>Mittelwert</b>	<b>100,00</b>	<b>91,62</b>	<b>69,14</b>	<b>56,11</b>	<b>35,98</b>	<b>9,13</b>
<b>Standardabweichung</b>	<b>3,7</b>	<b>10,0</b>	<b>9,8</b>	<b>16,0</b>	<b>11,4</b>	<b>6,4</b>

<b>Grandinin [<math>\mu\text{M}</math>]</b>	<b>0</b>	<b>5</b>	<b>10</b>	<b>15</b>	<b>20</b>	<b>30</b>
T/C [%]	100	-	90,25	-	-	-
T/C [%]	100	105,36	95,47	93,84	83,95	32,95
T/C [%]	100	99,13	98,90	79,84	65,17	45,29
<b>Mittelwert</b>	<b>100,00</b>	<b>102,24</b>	<b>94,87</b>	<b>86,84</b>	<b>74,56</b>	<b>39,12</b>
<b>Standardabweichung</b>	<b>4,9</b>	<b>3,11</b>	<b>3,56</b>	<b>7,00</b>	<b>9,39</b>	<b>6,17</b>

<b>Vescalagin [<math>\mu\text{M}</math>]</b>	<b>0</b>	<b>10</b>	<b>15</b>	<b>20</b>	<b>25</b>	<b>30</b>
T/C [%]	100	90,91	-	-	-	-
T/C [%]	100	100,90	84,02	49,05	-	9,52
T/C [%]	100	85,64	76,01	63,07	41,20	22,83
T/C [%]	100	101,83	89,23	84,28	38,32	12,20
<b>Mittelwert</b>	<b>100,00</b>	<b>94,82</b>	<b>83,09</b>	<b>65,47</b>	<b>39,76</b>	<b>14,85</b>
<b>Standardabweichung</b>	<b>4,3</b>	<b>6,8</b>	<b>5,4</b>	<b>14,5</b>	<b>1,4</b>	<b>5,8</b>

## Anhang

<b>Ellagsäure [<math>\mu\text{M}</math>]</b>	<b>0</b>	<b>10</b>	<b>20</b>	<b>25</b>	<b>30</b>	<b>40</b>	<b>50</b>	<b>100</b>
T/C [%]	100	99,22	100,57	76,50	89,28	53,63	54,91	39,25
T/C [%]	100	96,90	93,94	-	63,24	48,63	47,89	40,11
T/C [%]	100	95,45	85,09	78,09	76,43	80,13	-	18,69
T/C [%]	100	93,75	78,65	78,65	68,84	72,23	61,34	27,37
<b>Mittelwert</b>	<b>100,00</b>	<b>96,33</b>	<b>89,56</b>	<b>77,75</b>	<b>74,45</b>	<b>63,66</b>	<b>54,71</b>	<b>31,35</b>
<b>Standardabweichung</b>	<b>3,7</b>	<b>2,0</b>	<b>8,4</b>	<b>0,9</b>	<b>9,76</b>	<b>13,0</b>	<b>5,5</b>	<b>8,9</b>

### Daten zu Abb. 78

Abb. 78: Einfluss des Eichenholzextrakts auf das Wachstum von (HT29-Zellen).

<b>Eichenholzextrakt [<math>\mu\text{g/ml}</math>]</b>	<b>0</b>	<b>10</b>	<b>20</b>	<b>25</b>	<b>30</b>	<b>40</b>	<b>50</b>	<b>75</b>	<b>100</b>
T/C [%]	100	87,28	101,15	-	77,58	-	77,58	42,47	10,96
T/C [%]	100	-	89,65	73,27	-	-	58,40	26,63	9,34
T/C [%]	100	-	73,70	63,20	64,76	59,59	47,00	-	-
T/C [%]	100	-	86,22	-	85,38	64,49	-	-	-
<b>Mittelwert</b>	<b>100,00</b>	<b>87,28</b>	<b>87,66</b>	<b>69,99</b>	<b>74,18</b>	<b>62,04</b>	<b>60,99</b>	<b>34,55</b>	<b>10,15</b>
<b>Standardabweichung</b>	<b>8,5</b>	<b>-</b>	<b>9,8</b>	<b>3,3</b>	<b>11,2</b>	<b>2,5</b>	<b>12,6</b>	<b>7,9</b>	<b>0,8</b>

### Daten zu Abb. 84

Abb. 84: EtBr-Verdrängungstest mit Kalbsthymus-DNA zur Bestimmung der Konkurrenz des Eichenholzextrakts mit dem Interkalator Ethidiumbromid.

<b>Eichenholzextrakt [<math>\mu\text{g/ml}</math>]</b>	<b>0</b>	<b>5</b>	<b>10</b>	<b>15</b>	<b>20</b>	<b>25</b>	<b>30</b>	<b>40</b>	<b>50</b>
T/C [%]	100	77,68	67,38	64,32	61,05	58,30	59,17	56,18	55,46
T/C [%]	100	79,61	64,83	62,20	60,37	59,98	58,50	53,87	52,58
<b>Mittelwert</b>	<b>100,00</b>	<b>78,65</b>	<b>66,22</b>	<b>63,26</b>	<b>60,71</b>	<b>59,14</b>	<b>58,84</b>	<b>55,02</b>	<b>54,02</b>
<b>Standardabweichung</b>	<b>1,1</b>	<b>1,0</b>	<b>1,3</b>	<b>1,1</b>	<b>0,3</b>	<b>0,8</b>	<b>0,3</b>	<b>1,2</b>	<b>1,4</b>

**Daten zu Abb. 85**

Abb. 85: H33258-Verdrängungstest mit Kalbsthymus-DNA zur Bestimmung der Konkurrenz des Eichenholzextrakts mit dem „minor groove binder“ H33258.

Eichenholzextrakt [µg/ml]	0	5	10	15	20	25	30	40	50
T/C [%]	100	82,80	71,62	71,14	68,64	66,64	65,95	65,95	64,18
T/C [%]	100	100,87	78,62	81,17	79,20	75,73	76,77	80,68	78,83
Mittelwert	<b>100,00</b>	<b>91,84</b>	<b>75,12</b>	<b>76,16</b>	<b>73,92</b>	<b>71,19</b>	<b>71,36</b>	<b>73,31</b>	<b>72,50</b>
Standardabweichung	<b>2,5</b>	<b>9,0</b>	<b>3,5</b>	<b>5,0</b>	<b>5,3</b>	<b>4,5</b>	<b>5,4</b>	<b>7,4</b>	<b>7,3</b>

**Daten zu Abb. 86**

Abb. 86: Zellzyklusverteilung von 50.000 HT29-Zellen nach Synchronisation in der G<sub>1</sub>-Phase des Zellzyklus und anschließender Inkubation mit (A) Ellagsäure (36 h, 10 % FKS) und (C) Eichenholzextrakt bzw. nach Synchronisation in der G<sub>2</sub>/M-Phase und anschließender Inkubation (36 h, 10 % FKS) mit (B) Ellagsäure und (D) Eichenholzextrakt.

1. Zellzyklusverteilung nach Synchronisation in der G<sub>1</sub>-Phase, Inkubation mit Ellagsäure, Zellen in der G<sub>1</sub>-Phase

Zellen in der G <sub>1</sub> - Phase [%]	Kontrolle	Arrest	DMSO	0,01 µM	0,1 µM	1 µM	10 µM	50 µM	100 µM
	65,25	72,37	49,37	53,01	58,77	57,82	60,48	52,61	57,10
	58,75	62,90	-	-	-	-	-	-	-
	58,09	75,77	65,04	66,84	71,17	70,03	68,62	66,96	65,51
	59,34	79,05	69,51	-	-	-	-	-	-
Mittelwert	<b>60,36</b>	<b>72,52</b>	<b>61,31</b>	<b>59,93</b>	<b>64,97</b>	<b>63,93</b>	<b>64,55</b>	<b>59,79</b>	<b>61,31</b>
Standardabweichung	<b>3,30</b>	<b>6,96</b>	<b>10,58</b>	<b>9,78</b>	<b>8,77</b>	<b>8,63</b>	<b>5,76</b>	<b>10,15</b>	<b>5,95</b>

## Anhang

### 2. Zellzyklusverteilung nach Synchronisation in der G<sub>1</sub>-Phase, Inkubation mit Ellagsäure, Zellen in der S-Phase

Zellen in der S-Phase [%]	Kontrolle	Arrest	DMSO	0,01 μM	0,1 μM	1 μM	10 μM	50 μM	100 μM
	17,84	13,12	23,55	20,77	18,67	20,41	16,17	19,26	19,21
	20,27	18,60	-	-	-	-	-	-	-
	18,14	8,95	16,96	16,84	15,35	15,13	14,84	14,02	12,75
	18,15	9,96	14,24	-	-	-	-	-	-
<b>Mittelwert</b>	<b>18,60</b>	<b>12,66</b>	<b>18,25</b>	<b>18,81</b>	<b>17,01</b>	<b>17,77</b>	<b>15,51</b>	<b>16,64</b>	<b>15,98</b>
<b>Standardabweichung</b>	<b>1,12</b>	<b>4,34</b>	<b>4,79</b>	<b>2,78</b>	<b>2,35</b>	<b>3,73</b>	<b>0,94</b>	<b>3,17</b>	<b>4,57</b>

### 3. Zellzyklusverteilung nach Synchronisation in der G<sub>1</sub>-Phase, Inkubation mit Ellagsäure, Zellen in der G<sub>2</sub>/M-Phase

Zellen in der G <sub>2</sub> /M-Phase [%]	Kontrolle	Arrest	DMSO	0,01 μM	0,1 μM	1 μM	10 μM	50 μM	100 μM
	16,91	14,52	27,08	26,23	22,56	21,77	23,36	28,14	23,69
	20,98	18,50	-	-	-	-	-	-	-
	23,77	15,28	18,00	16,32	13,48	14,84	16,54	19,01	21,74
	22,52	10,99	16,26	17,42	17,66	18,81	19,68	24,24	27,82
<b>Mittelwert</b>	<b>21,05</b>	<b>14,82</b>	<b>20,45</b>	<b>19,99</b>	<b>17,90</b>	<b>18,47</b>	<b>19,86</b>	<b>23,80</b>	<b>24,42</b>
<b>Standardabweichung</b>	<b>2,98</b>	<b>3,08</b>	<b>5,18</b>	<b>5,43</b>	<b>4,54</b>	<b>3,48</b>	<b>3,41</b>	<b>4,58</b>	<b>3,10</b>

### 4. Zellzyklusverteilung nach Synchronisation in der G<sub>2</sub>/M-Phase, Inkubation mit Ellagsäure, Zellen in der G<sub>1</sub>-Phase

Zellen in der G <sub>1</sub> -Phase [%]	Kontrolle	Arrest	DMSO	0,01 μM	0,1 μM	1 μM	10 μM	50 μM	100 μM
	65,25	16,16	-	-	-	-	-	-	-
	58,75	12,43	-	-	-	-	-	-	-
	58,09	12,19	58,80	62,35	61,98	59,75	56,91	57,44	56,70
	59,34	11,96	67,40	65,40	63,02	60,28	59,22	56,80	51,13
<b>Mittelwert</b>	<b>60,36</b>	<b>13,19</b>	<b>63,10</b>	<b>63,88</b>	<b>62,50</b>	<b>60,02</b>	<b>58,07</b>	<b>57,12</b>	<b>53,92</b>
<b>Standardabweichung</b>	<b>3,30</b>	<b>1,99</b>	<b>6,08</b>	<b>2,16</b>	<b>0,74</b>	<b>0,37</b>	<b>1,63</b>	<b>0,49</b>	<b>3,94</b>

## Anhang

### 5. Zellzyklusverteilung nach Synchronisation in der G<sub>2</sub>/M-Phase, Inkubation mit Ellagsäure, Zellen in der S-Phase

Zellen in der S-Phase [%]	Kontrolle	Arrest	DMSO	0,01 μM	0,1 μM	1 μM	10 μM	50 μM	100 μM
	17,84	15,41	-	-	-	-	-	-	-
	20,27	11,99	-	-	-	-	-	-	-
	18,14	21,11	13,50	12,12	12,04	11,81	11,91	12,83	11,69
	18,15	18,38	12,00	11,81	12,48	12,23	11,88	12,90	11,45
<b>Mittelwert</b>	<b>18,60</b>	<b>16,72</b>	<b>12,75</b>	<b>11,97</b>	<b>12,26</b>	<b>12,02</b>	<b>11,90</b>	<b>12,87</b>	<b>11,57</b>
<b>Standardabweichung</b>	<b>1,12</b>	<b>3,92</b>	<b>1,06</b>	<b>0,22</b>	<b>0,31</b>	<b>0,30</b>	<b>0,02</b>	<b>0,05</b>	<b>0,17</b>

### 6. Zellzyklusverteilung nach Synchronisation in der G<sub>2</sub>/M-Phase, Inkubation mit Ellagsäure, Zellen in der G<sub>2</sub>/M-Phase

Zellen in der G <sub>2</sub> /M-Phase [%]	Kontrolle	Arrest	DMSO	0,01 μM	0,1 μM	1 μM	10 μM	50 μM	100 μM
	16,91	68,43	-	-	-	-	-	-	-
	20,98	75,59	-	-	-	-	-	-	-
	23,77	66,70	27,69	25,52	25,98	28,44	31,18	29,73	31,61
	22,52	69,59	20,60	22,79	24,50	27,49	28,90	30,30	37,42
<b>Mittelwert</b>	<b>21,05</b>	<b>70,08</b>	<b>24,15</b>	<b>24,16</b>	<b>25,24</b>	<b>27,97</b>	<b>30,04</b>	<b>30,02</b>	<b>34,52</b>
<b>Standardabweichung</b>	<b>2,98</b>	<b>3,86</b>	<b>5,01</b>	<b>1,93</b>	<b>1,05</b>	<b>0,67</b>	<b>1,61</b>	<b>0,40</b>	<b>4,11</b>

### 7. Zellzyklusverteilung nach Synchronisation in der G<sub>1</sub>-Phase, Inkubation mit Eichenholzextrakt, Zellen in der G<sub>1</sub>-Phase

Zellen in der G <sub>1</sub> -Phase [%]	Kontrolle	Arrest	DMSO	0,01 μg/ml	0,1 μg/ml	1 μg/ml	10 μg/ml	50 μg/ml	100 μg/ml
	65,25	72,37	49,37	47,08	57,68	60,18	58,23	55,81	52,78
	58,75	62,90	-	-	-	-	-	-	-
	58,09	75,77	65,04	67,46	70,08	64,96	61,46	68,34	68,73
	59,34	79,05	69,51	66,81	68,28	68,32	69,20	66,81	56,74
<b>Mittelwert</b>	<b>60,36</b>	<b>72,52</b>	<b>61,31</b>	<b>60,45</b>	<b>65,35</b>	<b>64,49</b>	<b>62,96</b>	<b>64,29</b>	<b>58,77</b>
<b>Standardabweichung</b>	<b>3,30</b>	<b>6,96</b>	<b>10,58</b>	<b>11,58</b>	<b>6,70</b>	<b>4,09</b>	<b>5,64</b>	<b>7,35</b>	<b>7,23</b>

## Anhang

### 8. Zellzyklusverteilung nach Synchronisation in der G<sub>1</sub>-Phase, Inkubation mit Eichenholzextrakt, Zellen in der S-Phase

Zellen in der S-Phase [%]	Kontrolle	Arrest	DMSO	0,01 µg/ml	0,1 µg/ml	1 µg/ml	10 µg/ml	50 µg/ml	100 µg/ml
	17,84	13,12	23,55	23,31	16,01	14,66	18,05	16,15	19,03
	20,27	18,60	-	-	-	-	-	-	-
	18,14	8,95	16,96	16,44	13,12	16,79	15,90	19,03	12,21
	18,15	9,96	14,24	13,51	13,34	13,68	13,83	10,71	16,70
<b>Mittelwert</b>	<b>18,60</b>	<b>12,66</b>	<b>18,25</b>	<b>17,75</b>	<b>14,16</b>	<b>15,04</b>	<b>15,93</b>	<b>13,96</b>	<b>15,98</b>
<b>Standardabweichung</b>	<b>1,12</b>	<b>4,34</b>	<b>4,76</b>	<b>5,03</b>	<b>1,61</b>	<b>1,59</b>	<b>2,11</b>	<b>2,87</b>	<b>3,47</b>

### 9. Zellzyklusverteilung nach Synchronisation in der G<sub>1</sub>-Phase, Inkubation mit Eichenholzextrakt, Zellen in der G<sub>2</sub>/M-Phase

Zellen in der G <sub>2</sub> /M-Phase [%]	Kontrolle	Arrest	DMSO	0,01 µg/ml	0,1 µg/ml	1 µg/ml	10 µg/ml	50 µg/ml	100 µg/ml
	16,91	14,52	27,08	29,61	26,31	25,16	23,72	28,05	28,19
	20,98	18,50	-	-	-	-	-	-	-
	23,77	15,28	18,00	16,09	16,81	18,26	22,64	16,63	20,98
	22,52	10,99	16,26	19,67	18,37	18,00	16,97	20,57	26,56
<b>Mittelwert</b>	<b>21,05</b>	<b>14,82</b>	<b>20,45</b>	<b>21,79</b>	<b>20,50</b>	<b>20,47</b>	<b>21,11</b>	<b>21,75</b>	<b>25,24</b>
<b>Standardabweichung</b>	<b>2,98</b>	<b>3,08</b>	<b>5,18</b>	<b>7,00</b>	<b>5,09</b>	<b>4,06</b>	<b>3,62</b>	<b>5,80</b>	<b>3,78</b>

### 10. Zellzyklusverteilung nach Synchronisation in der G<sub>2</sub>/M-Phase, Inkubation mit Eichenholzextrakt, Zellen in der G<sub>1</sub>-Phase

Zellen in der G <sub>1</sub> -Phase [%]	Kontrolle	Arrest	DMSO	0,01 µg/ml	0,1 µg/ml	1 µg/ml	10 µg/ml	50 µg/ml	100 µg/ml
	65,25	16,16	10,49	25,08	29,21	33,01	28,15	36,13	32,08
	58,75	12,43	25,45	-	-	-	-	-	-
	58,09	12,19	58,80	63,15	61,55	59,84	56,42	55,16	54,98
	59,34	11,96	67,40	63,37	64,49	63,65	60,31	60,63	58,42
<b>Mittelwert</b>	<b>60,36</b>	<b>13,19</b>	<b>40,54</b>	<b>50,53</b>	<b>51,75</b>	<b>52,17</b>	<b>48,29</b>	<b>50,64</b>	<b>48,49</b>
<b>Standardabweichung</b>	<b>3,30</b>	<b>1,99</b>	<b>26,99</b>	<b>22,04</b>	<b>19,58</b>	<b>16,70</b>	<b>17,55</b>	<b>12,86</b>	<b>14,32</b>

## Anhang

### 11. Zellzyklusverteilung nach Synchronisation in der G<sub>2</sub>/M-Phase, Inkubation mit Eichenholzextrakt, Zellen in der S-Phase

Zellen in der S-Phase [%]	Kontrolle	Arrest	DMSO	0,01 µg/ml	0,1 µg/ml	1 µg/ml	10 µg/ml	50 µg/ml	100 µg/ml
	17,84	15,41	10,26	11,73	12,04	12,17	12,48	12,88	10,77
	20,27	11,99	12,81	-	-	-	-	-	-
	18,14	21,11	13,50	12,36	12,27	12,24	12,46	12,21	12,35
	18,15	18,38	12,00	12,77	12,11	12,03	11,68	11,89	12,21
<b>Mittelwert</b>	<b>18,60</b>	<b>16,72</b>	<b>12,14</b>	<b>12,29</b>	<b>12,14</b>	<b>12,15</b>	<b>12,21</b>	<b>12,33</b>	<b>11,78</b>
<b>Standardabweichung</b>	<b>1,12</b>	<b>3,92</b>	<b>1,40</b>	<b>0,52</b>	<b>0,12</b>	<b>0,11</b>	<b>0,46</b>	<b>0,51</b>	<b>0,87</b>

### 12. Zellzyklusverteilung nach Synchronisation in der G<sub>2</sub>/M-Phase, Inkubation mit Eichenholzextrakt, Zellen in der G<sub>2</sub>/M-Phase

Zellen in der G <sub>2</sub> /M-Phase [%]	Kontrolle	Arrest	DMSO	0,01 µg/ml	0,1 µg/ml	1 µg/ml	10 µg/ml	50 µg/ml	100 µg/ml
	16,91	14,52	27,08	29,61	26,31	25,16	23,72	28,05	28,19
	20,98	18,50	-	-	-	-	-	-	-
	23,77	15,28	18,00	16,09	16,81	18,26	22,64	16,63	20,98
	22,52	10,99	16,26	19,67	18,37	18,00	16,97	20,57	26,56
<b>Mittelwert</b>	<b>21,05</b>	<b>14,82</b>	<b>20,45</b>	<b>21,79</b>	<b>20,50</b>	<b>20,47</b>	<b>21,11</b>	<b>21,75</b>	<b>25,24</b>
<b>Standardabweichung</b>	<b>2,98</b>	<b>3,08</b>	<b>5,18</b>	<b>7,00</b>	<b>5,09</b>	<b>4,06</b>	<b>3,62</b>	<b>5,80</b>	<b>3,78</b>

**Daten zu Abb. 87**

Abb. 87: Cometassay: Induktion von DNA-Strangbrüchen durch (A) die Ellagtannine und (B) die Ellagsäure.

	<b>DMSO</b>	<b>CAS 10 µM</b>	<b>CAS 50 µM</b>	<b>VES 10 µM</b>	<b>VES 50 µM</b>	<b>ROB 10 µM</b>	<b>ROB 50 µM</b>	<b>GRA 10 µM</b>	<b>GRA 50 µM</b>
<b>TI [%]</b>	1,23	0,79	2,31	1,03	1,92	0,77	1,00	1,19	1,01
<b>TI [%]</b>	1,01	-	1,26	-	2,38	-	0,31	-	1,00
<b>TI [%]</b>	0,25	0,53	0,67	1,11	2,74	0,59	0,56	0,61	0,31
<b>TI [%]</b>	0,24	0,53	0,71	0,56	3,85	0,69	0,49	0,18	0,49
<b>Mittelwert</b>	<b>0,80</b>	<b>0,66</b>	<b>1,20</b>	<b>0,94</b>	<b>2,73</b>	<b>0,71</b>	<b>0,60</b>	<b>0,80</b>	<b>0,71</b>
<b>Standardabweichung</b>	<b>0,63</b>	<b>0,26</b>	<b>1,01</b>	<b>0,29</b>	<b>1,15</b>	<b>0,13</b>	<b>0,13</b>	<b>0,79</b>	<b>0,61</b>

	<b>DMSO</b>	<b>ES 10 µg/ml</b>	<b>ES 50 µg/ml</b>
<b>TI [%]</b>	0,16	0,06	0,38
<b>TI [%]</b>	0,20	0,30	0,23
<b>TI [%]</b>	-	0,30	0,23
<b>TI [%]</b>	-	0,40	2,82
<b>Mittelwert</b>	<b>0,18</b>	<b>0,27</b>	<b>0,92</b>
<b>Standardabweichung</b>	<b>0,02</b>	<b>0,12</b>	<b>0,86</b>

**Daten zu Abb. 88**

Abb. 88: Cometassay: Induktion von DNA-Strangbrüchen und durch den Eichenholzextrakt.

	<b>DMSO</b>	<b>EE 10 µg/ml</b>	<b>EE 50 µg/ml</b>	<b>EE 100 µg/ml</b>
<b>TI [%]</b>	1,54	1,11	0,68	3,13
<b>TI [%]</b>	1,02	0,85	4,16	1,88
<b>TI [%]</b>	1,23	1,24	2,31	2,10
<b>TI [%]</b>	0,96	0,85	1,69	3,11
<b>Mittelwert</b>	<b>1,19</b>	<b>1,02</b>	<b>2,21</b>	<b>2,56</b>
<b>Standardabweichung</b>	<b>0,26</b>	<b>0,19</b>	<b>1,46</b>	<b>0,66</b>

**Daten zu Abb. 89**

Abb. 89: Modulation der strangbrechenden Wirkung von Camptothecin durch Castalagin, gemessen mittels Cometassay.

	<b>DMSO</b>	<b>Cpt 100 µM</b>	<b>Cpt + Cas 1</b>	<b>Cpt + Cas 10</b>	<b>Cpt+ Cas 50</b>
<b>TI [%]</b>	2,32	9,59	8,38	2,99	10,21
<b>TI [%]</b>	2,77	6,59	5,94	3,13	10,60
<b>TI [%]</b>	2,34	4,56	4,06	4,95	7,85
<b>TI [%]</b>	1,50	2,95	5,28	2,02	8,18
<b>Mittelwert</b>	<b>2,23</b>	<b>5,92</b>	<b>5,29</b>	<b>3,27</b>	<b>9,21</b>
<b>Standardabweichung</b>	<b>0,53</b>	<b>2,86</b>	<b>1,82</b>	<b>1,22</b>	<b>1,40</b>

**Daten zu Abb. 91**

Abb. 91: Amplexrot<sup>®</sup>-Test zu Bestimmung des H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Gehalts im Zellkulturmedium nach Inkubation von HT29-Zellen mit verschiedenen Konzentrationen an Castalagin nach 45 min in Abwesenheit (ausgefüllte Balken) und Anwesenheit (gestreifte Balken) von 100 U/ml Katalase.

## 1. Castalagin, 45 min

	Medium	DMSO	1 µM	10 µM	50 µM	100 µM
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> [µM]	0,04	0,03	2,11	11,68	16,28	31,10
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> [µM]	-0,11	-0,06	1,50	12,49	15,54	27,88
Mittelwert	<b>-0,04</b>	<b>-0,02</b>	<b>1,81</b>	<b>12,09</b>	<b>15,91</b>	<b>29,49</b>
Standardabweichung	<b>0,11</b>	<b>0,06</b>	<b>0,43</b>	<b>0,57</b>	<b>0,52</b>	<b>2,28</b>

## 2. Castalagin, 45 min, 100 U/ml Katalase

	Medium	DMSO	1 µM	10 µM	50 µM	100 µM
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> [µM]	-0,33	-0,32	-0,30	0,21	0,73	1,57
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> [µM]	-0,29	-0,25	-0,29	0,36	1,58	2,41
Mittelwert	<b>-0,36</b>	<b>-0,29</b>	<b>-0,30</b>	<b>0,29</b>	<b>1,16</b>	<b>1,99</b>
Standardabweichung	<b>0,04</b>	<b>0,05</b>	<b>0,01</b>	<b>0,11</b>	<b>0,60</b>	<b>0,59</b>

## 3. Oenocyanine, 15 min

	DMSO	10 µM	30 µM	100 µM	250 µM	500 µM
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> [µM]	-0,18	0,22	1,01	2,18	4,43	10,61
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> [µM]	-0,14	0,38	0,73	3,36	7,56	15,12
Mittelwert	<b>-0,16</b>	<b>0,30</b>	<b>0,87</b>	<b>2,77</b>	<b>6,00</b>	<b>12,87</b>
Standardabweichung	<b>0,03</b>	<b>0,11</b>	<b>0,20</b>	<b>0,83</b>	<b>2,21</b>	<b>3,19</b>

## 4. Oenocyanine, 15 min, 100 U/ml Katalase

	DMSO	10 µM	30 µM	100 µM	250 µM	500 µM
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> [µM]	-0,27	-0,17	0,19	0,50	0,82	0,81
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> [µM]	-0,31	-0,24	-0,08	0,43	0,83	0,80
Mittelwert	<b>-0,29</b>	<b>-0,21</b>	<b>0,06</b>	<b>0,47</b>	<b>0,83</b>	<b>0,81</b>
Standardabweichung	<b>0,03</b>	<b>0,05</b>	<b>0,19</b>	<b>0,05</b>	<b>0,01</b>	<b>0,01</b>

## Veröffentlichungen

### Veröffentlichungen aus dieser Arbeit:

#### **Posterbeitrag:**

Jessica Fritz, Michael Habermeyer und Doris Marko: Modulation der DNA-schädigenden Wirkung von Topoisomerasegiften durch Anthocyanidine  
GDCh Regionaltagung Südwest, 08. März bis 09. März 2005

#### **Posterbeitrag:**

Doris Marko, Michael Habermeyer, Jessica Fritz, Hans U. Barthelmes, Morten O. Christensen, Fritz Boege: Delphinidin acts as a catalytic topoisomerase I inhibitor, protecting against the DNA-damaging properties of the topoisomerase I poison camptothecin.  
96<sup>th</sup> Annual Meeting of the AACR, 16. April bis 20. April 2005

#### **Posterbeitrag:**

Jessica Fritz and Doris Marko: Protective properties of anthocyanidins against the DNA damaging effect of topoisomerase poisons.  
34. Deutscher Lebensmittelchemikertag und EURO FOOD CHEM XIII, Hamburg, 19. September bis 23. September 2005

#### **Publikation:**

Habermeyer, M., Fritz, J., Barthelmes, H.U., Christensen, M.O., Larsen, M.K., Boege, F., Marko, D. (2005): Anthocyanidins modulate the activity of human DNA topoisomerases I and II and affect cellular DNA integrity. Chem. Res. Toxicol., 18 (9), 1395-1404

#### **Posterbeitrag:**

Jessica Fritz and Doris Marko: The anthocyanidin delphinidin acts as a catalytic topoisomerase I and II inhibitor, suppressing the DNA-damaging properties of topoisomerase poisons in-vitro.  
19<sup>th</sup> Annual Meeting of the EACR, 1. Juli bis 4. Juli 2006

**Posterbeitrag:**

Jessica Fritz and Doris Marko: Can anthocyanidins prevent the DNA damaging effect of topoisomerase I poisons?

Food chemistry - link between chemistry, biology and medicine – 25 Jahre Lebensmittelchemie in Würzburg, 14. Oktober 2006

**Publikation:**

Fritz, J., Kern, M., Pahlke, G., Vatter, S., Marko, D. (2006): Biological activities of malvidin, a red wine anthocyanidin. Mol. Nutr. Food Res., 50, 390-395

**Posterbeitrag:**

Jessica Fritz, Melanie Kern, Julia Reichert and Doris Marko: Protective effect of delphinidin on DNA-damaging properties of topoisomerase poisons in HT29 cells.

First International Symposium on Nutrition and Intestinal Health (NUTINTEST), 28. Februar bis 1. März 2007

**Posterbeitrag:**

Matthias Roth, Jessica Fritz, Doris Marko: Lack of antioxidative effectiveness of Delphinidin in cell culture.

First International Symposium on Nutrition and Intestinal Health (NUTINTEST), 28. Februar bis 1. März 2007

**Posterbeitrag:**

Nicole Teller, Jessica Fritz, Marie-Luise Fischer and Doris Marko: Impact of ellagitannins on EGFR autophosphorylation

Baden Württemberger Toxikologen Treffen (BW Toxnet) 2007, Karlsruhe, 10. Juli 2007

**Posterbeitrag:**

Jessica Fritz, Melanie Kern und Doris Marko: Protektiver Effekt von Delphinidin gegen die DNA-schädigende Wirkung von Topoisomerasegiften in HT29-Zellen.

36. Deutscher Lebensmittelchemikertag, Erlangen, 10. September bis 12. September.2007

**Posterbeitrag:**

Jessica Fritz, Matthias Roth, Peter Holbach and Doris Marko: Impact of delphinidin on DNA damage.

Scientific Symposium 25 Years Food Chemistry at University of Kaiserslautern, Department of Chemistry, 28.09.2007

**Posterbeitrag:**

Melanie Kern, Jessica Fritz, Doris Marko: Delphinidin interferes with the DNA-damaging properties of the topoisomerase II poisons doxorubicin and etoposide in human colon carcinoma cells.

44<sup>th</sup> congress of the European Societies of Toxicology, Amsterdam, 7. Oktober bis 10. Oktober 2007

**Publikation:**

Fridrich, D., Glabasnia, A., Fritz, J., Esselen, M., Pahlke, G., Hofmann, T., Marko, D. (angenommen): Oak Ellagitannins Suppress the Phosphorylation of the Epidermal Growth Factor Receptor in Human Colon Carcinoma Cells

**Publikation:**

Fritz, J., Roth, M., Holbach, P., Marko, D. (in Bearbeitung): Impact of delphinidin on the maintenance of DNA-integrity in human colon carcinoma cells

**Publikation:**

Fritz, J., Esselen, M., Marko, D. (in Bearbeitung): Impact of delphinidin on the DNA damaging properties of topoisomerase II poisons

**Publikation:**

Fritz, J., Esselen, M., Boege, F., Marko, D. (in Bearbeitung): Multiple cellular effects of anthocyanin-rich extracts affecting cell growth and DNA integrity.

**Weitere Veröffentlichungen:**

**Posterbeitrag:**

Jessica Fritz, Michael Habermeyer und Doris Marko: Flavonoide aus Lebensmitteln als Hemmstoffe humaner Topoisomerasen.

33. Deutscher Lebensmittelchemikertag, Bonn, 13. September bis 15. September 2004

**Diskussionsvortrag:**

J. Fritz, Karlsruhe und D. Marko, Karlsruhe: Einfluss oxidativer Metabolisierung auf zelluläre Wirkungen von Isoflavonen.

GDCh Regionaltagung Südwest, Karlsruhe, 06. März bis 07. März 2006

**Posterbeitrag:**

Jessica Fritz und Doris Marko: Einfluss oxidativer Metabolisierung auf zelluläre Wirkungen von Isoflavonen

35. Deutscher Lebensmittelchemikertag, Dresden, 18. September 2005 bis 20. September 2006

**Posterbeitrag:**

Markus Fehr, Gudrun Pahlke, Jessica Fritz, Doris Marko: Genotoxic properties of Alternaria toxins.

Schwerpunkt Lebensmittel und Gesundheit: Fungi – Toxins – Food, Karlsruhe, 15. Oktober bis 16. Oktober 2007

**Posterbeitrag:**

Markus Fehr, Gudrun Pahlke, Jessica Fritz, Doris Marko: Alternariol acts as a topoisomerase poison.

44<sup>th</sup> congress of the European Societies of Toxicology, Amsterdam, 7. Oktober bis 10. Oktober 2007

Schwerpunkt Lebensmittel und Gesundheit: Fungi – Toxins – Food, Karlsruhe, 15. Oktober bis 16. Oktober 2007

**Posterbeitrag:**

Fehr, M., Karlsruhe/D, Pahlke, G., Karlsruhe/D, Fritz, J., Karlsruhe/D, Marko, D., Karlsruhe/D: Alternariol acts as a topoisomerase poison.

29th Mycotoxin Workshop, Fellbach, 14. May bis 16. May 2007

**Posterbeitrag:**

Fehr, M., Pahlke, G., Fritz, J. und Marko, D.: Alternariol wirkt als Topoisomerasegift

36. Deutscher Lebensmittelchemikertag, Erlangen, 10. September bis 12. September.2007

mit Posterpreis ausgezeichnet

**Publikation:**

Fridrich, D., Kern, M., Fritz, J., Pahlke, G., Köhler, N., Winterhalter, P., Marko, D. (2007):  
The epidermal growth factor receptor and human topoisomerases represent potential cellular  
targets of oligomeric procyanidins. MNF, 51, 192-200

**Publikation:**

Fehr, M., Pahlke, G., Fritz, J., Podlech, J., Marko, D. (angenommen): Alternariol acts as a  
topoisomerase poison, preferentially affecting the II $\alpha$  isoform.

## Dank

Für das in mich gesetzte Vertrauen und die tolle Unterstützung, auch neben der Promotion, während der letzten vier Jahre möchte ich mich nochmals bei Doris bedanken. Ich hatte wirklich Glück, dass ich in deinem Arbeitskreis arbeiten durfte.

Ich bedanke mich auch nochmals bei Herrn Prof. Eisenbrand, dass er es mir ermöglicht hat meine wissenschaftliche Aussprache in Kaiserslautern durchzuführen.

Außerdem danke ich dem gesamten Arbeitskreis, Michael Habermeyer, Sandra Vatter, Melanie Esselen, Diana Fridrich, Gudrun Pahlke, Matthias Roth, Markus Fehr, Nicole Teller, Ute Böttler, Joanna Pelka und Nadine Volz für unterhaltsame und interessante vier Jahre. Es hat Spaß gemacht mit Euch zusammenzuarbeiten. Vielleicht wünscht ihr Euch zu Weihnachten mal wieder „hauskaa joulua“ und denkt an mich.

Den Diplomanden Peter Holbach, Matthias Roth, Julia Reichert, sowie Markus Fehr, Nicole Jäger danke ich für ihr Interesse und eine super Zusammenarbeit. Auch den übrigen Diplomanden, Forschungspraktikanten und Seminaristen ein herzliches Dankeschön.

Auch den Arbeitskreisen von Herrn Prof. Eisenbrand und Herrn Prof. Metzler danke ich für die gute Zusammenarbeit und viel Freude. Danke – Sandra, Sandra, Rainer, Phillip, Tamara, Matthias, Daniel, Silke, Julia, Simone, Erika, Renate, Leane, Jörg, Simon und Georg, sowie den Sekretärinnen, Heike Schramm, Ingrid Hemm und Thea Biedermann.

Ganz besonders möchte ich mich bei Melanie bedanken. Ich habe keine Ahnung, wie ich die ganzen letzten vier Jahre und vor allem die letzten Monate ohne dich gemacht hätte. Danke für deinen Einsatz als Köchin, Korrektorin, Umzugshelferin, Seelsorgerin - als Freundin. Kiitoksia! Ich weiß, das war ganz schön anstrengend und schwierig von Zeit zu Zeit. Ich weiß nicht womit ich das alles verdient habe, aber es macht mich wirklich glücklich.

Danke Michel – für den Glauben an mich und deine Unterstützung, für erhöhten Papierverbrauch im Februar, für „magic hands“ und viele schöne Erinnerungen.

## Anhang

Ein weiteres Dankeschön geht auch an die übrigen Lauterer: Sandra, Tom, Sandra und Co. für eine schöne Zeit in Kaiserslautern.

Meinen Kommilitonen Melanie Olk, Sebastian Ganß, Claudia Handrich, Christian Strupp und Wipa Roikaew danke ich dafür, dass wir uns auch nach dem Diplom nicht völlig aus den Augen verloren haben und auch in den letzten vier Jahren viele schöne Erlebnisse teilen durften.

Für Ablenkung vom Laboraltag und viele anstrengende, aber unvergessliche Wochenenden danke ich Sandra Volk, Marion Nagel, Denise Reichel, Susi Roßberg und dem gesamten nordischen Weltcupzirkus. Ich freue mich auf viele weitere spannende Wettkämpfe.

Danke für eure Freundschaft: Mel und Tom, Michel und Petra, Sandra; Sebastian, Mel, Claudi und Wipa; Sunny, Marion, Susi und Denise; Martina und Volker, Anni und Lukas; Karin, Sandra, Nina, Petra, Nadine und Anette; Andrea, Ann, Tina, Ulla, Ulrike und Chrissi.

Bei meiner Familie bedanke ich mich, dass sie mir das Studium und die Promotion ermöglicht haben, sowie für ihre Unterstützung und den Glauben in mein Können. Ohne Eure Hilfe hätte ich das nicht geschafft. Danke.

## Lebenslauf

**Name:** Jessica Fritz  
**Adresse:** Talstraße 3, 56368 Roth  
Silcherstraße 19, 76744 Wörth  
**Geburtsdatum:** 06.02.1980  
**Geburtsort:** Nastätten  
**Nationalität:** deutsch  
**Familie:** Joachim Fritz, Heidemarie Fritz geb. Zils, Alexander Fritz

### Schulische Laufbahn:

- 1986 bis 1990: Grundschule im Einrich, Katzenelnbogen
- 1990 bis 1994: Realschule Katzenelnbogen, Katzenelnbogen
- 1994 bis 1999: Sophie-Hedwig-Gymnasium Diez, Diez
- 26.06.1999 Allgemeine Hochschulreife, Abitur

### Hochschulbildung:

- WS 99/00 bis WS 03/04: Studium der Lebensmittelchemie/Toxikologie an der Technischen Universität Kaiserslautern
- 31.03.2004: Diplomgrad im Studiengang Lebensmittelchemie an der Technischen Universität Kaiserslautern
- seit Mai 2004: Promotion an den Universitäten TU Kaiserslautern und Universität Karlsruhe (TH) im Arbeitskreis von Prof. Marko

### weitere Qualifikationen:

- 2003: Forschungspraktikum (12 Wochen) im Rahmen des Studiums in Murcia, Spanien
- Sprachkenntnisse: deutsch, englisch, spanisch, schwedisch, finnisch
- Seit 2006 Toxkurse der GSF: Organotox I + II, Fremdstoffmetabolismus
- 2002 bis 2006: Mitarbeit in der AG Junge LebensmittelchemikerInnen (AG JLC) der LChG

## Anhang