Wirkmechanistische Untersuchungen zur Beeinflussung humaner Topoisomerasen durch Anthocyanidine, sowie Einfluss der Tyrosyl-DNA-Phosphodiesterase 1 (TDP1) auf die Wirkung von Topoisomerasegiften

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

(D 386)

vorgelegt von
Diplom Lebensmittelchemiker
Michael Habermeyer

Betreuer: **Prof. Dr. D. Marko**
Kaiserslautern 2005

Eröffnung des Promotionsverfahrens: 19.01.2005

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 02. Mai 2005

Prüfungskommission:

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

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

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

Die vorliegende Arbeit entstand zwischen Juni 2001 und Oktober 2004 im Fachbereich Chemie, Fachrichtung Lebensmittelchemie und Umwelttoxikologie der Technischen Universität Kaiserslautern.

Frau Prof. Dr. Marko danke ich für die Überlassung des interessanten Themas, die stete Diskussionsbereitschaft und Unterstützung, sowie für viele wertvolle Anregungen während meiner Promotionszeit.

Herrn Prof. Dr. Eisenbrand danke ich für die Übernahme des Koreferates sowie für die Unterstützung während meiner Promotionszeit.

Herrn Prof. Dr. Thiel danke ich für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Inhaltsverzeichnis

1 EINLEITUNG 1

2 THEORETISCHE GRUNDLAGEN 2

2.1 Aufbau und Organisation der DNA 2

2.2 Topoisomerasen 7
2.2.1 Topoisomerase I 9
2.2.2 Topoisomerase II 16
2.2.3 Topoisomerasehemmstoffe 26
2.2.3.1 Katalytische Topoisomeraseinhibitoren 26
2.2.3.2 Topoisomerasegifte 28
2.2.3.3 DNA-Interkalatoren und Liganden der kleinen Furche 35

2.3 Tyrosyl-DNA-Phosphodiesterase 1 (TDP1) 38

2.4 Flavonoide 40
2.4.1 Flavonoide als Hemmstoffe von Topoisomerasen 42
2.4.2 Struktur-/Aktivitätsanforderungen für Flavone als Topoisomerasehemmstoffe 45

2.5 Anthocyane 46
2.5.1 Struktur, Eigenschaften und Vorkommen 46
2.5.2 Aufnahme und biologische Verfügbarkeit 49
2.5.3 Biologische Wirkungen 51

3 PROBLEMSTELLUNG 56

4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION 57

4.1 Ergebnisse zur Topoisomerase I 57
4.1.1 Katalytische Aktivität der Topoisomerase I 57
4.1.2 Topoisomerase I-Hemmstoff oder Gift? 59
4.1.3 Zusammenfassung der Ergebnisse zur Topoisomerase I 62

4.2 Ergebnisse zur Topoisomerase II 63
4.2.1 Katalytische Aktivität Topoisomerase II 63
4.2.2 Topoisomerase II-Hemmstoff oder Gift? 65
4.2.3 Zusammenfassung der Ergebnisse zur Topoisomerase II 71

4.3 Interaktion der Anthocyanidine mit Doppelstrang-DNA 73
4.3.1 Verdrängung von EtBr / Interkalation in die DNA 73
4.3.2 Verdrängung von Hoechst 33258 / Bindung an die kleine Furche 76

4.4 Induktion von DNA-Schäden durch Anthocyanidine 78

4.5 Zusammenfassende Diskussion der Ergebnisse zu den Anthocyanidinen 82

4.6 Untersuchungen zur TDP1 86
4.6.1 Wachstumsbeeinflussung durch Topoisomerasegifte an TDP1 überexprimierenden Zellen 87
4.6.2 Induktion von DNA-Schäden durch Topoisomerasegifte an TDP1 überexprimierenden Zellen 90

5 ZUSAMMENFASSUNG 95

6 MATERIAL UND METHODEN 98

6.1 Zellkultur 98
6.1.1 Verwendete Zelllinien 98
6.1.2 Kultivierung von Zellen 99
6.1.3 Passagieren von Zellen 99
6.1.4 Zellzahlbestimmung 100
6.1.5 Einfrieren von Zellen 101
6.1.6 Auftauen von Zellen 101
6.1.7 Mycoplasmenscreening 102

6.2 Untersuchungen zur Zytotoxizität – MTT-Test 102

6.3 Untersuchungen zur DNA-strangbrechenden Wirkung mittels Einzelzellgelelektrophorese – Comet-Assay 104
6.3.1 Vorbereiten der Objektträger (OT) 105
6.3.2 Inkubation der Zellen 105
6.3.3 Auftragen der Zellen auf die Objektträger 106
6.3.4 Elektrophorese und Auswertung der Objektträger 107

6.4 Untersuchungen zur DNA-Interaktion 109
6.4.1 Interkalation in die DNA – Verdrängung von EtBr 109
6.4.2 Bindung an die kleine Furche – Verdrängung von Hoechst 33258 111

6.5 Untersuchung humaner Topoisomerasen 112
6.5.1 Gewinnung von Kernextrakt 113
6.5.2 Katalytische Aktivität von Topo I – Relaxationsassay 114
6.5.3 Katalytische Aktivität von Topo II – Dekatenierungsassay 117
6.5.4 Stabilisierung des Cleavable Complex – Cleavageassay 119
6.5.5 Immunoband-Depletion Topoisomerase II 122
6.5.5.1 Inkubation der Zellen und Probenvorbereitung 122
6.5.5.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) 123
6.5.5.3 Western Blot 126

6.6 Gewinnung von pUC18-Plasmid-DNA 128
6.6.1 Plasmid-Maxipräparation 129
6.6.2 Restriktionsverdau 131

6.7 Geräte 133

6.8 Reagenzien 136

6.9 Verbrauchsmaterialien 139

7 LITERATUR 140

8 ANHANG 156

Abkürzungen

A	Adenin
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
Ala	Alanin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Arg	Arginin
AS	Aminosäure
Asn	Asparagin
ATP	Adenosintriphosphat
Bgl I	Restriktionsenzym
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	Beziehungsweise
C	Cytosin
c-Abl	Abelson Tyrosinkinase
Cpt	Camptothecin
Csd	Kernsubdomäne (Core subdomain)
Cy	Cyanidin
DAPI	4',6'-Diamino-2-phenylindol-dihydrochlorid
Del	Delphinidin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSMZ	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (Braunschweig)
DTT	Dithiotreitol
D-Val	D-Valin
EC_{50}	Konzentration einer Substanz, bei der ein Effekt 50% der Kontrolle beträgt (effective concentration)
ECG	Epicatechingallat
Eco RI	Restriktionsenzym
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGCG	Epigallocatechingallat
EGFR	Epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor
EtBr	Ethidiumbromid

FKS	Fetales Kälberserum
G	Guanin
gal	Galaktose/Galaktosid
GDP	Guanosindiphosphat
glc	Glukose/Glukosid
gly	Glykosid
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunden
HEK 293	Humane embryonale Nierenzelllinie
HEK-GFP	Humane embryonale Nierenzelllinie, die das green fluorescent protein überexprimiert
HEK-H263A	Humane embryonale Nierenzelllinie, die das TDP1-Protein mit einem gegen Alanin ausgetauschten Histidin 263 exprimiert
HEK-TDP1	Humane embryonale Nierenzelllinie, die das TDP1-Protein überexprimiert
H 33253	Bisbenzimide Hoechst 33258 Fluoreszenzfarbstoff, 2-[2-(4-Hydroxyphenyl)-6-benzimidazoyl]-6-(1-methyl-4-piperazyl)-benzimidazol
His	Histidin
HRP	Meerrettich-Peroxidase (horse radish peroxidase)
HT29	Humane Kolon Adenokarzinomzelllinie
IC_{50}	Konzentration einer Substanz, die eine 50%ige Hemmung im vergleich zur Kontrolle zeigt
k. H.	Keine Hemmung
kDa	Kilo Dalton, Molekülmasse
kDNA	Kinetoplasten DNA
KE	Kernextrakt
LMA	Low melting agarose
L-Meval	L-Methylvalin
L-Pro	L-Prolin
L-Thr	L-Threonin
Lys	Lysin
MCF-7	Humane Mammakarzinomzelllinie
MNNG	1-Methyl-3-nitro-nitrosoguanidin
MTP	Mikrotiterplatte (96-well Platte)
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2*H*-tetrazoliumbromid
Mv	Malvidin

n. t.	Nicht getestet (not tested)
NFκB	Kern Faktor kappa B (nuclear factor kappa B)
NLS	Kernlokalisationssequenz (nuclear localisation sequence)
NMA	Normal melting agarose
OT	Objektträger
p	Signifikanz
PARP	Poly(ADP-Ribose)-Polymerase
PBS	Phosphatpuffer
PDE	Phosphodiesterase
Pg	Pelargonidin
PKC	Proteinkinase C
Pn	Paeonidin
Pvu II	Restriktionsenzym
Rsa I	Restriktionsenzym
rut	Rutinose/Rutinosid
S/MAR	Scaffold matrix attatchment regions
Sar	Sarcosin
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
sop	Sophorosid
SR 101	Sulforhodamin 101
SRE	Serum-responsive-element (Promotor)
T	Thymin
T/C	Prozent der Kontrolle (test over control)
Tab.	Tabelle
TDP1	Tyrosyl-DNA-Phosphodiesterase 1
TEMED	N,N,N',N'-Tetraethylendiamin
TI	Schweifintensität (tail intensity)
Topo	Topoisomerase
Tyr	Tyrosin
VP-16	Etoposid
VZ	Verwindungszahl
z.B.	Zum Beispiel

1 Einleitung

In den letzten Jahrzehnten ist das öffentliche Interesse bezüglich Fragen der Gesundheit und Lebensqualität stetig gestiegen. Parallel zum wachsenden Gesundheitsinteresse entwickelte sich ein weiterhin expandierender Markt für Produkte, die verbesserte Gesundheit, Wohlbefinden und lange Lebensdauer versprechen. Der Anteil an Nahrungsergänzungsmitteln in diesem Markt erzielt in den USA bereits Umsätze von über $18 Milliarden pro Jahr [Dietary Supplements 2004]. In Deutschland umfasste der Marktanteil an Nahrungsergänzungsmittel im Jahr 1997 ca. 2 Milliarden DM [BgVV 2002]. Da ein Grossteil dieser Produkte zusätzlich über das Internet vertrieben wird, dürften die Verkaufs-/ bzw. Umsatzzahlen deutlich über diesen Werten liegen. Eine Produktgruppe auf dem Markt der Nahrungsergänzungsmittel stellen Zubereitungen auf Anthocyanbasis dar. Anthocyane, eine Untergruppe der Flavonoide, sind als natürliche Farbstoffe weit verbreitet in Lebensmitteln pflanzlicher Herkunft. Die Anthocyane werden mit einer ganzen Reihe von gesundheitlich positiven Aspekten assoziiert. So sollen sie beispielsweise antioxidative, antiinflammatorische, antimutagene und chemopräventive Eigenschaften besitzen, sowie vor kardiovaskulären Erkrankungen schützen [Murkovic 2002, Hou 2003, Kong et al. 2003, Hou et al. 2004]. Ein großes Problem bei diesen Nahrungsergänzungsmitteln ist nicht nur die Art und Vielfalt der Produkte, sondern auch die Mengen, die konsumiert werden. So kann mit diesen Produkten beispielsweise ein Vielfaches der üblicherweise mit der Nahrung aufgenommenen Mengen erreicht werden. Hier stellt sich insbesondere die Frage, ob diese, gegenüber der „verzehrsüblichen“ Menge vielfach erhöhte Aufnahme, eventuell mit gesundheitlich nachteiligen Wirkungen assoziiert ist. Bislang ist jedoch nur wenig über den zellulären Wirkmechanismus dieser Verbindungen bekannt. Als möglicher nachteiliger Faktor für eine potentielle genotoxische Wirkung verschiedener Flavonoide wird die Interaktion mit humanen Topoisomerasen diskutiert. Bezüglich einer möglichen Risiko/Nutzen-Evaluierung ist es nicht nur von Bedeutung, ob Flavonoide mit diesen Enzymen interagieren, sondern auch die Art dieser Interaktion und sich möglicherweise daraus ergebende Konsequenzen, besonders im Hinblick auf die Integrität der DNA.

2 Theoretische Grundlagen

Die Nukleinsäuren gelten als die Schlüsselmoleküle des Lebens, denn sie enthalten die genetische Information. Nukleinsäuren sind chemisch gesehen Polynukleotide, aufgebaut aus heterozyklischen Basen, 2-Desoxyribose und Phosphorsäure. Die Nukleinsäuren wurden 1869 von Mieschler in Lymphozyten entdeckt. Ihre biologische Bedeutung blieb lange Zeit unbekannt, bis Avery, MacLeod und McCarty 1944 den Beweis für ihre genetische Funktion erbrachten. Aufgrund von Röntgenstrukturanalysen von Franklin und Wilkins entwickelten Watson und Crick 1953 das DNA-Modell der Doppelhelix [Karlson et al. 1994, Römpp 2005]. In den nachfolgenden Kapiteln soll der Aufbau und die Organisation der DNA, sowie Grundlagen zu DNA-Topoisomerasen und der Tyrosyl-DNA-Phosphodiesterase 1 (TDP1), kurz vorgestellt werden.

2.1 Aufbau und Organisation der DNA

Chemische Grundstruktur der DNA

Ein DNA-Molekül besteht aus zwei langen Polynukleotidketten, die aus vier unterschiedlichen Nukleotidbausteinen zusammengesetzt sind. Jede dieser Ketten wird als DNA-Strang bezeichnet. Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Nukleobasen halten die zwei Ketten zusammen. Die Nukleotidbausteine setzen sich, im Falle der DNA, aus 2-Desoxyribosen, einer oder mehrerer Phosphatgruppen und einer stickstoffhaltigen Base zusammen. Als Nukleobasen kommen bei DNA die Purin-Derivate Adenin und Guanin, sowie die Pyrimidine Cytosin und Thymin vor. In Abb. 1 sind die Basenpaarungen eines DNA-Doppelstranges dargestellt.

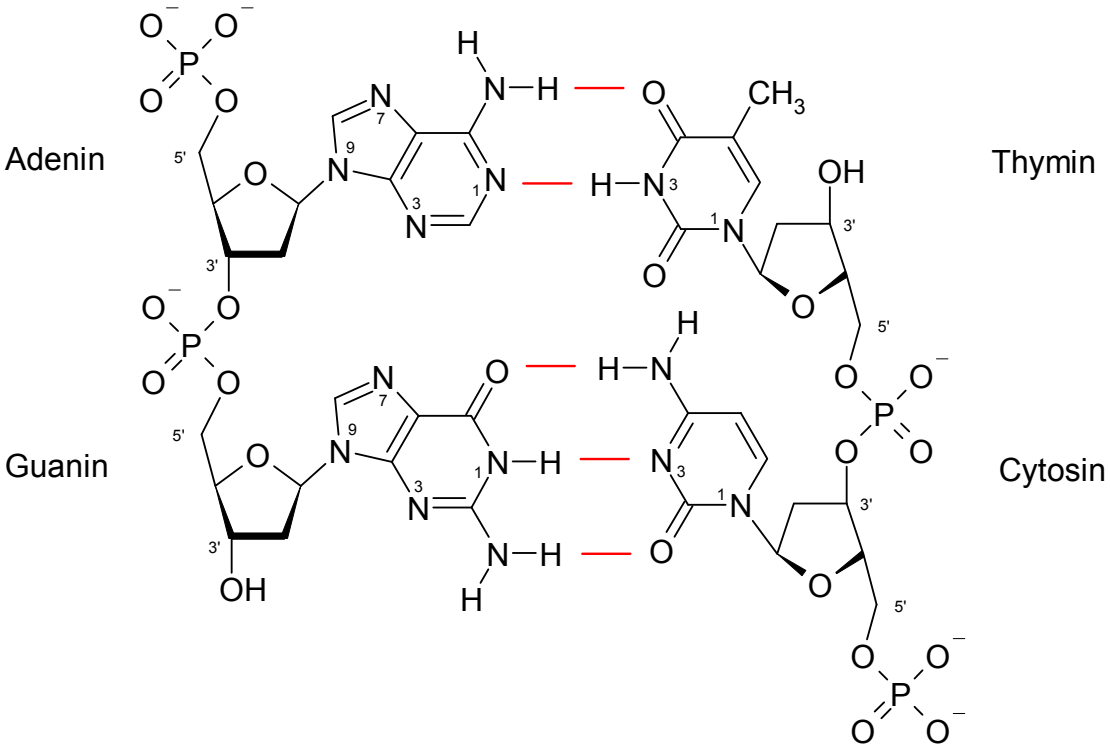


Abb. 1: Strukturformel der charakteristischen Basenpaarung im DNA-Doppelstrang.

Die Nukleotide sind untereinander kovalent durch den Zucker und die Phosphatgruppe zu einer Kette verknüpft, die so ein „Rückgrat“ aus alternierenden Zucker-Phosphat-Zucker-Phosphat-Einheiten bilden. Die Phosphat-Gruppen verleihen der DNA den Charakter eines Polyanions und bestimmen damit die Wanderungseigenschaften im elektrischen Feld. Im Fall freier Enden im Einzel- oder Doppelstrang entstehen in den meisten Reaktionen 5´-Phosphat- und 3´-Hydroxy-Enden [Alberts et al. 2003].

Im Doppelstrang liegen die Partnerstränge in entgegengesetzter Orientierung, d.h. antiparallel, vor. Die Komplementarität zwischen Einzelsträngen im Doppelstrang ergibt sich aus den Basenpaarungen zwischen Adenin und Thymin (2 Wasserstoffbrücken) sowie Guanin und Cytosin (3 Wasserstoffbrücken) (siehe Abb. 1).

Höhere Strukturen der DNA

Die dreidimensionale Struktur der DNA, die Doppelhelix, entspringt den chemischen und strukturellen Eigenschaften ihrer beiden Polynukleotidketten. Es gibt 3 Arten der DNA-Doppelhelix: A-DNA, B-DNA und Z-DNA. Da die in der Zelle vorherrschende Form die B-DNA ist, werden die anderen DNA-Formen nicht weiter erläutert.

Bei der B-DNA handelt es sich um eine rechtsgängige Doppelhelix mit einem Durchmesser von 2 nm. Die Ebenen der nach innen gerichteten, jeweils um 36° versetzten, 0,34 nm

voneinander entfernten Basenpaare stehen senkrecht zur Achse. Eine volle Helixwindung umfasst ca. 10,4-10,6 Basenpaare und entspricht somit einer Länge von ca. 3,4 nm. Die Außenseite zeigt, jeweils spiralig gewunden, eine große (0,85 nm tiefe, 1,2 nm breite) und eine kleine (0,75 nm tiefe, 0,6 nm breite) Furche, oder auch „major groove“ und „minor groove“ genannt (siehe Abb. 2). In diesen Furchen können sowohl Moleküle (Interkalatoren, Liganden der kleinen Furche) als auch Proteine binden. Da die Basenpaare horizontal liegen (engl. base stacking), können dadurch ihre π-Elektronen in Wechselwirkung treten. Die daraus resultierenden hydrophoben Bindungen (engl. stacking forces) bewirken eine zusätzliche Stabilisierung der Konformation.

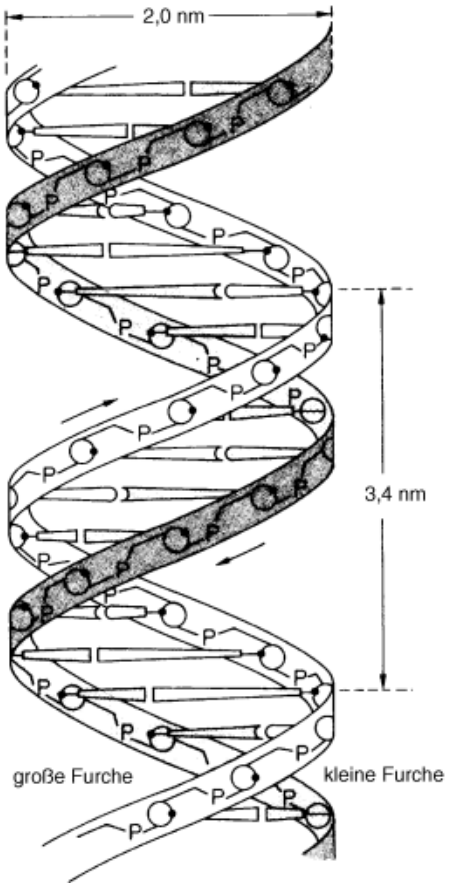


Abb. 2: Doppelhelixstruktur der DNA [Karlson et al. 1994].

Bei Eukaryonten befindet sich die DNA im Zellkern, auf einen Satz unterschiedlicher Chromosomen aufgeteilt. Die menschliche DNA besitzt ca. $3{,}2 \times 10^9$ Basenpaare, dass entspricht einem DNA-Strang mit einer Länge von etwa 2 Metern, wobei der Zellkern nur einen Durchmesser von etwa 6 µM hat [Alberts et al. 2003]. Die DNA wird in eine Folge von Windungen und Schleifen aufgefaltet, die stufenweise eine höhere Organisation bilden und somit ein unauflösbares Knäuel verhindern.

Die erste Stufe der „Packung“ bildet das so genannte Nukleosom. Das Nukleosom besteht aus einem Proteinkern, gebildet von je 2 Histonen H2A, H2B, H3 und H4, sowie einem DNA Doppelstrang mit einer Länge von etwa 146 Basenpaaren. Dieses DNA Stück wickelt sich zweimal um das Histon-Oktamer. Jedes Nukleosom ist von dem Nächsten durch ein Stück Linker-DNA getrennt, welches eine Länge von bis zu 80 Basenpaaren erreichen kann. Die Nucleosombildung verwandelt ein DNA-Molekül in einen Chromatinfaden von rund 1/3 seiner ursprünglichen Länge [Alberts et al. 2003, Felsenfeld und Groudine 2003].

Die nächste Stufe der „Packung“ wird dadurch erreicht, dass das Histon H1 an jedes Nukleosom und die ausgehende Linker-DNA bindet. Es bildet sich eine 30 nm durchmessende Faser/Fibrille, bestehend aus etwa sechs schraubenförmig oder zickzak angeordneten Nukleosomen. Als eine 30 nm-Faser wäre das typische menschliche Chromosom 0,1 cm lang und wäre somit mehr als 100-mal größer als der Zellkern.

Bei der nächst höheren Stufe der Organisation sind die Fibrillen durch Wechselwirkungen mit Proteinen des Zellkerns zu schleifenförmigen Domänen angeordnet, den so genannten „loops“ oder Schleifen. Diese Schleifen sind vermutlich an einem Proteingerüst, auch „scaffold“ oder „matrix“ genannt, befestigt. Jedoch ist bisher nicht eindeutig geklärt, wie dieses Gerüst aussieht oder aus was es besteht [Felsenfeld und Groudine 2003, Alberts et al. 2003, Heng et al. 2004]. Die Ausbildung eines „loops“ hängt von einer bestimmten Chromatin-Sequenz ab, welche wie ein Anker wirkt und die 30 nm-Faser an die „matrix“ bindet. Diese Chromatinsequenzen werden auch „scaffold/matrix-attatchment regions“ (S/MARs) genannt [Heng et al. 2004].

Die DNA-Schleife nimmt, wenn sie nicht exprimiert wird, ein verdicktes Aussehen an, möglicherweise in einer Struktur ähnlich der 30 nm-Faser. Bei beginnender Genexpression beispielsweise wird die Schleife aufgefaltet. Die Faltung der DNA-Schleifen stellt die höchste Stufe der DNA-Packung dar, wie sie beispielsweise bei Mitose-Chromosomen zu sehen ist. Ein Überblick über die verschiedenen Stufen der DNA-Packung gibt Abb. 3.

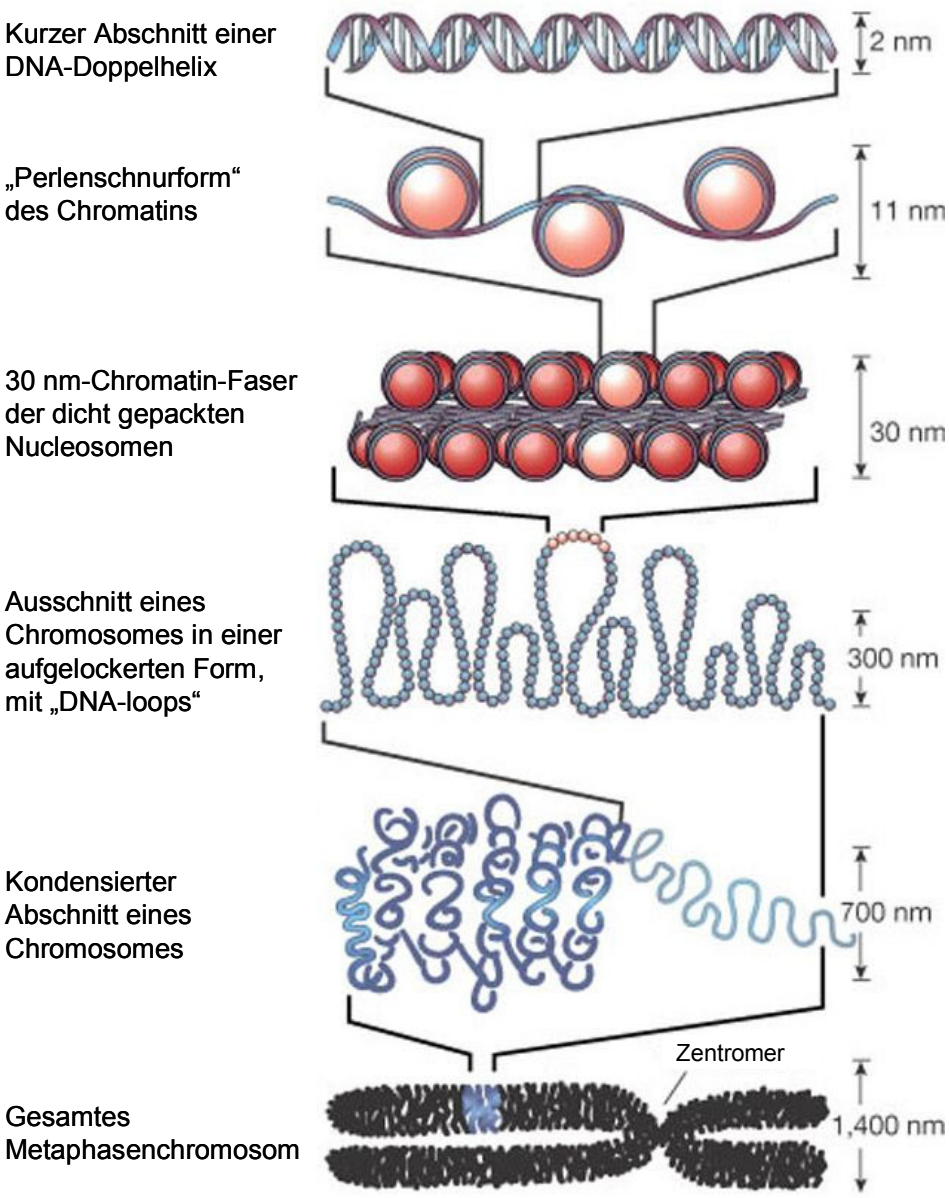


Abb. 3: Modell zur Chromatinpackung [modifiziert nach Felsenfeld und Groudine 2003].

Die bisher besprochenen Chromosomenstrukturen, 30 nm-Faser und „DNA-loops“ bezeichnet man als Euchromatin. Eine weitere Verdichtung und Packung führt zu dem so genannten Heterochromatin. In einer typischen Säugerzelle liegt etwa 10% des Genoms als Heterochromatin vor, welches transkriptionsinaktiv ist. Heterochromatin schließt zudem weitere Proteine mit ein, die beispielsweise für „gene silencing“, Histonacetylierung oder DNA-Methylierung verantwortlich sind. Die Faltung und Packung des Chromosoms ist nicht statisch, sondern ein dynamischer Prozess [Alberts et al. 2003, van Driel et al. 2003].

In dem bereits erläuterten höchstkondensierten chromosomalen Zustand ist die genetische Information der DNA vollkommen unzugänglich. Dies stellt zunächst kein Problem dar, da

sie während der Mitose nicht verarbeitet werden muss. Doch auch im Interphasenchromatin oder in Kernen ruhender Zellen, in denen die meisten Vorgänge des DNA-Metabolismus ablaufen, bleibt die kompakte Struktur der DNA weitgehend erhalten. Nur punktuell wird das Heterochromatin ausgepackt in aktives Euchromatin. Verdeutlicht wird dies bei der Replikation der DNA für die Zellteilung, denn hier muss die Zelle das gesamte genomische Material kopieren. Dazu müsste es komplett ausgepackt werden, jedoch ist im Zellkern nur Platz für 1/100.000 des Genoms, etwa 40 kb [Hardy et al. 2003]. Die erwähnten Prozesse können also immer nur Domäne nach Domäne durchgeführt werden. Dazu müssen die „loops“ entschlungen, die 30 nm-Fasern dekondensiert und die Nukleosomen aufgelöst oder beiseite geschoben werden. Letztendlich muss auch noch die DNA entspiralisiert werden. Die Enzyme, die diese Vorgänge katalysieren und regulieren, sind die Topoisomerasen.

2.2 Topoisomerasen

Wie dargestellt, muss die DNA einer Zelle ständig ein- und ausgepackt werden, um sämtliche DNA-Metabolismus-Vorgänge wie Replikation, Transkription, Rekombination, und Reparatur, zu ermöglichen. Bei der Regulation der Verdrillung des DNA-Doppelstranges, z.B. bei der Transkription, muss der DNA-Strang vor der Replikationsgabel entwunden und anschließend wieder verdrillt werden. Topoisomerasen sind Enzyme, die die Topologie der DNA durch Einfügen von Schnitten, Hindurchführen von anderen Strängen und Verschließen der Brüche, regulieren. Vor allem Topoisomerasen vom Typ I spielen bei der Transkription eine wichtige Rolle [Borde und Duguet 1998, Postow et al. 2001, Corbett und Berger 2004], während Topoisomerasen vom Typ II vor allem die Topologie der DNA-loops, sowie des Chromatins, regulieren und daher bevorzugt an den S/MARs zu finden sind. Weiterhin sind Typ II-Topoisomerasen aber auch wichtig bei der Dekatenierung von Tochter-DNA-Molekülen oder auch bei der Initiation der Replikation [Craig et al. 1997, Borde und Duguet 1998, Strick et al. 2001].

Aufgrund der Struktur und des Wirkmechanismus werden Topoisomerasen in vier Klassen eingeteilt:

- **Typ IA** Enzyme wurden erstmals 1971 von Wang entdeckt [Wang 1971]. Sie relaxieren DNA, indem sie einen Strang schneiden und den komplementären Strang hindurchführen und anschließend den Bruch wieder verschließen. Die Verwindungszahl wird dabei immer in Einer-Schritten pro Reaktion verändert. Zu

dieser Klasse gehören *E. coli* Topoisomerase I und III, Hefe Topoisomerase III und Topoisomerase IIIα/β in Säugerzellen [Hanai et al. 1996, Corbett und Berger 2004].

- **Typ IB** Topoisomerasen schneiden ebenfalls einen DNA-Strang, können jedoch mehrere Drehungen der Duplex-DNA um die Phosphodiesterbindung durchführen und somit die Verwindungszahl um mehrere Einheiten pro Reaktion verändern. Zu dieser Klasse gehören Topoisomerase I aus Hefen und Säugetierzellen, sowie Topoisomerase V aus *Methanopyrus kandleri* (Archae-Bakterium) [Corbett und Berger 2004].
- **Typ IIA** Topoisomerasen katalysieren Doppelstrangbrüche in der DNA, indem sie transient die zwei Stränge der Doppelhelix schneiden und damit ein Enzym-DNA-Tor bilden, durch welches ein zweiter DNA-Doppelstrang hindurchgeführt wird. Anschließend wird der DNA-Doppelstrangbruch unter ATP-Verbrauch wieder verschlossen. Gehören die beiden DNA-Stränge zum gleichen DNA-Segment, wird die Verwindungszahl pro Reaktion um zwei geändert. Zu dieser Gruppe von Topoisomerasen gehören *E. coli* DNA-Gyrase und Topoisomerase IV, Topoisomerase II in Hefen und Topoisomerase IIα und IIβ in Säugetierzellen [Corbett und Berger 2004].
- **Typ IIB** Topoisomerase wurde von Bergerat 1994 erstmals beschrieben. Zu dieser Klasse zählt die Topoisomerase VI aus Archaebakterien, die ähnliche katalytische Eigenschaften wie Typ IIA Enzyme, jedoch eine deutlich andere Struktur besitzt [Bocs et al. 2001, Corbett und Berger 2004].

Allen Topoisomerasen ist gemein, dass während des katalytischen Zyklus eine kovalente Bindung des Enzyms an die DNA über eine Tyrosin-Phosphodiester-Brücke erfolgt. Tabelle 1 zeigt noch einmal einen kurzen Überblick über die verschiedenen Klassen von Topoisomerasen.

Tab. 1: Klassen von Topoisomerasen (Topo) sowie deren Eigenschaften.

Typ	Tyrosin-Bindung	Enzyme	DNA-Schnitte	Änderung VZ*	ATP	Mg^{2+}-Cofaktor
IA	5'-Ende	Bakterielle Topo I + III; Topo IIIα/β; Reverse Gyrase;	Einzelstrang	+1	–	+
IB	3'-Ende	**Topo I;** Topo V;	Einzelstrang	+/– n	–	–
IIA	5'-Ende	**Topo IIα/β**; DNA-Gyrase; Topo IV;	Doppelstrang	+/– 2	+	+
IIB	5'-Ende	Topo VI;	Doppelstrang	+/– 2	+	+

* VZ: Verwindungszahl, rot gedruckt sind Topoisomerasen aus Säugerzellen.

In den nächsten Kapiteln werden nur die humanen Topoisomerase I (aus der Klasse Typ IB) und Topoisomerase IIα und IIβ (Typ IIA-Enzyme) eingehender beschrieben, da nur diese im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht wurden.

2.2.1 Topoisomerase I

Topoisomerasen vom Typ IB wurden erstmals von Champoux und Dulbecco [1972] beschrieben. Typ IB Topoisomerasen sind monomere Enzyme und benötigen keine energetischen Cofaktoren wie ATP oder zweiwertige Ionen wie Mg^{2+}, um superspiralisierte DNA zu relaxieren. Der Grossteil von Typ IB Topoisomerasen hat eine Größe von 80-100 kDa [Berger 1998]. Eine der am besten untersuchten Topoisomerasen vom Typ IB ist die humane Topoisomerase I, welche von einem einzigen Gen auf Chromosom 20q12-13.2 codiert wird [Juan et al. 1988]. In der Promotorregion dieses Gens finden sich Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren wie beispielsweise cAMP-responsive-element-binding protein (CREB/ATF), octamer transcription factor (OTF), Sp1 oder NF-κB [Larsen und Gobert 1999]. Topoisomerase I ist ein im Zellkern lokalisiertes Protein bestehend aus 765 Aminosäuren und besitzt ein Molekulargewicht von 91 kDa. Im Zellkern liegen etwa 10^5 bis 10^6 Moleküle vor, die eine Halbwertszeit von 10-16 Stunden besitzen. Beim Durchlaufen des Zellzyklus wird Topoisomerase I kontinuierlich exprimiert [Boege 1996, Meyer et al. 1997, Desai et al. 1997, Champoux 2001].

Topoisomerase I ist ein Phosphoprotein und kann durch Serin/Threonin-Kinasen wie Proteinkinase C (PKC), Casein-Kinase II oder c-Abl (Abelson Tyrosin-Kinase) phosphoryliert werden, was zu einer Aktivierung der Enzymaktivität führt [Pommier et al. 1990, Larsen und Gobert 1999, Yu et al. 2004]. Eine Dephosphorylierung geht mit einem Verlust der Fähigkeit superspiralisierte DNA zu relaxieren einher. Eine weitere posttranslationale Modifizierung der Topoisomerase I, eine poly(ADP-Ribosyl)ierung, welche zu einer 3-5-fachen Abnahme der Aktivität führt, wird durch die Poly(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP) katalysiert. PARPs werden in der Zelle aktiviert, wenn DNA-Strangbrüche auftreten, jedoch ist die poly(ADP-Ribosyl)ierung nicht von langer Dauer. Somit soll möglicherweise durch die Hemmung der Topo I-Aktivität die DNA-Replikation während eines vorliegenden DNA-Strangbruches so lange „lokal“ inaktiviert werden, bis der Schaden wieder repariert ist [Larsen und Gobert 1999].

Die humane Topoisomerase I lässt sich in 4 Domänen einteilen: Die aminoterminale Domäne, die Kern-Domäne (core), die Linker-Domäne und die C-terminale Domäne (siehe Abb. 4)

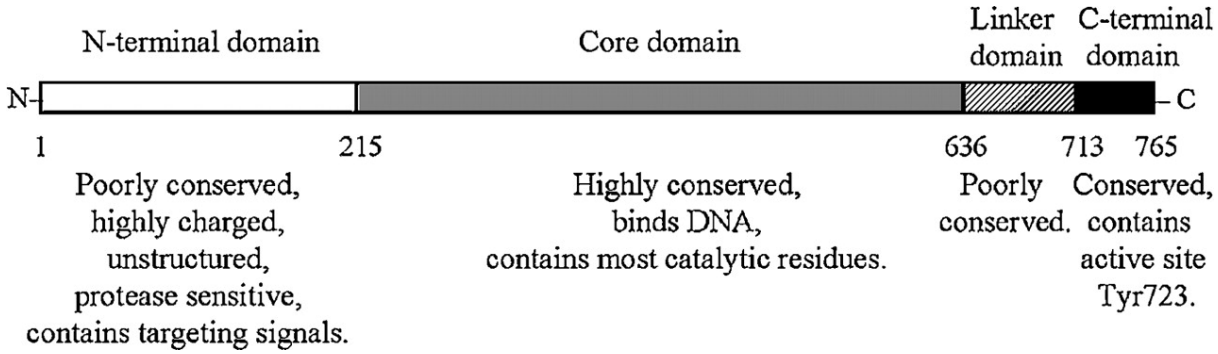


Abb. 4: Struktur der humanen Topoisomerase I [Champoux 2001].

Die N-terminale Domäne besteht aus 214 Aminosäuren und besitzt die größte Variabilität, d.h. sie ist über die Evolution hinweg wenig konserviert. Sie ist für die katalytische Aktivität nicht essentiell und fehlt in viralen Enzymen völlig. Auch wenn sie für die *in vitro*-Aktivität unwesentlich ist, so besitzt sie in der Zelle eine wichtige Rolle. In der N-terminalen Domäne findet man 4 nucleäre Lokalisationssequenzen (NLS), sowie Sequenzen um mit anderen Proteinen, wie beispielsweise Transkriptionsfaktoren oder p53, zu interagieren [Mo et al. 2000, Pourquier und Pommier 2001, Champoux 2001]. Nach der N-terminalen Domäne folgt die hoch konservierte, 421 Aminosäure große, Kern-Domäne. In dieser sind alle weiteren katalytischen Aktivitäten zu finden, jedoch nicht das für die eigentliche Topoisomerase-

Aktivität verantwortliche Tyrosin 723. Die „Core“-Domäne wird in 3 Untereinheiten (Csd: core subdomain I, II und III) eingeteilt und ist für die eigentliche DNA-Bindung verantwortlich [Champoux 2001]. Eine 77 Aminosäuren umfassende Linker-Domäne verbindet die Kern-Domäne mit der C-terminalen Domäne. Die Linker-Domäne ist für die katalytische Aktivität entbehrlich. In Kristallstrukturuntersuchungen hat sich gezeigt, dass die Linker-Domäne aus der Kernregion des Enzyms herausragt und möglicherweise die Rotation des ungespaltenen Stranges während der DNA-Relaxierung kontrolliert, unter Umständen sogar in Verbindung mit der N-terminalen Domäne [Stewart et al. 1997, Pourquier und Pommier 2001, Lisby et al. 2001, Corbett und Berger 2004]. Die letzten 53 Aminosäuren bilden die C-terminale Domäne des Enzyms, in denen auch das katalytische Zentrum, Tyrosin 723 (Tyr^{723}), lokalisiert ist. Eine aktive Form der Topoisomerase kann aus Fragmenten, die annähernd der Kern-Domäne (AS 175-659) und der C-terminalen Domäne (AS 713-765) entsprechen, rekonstituiert werden [Stewart et al. 1997, Champoux 2001].

Die Kristallstruktur eines 22 Basenpaar-DNA-Stranges und einer trunkierten humanen Topoisomerase I (ab AS 215) ist in Abb. 5 dargestellt. Der Topoisomerase in Abb. 5 fehlt die N-terminale Domäne, da eine Röntgenstrukturanalyse des Enzym-DNA-Komplexes mit diesem Fragment nicht eindeutig interpretierbar war [Champoux 2001].

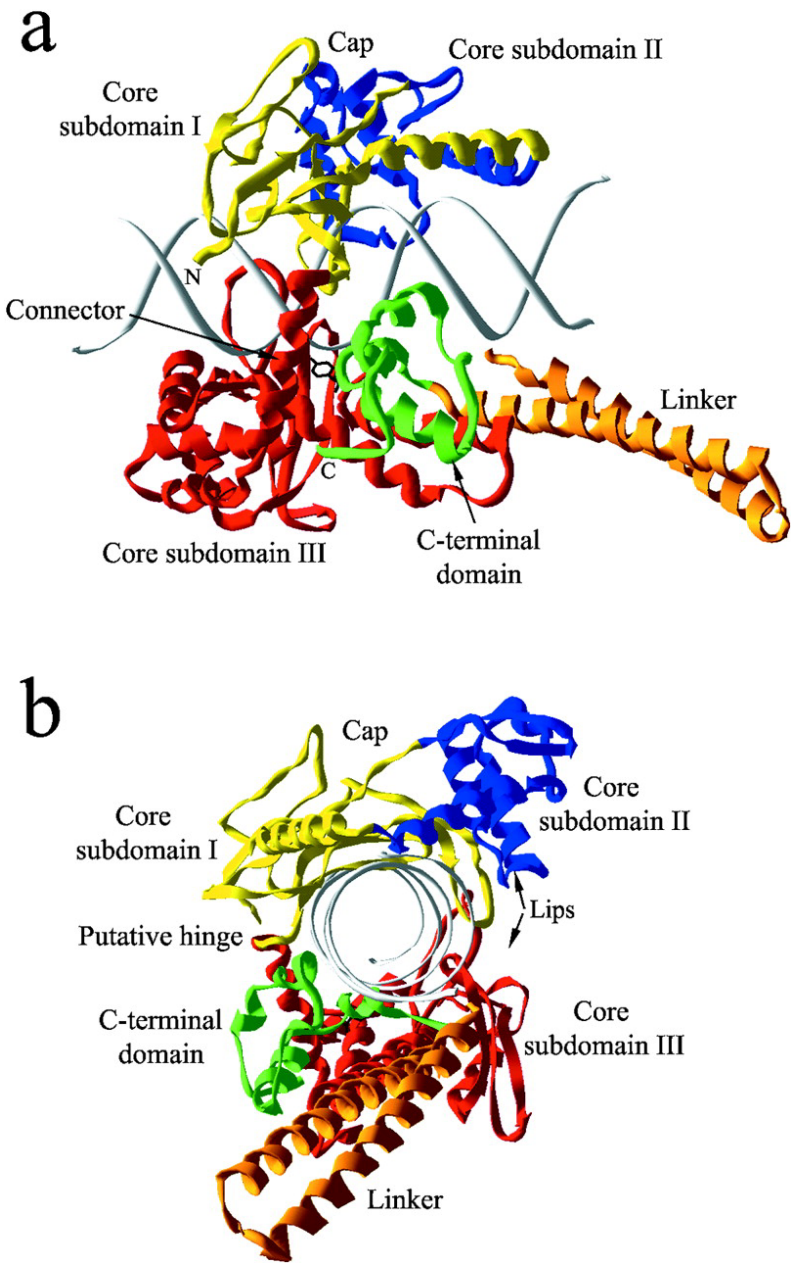


Abb. 5: Struktur eines Fragmentes humaner Topoisomerase I mit einem 22 Basenpaar DNA-Strang [Champoux 2001]. (**a**) Ansicht mit horizontaler DNA-Achse, (**b**) Ansicht entlang des DNA-Stranges. Die einzelnen Subdomänen sind farbig markiert: Csd I-Gelb, Csd II-Blau, Csd III-Rot, C-terminale Domäne-Grün, Linker-Orange.

Als möglicher Bindungsmechanismus an die DNA stellt man sich vor, dass die Topoisomerase den DNA-Strang mit zwei „Flügeln“ umklammert, ähnlich einer Zange, und so eine positiv geladene Tasche für die DNA bildet, wobei der Kontakt zwischen Protein und dem Phosphatrückgrat der DNA sich über 14 Basenpaare erstreckt. Einer dieser „Flügel“ umfasst die Csd I und Csd II, die so etwas wie eine Haube, auch als „cap“ bezeichnet, bilden. Die Csd III und die C-terminale Domäne bilden den zweiten „Flügel“ und formen eine Basis,

in die sich die DNA legt. Das Drehgelenk der Zange wird zwischen der Csd I und Csd III vermutet (siehe Abb. 5, putative hinge). Gegenüber dem vermutlichen Drehgelenk liegt die Öffnung der Zange, welche sich durch Annäherung der Haube und der Basis formt (Abb. 5, lips). Stabilisiert wird der „Verschluss“ durch eine Interaktion von sechs Aminosäuren und einer Ionenbrücke [Champoux 2001, Carey et al. 2003]. Abb. 6 zeigt einen möglichen Mechanismus, wie ein DNA-Strang in die „geöffnete“ Topoisomerase I eingelagert wird und sich die „Flügel“ schließen.

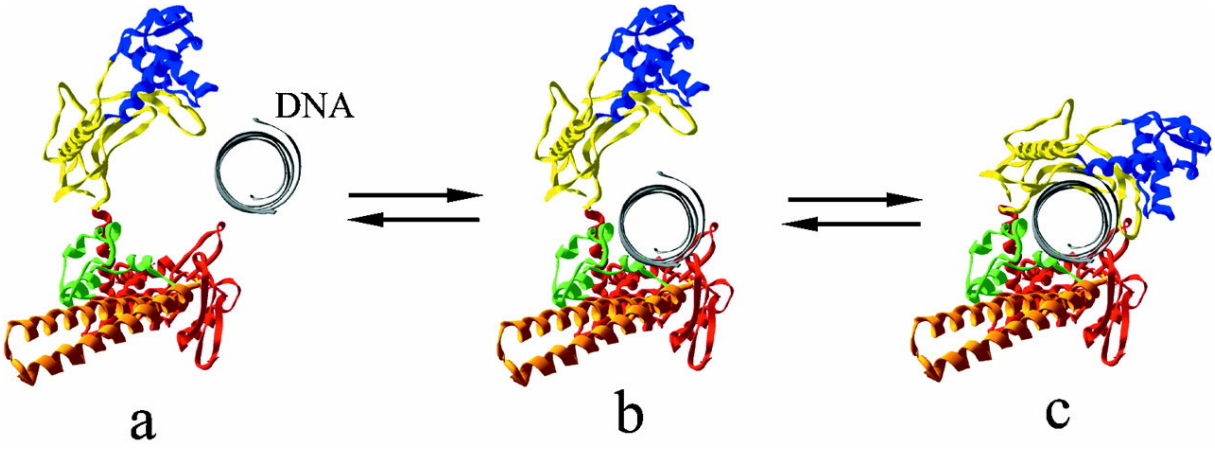


Abb. 6: Möglicher Mechanismus der Einlagerung eines DNA-Stranges in die humane Topoisomerase I. (a) Die Topoisomerase ist in einer offenen Konformation. (b) Ein DNA-Doppelstrang wird in die Basis der Bindungstasche eingelagert. (c) Das Enzym schließt sich und der katalytische Zyklus beginnt [modifiziert nach Champoux 2001].

Den katalytischen Zyklus der humanen Topoisomerase I kann man in vier Schritte unterteilen:

1. Das Enzym bindet doppelsträngige DNA, indem die Haube (Csd I und II) sich über die in der Basis (Csd III und C-Terminus) liegende DNA legt. Dabei wird die DNA für das Schneiden positioniert. Es konnte gezeigt werden, dass die Topoisomerase I den topologischen Zustand des Substrates erkennt, da es 5-10-mal effizienter an superspiralisierte DNA bindet als an relaxierte DNA [Muller 1985]. Eine bevorzugte Sequenz für eine leichte DNA-Spaltung ist 5’-(A/T)(G/C)(A/T)T-3’, wobei die kovalente Bindung am -1T Rest erfolgt.

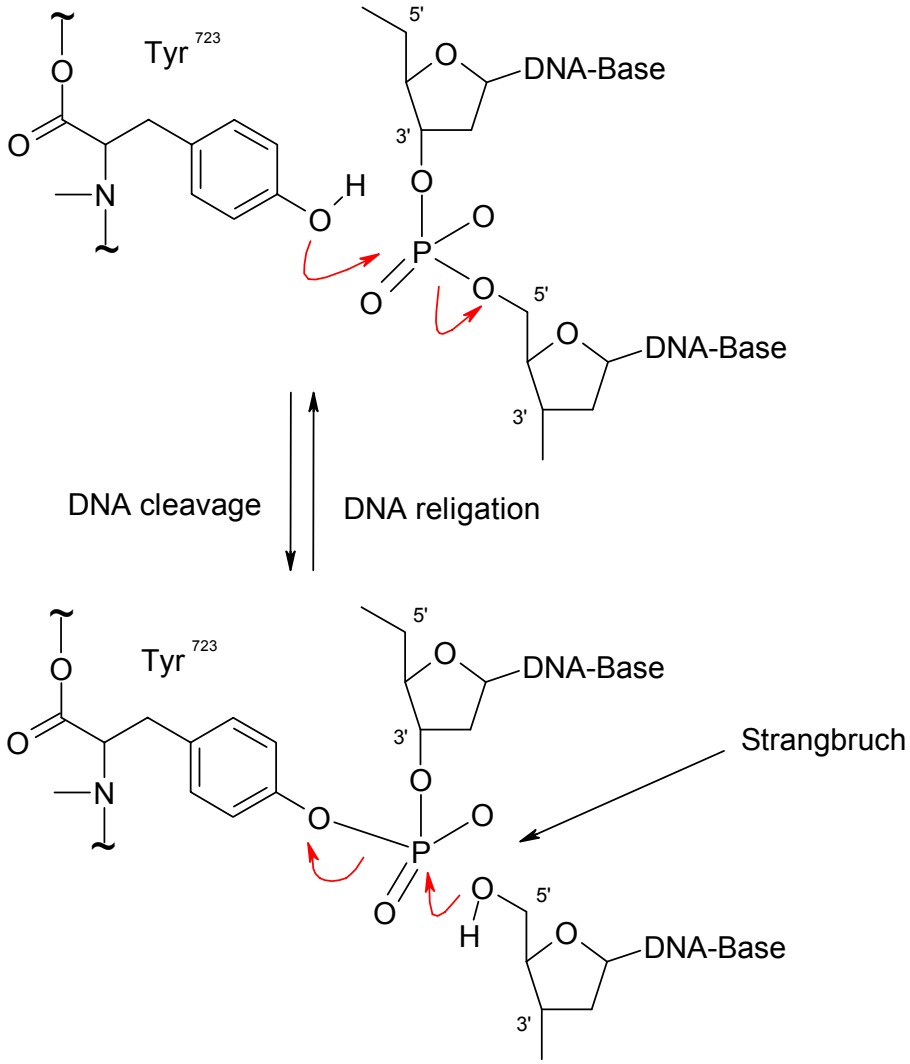


Abb. 7: Mechanismus der Topoisomerase I induzierten Spaltung (cleavage) und Verknüpfung (religation) der DNA. Gezeigt sind der nukleophile Angriff des Tyrosins 723 (Tyr^{723}) der Topoisomerase I und die Ausbildung der Phosphotyrosinbrücke mit einhergehendem DNA-Strangbruch.

2. Der DNA-Strang wird geschnitten (cleavage). Dabei findet ein nukleophiler Angriff des O-4 des Tyr^{723} an der Phosphatgruppe statt, wobei eine Phosphodiesterbrücke zwischen dem 3'-Ende der DNA und dem Tyrosinrest der Topoisomerase ausgebildet und ein freies 5'-Hydroxy-Ende an der DNA gebildet wird (siehe Abb. 7). Dieses kovalente Enzym-DNA-Intermediat wird auch als „Cleavable Complex" bezeichnet. Zwischen diesem Komplex und der verschlossenen DNA entsteht ein Gleichgewicht, welches auf die Seite des Wiederverschlusses hin verschoben ist. Der Mechanismus des Angriffs erfolgt nach einer klassischen S_N2-Reaktion.

3. Der komplementäre DNA-Strang wird durch die entstandene Lücke im Ribose-Phosphat-Rückgrat hindurchgeführt. Bei dieser kontrollierten Rotation wird, nach dem Rotationsmodell [Berger 1998, Stewart et al. 1998], der geschnittene DNA-Strang stationär gehalten, während das freie Ende gedreht wird (siehe Abb. 8). Bei diesem Modell sind mehrere Rotationen, und damit größere Änderungen der Verwindungszahl als eins, möglich. Als „treibende" Kraft für die Relaxierung vermutet man den Abbau der Torsionsspannung.

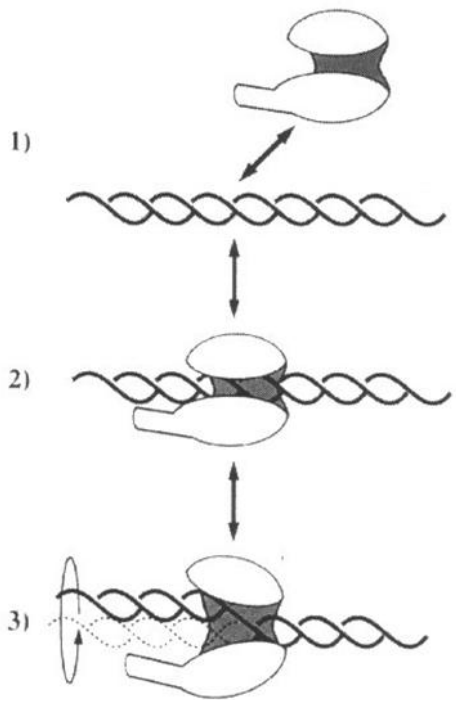


Abb. 8: Rotationsmodell für den katalytischen Zyklus humaner Topoisomerase I [Berger 1998].

4. Der geöffnete DNA-Strang wird wieder verschlossen (Religation). Dies ist die zweite Transesterreaktion im katalytischen Zyklus. Die freie 5'-Hydroxylgruppe des geschnittenen Stranges wirkt nun als Nukleophil und greift die Phosphotyrosinbindung an, wodurch die Bruchstelle wieder verschlossen wird. Die Energie für diese Reaktion stammt aus der gespeicherten Energie der superspiralisierten DNA. Nachdem sich das Enzym geöffnet und den DNA-Strang freigesetzt hat, steht die Topoisomerase I wieder für einen neuen katalytischen Zyklus zur Verfügung.

Für die beschriebene Reaktion sind im katalytischen Zentrum weitere 4 Aminosäure von Bedeutung: Arg^{488}, Lys^{532}, Arg^{590} und His^{632}. Die Aminosäuren Arg^{590} und His^{632} stabilisieren durch Wasserstoffbrücken mit Sauerstoffatomen den zu schneidenden DNA-Strang. Arg^{488} und Lys^{532} werden in einen „proton relay"-Mechanismus der Katalyse einbezogen, in dem sie dazu beitragen, dass das katalytische Tyr^{723} deprotoniert wird, um den nukleophilen Angriff an die DNA zu ermöglichen [Pommier et al. 1998, Berger 1998, Champoux 2001, Corbett und Berger 2004].

Als Ergebnis der Hindurchführung eines Einzelstranges verändert die Topoisomerase I den Verwindungsgrad seines Substrates in Einerschritten. Sie ist somit in der Lage superspiralisierte Duplex-DNA zu relaxieren, einzelsträngige Zirkel mit sich gegenseitig ergänzenden primären Strukturen zu verschlingen, wie auch einzelsträngige DNA zu ver- und entknoten. Im Gegensatz zur prokaryontischen Topoisomerase I kann die eukaryontische Form des Enzyms sowohl positive als auch negative superhelikale Verdrillungen einführen oder entwinden (siehe Abb. 9).

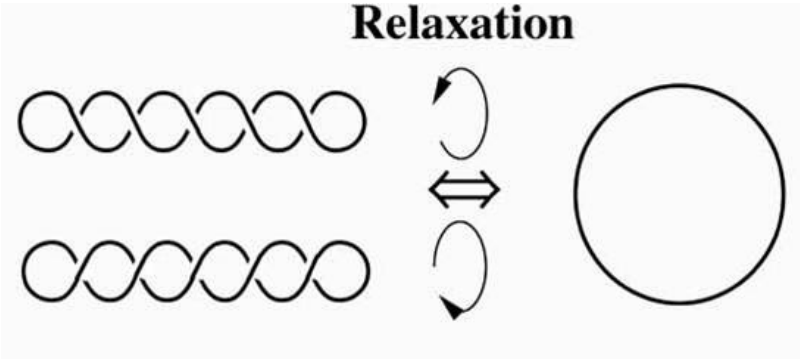


Abb. 9: Relaxation positiv oder negativ verdrillter DNA [Boege 1996].

2.2.2 Topoisomerase II

Die humane Topoisomerase II gehört zu den Topoisomerasen vom Typ IIA, die erstmals von Gellert et al. [1972] isoliert wurden. Seit der Entdeckung der eukaryontischen Topoisomerase II findet sie eine große Beachtung, da relativ kurz nach ihrer Entdeckung klar wurde, dass sie ein essentielles Enzym für Zellen ist. Auch die Entdeckung, dass Topoisomerase II ein primäres Ziel vieler bereits klinisch eingesetzter Chemotherapeutika war bzw. ist, machte die Topoisomerase II noch interessanter [Osheroff 1998]. Sie unterscheiden sich grundlegend von den Typ I Enzymen, da sie nur als Homodimer auftreten, Mg^{2+} als Cofaktoren benötigen und

ATP verbrauchen, um einen DNA-Doppelstrang aktiv durch einen transienten DNA-Doppelstrangbruch hindurchzuführen. Dazu müssen Topoisomerase II-Enzyme beide Stränge eines DNA-Doppelstranges schneiden. Die beiden Schnittstellen sind um 4 Basenpaare versetzt und durch dieses entstehende „Tor“ kann ein weiterer DNA-Doppelstrang hindurchgeführt werden. Wie bereits erwähnt, spielt die Topoisomerase II eine wichtige Rolle im Nukleinsäure-Metabolismus, in der DNA-Replikation, Rekombination und Transkription. Des Weiteren ist sie wichtig für den Aufbau der Chromosomen, deren Kondensation und Dekondensation, die Regulation an den S/MARs und für die Matrix von Interphase-Zellkernen.

In Zellen von niedrigen Eukaryonten wird nur eine Form der Topoisomerase II exprimiert, wohingegen in Säuger-Zellen zwei Isoformen, Topoisomerase IIα und IIβ, vorkommen. Die α-Isoform des Enzyms scheint die Form zu sein, die ursprünglich als Typ II-Enzym in Säugetieren beschrieben wurde, und in niedrigen Eukaryonten als einzige auftritt. Topoisomerase IIα ist ein Protein mit einer Größe von 170 kDa und wird auf Chromosom 17q21-22 codiert. Das Gen für die Topoisomerase IIβ-Isoform ist auf Chromosom 3p24 lokalisiert und codiert für ein Protein mit einer Größe von 180 kDa [Tan et al. 1992]. Die beiden Isoformen sind etwa zu 70% sequenzhomolog. Trotz ihrer großen Ähnlichkeit werden die beiden Isoformen auf verschiedenen Genen codiert und werden daher auch verschieden reguliert. Dies führt dazu, dass Topoisomerase IIα und IIβ während des Zellzyklus unterschiedlich exprimiert werden. Dies wird durch unterschiedliche Transkriptionsraten und Veränderungen der mRNA-Gehalte, sowie der Proteinstabilität erreicht. So unterliegt beispielsweise Topoisomerase IIα einer zellzyklusabhängigen Veränderung sowohl bezüglich der Proteinmenge, als auch Stabilität. Der Gehalt an Topoisomerase IIα steigt zu Beginn der Replikation, wächst während der S- und G_2-Phase des Zellzyklus weiter an, erreicht seinen Höchstwert in der späten G_2/M-Phase und fällt, nach Beendigung der Mitose, rapide ab. Dabei wird die Topoisomerase vermutlich ubiquitiniert und anschließend proteosomal abgebaut. Der Gehalt an Topoisomerase IIβ hingegen bleibt während des gesamten Zellzyklus konstant [Larsen et al. 1996, Isaacs et al. 1998, Austin und Marsh 1998]. Die Topoisomerase IIα-Expression ist in stark proliferierenden Geweben erhöht, in nicht-proliferierenden Zellen ist die Expression stark vermindert. Dies legt die Vermutung nahe, dass Topoisomerase IIα eine wichtigere Rolle bei der Proliferation spielt, wohingegen die Topoisomerase IIβ eher eine Rolle als „housekeeping“-Enzym besitzt und daher vermehrt an DNA-Transkription oder Reparatur beteiligt ist [Burden und Osheroff 1998, Austin und Marsh 1998]. Unterstützt wird

diese These durch Beobachtungen der Verteilung der Topoisomerase II-Isoenzyme bei der Mitose, da die hauptsächliche Funktion der Topoisomerase IIα während der Zellteilung vermutlich in der Trennung der Katenane zentromerer DNA liegt. In Interphasenzellkernen ist die Verteilung der beiden Isoenzyme sehr ähnlich. Man findet sie im Zellkern, wobei der Hauptanteil im Nukleolus zu finden ist und ein geringer Anteil im Nukleoplasma. Während der Zellteilung jedoch unterscheidet sich die Verteilung der beiden Isoenzyme. Während der Metaphase ist Topoisomerase IIα hauptsächlich Chromosom-assoziiert, wohingegen die Lokalisation von Topoisomerase IIβ in der Mitosephase variiert. Topoisomerase IIβ ist am Anfang der Mitosephase aus dem Zellkern ausgeschlossen, die Chromosomassoziation setzt erst bei beginnender Segregation, der Trennung des Chromosomensatzes, ein und steigt bis zur Zytokinese an. Von da an verhalten sich die beiden Isoenzyme wieder ähnlich [Meyer et al. 1997, Christensen et al. 2002].

Vergleicht man die Aminosäure-Sequenzen der Typ-IIA Topoisomerasen verschiedener Spezies, so erkennt man eine große Homologie der verschiedenen Enzyme. Eine der bestuntersuchten Typ IIA-Topoisomerasen ist die DNA-Gyrase aus *E. coli*, aufgrund deren Aminosäuresequenz die Einteilung der verschiedenen Domänen beruht. Eukaryontische Topoisomerase sind Homodimere (AB), wohingegen die bakteriellen Analoga als Heterotetramere (A_2B_2) vorliegen. Topoisomerase II-Enzyme lassen sich in 3 Domänen einteilen (siehe Abb. 10).

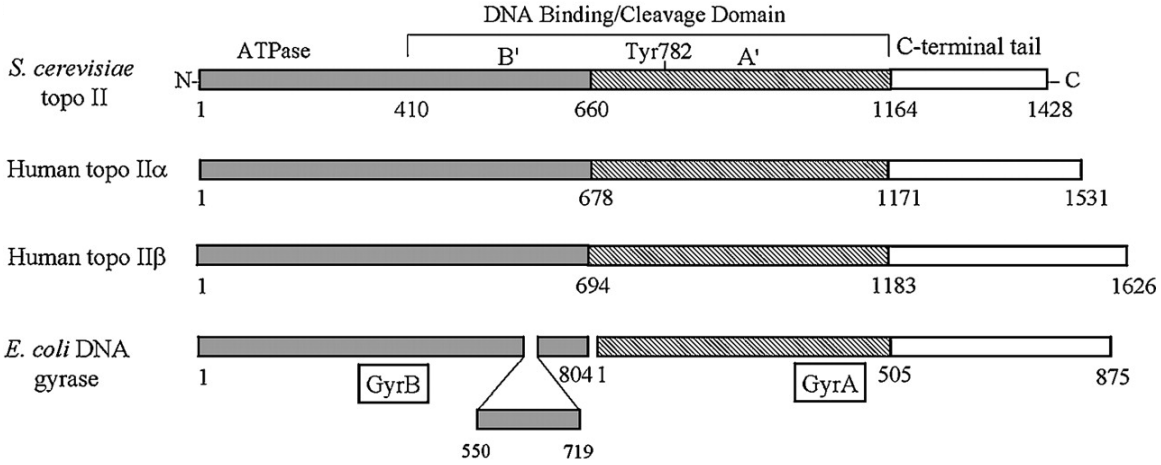


Abb. 10: Strukturdomänen verschiedener Topoisomerase II-Enzyme [modifiziert nach Champoux 2001].

Die aminoterminale Domäne ist mit der B-Untereinheit der DNA-Gyrase (GyrB) homolog. In diesem Abschnitt befinden sich 2 Sequenzen für die ATP-Bindung und Hydrolyse (ATPase). Die mittlere Untereinheit, oder zentrale Domäne, ist vergleichbar mit der A-Untereinheit der DNA-Gyrase (GyrA) und ist verantwortlich für die DNA-Bindung. In dieser Domäne befindet sich ebenfalls das katalytische Tyrosin, ~120 Aminosäuren vom Aminoterminus der GyrA entfernt, welches die kovalente Phosphotyrosin-Bindung mit dem DNA-Phosphatrückgrat während des Schneidevorgangs eingeht. Betrachtet man die DNA-bindende und –schneidende Region als eigene Domäne, so umfasst dies einen Teil der GyrB-Untereinheit (Richtung C-Terminus) und die GyrA-Untereinheit (siehe Abb. 10). Die C-terminale Domäne besitzt keine Ähnlichkeit mit Untereinheiten der Gyrase und ist auch über die Enzyme verschiedener Spezies sehr divergent. Für die katalytische Aktivität des isolierten Enzyms ist die C-terminale Domäne nicht nötig. Jedoch beinhaltet sie die NLS und besitzt einige Phosphorylierungsstellen, die vermutlich bei der physiologischen Regulation des Enzyms eine Rolle spielen [Burden und Osheroff 1998, Berger 1998].

Bis zum heutigen Zeitpunkt konnte noch keine Kristallstruktur einer intakten Typ IIA-Topoisomerase erhalten werden. Verfügbar sind jedoch Strukturen von Fragmenten der *E. coli* DNA-Gyrase und Hefe Topoisomerase II, welche einen guten Einblick in die Struktur und den möglichen Reaktionsmechanismus der Typ IIA-Enzyme liefern. Die Kristallstruktur eines 92 kDa großen Fragmentes der Hefe-Topoisomerase II (AS 410-1202) ist in Abb. 11 gezeigt.

Abb. 11: Kristallstruktur eines 92 kDa großen Fragmentes der Hefe Topoisomerase II [modifiziert nach Berger 1998]. Die Subdomänen sind farbig markiert: Subfragment A'-Blau und Lila, Subfragment B'-Orange und Rot. Das katalytische Tyrosin (Y*) ist als grüner Punkt eingezeichnet (siehe Pfeile).

Das in Abb. 11 gezeigte Fragment umfasst die zentrale DNA-bindende und –schneidende Domäne, jedoch fehlt in der Darstellung die ATPase Domäne und die C-terminale Domäne. Dieses Fragment wäre somit in der Lage die DNA zu schneiden, jedoch könnte die Strangpassage, aufgrund der fehlenden ATPase, nicht vollzogen werden. Das 92 kDa große Polypeptid kann in 2 Subfragmente unterteilt werden, in Abb. 11 mit A' (AS 682-1178) und B' (AS 420-630) bezeichnet, die über einen ~50 AS umfassenden Linker verbunden sind. Das eigentlich aktive Enzym besteht aus einem $(A'B')_2$-Dimer, welches annähernd eine Herzform annimmt und einen ca. 50 Å durchmessenden Hohlraum bildet. Wie aus Abb. 11 ersichtlich, gibt es 2 Dimerisierungsbereiche, einen zwischen den B'-Domänen und einen weiteren zwischen den C-terminalen Enden der A'-Domänen. Untersuchungen an *E. coli* DNA-Gyrase und biochemische Untersuchungen haben gezeigt, dass eine weitere Dimerisierungsregion von der ATPase-Domäne gebildet wird. Dieses Dimer formt ebenfalls einen positiv geladenen Hohlraum, jedoch nur von 20 Å Durchmesser, wohingegen der Rest des Moleküls primär negativ geladen ist. Das Dimer aus der ATPase-Domäne würde, wenn man die Struktur aus

Abb. 11 zugrunde legt, oberhalb der B'-Region liegen. In diese beiden Hohlräume können die zu passagierenden DNA-Stränge binden. Dies sind erstens, der DNA-Strang an dem die Strangbrüche erfolgen (G-Segment) und zweitens das T-Segment, welches durch die Lücke des G-Segmentes hindurchgeführt wird. Die Abkürzungen leiten sich dabei für G-Segment von „gate" ab, da in diesem Strang das Tor geöffnet wird, und bei T-Segement von „transport", da dieser Strang durch die Lücke transportiert wird. Die Untersuchungen zur Struktur der Typ IIA-Enzyme, sowie die biochemischen Untersuchungen, führen zu einem Modell, in dem man sich die Topoisomerase II als ein Enzym mit zwei paar Zangen vorstellt, die über einige Gelenke miteinander verbunden sind. Ein Zangenpaar bilden dabei die ATPase-Domänen, die sich durch ATP-Bindung und Hydrolyse öffnen und schließen. Das andere Zangenpaar wird hauptsächlich von der A'-Domäne gebildet und dient der „Ergreifung" und Öffnung des DNA-Doppelstranges [Burden und Osheroff 1998, Berger 1998, Corbett und Berger 2004]. Der katalytische Zyklus dieses Modells ist in Abb. 12 dargestellt.

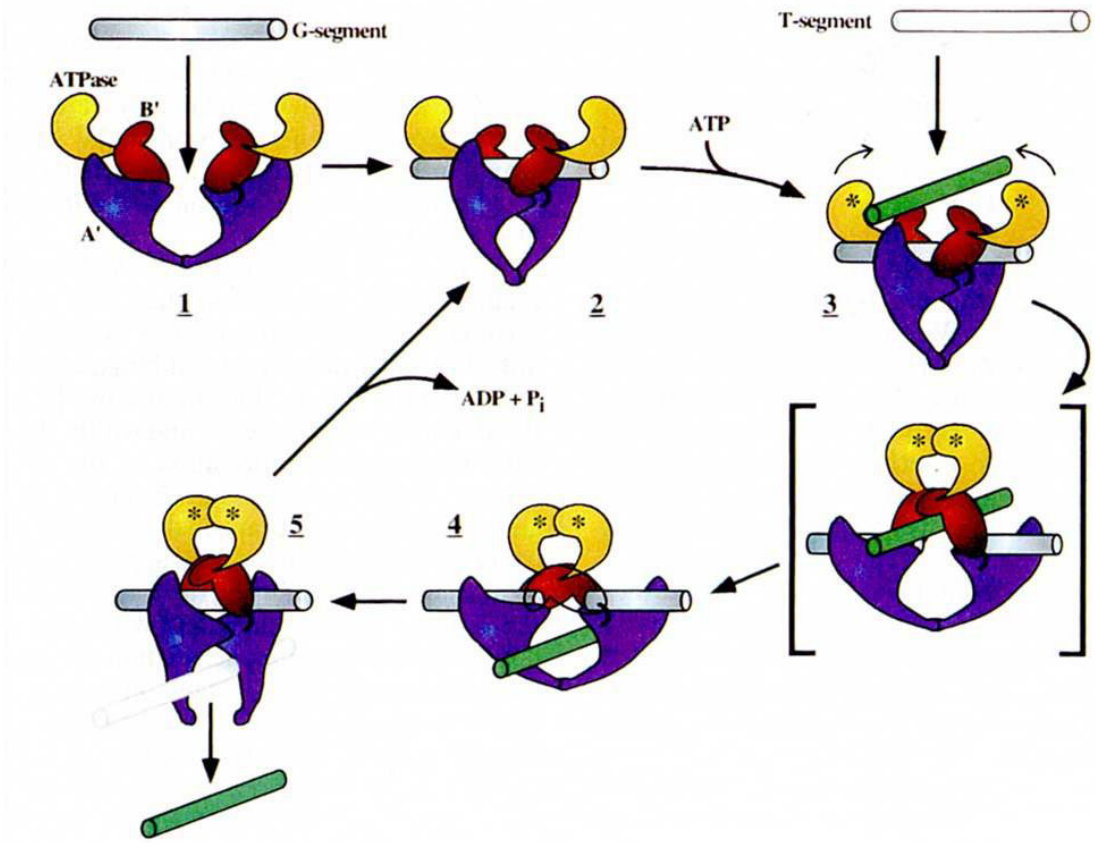


Abb. 12: Modell für den katalytischen Zyklus der Topoisomerase II [modifiziert nach Berger 1998].

Der katalytische Zyklus der humanen Topoisomerase II umfasst dabei folgende, in Abb. 12 dargestellte, Schritte:

1. Der katalytische Zyklus beginnt, indem die Topoisomerase II den zu schneidenden DNA-Strang (G-Segment) bindet. Die Bindung erfolgt dabei in der zentralen DNA-schneidenden Domäne. Die N-terminalen Enden der beiden A'-Domänen bilden dabei eine halbrunde Öffnung von 20-25 Å, die sich trichterförmig zu der eigentlich katalytisch aktiven Region mit den beiden Tyrosin-Resten ausweitet. Die Erkennung der Schnittstelle in der DNA wird dabei hauptsächlich von der topologischen Struktur bestimmt, da die Topoisomerase II keine bestimmten DNA-Sequenzen für eine Spaltung bevorzugt. Es konnten zwar bereits einige DNA-Sequenzen bestimmt werden, jedoch besteht zwischen diesen noch kein eindeutiger Zusammenhang. Diese relativ unspezifische Wahl könnte eine wichtige physiologische Rolle spielen, da die Topoisomerase II dadurch in die Lage versetzt ist, ihre Funktion über den Bereich des gesamten Genoms zu erfüllen. Dass die Topoisomerase II in der Lage ist zwischen den topologischen Zuständen des Substrates zu unterscheiden, erkennt man beispielsweise daran, dass es negativ superspiralisierte pBR322-Plasmid-DNA mit 4- bis 8-facher Affinität, verglichen mit relaxierten Plasmiden, bindet. Die erhöhte Affinität des Enzyms bezüglich superspiralisierter DNA lässt sich vermutlich auf die Erkennung sich gegenüberliegender DNA-Stränge zurückführen. Dass das Enzym auch den Torsionszustand seines Substrates erkennt kann ausgeschlossen werden, da seine kinetische Affinität sowohl zu überdrehten (negativ superspiralisierten), als auch unterdrehten (positiv superspiralisierten) Plasmiden gleich ist.
2. Nach der Bindung des G-Segmentes ändert die Topoisomerase II ihre Konformation. Eine Bewegung der A' und B'-Regionen führt dazu, dass die A'-Regionen einander angenähert werden und somit die katalytischen Tyrosin-Reste für den Angriff an die DNA positioniert werden. Auch hier findet ein nukleophiler Angriff am DNA-Phosphatrückgrat statt. Das Enzym scheint allerdings, statt einem gemeinsamen Doppelstrangbruch, zwei koordinierte Einzelstrangbrüche einzuführen. Die Schnitte erfolgen um 4 Basenpaare versetzt. Das Enzym bindet kovalent an das 5'-Ende der DNA über eine O^4-Phosphotyrosin-Brücke und ein freies 3'-Hydroxyende wird generiert. Dadurch kann das Enzym den topologischen Zustand seines Substrates aufrechterhalten und verhindert ein Ablösen der DNA mit dem Doppelstrangbruch.

Für die Einführung des DNA-Schnittes ist die Anwesenheit eines zweiwertigen Kations (Mg^{2+} wird bevorzugt) notwendig, jedoch wird kein ATP benötigt.

3. Durch die Bindung des Cofaktors ATP durchläuft die Topoisomerase II eine strukturelle Umformung. Begleitend mit dieser Strukturänderung ist der Transport einer intakten DNA-Helix (T-Segment) durch den im G-Segment erzeugten, transienten DNA-Doppelstrangbruch verbunden. Diese ATP-induzierte Konformationsänderung des Enzyms führt dazu, dass die Topoisomerase II topologisch an sein Nukleinsäure-Substrat gebunden wird. Es bildet sich eine bewegliche Klammer („sliding clamp“) aus, die sich durch eindimensionale Diffusion entlang der DNA bewegen, aber nicht vom kreisförmigen Substrat abdissoziieren kann. Es muss hier allerdings noch darauf hingewiesen werden, dass die Hydrolyse des gebundenen ATPs für die Hindurchführung des T-Segmentes nicht notwendig ist.
4. Nach der Hindurchführung des Doppelstranges durch die Lücke, unterliegt das Enzym erneut einem Gleichgewicht zwischen Spaltung und Wiederverschluss mit der DNA. Studien haben gezeigt, dass zirkuläre DNA-Moleküle mit Strangbruch ein kinetisches Intermediat des DNA-Wiederverschlusses darstellen. Dies lässt darauf schließen, dass auch beim Wiederverschluss des Doppelstranges die zwei Einzelstränge koordiniert verschlossen werden und nicht in einem Schritt. Auch wenn die DNA-Enzym-Komplexe vor und nach Hindurchführung strukturell vergleichbar sind, wird der Komplex nach Hindurchführung des T-Segmentes kinetisch bevorzugt. Der Komplex ist in Anwesenheit von ATP 2-4-mal stabiler, als vor der ATP-Bindung.
5. Die Topoisomerase II hydrolysiert den Cofaktor ATP zu ADP und Orthophosphat. Hierfür ist die Anwesenheit von Mg^{2+} essentiell. Die Hydrolyse von ATP führt zu der erneuten Ausbildung der alten Konformation des Enzyms, d.h. die Zange wird wieder geöffnet. Die Topoisomerase steht dann wieder für einen neuen Zyklus bereit. In Untersuchungen an Hefe-Topoisomerase II konnte gezeigt werden, dass die Topoisomerase II für einen kompletten katalytischen Zyklus insgesamt 2 ATPs benötigt, die jedoch zu unterschiedlichen Zeitpunkten hydrolysiert werden [Corbett und Berger 2004]. Nachdem die beiden ATP’s gebunden wurden, was zu einer Veränderung in der Enzymkonformation führt (siehe Schritt 3), wird anschließend ein ATP bereits hydrolysiert. Dies führt vermutlich zu einer Bewegung in der DNA-schneidenden Region und der Passage des T-Segmentes durch das Enzym. Über die Rolle der Hydrolyse des zweiten ATP-Moleküls ist noch nichts Genaues bekannt. Man nimmt jedoch an, dass der oben beschriebene Mechanismus, d.h. öffnen der Zange

und abdissoziieren des ADP, sowie die Öffnung des N-terminalen Tores dadurch ausgelöst werden [Berger 1998, Burden und Osheroff 1998, Champoux 2001, Wilstermann und Osheroff 2003, Corbett und Berger 2004].

Die Topoisomerase II liegt in der Zelle als Phosphoprotein vor, wobei hauptsächlich Serin-Reste phosphoryliert werden, selten auch Threonin-Reste. Die Phosphorylierung der Topoisomerase II scheint durch den Zellzyklus reguliert zu werden, mit einem Maximum in der G_2/M-Phase. Die Phosphorylierungsstellen liegen dabei in der C-terminalen Domäne des Proteins. Es wird vermutet, dass die Phosphorylierungen sowohl die Aktivität des Enzyms regulieren, als auch die Interaktion mit anderen zellulären Proteinen. Für die Proteinkinase Caseinkinase II konnte gezeigt werden, dass sie eine Rolle bei der physiologischen Phosphorylierung des Enzyms spielt. Weitere Proteinkinasen, die die Topoisomerase II phosphorylieren können sind die Proteinkinase C (PKC), die $p34^{cdc2}$-Kinase (CDK1) oder auch ERK1 MAP-Kinase [Larsen et al. 1996, Burden und Osheroff 1998, Austin und Marsh 1998, Chen et al. 1999].
Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die N-terminale Domäne und die zentrale Domäne für die eigentliche katalytische Aktivität verantwortlich sind, wohingegen die C-terminale Domäne vielmehr für die Verteilung und biologische Regulation/Funktion verantwortlich ist, z.B. für den Transport in den Zellkern, Proteininteraktionen und Phosphorylierungen.

Aufgrund des beschriebenen Mechanismus, einen DNA-Doppelstrang durch einen Weiteren (oder anderes Segment des gleichen Stranges) hindurchzuführen, ist die Topoisomerase II in der Lage negative oder positive helikale Twists des genetischen Materials abzubauen. Es können sogar intramolekulare DNA-Knoten oder intermolekulare Verwirrungen, wie beispielsweise bei katenierten DNA-Zirkeln, gelöst werden [Berger 1998, Burden und Osheroff 1998]. Dies ist in Abb. 13 in vereinfachter Weise dargestellt.

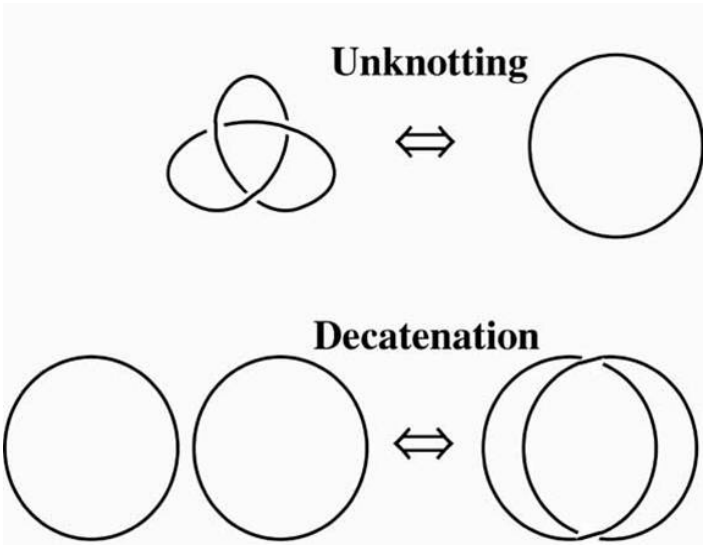


Abb. 13: Topoisomerase II-vermittelte Änderungen der DNA-Topologie [modifiziert nach Boege 1996].

Diese spezielle Fähigkeit der Topoisomerase II, ineinander verknüpfte (katenierte) DNA-Zirkel zu trennen (dekatenieren), lässt sich besonders gut mit einem speziellen Substrat, der Kinetoplasten-DNA (kDNA) untersuchen. Diese ist aus einem Netzwerk ineinander verknüpfter DNA-Zirkel aufgebaut, ähnlich den Ringen eines Kettengewebes. Die einzelnen Zirkel können aus dem Netzwerk nur durch die katalytische Aktivität der Topoisomerase II freigesetzt werden. In Abb. 14 ist die elektronenmikroskopische Aufnahme eines kDNA-Segmentes aus *Crithidia fasciculata* exemplarisch dargestellt.

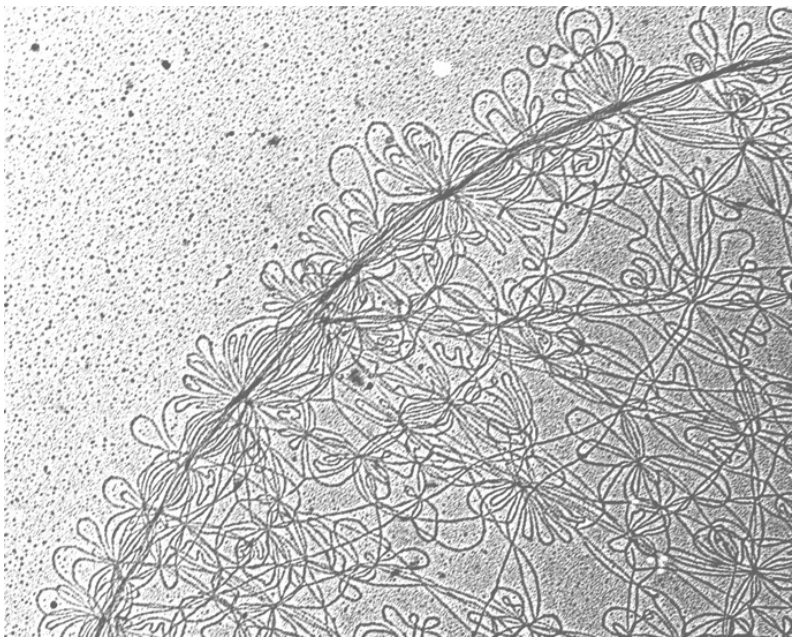


Abb. 14: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines kDNA-Segementes [Klingbeil und Englund 2004].

2.2.3 Topoisomerasehemmstoffe

Topoisomerasen sind das Ziel einer Reihe von Substanzen, die standardmäßig in der Chemotherapie eingesetzt werden. Das Wissen um den Mechanismus des katalytischen Zyklus von Topoisomerasen hat dazu beigetragen, dass man bei vielen Substanzen eine mehr oder weniger genaue Vorstellung hat, wie sie mit den Zielenzymen interagieren. Aufgrund ihres Wirkmechanismus unterscheidet man bei Topoisomerasehemmstoffen klassischerweise zwischen den katalytischen Inhibitoren und den Topoisomerasegiften [Froelich-Ammon und Osheroff 1995, Boege 1996, Austin und Marsh 1998].

2.2.3.1 Katalytische Topoisomeraseinhibitoren

Die gemeinsame Eigenschaft katalytischer Topoisomeraseinhibitoren ist, dass sie nicht mit dem kovalenten Enzym-DNA-Intermediat im Zustand des DNA-Strangbruches interagieren und dieses stabilisieren. Sie können jedoch auf verschiedene Weise mit dem Zielenzym interagieren. So können beispielsweise Aclarubicin (Abb. 15), bestimmte synthetische Flavonoid-Derivate wie EMD 509689 oder EMD 21388 (Abb. 15) und Suramin (Abb. 15) die Bindung zwischen DNA und der Topoisomerase behindern [Boege et al. 1996, Larsen et al. 2003]. Ein nicht kovalenter Komplex zwischen DNA und Topoisomerase wird durch Bis-dioxopiperazine wie ICRF-187/-193 (Abb. 15), Merbaron (Abb. 15) oder ß-Lapachone (Abb. 15) stabilisiert, wohingegen Novobiocin (Abb. 15) beispielsweise die ATP-Bindung bei der Topoisomerase II hemmt [Boege 1996, Bailly 2000, Larsen et al. 2003].
Die Strukturen einiger ausgewählter Topoisomeraseinhibitoren sind in Abb. 15 dargestellt.

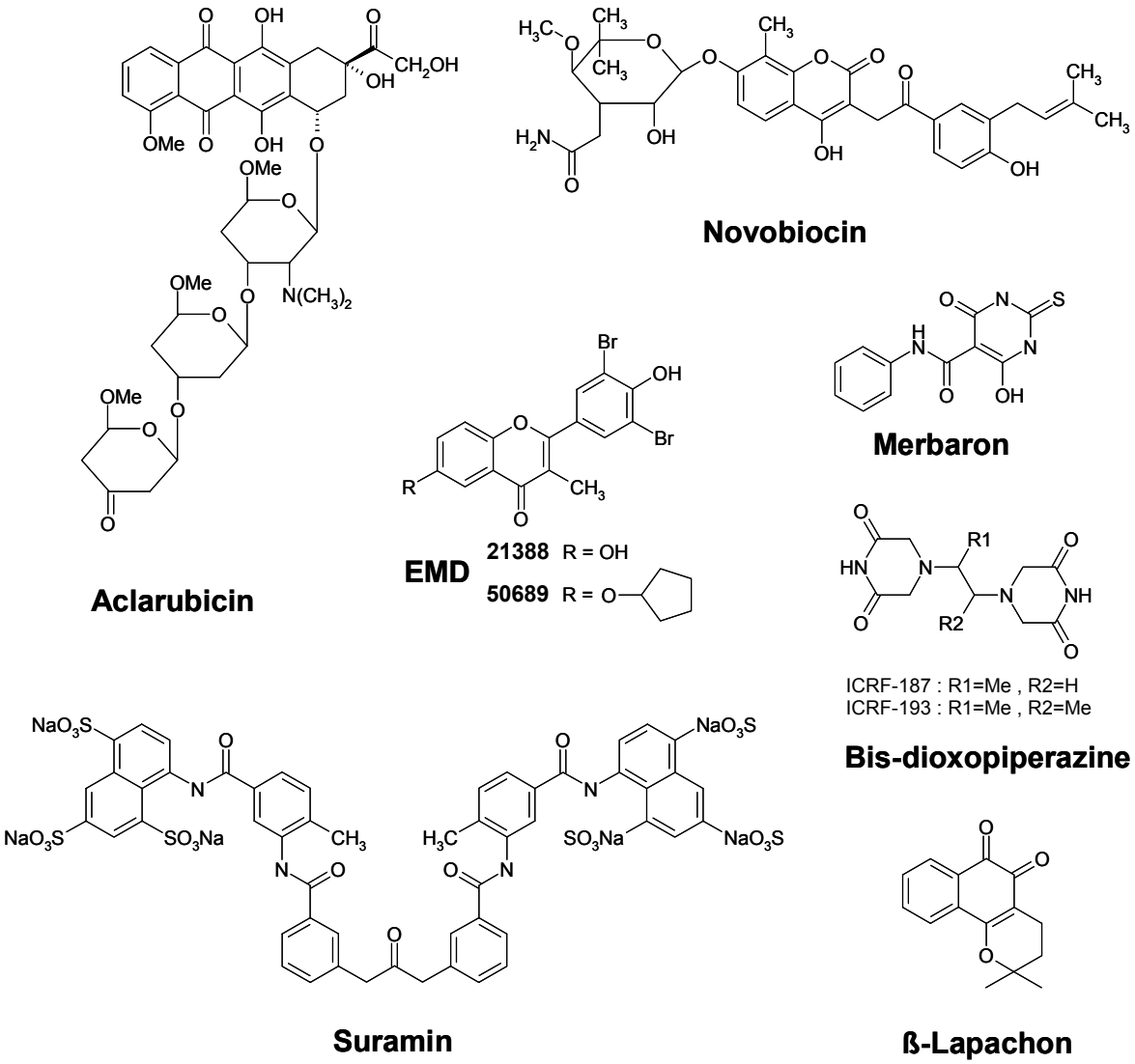


Abb. 15: Strukturen einiger katalytischer Topoisomeraseinhibitoren.

Die katalytischen Inhibitoren sind eine heterogene Gruppe von Substanzen, die nicht nur aufgrund ihrer antineoplastischen Eigenschaften (Aclarubicin), sondern beispielsweise auch als Kardioprotektoren (ICRF-187) eingesetzt werden. Einige Substanzen (Suramin, Novobiocin) werden auch als Modulatoren eingesetzt, da sie in der Lage sind, die Effizienz anderer Verbindungen zu steigern. Hierzu untersucht man, ob niedrige, nichttoxische Dosen Suramin eingesetzt werden können um zu verhindern, dass Wachstumsfaktoren (insulin-like growth factor, basic fibroblast growth factor) an Rezeptoren binden und somit die Ausbildung von Resistenzen gegen Chemotherapeutika auslösen. Novobiocin kann u. a. die zytotoxische Wirkung der Topoisomerasegifte Etoposid und Teniposid verstärken, indem es deren Transport aus der Zelle herabsetzt, was letztendlich zu einer erhöhten intrazellulären Konzentration des Topoisomerasegiftes führt [Larsen et al. 2003].

2.2.3.2 Topoisomerasegifte

Topoisomerasegifte unterscheiden sich dadurch von den katalytischen Inhibitoren, dass sie das kovalente Enzym-DNA-Intermediat (Cleavable Complex) im Zustand des DNA-Strangbruches stabilisieren. Die eingeführten Strangbrüche sind notwendig für die katalytische Aktivität des Enzyms, aber auch für die Zelle potentiell gefährlich, was in der Literatur manchmal mit einem Dr. Jekyll / Mr. Hide-Charakter des Enzyms verglichen wird [Corbett und Osheroff 1993, Froelich-Ammon und Osheroff 1995, Burden und Osheroff 1998, Larsen und Gobert 1999].

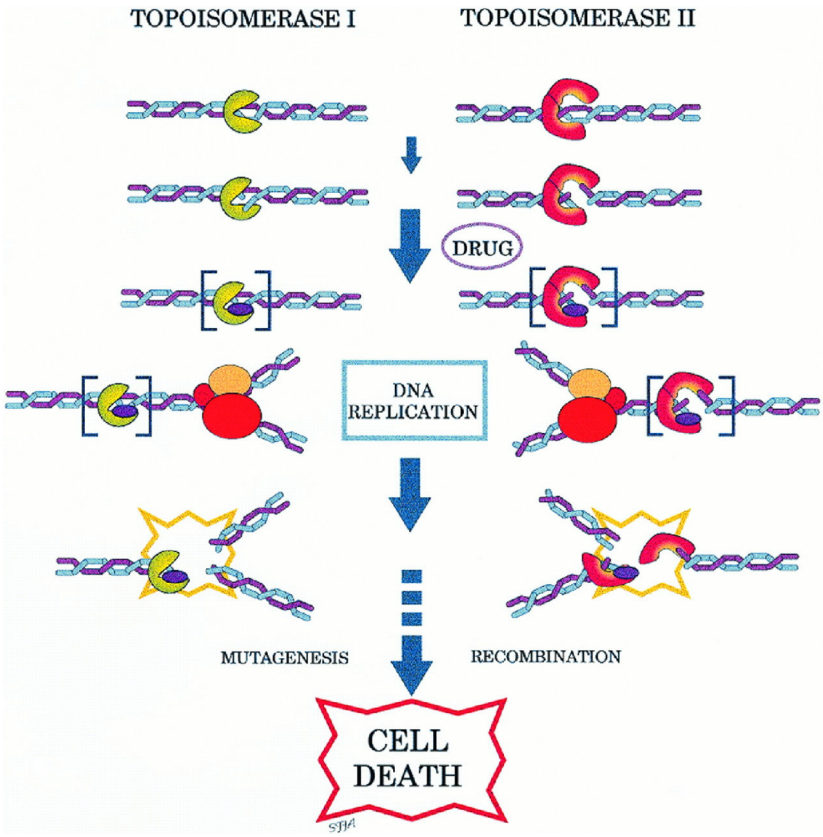


Abb. 16: Mechanismus der Zytotoxizität von Topoisomerasegiften [Froelich-Ammon und Osheroff 1995].

In Normalfall bildet die Topoisomerase einen transienten, kurzlebigen, reversiblen Protein-DNA-Komplex als Zwischenschritt im katalytischen Zyklus aus. Infolgedessen findet man in der Zelle einen normalen „steady-state"-Gehalt dieser Komplexe. Wird nun dieser Komplex durch ein Topoisomerasegift stabilisiert, bzw. die Halbwertszeit verlängert, verwandelt man die Topoisomerase in ein zelluläres Toxin. Infolge dessen kann es, beispielsweise durch Kollision der Replikationsapparatur mit diesen Blockaden aus kovalenten DNA-Protein-

Komplexen, zu DNA-Schäden kommen (siehe Abb. 16). Da der schädigende Prozess des Hemmstoff-stabilisierten DNA-Topoisomerase-Intermediates durch DNA-Replikation oder Transkription verstärkt wird, besitzt eine Verbindung, die einen Strangbruch in der Nachbarschaft von Replikationsstellen oder Genen mit hoher Transkriptionsaktivität bewirkt ein größeres zytotoxisches Potential als Verbindungen, die einen Strangbruch an einer weniger aktiven Stelle im Genom induzieren [Corbett und Osheroff 1993, Froelich-Ammon und Osheroff 1995, Wu und Liu 1997, Burden und Osheroff 1998, Errington et al. 2004].
Für die Bildung dieser ternären Enzym-DNA-Substanz-Komplexe gibt es 3, in der Literatur belegte, mögliche Bildungswege, die in Abb. 17 gezeigt sind.

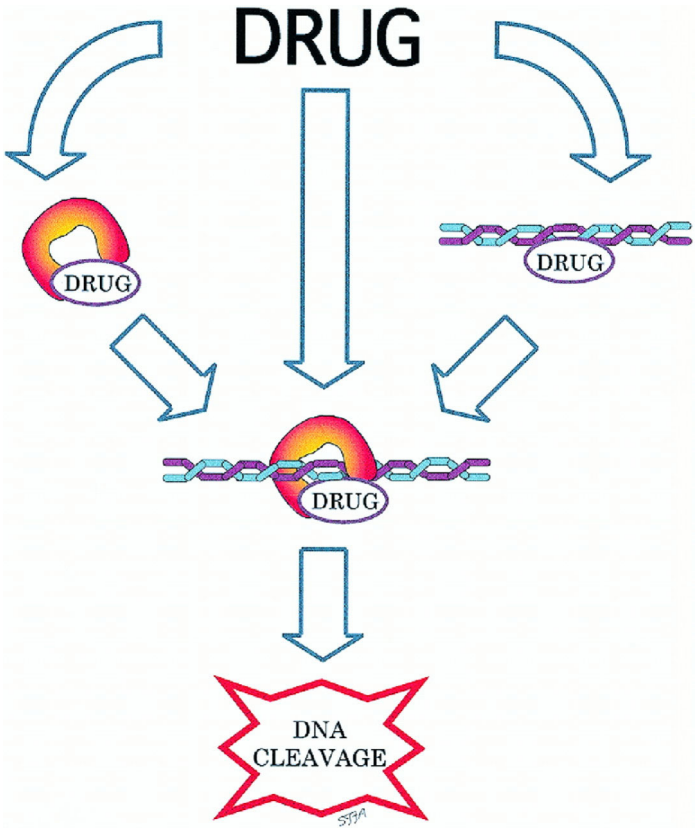


Abb. 17: Bildungswege ternärer Topoisomerase-DNA-Substanz-Komplexe [Froelich-Ammon und Osheroff 1995].

Beim ersten möglichen Bildungsweg bindet die Substanz spezifisch an den Topoisomerase-DNA-Komplex, mit minimaler individueller Interaktion an dem Enzym oder der DNA. Dieser Weg würde in Abb. 17 dem mittleren Weg entsprechen. Hinweise dafür zeigten beispielsweise Bindungsstudien von Camptothecin an eukaryontischer Topoisomerase I. Die zweite Möglichkeit von Substanzen Teil des ternären Komplexes zu werden besteht darin, zuerst mit der DNA zu interagieren (Abb. 17, rechter Weg). Unterstützt wird diese Theorie,

da einige Topoisomerase-zielende Verbindungen an Nukleinsäuren binden. Dabei kann man sich vorstellen, dass die DNA sozusagen als Aufbewahrungsort für Topoisomerasegifte dient und es so zu einer lokalen Anreicherung der Topoisomerasegifte in der Enzymumgebung kommt. Bei der dritten Variante binden die Substanzen zuerst an das Zielenzym, bevor anschließend der ternäre Komplex gebildet wird (Abb. 17, linker Weg). Hinweise für diesen Bildungsweg liefern kinetische Studien und Bindungsstudien von Ellipticin (Abb. 18) sowie Etoposid [Ammon-Froelich und Osheroff 1995, Burden und Osheroff 1998].

Der Wirkmechanismus von Topoisomerasegiften beruht darauf, das Gleichgewicht zwischen DNA-Cleavage und –Religation zu stören, so dass es zu einem Anstieg von unverschlossenen Strangbrüchen kommt. Intensive Untersuchungen zu verschiedenen Topoisomerasegiften haben gezeigt, dass man hier zwei Wirkmechanismen der „Giftung“ hat. Zum einen gibt es Substanzen, die effektiv die Religation, also das Verschließen des Strangbruches, behindern. Hierzu gehören beispielsweise Teniposid oder Amsacrin (Abb. 18). Auf der anderen Seite gibt es eine zweite Klasse von Verbindungen, die die Religation unwesentlich beeinflussen, dafür aber die Bildungsrate von „Cleavage-Komplexen“ verstärken. Dieser Wirkmechanismus wird beispielsweise für Ellipticin, Quinolone (CP-115,953) oder Genistein (alle Abb. 18) vermutet [Burden und Osheroff 1998, Wilsterman und Osheroff 2003].

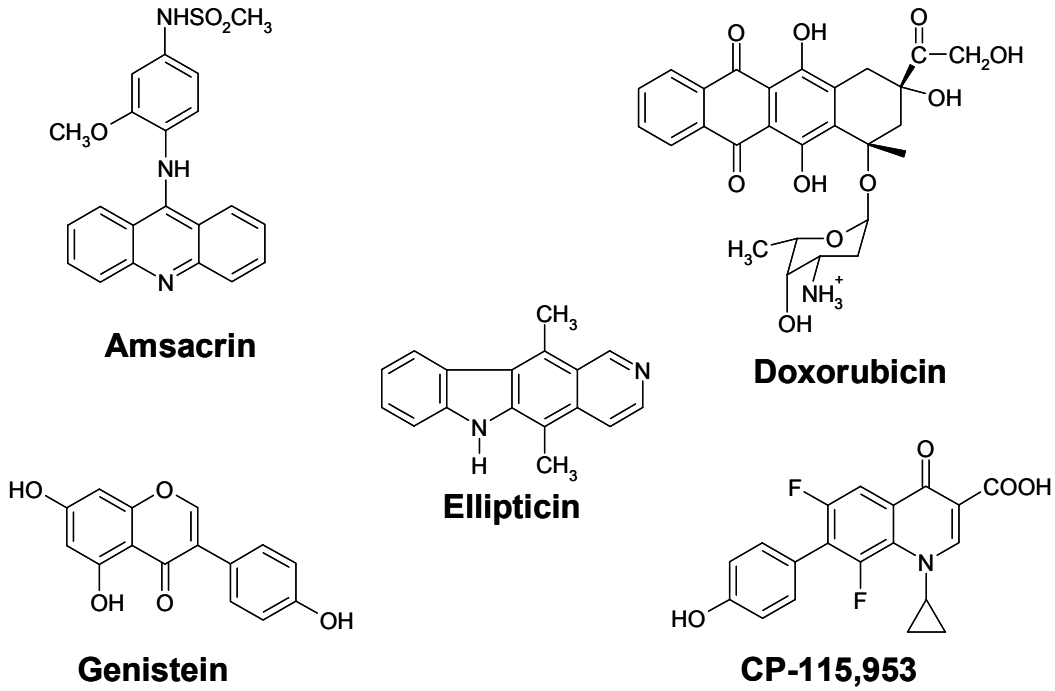


Abb. 18: Strukturen ausgewählter Topoisomerasegifte.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden als Referenz hauptsächlich das Topoisomerase I-Gift Camptothecin (Abb. 19) und das Topoisomerase II-Gift Etoposid (Abb. 20) verwendet, die in den nächsten Abschnitten eingehender vorgestellt werden.

Topoisomerase I-Gift Camptothecin

Topoisomerase I ist das spezifische Target einer Familie von chemischen Verbindungen die sich von dem natürlich vorkommenden Alkaloid Camptothecin ableiten. Camptothecin wurde in den 60er Jahren erstmals von Wall et al. [1966] aus der Rinde des chinesischen Baumes *Camptotheca acuminata* isoliert, dem in der traditionellen chinesischen Medizin Antitumoraktivität zugeschrieben wurde. Die Wirksamkeit von Camptothecin gegen Tumorzellen wurde im Rahmen eines Wirkstoff-Screenings des National Cancer Institutes (NCI) erstmals entdeckt. Derzeit werden 2 „first-generation"-Derivate, Hycamtin® (Topotecan) und Camptosar® (Irinotecan oder CPT-11) (Abb. 19), eingesetzt um Ovarial-, Kolon- und kleinzellige Lungenkarzinome zu behandeln. Neuere, „second-generation"-Derivate befinden sich derzeit in klinischen Studien [Bailly 2000, Oberlies und Kroll 2004, Pommier 2004].

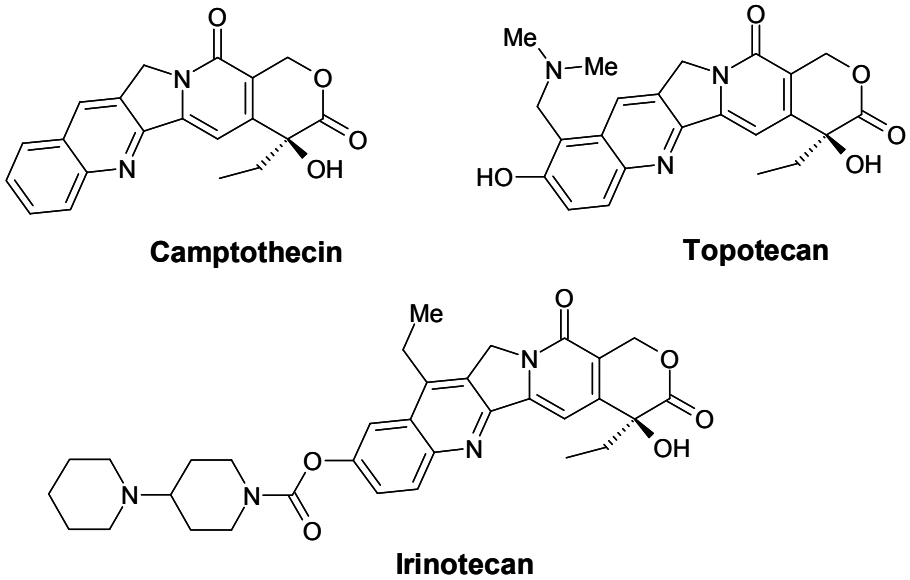


Abb. 19: Strukturformeln des Topoisomerase I-Giftes Camptothecin und davon abgeleiteter Derivate.

Der eigentliche Wirkmechanismus bzw. das zelluläre Target von Camptothecin war bis Mitte der 80er Jahre unbekannt. Erst Hsiang et al. [1985] konnten zeigen, dass Topoisomerase I das Ziel von Camptothecin ist. Der zytotoxische Effekt von Camptothecin basiert im

Wesentlichen auf seiner Interaktion mit der Topoisomerase I. Bereits geringfügige Mutationen im Enzym führen zu einer Resistenz von Zellen gegenüber dem Wirkstoff [Pommier et al. 1999, Chrencik et al. 2004]. Wie bereits erläutert, bindet Camptothecin spezifisch an den Topoisomerase-DNA-Komplex im Zustand des Strangbruches. Dabei schiebt sich der planare, aromatische Teil des Moleküls zwischen die DNA-Basenpaare, wohingegen der aus der großen Furche herausragende Teil des Moleküls ein Netzwerk möglicher Wasserstoffbrückenbindungen mit der Topoisomerase I eingeht, darunter die Aminosäuren Arg^{364}, Lys^{532} und Asn^{722}, wodurch der Verschluss des DNA-Strangbruches blockiert wird [Laco et al. 2002, Pommier 2004]. Diese stabilisierten Einzelstrangbrüche können durch Kollision mit der Transkriptions- oder Replikationsapparatur in DNA-Doppelstrangbrüche verwandelt werden. In Zellen führt die Anhäufung nicht reparierter Doppelstrangbrüche letztendlich zum Zelltod durch Nekrose oder Apoptose [Froelich-Ammon und Osheroff 1995, Sordet et al. 2003]. Derzeit befinden sich etwa ein Dutzend weitere Camptothecin-Analoge in der klinischen Entwicklung, um als Chemotherapeutika eingesetzt zu werden. Ein weiterer Ansatzpunkt für Modifikationen ist beispielsweise die Verknüpfung mit funktionellen Gruppen, die an die kleine Furche der DNA binden, um so eine erhöhte biologische Wirkung zu erzielen [Oberlies und Kroll 2003, Sukhanova et al. 2003].

Topoisomerase II-Gift Etoposid (VP-16)

In Studien in den 50er und 60er Jahren zeigte eine Reihe aldehydischer Kondensationsprodukte aus den Wurzeln von Pflanzen der *Podophyllum*-Familie Antitumoraktivität. Als Verbindungen mit der besten antineoplastischen Aktivität konnte 1966 die Epipodophyllotoxine Etoposid (VP-16) und 1967 Teniposid (VM-26) identifiziert werden (Abb. 20). Jedoch beeinflussten diese nicht den Spindelapparat der Zelle, wie ein Grossteil der Podophyllotoxine, die 9-Epimere der Epipodophyllotoxine [Gordaliza et al. 2000]. Erst 1984 wurde der Effekt von Etoposid auf die Topoisomerase II beschrieben. Somit war Etoposid die erste Substanz, für die gezeigt werden konnte, dass ihre Antitumoraktivität auf Hemmung der Topoisomerase II zurückzuführen ist [Hande 1998].

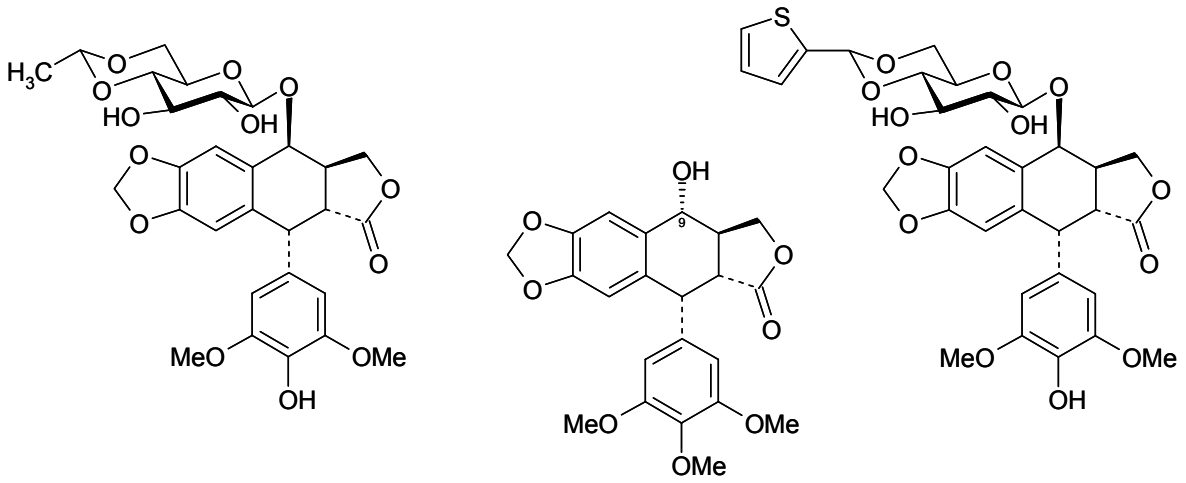


Abb. 20: Strukturformeln von Podophyllotoxin sowie der Epipodophyllotoxine Etoposid und Teniposid.

Etoposid wird zur Behandlung einer Vielzahl von Tumoren, wie beispielsweise Lungenkrebs, Weichgewebssarkomen, Leukämien und Neuroblastomen eingesetzt. Des Weiteren spielt es eine wichtige Rolle in der vorausgehenden Behandlung von Knochenmarktransplantationen. Wie bereits beschrieben stellt Etoposid ein Topoisomerase II-Gift dar. Es stabilisiert den kovalenten Topoisomerase-DNA-Komplex, indem es den Verschluss des Strangbruches verhindert und somit das Gleichgewicht zwischen offener und geschlossener DNA verschiebt. Aufgrund kinetischer Studien vermutet man, dass Etoposid hauptsächlich zuerst an das Enzym bindet bevor die Ausbildung des Komplexes erfolgt (siehe Abb. 21, linker Reaktionsweg). Auch wenn Etoposid an die DNA binden kann, so ist dieser Reaktionsweg (Abb. 21, rechte Seite) eher von untergeordneter Bedeutung [Burden et al. 1996].

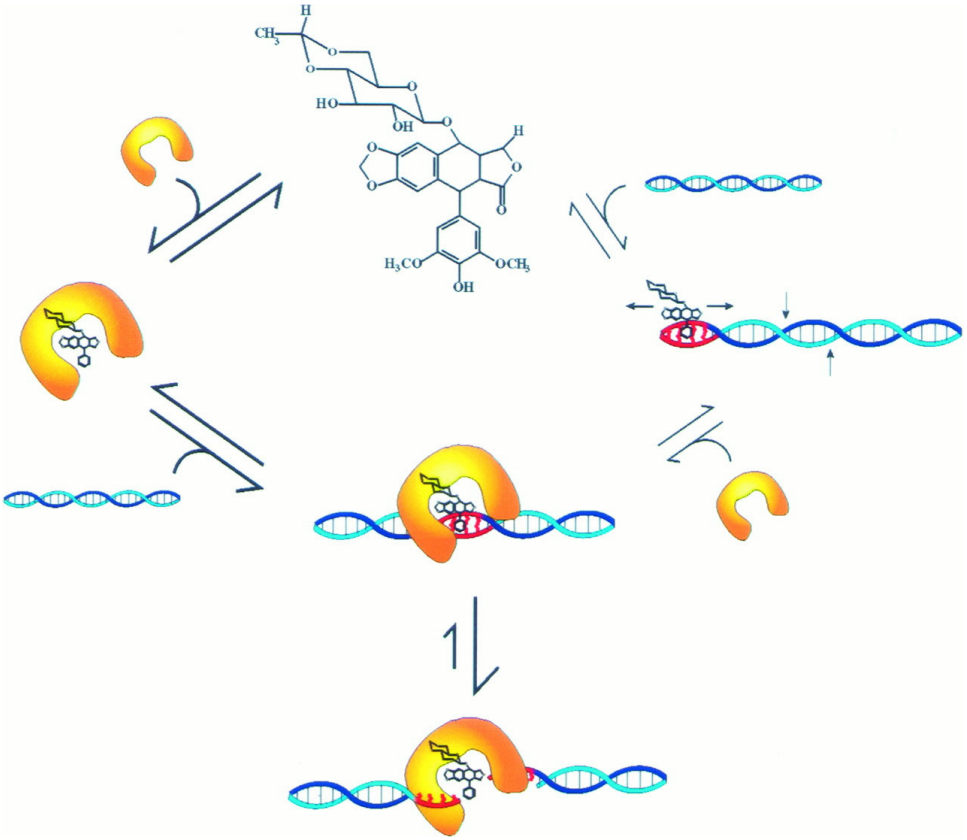


Abb. 21: Reaktionsweg der Etoposid-vermittelten Stabilisierung des Topoisomerase II-DNA-Komplexes [Burden et al. 1996].

Trotz des hohen Stellenwertes von Etoposid (und Teniposid) in der Krebs-Chemotherapie gibt es einige Untersuchungen die zeigen, dass die Behandlung mit Topoisomerase II-Giften zu chromosomalen Translokationen führen kann, beispielsweise im „myeloid-lymphoid leukemia“ Gen (MLL-Gen) auf Chromosom 11q23. Diese Translokation im MLL-Onkogen kann möglicherweise zur Entwicklung therapiebedingter Sekundärerkrankungen wie z.B. akuter myeloischer Leukämie (AML) führen. Solche akute nicht-lymphatische Leukämien treten etwa 1 bis 5 Jahre nach Behandlung mit Etoposid oder Teniposid auf. Nach einer erfolgreichen Chemotherapie liegt das 6-Jahres-Risiko eine Leukämie zu entwickeln bei etwa 3% [Felix 1998, Hande 1998, Wilstermann und Osheroff 2003]. In etwa 80% der Fälle von frühkindlicher Leukämie, treten ebenfalls Translokationen im MLL-Gen auf Chromosom 11q23 auf, obwohl die betroffenen Kinder nicht mit Topoisomerase II-Giften behandelt wurden. In epidemiologischen Studien fanden Ross et al. [1996] eine signifikante Assoziation zwischen dem Auftreten frühkindlicher akuter myeloischer Leukämie (AML) und einer erhöhten maternalen Exposition mit Topoisomerase II-Giften aus der Nahrung während der Schwangerschaft. Dies führte zu der Hypothese, dass eine maternale Exposition mit Topoisomerase II-Giften aus der Nahrung, z.B. Genistein oder Quercetin, in der

Schwangerschaft zu einer erhöhten *in utero* Exposition führt, welche die Entwicklung von frühkindlicher AML verursacht. Gestützt wird diese These durch Untersuchungen von Strick et al. [2000]. Die Autoren konnten zeigen, dass Flavonoide wie z.B. Luteolin, Quercetin oder Genistein eine Spaltung im MLL-Gen sowohl in hämatopoetischen Primärzellen als auch in Zelllinien bewirken. Die Spaltstellen nach Behandlung mit Quercetin oder Etoposid waren in der gleichen Region lokalisiert und nur um 4 Basenpaare versetzt. Eine Kombination von je 10 µM Quercetin, Fisetin und Genistein zeigte sich dabei als ebenso effektiv wie 25 µM Etoposid [Ross et al. 1996, Ross 2000, Strick et al. 2000].

Die Fähigkeit von Topoisomerase II-Giften Krebs zu heilen, statt zu erzeugen, ist eng mit der Menge an Topoisomerase II-vermittelten DNA-Strangbrüchen in einer Zelle verknüpft. Wenn die Konzentration der Enzym-vermittelten Strangbrüche hoch ist, können Rekombinations-Reparatur-Mechanismen überlastet werden und die Zelle geht in die Apoptose [Wilstermann und Osheroff 2003]. Jedoch können, wenn der Gehalt an Strangbrüchen nicht ausreicht den Zelltod herbeizuführen, Überlebens- und Reparaturmechanismen möglicherweise zu chromosomalen Translokationen führen, die letztendlich Krebsentstehung vorantreiben können [Wilstermann und Osheroff 2003].

2.2.3.3 DNA-Interkalatoren und Liganden der kleinen Furche

Eine weitere Klasse von Substanzen mit einem breiten Spektrum antiviraler-, antibakterieller- und antitumor-Aktivität stellen die DNA-Interkalatoren und Verbindungen, die sich als Ligand an die kleine Furche der DNA anlagern können dar. Substanzen mit vollständig oder auch teilweise planarer Struktur, die sich zwischen benachbarte Basenpaare schieben können, bezeichnet man als Interkalatoren (lat.: intercalare = einschieben). Andere Substanzen wiederum sind in der Lage, als Ligand an die kleine Furche der DNA zu binden (minor groove binder).
Die doppelhelikale Struktur der DNA weist zwei verschiedene Arten von Furchen auf, die dadurch entstehen, dass sich die glykosidischen Bindungen eines Basenpaares nicht diametral gegenüberstehen (Abb. 22). Die große Furche besitzt eine Breite von 1,2 nm und ist 0,85 nm tief, die kleine Furche dagegen ist 0,6 nm breit und 0,75 nm tief [Berg et al. 2003].

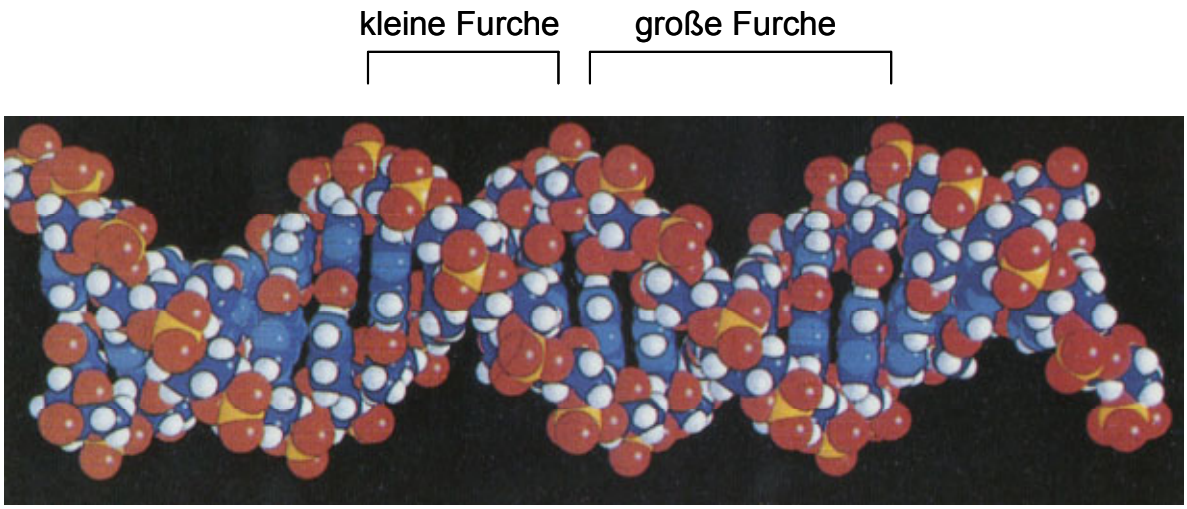


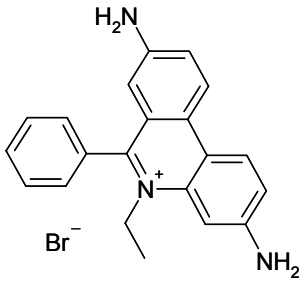
Abb. 22: Kalottenmodell eines DNA-Stückes mit großer und kleiner Furche [modifiziert nach Alberts et al. 2003].

Einige DNA-Interkalatoren und Substanzen, die an die kleine Furche der DNA binden können, sind in der Lage, Topoisomerasen zu hemmen und stellen effektive Hemmstoffe des Tumorzellwachstums dar [Tewey et al. 1984, Chen et al. 1993, Bell et al. 1997, Bailly 2000, Baraldi et al. 2004].

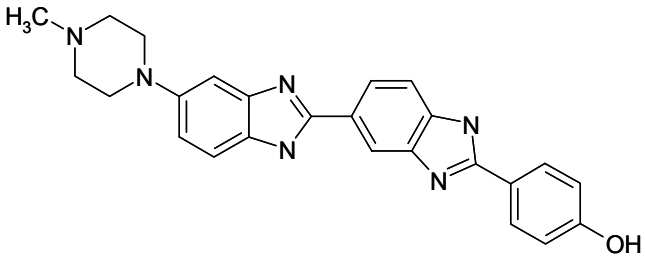
Ein bekannter DNA-Interkalator ist Ethidiumbromid (Abb. 23), welches sich zwischen die gestapelten Basenpaare der DNA, bevorzugt in G/C-reichen Regionen, schieben kann und aufgrund seiner fluoreszierenden Eigenschaften als Nachweis für Duplex-DNA eingesetzt wird. Aufgrund dieser Eigenschaft entwickelte Morgan et al. [1979] einen Assay zur Bestimmung der Interkalation einer Substanz, bezogen auf die Verdrängung von Ethidiumbromid aus der DNA, welcher in Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendet und modifiziert wurde. Als Referenz zur Etablierung des Assays diente Actinomycin D (Abb. 23), ein Polypeptid-Antibiotikum mit teilplanarer Struktur, von der man annimmt, dass die Interkalation zu einem Verbiegen der DNA führt und die Interaktion mit der Topoisomerase I in einer Stabilisierung des Cleavable Komplexes resultiert [Bailly 2000].

Die kleine Furche der DNA bietet eine Reihe von Möglichkeiten zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen mit Hilfe derer sich ein Ligand dort anlagern kann. Für den Bisbenzimidazol-Fluoreszenzfarbstoff Hoechst 33258 (Abb. 23) konnte gezeigt werden, dass er sich spezifisch an die kleine Furche der DNA anlagert, mit einer speziellen Affinität für A/T-reiche Regionen. Das Vermögen einer Substanz an die kleine Furche der DNA zu binden wurde im Rahmen dieser Arbeit durch Verdrängung des Hoechst 33258-Farbstoffes, was mit einer Fluoreszenzminderung einhergeht, bestimmt. Als Referenz zur Etablierung wurde

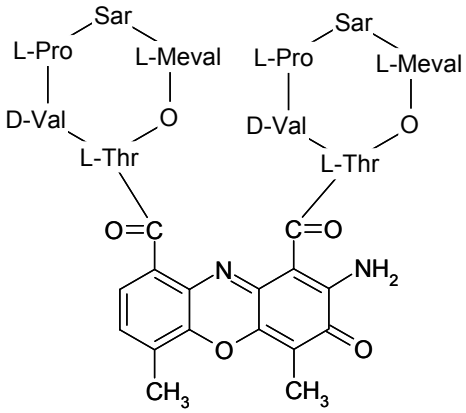
Netropsin (Abb. 23) verwendet. Bei Netropsin, ebenfalls ein Ligand der kleinen Furche, konnte gezeigt werden, dass es sich an einer sehr schmalen AATT-Bindungsstelle der kleinen Furche anlagert, wodurch ein guter van der Waals-Kontakt zwischen der Ober- und Unterseite des Liganden und der DNA-Furche möglich ist. Nicht alle Substanzen, die an die kleine Furche binden, stabilisieren auch den Komplex zwischen Topoisomerase und DNA. Es wird angenommen, dass einige dieser Substanzen durch die Bindung an die kleine Furche diese Stellen blockieren und die Topoisomerase I dazu zwingt an ligandfreien Regionen zu wirken. Es ist daher nicht sicher, ob eine Bindung an die kleine Furche per se eine Erhöhung der Rate von DNA-Brüchen verursacht [Chen et al. 1993, Bailly 2000].



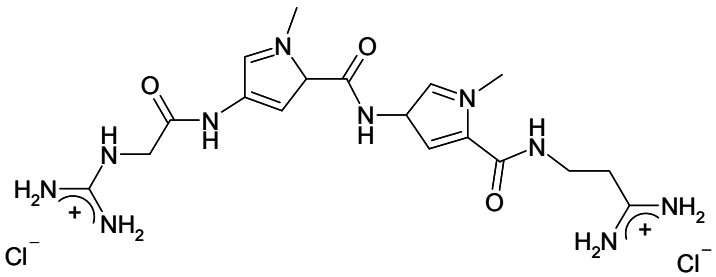
Ethidiumbromid



Hoechst 33258



Actinomycin D



Netropsin

Abb. 23: Strukturformeln der DNA-Interkalatoren Ethidiumbromid und Actinomycin D, sowie der DNA-Minor Groove Binder Hoechst 33258 und Netropsin. L-Pro: L-Prolin, D-Val: D-Valin, L-Thr: L-Threonin, L-Meval: L-Methylvalin, Sar: Sarcosin.

2.3 Tyrosyl-DNA-Phosphodiesterase 1 (TDP1)

Der kovalente Komplex zwischen Topoisomerase und DNA ist ein transientes Zwischenprodukt im katalytischen Zyklus des Enzyms. Unter bestimmten Umständen kann dieser Komplex in ein langlebiges Intermediat umgewandelt werden, welches zu DNA-Strangbrüchen und zum Zelltod führen kann. Ausgelöst wird dies z.B. durch Topoisomerasegifte oder Modifikationen der DNA-Struktur wie Basenfehlpaarungen, DNA-Einzelstrangbrüche („nicks“) und DNA-Addukte [Yang et al. 1996, Debéthune et al. 2002]. Ein eukaryontisches Enzym, welches kovalente Komplexe zwischen DNA und Typ I Topoisomerasen lösen kann, wurde erstmals von Yang et al. [1996] beschrieben. Dieses Enzym, die Tyrosyl-DNA-Phosphodiesterase 1 (TDP1), hydrolysiert die 3’-Tyrosin-DNA-Phosphodiesterbindung und generiert so eine freie DNA mit einer Phosphatgruppe in 3’-Position. Dabei kommt es auch hier, ähnlich wie bei den Topoisomerasen, zur Ausbildung eines kovalenten Enzym-DNA-Intermediates [Interthal et al. 2001].

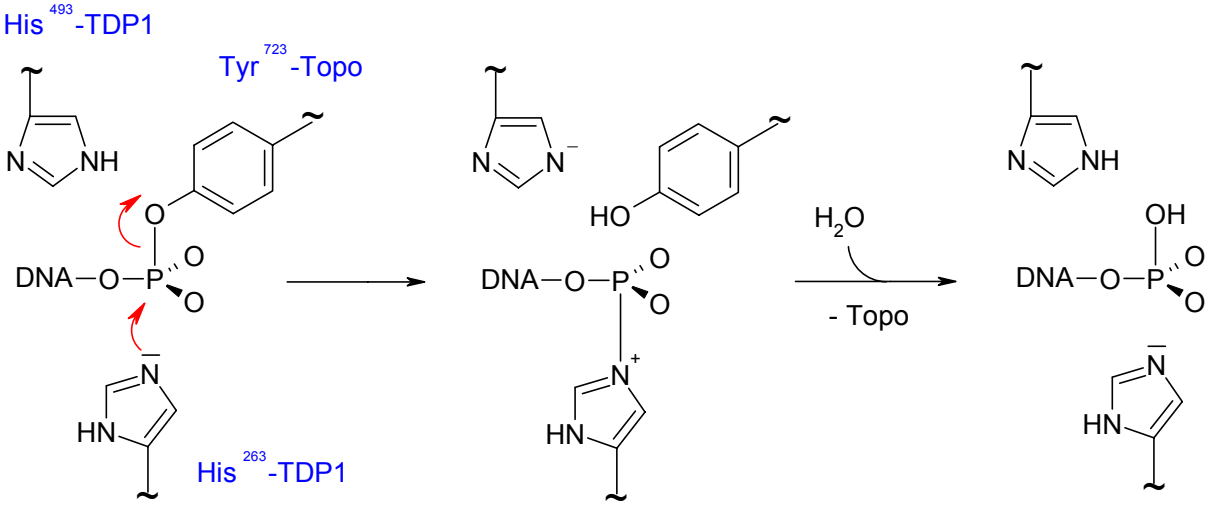


Abb. 24: Reaktionsmechanismus der TDP1 mit den katalytischen His^{263} und His^{493}. Tyr^{723} ist das katalytische Zentrum der Topoisomerase I [modifiziert nach Raymond et al. 2004].

Basierend auf Sequenzanalysen und Mutationsexperimenten mit dem aktiven Zentrum des Enzyms, konnte gezeigt werden, dass die TDP1 zur Superfamilie der Phospholipase D zu zählen ist. In dieser Enzymfamilie findet man eine hochkonservierte Sequenz von Aminosäuren $HXK(X)_4D$ (H=Histidin, K=Lysin, D=Asparagin, X=beliebige Aminosäure), das so genannte HKD-Motiv. Die humane TDP1 besitzt zwei HKD-Sequenzen, His^{263}/Lys^{265} und His^{493}/Lys^{495}, wobei das Asparagin über verschiedene Spezies nicht hoch konserviert ist. Dies führt dazu, dass die TDP1 eine eigene Subfamilie in der Phospholipase D-Superfamilie

bildet. Mittels Kristallstrukturuntersuchungen konnte bestätigt werden, dass das His^{263} das reaktive Zentrum des Enzyms darstellt, welches die kovalente Bindung zur DNA eingeht. Beide HKD-Motive sind für den zweistufigen Reaktionsmechanismus (Abb. 24) essentiell. Der erste Schritt im Reaktionsmechanismus ist eine Transesterreaktion, bei der ein nukleophiler Angriff des His^{263} an der Tyrosin-DNA-Phosphodiesterbindung stattfindet. Dadurch wird die Topoisomerase von der DNA losgelöst und die TDP1 bindet kovalent an das 3'-Ende der DNA. Gleichzeitig funktioniert das His^{493} als Säure und protoniert das Phenoxyanion des losgelösten Tyrosins der Topoisomerase. Der zweite Schritt ist die Hydrolyse des Phosphohistidin-Intermediates, wobei man vermutet, dass das His^{493} nun als Base fungiert und das Wassermolekül für die Hydrolyse aktiviert. Die Aminosäuren Lys^{265}, Lys^{495}, Asn^{283} sowie Asn^{516} sind ebenfalls wichtig für Substratbindung und Stabilisierung der Zwischenprodukte der Reaktion [Interthal et al. 2001, Davies et al. 2002, Connelly und Leach 2003, Davies et al. 2004, Raymond et al. 2004].

Die TDP1 stellt somit ein zelluläres Reparaturenzym dar, welches kovalente Topoisomerase I-DNA-Intermediate repariert, indem es das Protein vom 3'-Ende der DNA löst. Da die Tyrosin-Phosphodiesterbindung tief in der Struktur der Topoisomerase I liegt, vermutet man, dass die Topoisomerase erst aufwendige strukturelle Umformungen (z.B. Proteolyse oder Entfaltung) unterzogen werden muss, bevor die Bindung angegriffen werden kann. Wie dies jedoch genau geschieht ist noch unklar. Die TDP1 entfernt das Topoisomerase-DNA Hindernis, generiert dabei aber einen offenen Einzelstrangbruch, der von der Zelle noch repariert werden muss. Plo et al. [2003] konnten zeigen, dass die TDP1 funktionell mit Proteinen des XRCC1-assoziierten Reparaturkomplexes interagiert. Dabei stellt man sich vor, dass die TDP1 ein Nukleotid mit einem Phosphat in 3'-Position generiert, die Polynukleotid Kinase Phosphatase (PNKP) das 3'-Ende dephosphoryliert und das 5'-Ende phosphoryliert. Reparaturpolymerasen und Ligasen können dann den Strangbruch wieder verschließen. Es ist vorstellbar, dass dies ein möglicher Resistenzmechanismus von Tumorzellen gegenüber Topoisomerase I-Giften darstellt. Die TDP1 stellt somit möglicherweise ein neues potentielles Target für die Entwicklung von Chemotherapeutika dar [Liu et al. 2002, Plo et al. 2003, Liu et al. 2004, Connelly und Leach 2004].

2.4 Flavonoide

Flavonoide sind sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe die weit verbreitet sind in Lebensmitteln pflanzlicher Herkunft wie Früchte und Gemüse. Sie sind die in der Nahrung am häufigsten vorkommenden Polyphenole und werden von Pflanzen beispielsweise zum Schutz vor UV-Strahlung oder zur Abwehr gegen Erreger gebildet [Manach et al. 2004]. Derzeit sind schätzungsweise etwa 9000 verschiedene Flavonoide bekannt, wobei allein in den Jahren 2001 bis 2003 mehr als 450 neue Flavonoide in der Literatur beschrieben wurden [Williams und Grayer 2004]. Allen Flavonoiden ist die Grundstruktur des Flavans, mit 2 aromatischen Ringen (A und B) und einem an den A-Ring kondensierten O-heterozyklischen Ring (C), gemeinsam. Aufgrund des Oxidationsgrades im Pyranring (C-Ring) unterscheidet man folgende Hauptgruppen, die in Abb. 25 dargestellt sind:

- Flavanone, mit einer Oxo-Gruppe in 4-Position,
- Flavone, mit einer Oxo-Gruppe in 4-Position und einer Doppelbindung zwischen C2 und C3,
- Flavonole (3-Hydroxyflavon), mit einer Oxo-Gruppe in 4-Position, einer Doppelbindung zwischen C2 und C3, sowie einer Hydroxygruppe in 3-Position,
- Flavanole (Catechine), mit einer Hydroxygruppe in 3-Position,
- Isoflavone, mit einer Oxo-Gruppe in 4-Position und einer Doppelbindung zwischen C2 und C3, jedoch befindet sich der B-Ring hier in 3-Position,
- Anthocyane, mit einem aromatischen C-Ring und positiv geladenem Sauerstoff, sowie einer Hydroxygruppe in 3-Position.

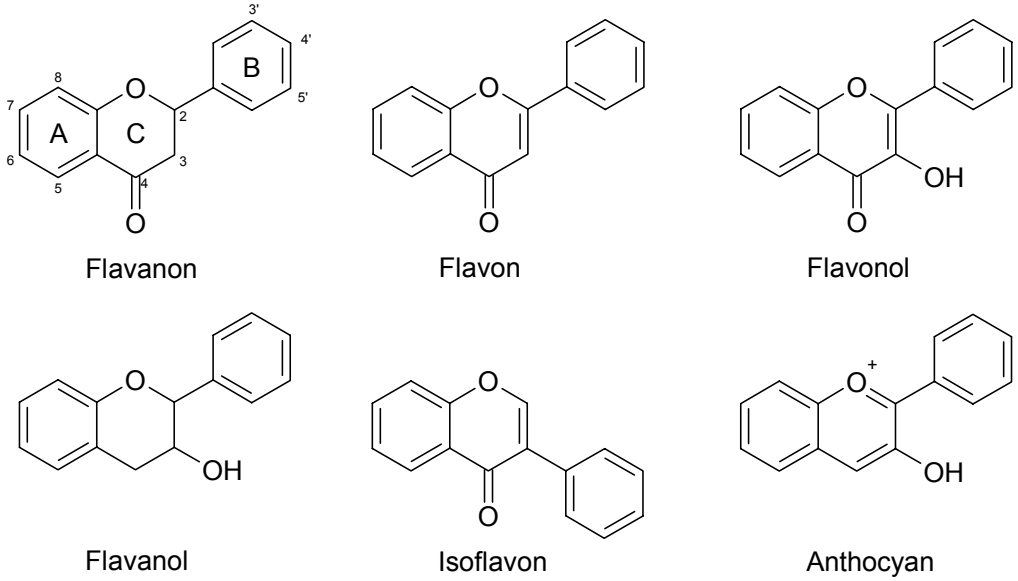


Abb. 25: Grundstrukturen der verschiedenen Flavonoidklassen.

Die meisten Flavonoide kommen in der Natur nicht frei, also so genanntes Aglykon, sondern als Glykoside, d.h. an Zucker gebunden, vor. Lediglich die Flavanole stellen eine Ausnahme dar. Mehr als 80 verschiedene Zucker sind bisher in Flavonoidglykosiden nachgewiesen worden. Zudem können diese auch noch mit verschiedenen organischen Säuren verestert sein, was zu der enormen Vielfalt an Flavonoiden beiträgt [Watzl und Rechkemmer 2001, Manach et al. 2004].

Gestützt durch epidemiologische Studien sind Flavonoide als bedeutende Verbindungsklasse in Früchten und Gemüse in Zusammenhang mit positiven ernährungsphysiologischen Eigenschaften gebracht worden. So sollen Flavonoide durch ihre antioxidative, antikanzerogene, antivirale, antiatherogene, antiallergene, antiinflammatorische und immunstimulierende Eigenschaften eine protektive Wirkung besitzen. Des Weiteren können eine Vielzahl von Flavonoiden die Aktivität unterschiedlichster Enzyme oder Zellrezeptoren modulieren. Jedoch ist bisher nicht genau geklärt, welche Verbindungen, oder Kombination von Substanzen aus Früchten und Gemüse, protektiv wirken. Ebenso wenig ist der Wirkmechanismus vollständig aufgeklärt [Depeint et al. 2002, Duthie et al. 2003, Manach et al. 2004, Galati und O'Brien 2004].
Untersuchungen bzw. Abschätzungen zur täglichen Aufnahme von Flavonoiden mit der Nahrung gestalten sich schwierig. Flavonoide kommen in vielen Lebensmitteln vor, jedoch kann sich die Flavonoidzusammensetzung stark unterscheiden. So beinhaltet bereits eine Tasse schwarzer Tee (100 ml) etwa 65 mg Flavonoide, hauptsächlich Catechine, wohingegen in Sojaprodukten, wie z.B. Tofu, etwa 36 mg Isoflavone pro 100 g vorkommen. Dies führt zu individuellen, ernährungsbedingten starken Schwankungen. Für die Niederlande wurde mit einer Schwankungsbreite von 0 bis 120 mg/Tag die tägliche Flavonol- und Flavonaufnahme von 23 mg/Person berechnet. In Deutschland betrug in einem bayerischen Teilkollektiv die Aufnahme an Flavonoiden insgesamt 54 mg/Tag, mit einer Schwankungsbreite von 7 bis 202 mg [Wiseman et al. 2001, Watzl und Rechkemmer 2001, Kulling und Watzl 2003, Manach et al. 2004].

Sowohl im Rahmen von Untersuchungen aus unserem Arbeitskreis [Fritz 2004], als auch aus der Literatur ist bekannt, dass einige Substanzen aus verschiedenen Flavonoidklassen Topoisomerasen beeinflussen. Im nachfolgenden Abschnitt soll kurz die Hemmung von Topoisomerasen durch Flavonoide vorgestellt werden. Davon ausgenommen ist die Klasse

der Anthocyane die Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist und in Kap 2.5 eingehender vorgestellt wird.

2.4.1 Flavonoide als Hemmstoffe von Topoisomerasen

Okura et al. [1988] berichteten erstmals, das Genistein ein Hemmstoff von Topoisomerasen darstellt. Dies war der erste Bericht über eine topoisomerasehemmende Verbindung aus der Klasse der Flavonoide. Seitdem wurden einige Studien zur Beeinflussung von Topoisomerasen durch Flavonoide veröffentlicht. Aufgrund der Vielzahl von Verbindungen soll aus jeder Klasse nur eine Verbindung kurz exemplarisch vorgestellt werden, die in Abb. 26 dargestellt sind.

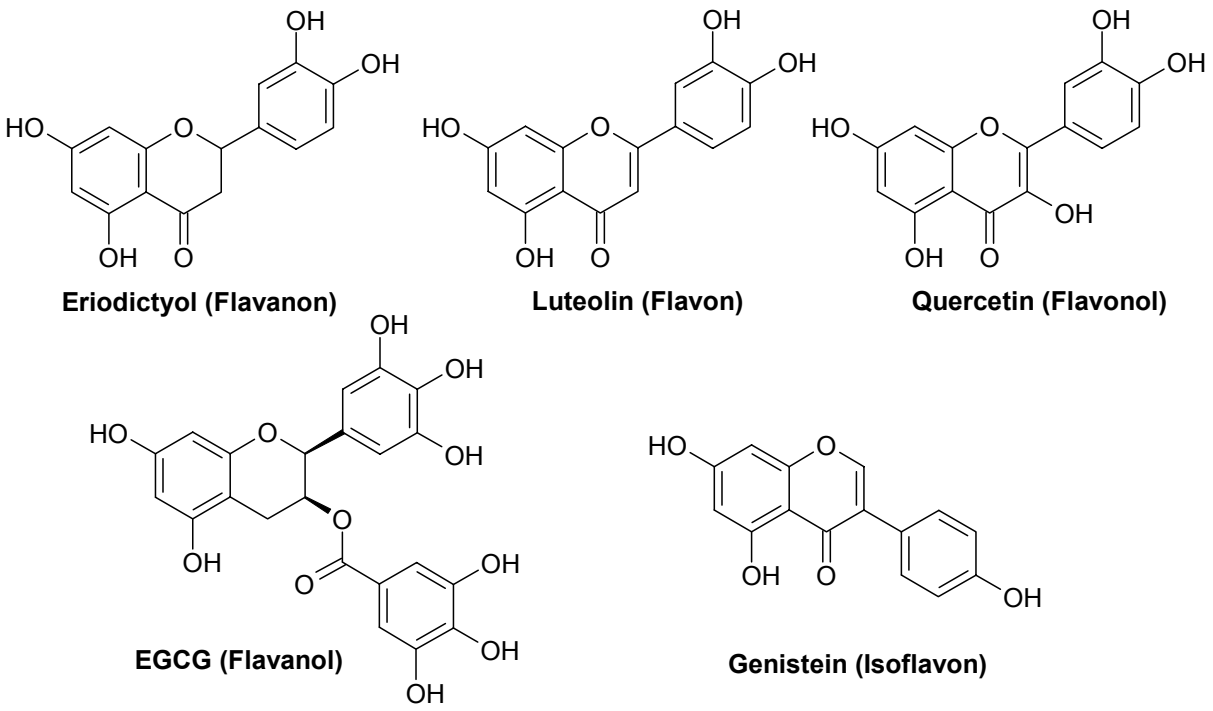


Abb. 26: Als Topoisomerasehemmstoffe beschriebene Flavonoide. EGCG: (-)-Epigallocatechin-3-gallat.

Flavanone

Bislang gibt es nur wenige Daten zur Wirkung von Flavanonen auf Topoisomerasen. Betrachtet man sich die verfügbare Literatur, kann man daraus folgern, dass die bisher untersuchten Flavanone, im Vergleich mit den anderen Flavonoidklassen, wahrscheinlich die geringste Wirkung an Topoisomerasen besitzen. Lediglich für 3 Flavanone, darunter auch das

Eriodictyol (5,7,3',4'-Tetrahydroxyflavanon), welches man beispielsweise in Zitronen findet, ist eine leichte Erhöhung von Topoisomerase II-vermittelten DNA-Strangbrüchen beschrieben [Austin et al. 1992, Manach et al. 2004].

Flavone

Die bislang effektivste Verbindung aus der Klasse der Flavone ist das Luteolin (5,7,3'4'-Tetrahydroxyflavon), das man im Färberwau oder in den Blüten des gelben Fingerhutes findet [Römpp 2005]. Luteolin zeigt eine komplette Hemmung eukaryontischer Topoisomerase I ab einer Konzentration von 40 µM, wobei der IC_{50} hier bei etwa 5 µM liegt. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Luteolin den kovalenten DNA-Topoisomerase Komplex stabilisiert, also ein Topoisomerasegift darstellt und in doppelsträngige DNA interkalieren kann [Mittra et al. 2000, Chowdhury et al. 2002, Webb und Ebeler 2004].

Mehrere Gruppen zeigten unabhängig voneinander, und mit verschiedenen Methoden, dass Luteolin auch ein potentes Topoisomerase II-Gift darstellt, wobei das Enzym ab etwa 30 µM komplett gehemmt ist [Austin et al. 1992, Mittra et al. 2000, Yamashita und Kawanishi 2000]. Untersuchungen im Arbeitskreis haben gezeigt, das beispielsweise auch das Flavon Baicalein (5,6,7-Trihydroxyflavon) ein potentes Topoisomerase I und II-Gift, mit einer signifikanten Hemmung der Enzyme ab 100 µM, darstellt [Niederberger 1998].

Flavonole

Eine der wahrscheinlich am besten untersuchten Substanzen ist Quercetin, das 3,5,7,3',4'-Pentahydroxyflavon. Auch mengenmäßig besitzt es die größte Bedeutung, da es in einer Vielzahl von Lebensmitteln vorkommt. So besitzen beispielsweise Zwiebeln, Grünkohl, Lauch, Äpfel, Trauben oder Paprika hohe Gehalte an Quercetin [Watzl und Rechkemmer 2001, Manach et al. 2004]. Erste Untersuchungen zur Beeinflussung von Topoisomerasen durch Quercetin wurden von Yamashita et al. (1990) veröffentlicht. Quercetin hemmt die Topoisomerase I, mit einem IC_{50}-Wert von 42 µM, und wirkt als Topoisomerasegift. Als ähnlich potent erwies sich auch das Myricetin, dass im Vergleich zu Quercetin noch eine zusätzliche Hydroxygruppe in 5'-Position trägt [Austin et al. 1992, Constantinou et al. 1995, Boege et al. 1996, Webb und Ebeler 2004].

Die Interaktion von Flavonolen mit der Topoisomerase II wurde über die letzten Jahre hinweg kontinuierlich untersucht. In der Gruppe der Flavonole ist Quercetin der potenteste Topoisomerase II-Hemmstoff und wirkt auch hier als Topoisomerasegift. IC_{50}-Hemmkonzentrationen für DNA-Entknotung oder –Dekatenierung reichen von 4 bis 23 µM

[Austin et al. 1992, Constantinou et al. 1995]. Aufgrund unterschiedlicher Untersuchungs- und Detektionsmethoden ist die Datenlage zur Wirkung von Quercetin jedoch sehr uneinheitlich. So sind auch höhere IC_{50}-Werte wie z.B. 40 µM [Robinson et al. 1993], 100 µM [Mittra et al. 2000, Yamashita und Kawanishi 2000] oder 90 µM [Ramirez-Mares et al. 2004] zu finden.

Flavanole (Catechine)

Der potenteste Topoisomerase-Hemmstoff unter den Flavanolen ist das Epigallocatechin-3-gallat (EGCG), welches man beispielsweise in hohen Mengen im grünen und schwarzen Tee findet [Römpp 2005]. Das Epicatechin-3-gallat (ECG), welches nur 2 Hydroxygruppen im B-Ring besitzt, zeigt sich in der Wirkung an der Topoisomerase als ähnlich potent wie EGCG. EGCG hemmt Topoisomerase I aus verschiedenen Organismen ab etwa 5 µM [Suzuki et al. 2001]. Dies stimmt gut mit Daten sowohl von Berger et al. [2001] (Hemmung ab 8,6-16,5 µM) als auch mit Daten unserer eigene Arbeitsgruppe (Hemmung ab 1 µM) überein [Fritz 2004]. Hwang et al. [2000] zeigten, dass EGCG ein Topoisomerase I-Gift darstellt. Im Gegensatz zu diesen Befunden berichteten Austin et al. [1992], dass durch EGCG die Relaxierung von pBR322-Plasmid-DNA durch Kalbsthymustopoisomerase, bis zu einer Konzentration von ca. 110 µM, nicht gehemmt werden konnte.

Das EGCG auch als Topoisomerase II-Gift wirkt, konnten bereits Austin et al. [1992] zeigen. Untersuchungen in unserem Arbeitskreis zur katalytischen Aktivität von Topoisomerase II zeigten eine effektive Hemmung des Enzyms bei 1 µM EGCG [Fritz 2004]. Dies stimmt mit Daten von Suzuki et al. [2001] sehr gut überein, die eine Hemmung der Topoisomerase II-vermittelten Dekatenierung ab 3 µM beschrieben. Im Gegensatz dazu fanden Berger et al. [2001], bei Untersuchungen mit Zelllysaten aus 3 Kolonkarzinomzelllinien, keine Hemmung der Dekatenierungsaktivität durch 550 µM EGCG, was eindeutig im Widerspruch zu den drei o. g. Autoren steht. Die Datenlage weist jedoch eindeutig darauf hin, dass EGCG ein potentes Topoisomerase II-Gift darstellt.

Isoflavone

In Sojabohnen und Sojaprodukten findet man hauptsächlich Flavonoide aus der Klasse der Isoflavone. Sowohl in einigen Studien, als auch in Untersuchungen in unserem Arbeitskreis, konnte gezeigt werden, dass Genistein bis zu 400 µM keine Hemmung der Topoisomerase I bewirkt [Constantinou et al. 1995, Boege et al. 1996, Fritz 2004].

Für Genistein konnte bereits mehrfach gezeigt werden, dass es ein spezifischer Topoisomerase II-Hemmstoff darstellt. Genauere Untersuchungen zum Wirkmechanismus zeigten, dass es als Topoisomerase II-Gift wirkt [Constantinou et al. 1995, Markovits et al. 1989, Martin-Cordero et al. 2000]. Die Hemmkonzentration in der Literatur reichen von 5 bis 100 µM [Okura et al. 1988, Markovits et al. 1989, Corbett et al. 1993, Robinson et al. 1993, Constantinou et al. 1995, Martin-Cordero et al. 2000], wobei in eigenen Untersuchungen für Genistein erst eine Hemmung der Topoisomerase II-vermittelten Dekatenierung ab 250 µM zu beobachten war [Fritz 2004].

Anthocyane

Bis dato gibt es noch keine Daten zur Wirkung von Anthocyanen oder Anthocyanidinen auf Topoisomerasen. Die vorliegende Arbeit berichtet erstmals über die Wirkung von Anthocyanidinen auf humane Topoisomerasen und deren Wirkmechanismus. Die Klasse der Anthocyane wird im nachfolgenden Kapitel 2.5 eingehender vorgestellt.

2.4.2 Struktur-/Aktivitätsanforderungen für Flavone als Topoisomerasehemmstoffe

Aufgrund von Struktur-/ Aktivitätsuntersuchungen konnten bestimmte strukturelle Eigenschaften für eine Topoisomerasehemmung durch Flavonoide identifiziert werden. So zeigten beispielsweise Austin et al. [1992], welche Strukturmerkmale am Flavonoid-Grundgerüst vorliegen müssen, um eine gute Hemmung der Topoisomerase II durch Flavone/Flavonole zu bewirken. In Abb. 27 sind die Strukturanforderungen am Beispiel des Quercetins dargestellt.

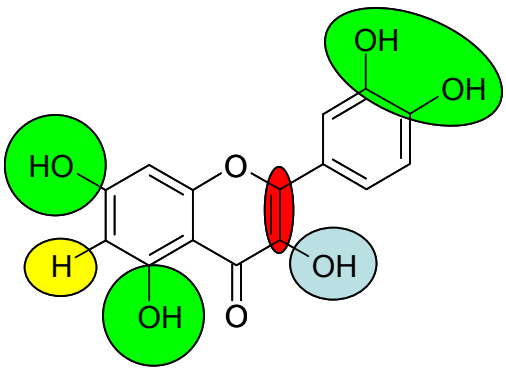


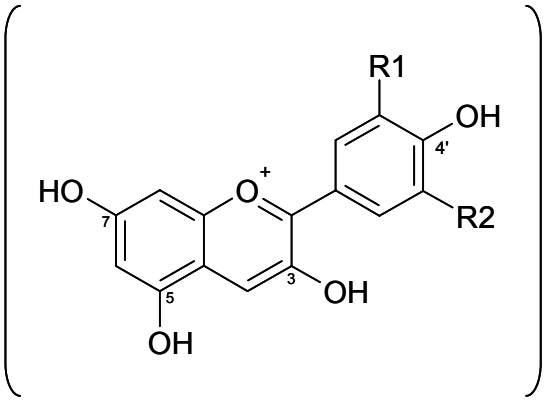
Abb. 27: Struktur-/Aktivitätsanforderungen für Topoisomerase II-Hemmstoffe aus der Klasse der Flavone/Flavonole.

Die Hydroxylierungen an der 3,5,3',4'-Position, in Abb. 27 grün unterlegt, bewirken eine gute Hemmung der Topoisomerase II. Eine Hydroxylierung in 3-Position, in Abb. 27 hellblau markiert, verändert nicht wesentlich die Aktivität. Ein fehlen der Hydroxygruppen im B-Ring kann durch ein Hydroxygruppe in 6-Position (Abb. 27, gelbe Markierung), wie beim Baicalein, wieder zu einer Topoisomerasehemmung führen. Ebenso wichtig für eine effiziente Topoisomerasehemmung ist eine Doppelbindung zwischen C2 und C3 (Abb. 27, rot markiert), da die Hydrierung dieser Doppelbindung zu einem Aktivitätsverlust führt [Austin et al. 1992]. Interessanterweise sind diese Strukturanforderungen sehr ähnlich denen für eine Hemmung der PKC [Austin et al. 1992]. Einige dieser Kriterien erfüllen die Anthocyane bzw. die Anthocyanidine.

2.5 Anthocyane

2.5.1 Struktur, Eigenschaften und Vorkommen

Anthocyane ist eine aus dem Griechischen abgeleitete Bezeichnung (anthos = Blume; kyanos = blau) für die größte Gruppe an wasserlöslichen Farbpigmenten des Pflanzenreiches. Das Farbspektrum der Verbindungen reicht dabei von einem hellen Rot (z.B. Johannisbeeren) über Blau bis zu dunklem Violett (z.B. Brombeeren, Trauben, Auberginen). Bei den Anthocyanen handelt es sich um Glykoside, deren eigentliche Chromophore ihre Aglykone, die Anthocyanidine, sind. Die Anthocyanidine unterscheidet man in erster Linie aufgrund ihres Hydroxy- und Methoxylierungsmuster im B-Ring des 2-Phenylbenzopyrylium (oder Flavylium) Grundgerüstes (siehe Abb. 28). Die in der Natur am häufigsten vorkommenden Verbindungen sind die Glykoside der Anthocyanidine Delphinidin (Del), Cyanidin (Cy), Pelargonidin (Pg), Paeonidin (Pn), Petunidin (Pt) und Malvidin (Mv). Bislang kennt man 17 natürlich vorkommende Anthocyanidine [Clifford 2000, Watzl et al. 2002, Kong et al. 2003].



Anthocyanidin	R1	R2
Delphinidin	OH	OH
Cyanidin	OH	H
Pelargonidin	H	H
Paeonidin	OMe	H
Petunidin	OMe	OH
Malvidin	OMe	OMe

Abb. 28: Substitutionsmuster der häufigsten Anthocyanidine.

Die Glykosylierung erfolgt primär an der C3-Hydroxylgruppe, zusätzlich können aber auch die C5- und C7-Position substituiert sein. Als Zucker finden sich neben Glukose und Galaktose auch häufig Arabinose und Rhamnose, die auch zu Di- und Trisacchariden gebunden vorliegen können [Watzl et al. 2002]. Bislang sind etwa 450 verschiedene Anthocyane in der Literatur beschrieben, wobei alleine in den Jahren von 2001 bis 2003 etwa 50 neue Anthocyane und drei neue Anthocyanidine gefunden wurden [Williams und Grayer 2004].

Im wässrigen Medium verhalten sich die meisten Anthocyanidine wie pH-Indikatoren, was auf pH-abhängige Änderungen in der Grundstruktur zurückzuführen ist (siehe Abb. 29). Bei niedrigen pH-Werten sind sie rot (Flavyliumkation), bei mittleren pH-Werten blau (chinoide Form) und bei hohen pH-Werten gelb (Chalkon-Form) [Belitz et al. 2001].

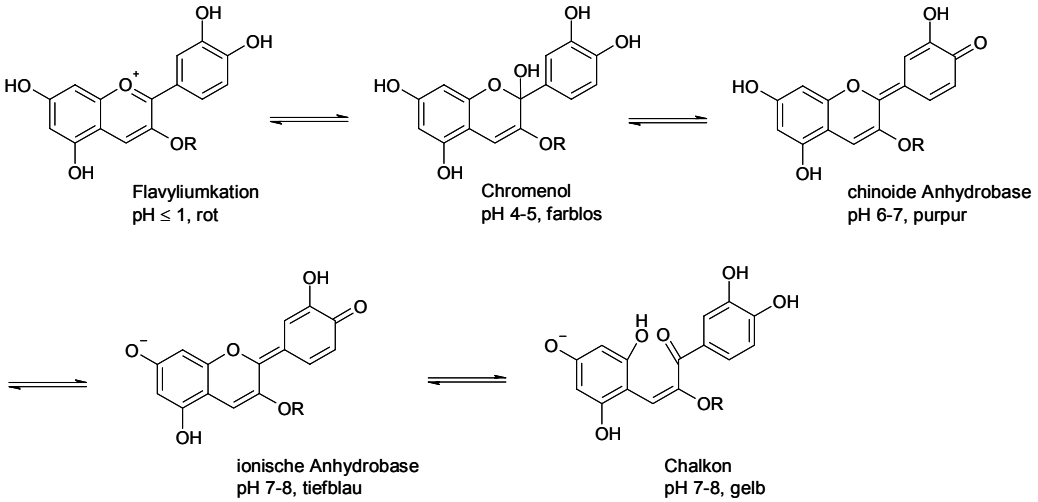


Abb. 29: pH-abhängige Struktur- und Farbveränderungen bei Anthocyanen [mod. nach Belitz et al. 2001].

Nicht nur der pH-Wert, sondern auch das Substituitionsmuster trägt zu einer Veränderung der Absorptionsmaxima, mit einer einhergehenden Veränderung der Farbe, bei. Zunehmende Hydroxylierung bewirkt eine Blauverschiebung (Pg 520 nm → Cy 535 nm → Del 545 nm), Glykosylierung und Methylierung eine Rotverschiebung (Pn 520 nm → Pn-3-glukosid 506 nm; Cy 535 nm → Pn 532 nm) [Belitz et al. 2001].

Die Glykoside der drei nicht methylierten Verbindungen (Pg, Cy, Del) sind in der Natur am weitesten verbreitet. Man findet sie beispielsweise in 80% aller pigemtierter Blätter, in 69% Früchten und in 50% der Blüten. Einen kleinen Überblick über die verschiedenen Anthocyane in Obstarten gibt Tab. 2.

Tab. 2: Anthocyane in verschiedenen Obstarten [Mazza und Miniati 1993].

Obstart	Anthocyane
Pflaume	Cy-3-glc, Cy-3-rut, Pn-3-glc, Pn-3-rut
Erdbeere	Pg-3-glc, Pg-3-gal, Cy-3-glc
Weintraube	Cy-, Del-, Pn-, Pt-, Mv-3-glc, Mv-3,5-diglc, Mv-3-p-cumaroylglc-5-glc, Mv-3-p-caffeoylglc-5-glc, Pn-3-p-cumaroylglc-5-glc
Heidelbeere	Pg-3-gly, Cy-3-gly, Pt-3-gly, Del-3-glc, Del-3-gal, Mv-3-glc
Himbeere	Cy-3-glc, Cy-3-glc-rut, Cy-3-rut, Cy-3-sop, Cy-3-glc-sop
Passionsfrucht	Del-3-glc, Del-3-glc-glc
Sauerkirsche	Cy-3-sop, Cy-3-rut, Cy-3-glc-rut, Cy-3-glc

gal: Galaktosid, glc: Glukosid, gly: Glykosid, rut: Rutinosid, sop: Sophorosid

Die sechs häufigsten Anthocyanidine in Früchten und Gemüse verteilen sich zu etwa 50% auf Cyanidin, je 12% Pelargonidin, Delphinidin und Paeonidin sowie je 7% Petunidin und Malvidin. An Glykosiden sind folgende Klassen weit verbreitet: 3-Glykoside, 3-Disaccharide, 3,5-Diglykoside und 3,7-Diglykoside, wobei 3-Glykoside am häufigsten zu finden sind. Man findet sie etwa zweieinhalb Mal so häufig wie 3,5-Diglykoside. Somit ist das am meist vorkommende Anthocyan das Cyanidin-3-Glukosid [Kong et al. 2003].

Die Gehalte verschiedener Lebensmittel an Anthocyanen sind sehr unterschiedlich. Sie reichen von wenigen mg/kg bis zu Spitzengehalten von ca. 10 g/kg, wie beispielsweise bei

Aroniabeeren oder Holunderbeeren. In Tab. 3 sind einige Beispiele für Anthocyangehalte verschiedener Lebensmittel aufgelistet.

Tab. 3: Anthocyangehalte ausgewählter Lebensmittel [Clifford 2000].

Lebensmittel	Anthocyangehalt [mg/kg]
Pflaume	20 - 250
Erdbeere	150 - 350
Weintraube (rot)	300 - 7500
Heidelbeere	825 - 4200
Holunderbeere	2000 - 10000
Himbeere	100 - 600
Kirsche	20 - 4500
Aronia (Apfelbeere)	5060 - 10000
Blutorangensaft	2000
Rhabarber	bis zu 2000
Portwein	140 - 1100

Anthocyane sind als Lebensmittelzusatzstoffe (E 163) zugelassen. Das Joint Expert Comitee of Food Additives (JECFA) der WHO (World Health Organization) kommt in seiner toxikologischen Bewertung zu dem Schluss, dass Anthocyane eine sehr geringe Toxizität besitzen. Eine Mengenbeschränkung als Zusatzstoff besteht für Anthocyane deshalb nicht (quantum satis), auch ist kein ADI-Wert (acceptable daily intake) festgelegt [Watzl et al. 2002].

2.5.2 Aufnahme und biologische Verfügbarkeit

Die tägliche Aufnahme von Anthocyanen in Deutschland wird auf durchschnittlich 2,7 mg pro Person geschätzt, wobei die Schwankungsbreite hierbei 0-76 mg beträgt [Watzl et al. 2002]. Zusätzlich muss man auch verschiedenste Ernährungsgewohnheiten berücksichtigen, da man beispielsweise mit einem Glas Rotwein bereits 24-35 mg Anthocyane aufnimmt [Watzl et al. 2002]. Saisonal bedingt kann durch hohen Obstverzehr, insbesondere durch Verzehr von roten Trauben, Beeren oder Steinobst, eine tägliche Aufnahmemenge von mehreren hundert Milligramm pro Tag erreicht werden [Watzl et al. 2002]. Als kritisch sind hier Nahrungsergänzungsmittel auf Anthocyanbasis zu nennen, die sich auf dem ständig

expandierenden Markt der Nahrungsergänzungsmittel einer zunehmenden Beliebtheit erfreuen. Mit diesen, teilweise über das Internet vertriebenen, Produkten ist es möglich ein Vielfaches der üblichen Verzehrsmengen zu sich zu nehmen.

In der Literatur findet man bereits eine ganze Reihe von Studien zur Bioverfügbarkeit von Anthocyanen. Dabei wurden die Untersuchungen nicht nur im Tiermodell an der Ratte durchgeführt, sondern auch in humanen Interventionsstudien. Da also eine Vielzahl von Humanstudien vorliegt, soll im weiteren Verlauf nur auf Ergebnisse aus Humanstudien eingegangen werden.

Erste Hinweise über die Bioverfügbarkeit von Anthocyanen stammen von Lapidot et al. [1998], nach Verabreichung von 300 ml Rotwein. Dies entsprach etwa 218 mg an Anthocyanen oder ca. 3,5 mg/kg Körpergewicht, wobei Malvidin-3-Glukosid und Malvidin-3-Glukosid-Acetat die Haupkomponenten darstellten. Zwei Verbindungen, vermutlich Anthocyan-Dimere, wurden unverändert in Urin über HPLC-UV wieder gefunden. Nach Ansäuern des Urins ergaben sich im Chromatogramm weitere Peaks mit typischen Anthocyanspektren, die nicht genauer identifiziert wurden. Die Autoren berechneten, dass nach 12 Stunden ca. 1,5-5,1% der verabreichten Anthocyanmenge im Urin gefunden wurde [Lapidot et al. 1998]. Bis dato wird die Bioverfügbarkeit von Anthocyanen meist nach Verabreichung von anthocyanreichen Lebensmitteln wie Säften, Extrakten oder Beeren bestimmt. Aufgrund der unterschiedlichen Anthocyanzusammensetzung, verabreichten Menge und unterschiedlichen Matrizes ergibt sich jedoch eine uneinheitliche Datenlage. Zusammenfassend kann jedoch gesagt werden, dass in einem Großteil der Studien unveränderte Anthocyanglykoside, entweder im Blutplasma [Murkovic et al. 2000, Bub et al. 2001, Cao et al. 2001, Mazza et al. 2002, Kay et al. 2004, Bitsch et al. 2004a] oder im Urin [Cao et al. 2001, Bub et al. 2001, Mülleder et al. 2002, McGhie et al. 2003, Kay et al. 2004, Bitsch et al. 2004a], nachgewiesen wurden.

In einigen Studien konnten auch Metabolite der Anthocyane detektiert werden. So fanden Felgines et al. [2003] im Urin der Probanden, die eine Pelargonidin-3-Glukosid reiche Erdbeermahlzeit zu sich genommen hatten, nach Behandlung mit Glucuronidase drei Pelargonidin-Monoglucuronide, die auch mittels HPLC-MS bestätigt werden konnten. Des Weiteren fanden die Autoren in den Urinproben Pelargonidinsulfat als Metabolit, sowie das Aglykon Pelargonidin. Nach Aufnahme eines Cyanidin-3-Gklykosid reichen Aroniaberrenextraktes konnten Kay et al. [2004] im Plasma und Urin der Probanden neben

der Haupkomponente Cyanidin-3-Galaktosid sowohl Cyanidin-Glucuronide als auch methylierte Metabolite identifizieren.

Angaben über Plasmakonzentrationen in den verschiedenen Studien unterliegen ebenfalls starken Schwankungen. So liegt einer der höchsten berichteten Plasmaspiegel an Anthocyanen bei ca. 1 µM nach der Einnahme von 20 g Aronia-Extrakt (1,3 g Cyanidin-3-Gkykoside) [Kay et al. 2004]. Dies stimmt recht gut mit Daten von Frank et al. [2003] überein, die zeigen konnten, dass 30 Minuten nach Aufnahme von 400 ml rotem Traubensaft (283,5 mg Anthocyane) eine Plasmakonzentration von 337 ng Anthocyane/ml (entspricht 0,7 µM berechnet als Cy-3-Glukosid) erreicht wurde. Ein Problem der gesamten Bioverfügbarkeitsstudien ist jedoch die extrem niedrige Wiederfindungsrate, d.h. nur wenige Prozent der gesamt verabreichten Anthocyanmenge werden gefunden. Das „Schicksal“ von über 90% der Gesamtmenge an aufgenommenen Anthocyanen ist nach wie vor unklar.

2.5.3 Biologische Wirkungen

Anthocyane werden mit den verschiedensten biologischen Wirkungen und Effekten in Verbindung gebracht. Wie auch für die Bioverfügbarkeit, finden sich in der Literatur für biologische Wirkungen ebenfalls eine Vielzahl von *in-vitro* Untersuchungen als auch einige *in-vivo* Studien. In Tab. 4 sind einige postulierte biologische Wirkungen von Cyanidin und seinen Glykosiden aufgelistet, die auf unterschiedlichste biologische Wirkungen und damit möglicherweise positive Gesundheitseffekte hinweisen könnten.

Tab. 4: Postulierte biologische Wirkungen von Cyanidin und seinen Glykosiden [modifiziert nach Galvano et al. 2004].

Biologische Wirkung
Antimutagen im Bakterienmodell an *Salmonella typhimurium*
Unterdrückung von Inzidenz und Anzahl von kolorectalen Adenomen und Karzinomen
Verbesserung der Dunkeladaption
Schutzwirkung gegen humane Augenkrankheiten
Herabsetzung der Empfindlichkeit von LDL gegen Lipidperoxidation
Schutz vor oxidativen Schäden in humanen Erythrozyten
Schutz vor oxidativem Stress, verursacht durch Leber oder Herz Ischämie/Reperfusionsschäden, in Ratten
Schutzwirkung an Kalbsthymus-DNA gegenüber oxidativen Schäden
Verbesserung der antioxidativen Kapazität von Plasma bei Ratten
Anti-inflammatorische Wirkung
Reduktion der Toxizität von Makrophagen durch Herabsetzung des NO-Gehaltes

LDL: low density lipoproteins

Anthocyane besitzen, wie die Mehrzahl der Flavonoide, antioxidative Eigenschaften. Die Eigenschaft der Anthocyane Radikale abzufangen und ihre antioxidative Kapazität ist vermutlich der am häufigsten publizierte Wirkmechanismus der Anthocyane, wobei hier überwiegend *in-vitro* Studien vorliegen [Lila 2004, Galvano et al. 2004].

Des Weiteren werden Anthocyane häufig assoziiert mit einer Reihe weiterer möglicherweise positiver Gesundheitseffekte, beispielsweise bei Diabetischer Retinopathie [Scharrer und Ober 1981] oder kardiovaskulären Erkrankungen [Renaud und de Lorgeril 1992]. Anthocyane sollen auch anti-inflammatorischen Effekte besitzen, da sie beispielsweise *in-vitro* die Cyclooxygenasen 1 und 2 hemmen [Seeram et al. 2003] Auch wird berichtet, dass Anthocyanextrakte der Sauerkirsche, vorwiegend Cyanidin-3-Glykoside, in einem Tiermodell an der Ratte dosisabhängig das entzündungsverursachte Schmerzverhalten verbesserten [Tall et al. 2004]. In einer Studie an Apc^{Min}-Mäusen, die eine Mutation des APC-Genes (adenomatous polyposis coli) tragen und folglich multiple intestinale Adenome entwickeln, konnte die Gabe eines Cyanidin-3-Glykosid reichen Sauerkirschextraktes mit dem Trinkwasser signifikant die Anzahl und Größe von caecalen Adenomen verringern [Kang et al. 2003]. Die Anzahl der Kolontumore oder die Tumorgröße zeigten in dieser Studie jedoch keine signifikanten Veränderungen.

Untersuchungen in unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass von den 5 häufigsten Anthocyanidinen (Del, Cy, Pg, Pn, Mv), Del und Mv am effektivsten das Wachstum der humanen Kolonkarzinomzelllinie HT29 hemmen [Marko et al. 2004]. Im Rahmen von Struktur-Aktivitäts-Untersuchungen wurde in unserer Arbeitsgruppe der Einfluss von Anthocyanen auf zelluläre Signalkaskaden, die wichtig für die Regulation von Zellwachstum und Differenzierung sind, untersucht (Abb. 30).

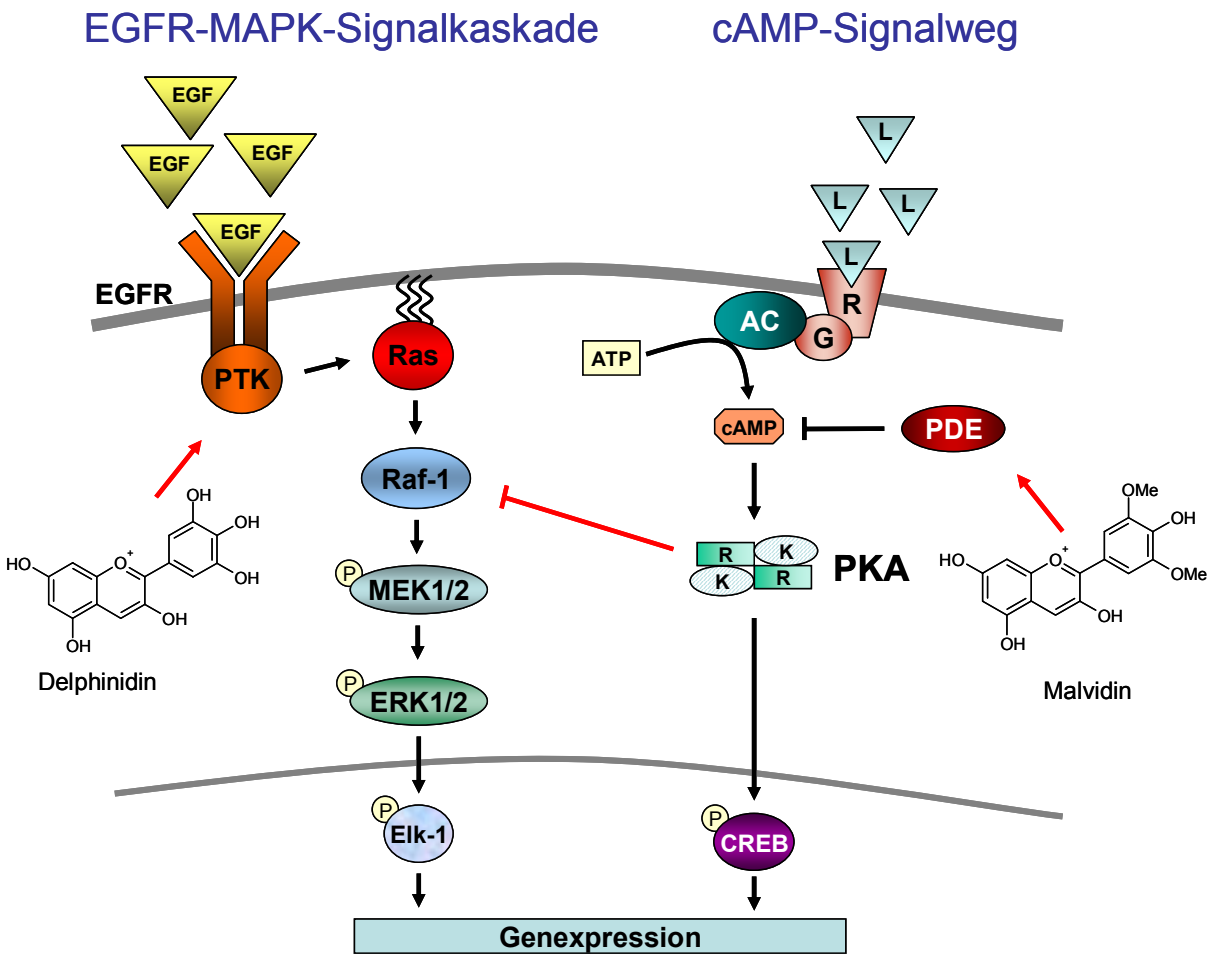


Abb. 30: In der Arbeitsgruppe untersuchten Signalkaskaden und deren Crosstalk. AC: Adenylatzyklase, CREB: Transkriptionsfaktor cAMP-responsive element binding Protein, EGF: epidermaler Wachstumsfaktor, EGFR: epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor, ERK1/2: extrazellulär regulierte Kinase, Elk-1: Transkriptionsfaktor, G: GTP-bindendes Protein, L: Ligand, MAPK: mitogen aktivierte Proteinkinase, MEK1/2: MAP-ERK-Kinase, PTK: Protein Tyrosin Kinase, R: Rezeptor, Ras: GTP-bindendes Protein, Raf-1: Serin/Threonin Kinase, PKA: Proteinkinase A (mit K: katalytische Untereinheit, R: regulatorische Untereinheit)

Es zeigte sich dabei, dass abhängig vom Substitutionsmuster der Anthocyane, unterschiedliche Signalkaskaden beeinflusst werden [Marko et al. 2004]. Vicinale OH-Gruppen am B-Ring, wie bei Del und Cy, führen zu einer effektiven Hemmung des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors (EGFR) bzw. dessen Protein-Tyrosin-Kinaseaktivität (PTK) (siehe Abb. 30 und 31) [Meiers et al. 2001, Marko et al. 2004]. Dieser Rezeptor stellt das erste Element der mitogen aktivierten Proteinkinasekaskade (MAPK-Kaskade) dar. Die Aktivierung des EGFR bewirkt am nachgeschalteten G-Protein Ras einen Austausch von GDP zu GTP. Ras wiederum aktiviert die Serin/Threonin-Kinase Raf-1 und über eine Kaskade weiterer Phosphorylierungen werden z.B. der Transkriptionsfaktoren Elk-1 aktiviert. Der aktivierte Transkriptionsfaktor Elk-1 bindet an SRE-Promotorregionen (serum responsive element) und aktiviert die Expression von Genen, die wichtig sind bei der Regulation der Proliferation, wie Beispielsweise des Transkriptionsfaktors c-fos. Die Verbindungen mit Methoxygruppen oder das Pg mit nur einer Hydroxygruppe im B-Ring sind in ihrer Hemmwirkung am EGFR um ca. 2 Größenordnungen weniger wirksam. Gegenläufig zu diesem Befund zeigen sich die Ergebnisse an der cAMP-vermittelten Signalkaskade. Die Anthocyanidine Mv und Pn sind effektive Hemmstoffe von cAMP-hydrolysierenden Phosphodiesterasen (PDE) (siehe Abb. 30 und 31), welche den second messenger cAMP zu 5'-AMP abbauen, wohingegen Pg, Cy und Del nur marginale Effekte zeigen. Das cAMP kann dann die Proteinkinase A (PKA) aktivieren, die anschließend in zwei katalytische Monomere und ein regulatorisches Homodimer dissoziiert. Die katalytische Untereinheit der PKA bewirkt eine deaktivierende Phosphorylierung an Raf-1 und hemmt somit die MAPK-Kaskade. Dies könnte eine mögliche Erklärung für den Effekt sein, dass nicht nur Del und Cy die Phosphorylierung von Elk-1, in einem in A431-Zellen etablierten Reportergen-System, hemmen, sonder Mv sich als ähnlich potent wie Cy erweist [Meiers et al. 2001]. Ein Vergleich der IC_{50}-Hemmkonzentrationen für die EGFR-Aktivität (rot), PDE-Aktivität (blau) und des Tumorzellwachstums (grün) von HT29 ist in Abb. 31 dargestellt. Man erkennt die oben beschriebenen strukturabhängigen gegenläufigen Effekte. Die Hemmung des Tumorzellwachstums korreliert hier entweder mit einer guten Hemmung des EGFR oder einer Hemmung der PDE [Meiers et al. 2001, Marko et al. 2004].

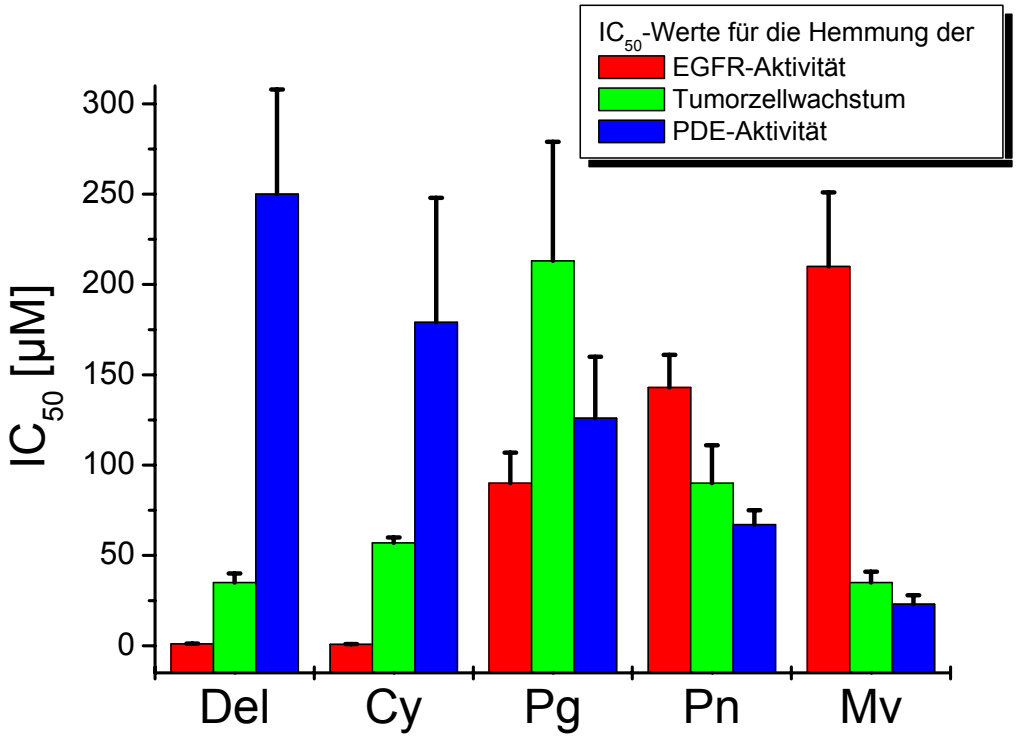


Abb. 31: Vergleich der IC_{50}-Werte für die Hemmung des Wachstums von HT29 Kolonkarzinomzellen, Hemmung der Proteintyrosinkinaseaktivität des EGFR und Hemmung der cAMP-hydrolysierenden PDE-Aktivität aus HT29 [modifiziert nach Marko et al. 2004].

3 Problemstellung

Durch das immer größer werdende Interesse an Gesundheit und verbesserter Lebensqualität finden sich auf dem Markt für Nahrungsergänzungsmittel immer mehr Produkte, die mit „bioaktiven“ Pflanzeninhaltsstoffen, oft als „Bioflavonoide“ bezeichnet, werben. Zunehmend findet man hier Stoffzubereitungen mit Anthocyanen, einer Unterklasse der Flavonoide. Über mögliche nachteilige Effekte bei der Aufnahme hoher Mengen, deren Gehalt vielfach über „nahrungsüblichen“ Werten liegen kann, ist bislang relativ wenig bekannt. Als möglicher Faktor für eine genotoxische Wirkung von Flavonoiden wird die Interaktion mit humanen Topoisomerasen diskutiert [Ross et al. 1996, Ross 2000, Strick et al. 2000].

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Anthocyanidine (Aglyka der Anthocyane) Delphinidin (Del), Cyanidin (Cy), Pelargonidin (Pg), Paeonidin (Pn) und Malvidin (Mv) hinsichtlich ihrer Beeinflussung humaner Topoisomerase I und II zu untersuchen. Ein Schwerpunkt lag in der Aufklärung des Wirkmechanismus der Verbindungen. Von besonderem Interesse war hierbei die Frage einer möglichen Stabilisierung des kovalenten DNA-Topoisomerase-Intermediates als potentielle genotoxische Wirkqualität. Die erzielten Ergebnisse sollten mit der Wirkung klassischer Topoisomerasegifte wie Camptothecin (Topoisomerase I-Gift) und Etoposid (Topoisomerase II-Gift) verglichen werden. Des Weiteren sollte die Frage der Relevanz des Wirkmechanismus der Anthocyanidine für die Integrität zellulärer DNA untersucht werden. Die Untersuchungen sollen einen Beitrag zur Sicherheitsbewertung von Anthocyanidinen liefern.

Ein weiterer Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit bildeten Untersuchungen zur Tyrosyl-DNA-Phosphodiesterase 1 (TDP1). Dieses von Yang et al. [1996] erstmals beschriebene Enzym ist in der Lage, die kovalente 3’-Tyrosin-DNA-Phosphodiesterbindung zu hydrolysieren und somit die kovalent an die DNA gebundene Topoisomerase abzulösen. Der Arbeitsgruppe von Prof. Boege (Universitätsklinikum Düsseldorf) gelang es, eine Zelllinie zu generieren, welche ein Fusionsprotein aus TDP1 und dem „Green Fluorescent Protein“, stabil exprimiert. Zusätzlich konnte dort eine weitere Zelllinie etabliert werden, in der das katalytische Histidin 263 der TDP1 gegen Alanin ersetzt ist, was zu einer Inaktivierung des Proteins führt. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Einfluss der katalytisch aktiven TDP1 als „Reparaturenzym“ bei Inkubation mit Topoisomerasegiften bezüglich Zellwachstum und DNA-Integrität zu bestimmen.

4 Ergebnisse und Diskussion

Eine Vielzahl von Flavonoiden sind als Hemmstoffe humaner Topoisomerasen I und II beschrieben und wurden in Kap. 2.4.1 bereits vorgestellt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Beeinflussung humaner Topoisomerasen I und II durch die Anthocyanidine Delphinidin (Del), Cyanidin (Cy), Pelargonidin (Pg), Paeonidin (Pn) und Malvidin (Mv), sowie sich aus dem potentiellen Wirkmechanismus ergebende mögliche Konsequenzen für die Integrität der DNA, untersucht.

4.1 Ergebnisse zur Topoisomerase I

Die Beeinflussung der katalytischen Aktivität von Topoisomerase I durch Anthocyanidine wurde mittels eines Plasmid-Relaxationsassays untersucht. Aktive Topoisomerase I wurde als Kernextrakt aus der humanen Mammakarzinomzelllinie MCF-7 gewonnen. Die Topoisomerase I des Kernextraktes überführt superspiralisierte Plasmid-DNA (pUC18) in ihre relaxierte Form, welche dann in einer nachfolgenden Agarosegelelektrophorese, aufgrund unterschiedlicher Wanderungsverhalten, von superspiralisiertem Plasmid getrennt werden kann. Nach Anfärben mit Ethidiumbromid erfolgt die Detektion im UV-Licht. Bei der Untersuchung zur Stabilisierung des kovalenten DNA-Topoisomerase I-Intermediates wurde rekombinante humane Topoisomerase I benutzt, welche freundlicherweise von Prof. Boege, Universitätsklinikum Düsseldorf, zur Verfügung gestellt wurde.

4.1.1 Katalytische Aktivität der Topoisomerase I

Zur Untersuchung der Beeinflussung der katalytischen Aktivität von Topoisomerase I durch Anthocyanidine wurde der Kernextrakt aus MCF-7-Zellen für 30 Minuten mit 250 ng superspiralisierter pUC18-Plasmid-DNA bei 37°C inkubiert. Die Anthocyanidine wurden für jeden Versuch frisch eingewogen und erst kurz vor Verwendung in DMSO gelöst. Abb. 32 zeigt das Gel eines Relaxationsassays für Pn, Pg und Mv.

Lane	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
pUC18	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
KE MCF-7		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Mv [µM]			100	50	25	10										
Pn [µM]							100	50	25	10						
Pg [µM]											100	50	25	10		
Cpt [µM]																100
DMSO [3,3%]															+	

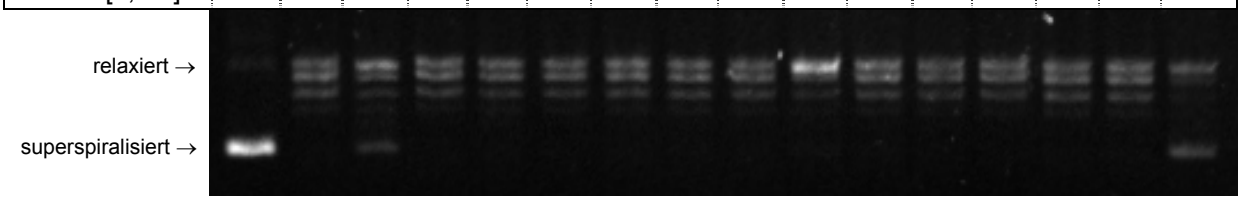


Abb. 32: Relaxationsassay (Topoisomerase I) für Mv, Pn und Pg. (n=3)

Vergleicht man Lane 1 mit Lane 2 in Abb. 32, so erkennt man, dass durch Zugabe von Kernextrakt zu superspiralisiertem pUC18-Plasmid die DNA entwunden (relaxiert) wird und die Bande im Gel retardiert. Das Topoisomerase I-Gift Camptothecin (100 µM) wurde als Positivkontrolle (Abb. 32, Lane 16) mitgeführt. Die Anthocyanidine Mv, Pn und Pg zeigen bis zu der höchsten getesteten Konzentration von 100 µM keine Hemmung der katalytischen Aktivität topoisomerase I-haltigen Kernextraktes. Lediglich bei 100 µM Mv (Abb. 32, Lane 3) erkennt man noch etwas superspiralisierte DNA und man könnte eine leichte, einsetzende Hemmung der Topoisomerase vermuten. Jedoch war dieser Effekt nicht reproduzierbar. Die Lösungsmittelkontrolle von 3,3% DMSO (Abb. 32, Lane 15) zeigt keinen Unterschied zur Inkubation ohne DMSO (Abb. 32, Lane 2). Die Ergebnisse zur Beeinflussung der katalytischen Aktivität von Topoisomerase I durch Del und Cy sind in Abb. 33 in einem repräsentativen Gel dargestellt.

Lane	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
pUC18	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
KE MCF-7		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Del [µM]			10	7,5	5	2,5	1							
Cy [µM]								10	7,5	5	2,5	1		
Cpt [µM]													100	
DMSO [3,3%]														+

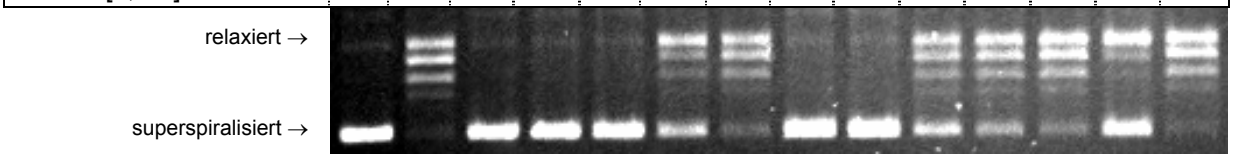


Abb. 33: Relaxationsassay (Topoisomerase I) für Del und Cy. (n=3)

Bei der Inkubation von DNA, Kernextrakt und den Anthocyanidinen Del und Cy erkennt man eine dosisabhängige Hemmung der katalytischen Aktivität der Topoisomerase I. Bei 1 µM Del (Abb. 33, Lane 7) deutet sich bereits eine leichte Hemmung des Enzyms an, eindeutig sichtbar ist der Effekt ab 2,5 µM Del (Abb. 33, Lane 6). Ab einer Konzentration von 5 µM Del (Abb. 33, Lane 5) erhält man kein relaxiertes Plasmid, was auf eine vollständige Hemmung der katalytischen Aktivität schließen lässt. Einen ähnlichen Effekt erkennt man bei der Inkubation mit Cy. Eine eindeutige Hemmung des Enzyms erkennt man hier bei 2,5 µM und 5 µM (Abb. 33, Lane 11 und 10). Die katalytische Aktivität des Kernextraktes ist ab einer Konzentration von 7,5 µM (Abb. 33, Lane 9) vollständig gehemmt. Vergleicht man diese Ergebnisse mit den Struktur-Aktivitäts-Daten anderer Flavonoidklassen, insbesondere den Flavan-3-olen, ergibt sich hier ein ähnliches Bild. Eine Hydroxygruppe im B-Ring des Anthocyanidingrundgerüstes ist nicht ausreichend, um die Topoisomerase I zu inhibieren. Für eine Hemmung des Enzyms sind 2 vicinale Hydroxygruppen notwendig. Eine Erhöhung auf 3 Hydroxygruppen im B-Ring, wie bei Delphinidin, bewirkt keine wesentliche Verbesserung der Hemmung der katalytischen Aktivität des Enzyms. Die Verbindungen mit Methoxygruppen im B-Ring, Mv und Pn, erweisen sich bis zu einer Konzentration von 100 µM als unwirksam.

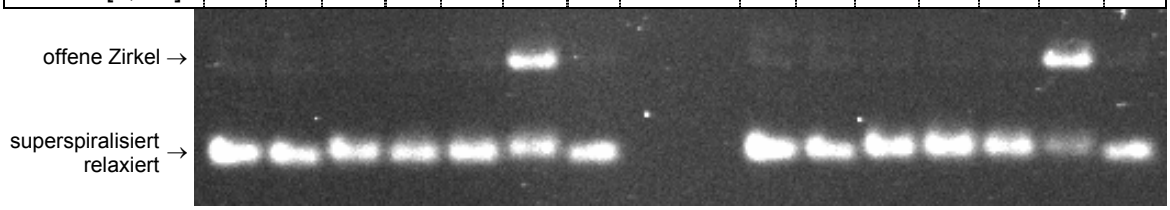
4.1.2 Topoisomerase I-Hemmstoff oder Gift?

Augrund des Wirkmechanismus der Topoisomerasehemmung, unterscheidet man klassischerweise zwischen rein katalytischen Hemmstoffen und Topoisomerasegiften, die das kovalente Topoisomerase-DNA-Intermediat (Cleavable Complex) stabilisieren. Für die Anthocyanidine Del und Cy wurde eine effektive Hemmung der Topoisomerase I in Konzentrationen von 5 µM und 7,5 µM gefunden. Es stellt sich nun die Frage, ob die Substanzen als katalytische Inhibitoren oder Topoisomerasegifte wirken. Hierzu wurde die mögliche Stabilisierung des Cleavable Complex von rekombinanter Topoisomerase I und pUC18-Plasmid-DNA durch Del und Cy, im so genannten „Cleavageassay“, untersucht. Inkubiert man DNA mit Topoisomerase und einem Topoisomerasegift, so stabilisiert man das kovalente Enzym-DNA-Intermediat im Zustand des DNA-Strangbruches. Verdaut man die Topoisomerase mit Proteinase K ab, bleibt das Plasmid mit einem Einzelstrangbruch, die offenen Zirkel (open circular), übrig. Die offenen Zirkel lassen sich mit einem ethidiumbromidhaltigen Agarosegel elektrophoretisch von der superspiralisierten und relaxierten Form abtrennen. In Abb. 34A und 34B sind repräsentative Gele für

Cleavageassays mit rekombinanter Topoisomerase I gezeigt. Als Positivkontrolle wurde das Topoisomerase I-Gift Camptothecin in einer Konzentration von 100 µM eingesetzt.

A

Lane	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
pUC18	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+
Topo I [60 ng]		+	+	+	+	+	+			+	+	+	+	+	+
Cy [µM]			10	5	1										
Del [µM]											20	10	5		
Cpt [µM]						100								100	
DMSO [3,3%]							+								+



B

Lane	1	2	3	4	5	6	7
pUC18	+	+	+	+	+	+	+
Topo I [50 ng]		+	+	+	+	+	+
Cy [µM]					100	10	
Del [µM]			100	10			
Cpt [µM]							100

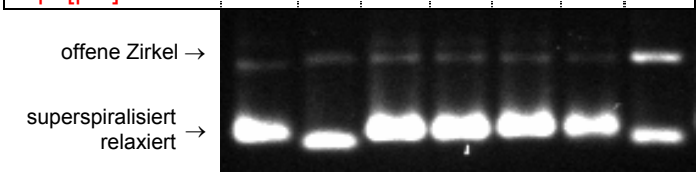


Abb. 34: Cleavageassays (Topo I) für Del und Cy. (**A**) Konzentration von Del bis 20 µM, Cy bis 10 µM, (**B**) Konzentrationen von Cy und Del bis 100 µM. (n=3)

Bei der Positivkontrolle Camptothecin ist eindeutig eine Bande für die Plasmide mit dem Einzelstrangbruch (offene Zirkel), verursacht durch die Stabilisierung des Cleavable Complex, zu erkennen (Abb. 34A Lane 6 und 14, Abb. 34B Lane 7). Bei den Inkubationen mit Del oder Cy erkennt man sowohl in niedrigen, topoisomerasehemmenden Konzentrationen bis 10 bzw. 20 µM (Abb. 34A), als auch in hohen Konzentrationen bis 100 µM (Abb. 34B), keine Bande für die offenen Zirkel. Diese Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass Del und Cy nicht als Topoisomerase I-Gifte wirken. Gleichwohl hemmen sie effizient die Aktivität der Topoisomerase I. Damit stellt sich die Frage, ob die Anthocyanidine Del und Cy möglicherweise rein katalytische Hemmstoffe darstellen. Katalytische Inhibitoren interagieren mit dem Zielenzym bevor der DNA-Strang geschnitten wird und verhindern so die Ausbildung des kovalenten Enzym-DNA-Intermediates. Damit wird das eigentliche Ziel von Topoisomerasegiften, der Cleavable Complex, nicht mehr oder zumindest vermindert

gebildet. Ein katalytischer Inhibitor könnte also eine gewisse Schutzfunktion gegenüber Topoisomerasegiften darstellen. Es sollte nun die Hypothese überprüft werden, ob in Gegenwart eines katalytischen Hemmstoffes, hier Del und Cy, die Ausbildung und Stabilisierung des Cleavable Complex durch das Topoisomerasegift Camptothecin verhindert werden kann. Dazu wurde dem Reaktionsansatz mit Plasmid und Topoisomerase I Del und Cy in verschiedenen Konzentrationen zugegeben, fünf Minuten inkubiert, anschließend Camptothecin zugesetzt und für 30 Minuten koinkubiert. Das Resultat der Koinkubation von Del bzw. Cy mit Camptothecin ist in Abb. 35 wiedergegeben.

Lane	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**
pUC18	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Topo I [50 ng]		+	+	+	+	+	+	+	+	+
Del [µM]			10	5	1					
Cy [µM]						10	5	1		
Cpt [µM]			100	100	100	100	100	100	100	
DMSO [6,6%]										+

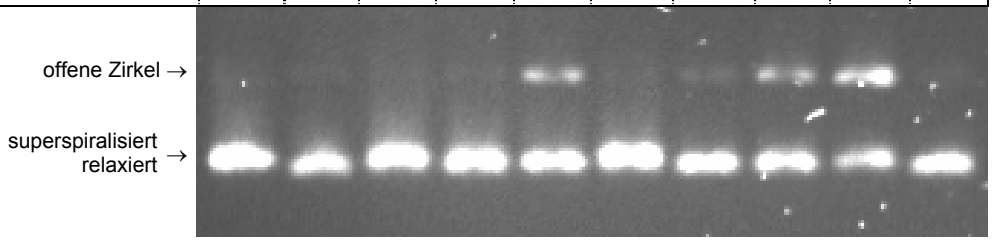


Abb. 35: Cleavageassay (Topo I) für Del und Cy, Koinkubation mit Camptothecin. (n=3)

Bei der Inkubation von pUC18-Plasmid-DNA, Topoisomerase I und 100 µM Camptothecin (Abb. 35, Lane 9) erkennt man eine deutliche Bande für die offene, zirkuläre Plasmidform. Bereits eine Konzentration von 1 µM Del oder Cy führt zu einer deutliche Reduktion der durch 100 µM Camptothecin induzierten offenen Zirkel (Abb. 35, Lane 5 und 8). Ab einer Konzentration von 5 µM Del oder Cy wird die Stabilisierung des Cleavable Complex durch 100 µM Camptothecin bereits komplett verhindert (Abb. 35, Lane 4 und 7). Um ausschließen zu können, dass dies ein unspezifischer Effekt der Anthocyanidine ist und der Effekt auf der spezifischen Hemmung der Topoisomerase I durch Del und Cy beruht, wurde das Experiment analog mit Mv durchgeführt, das keinen Effekt auf die katalytische Aktivität der Topoisomerase I bewirkt (siehe Abb. 36).

Lane	1	2	3	4	5	6	7	8	9
pUC18	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Topo I [50 ng]		+	+	+	+	+	+	+	+
Mv [µM]			100	50	10		100	50	10
Cpt [µM]						100	100	100	100
DMSO [6,6%]		+							

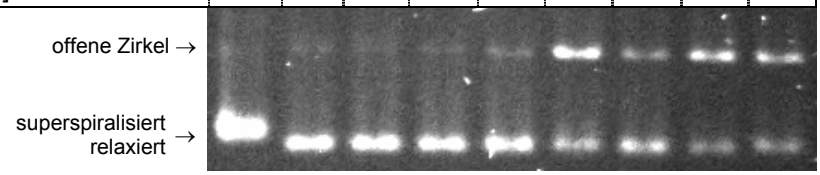


Abb. 36: Cleavageassay mit Koinkubation Mv und Cpt. (n=2)

Eine Inkubation von Plasmid, Topoisomerase I und Mv zeigte keine offene zirkuläre Plasmid-DNA (Abb. 36, Lane 3 bis 5). Die Koinkubation von bis zu 100 µM Mv mit 100 µM Camptothecin führte zu keiner wesentlichen Änderungen des Gehaltes an offenen Zirkeln. Lediglich 100 µM Mv zeigte eine leichte Verminderung der offene Zirkel, was darauf zurückzuführen sein könnte, dass Mv bei dieser hohen Konzentration eine leichte Hemmung der Topoisomerase I bewirkt, was sich ansatzweise auch schon in Plasmidrelaxationsassay (Abb. 32, Lane 3) zeigte. Denkbar wäre es, dass dieser Effekt möglicherweise auf einer Affinität zur Topoisomerase I beruht, die etwa 100-mal schwächer sein müsste als für Del oder Cy. Eine weitere Einflussmöglichkeit könnte auf die Eigenschaft der Anthocyanidine zurückgeführt werden in die DNA zu interkalieren oder sich an die kleine Furche der DNA anzulagern, was in Kapitel 4.3 eingehender beschrieben wird.

4.1.3 Zusammenfassung der Ergebnisse zur Topoisomerase I

Eine Übersicht der Daten zur Interaktion der Anthocyanidine mit der Topoisomerase I zeigt Tab. 5. Die Anthocyanidine mit Methoxygruppen im B-Ring des Flavonoid-Grundgerüstes, sowie das Pg mit einer Hydroxygruppe, bewirken keine Hemmung der katalytischen Topoisomerase I-Aktivität von Kernextrakt aus MCF-7-Zellen. Die Verbindungen mit einer Catecholstruktur (Cy) oder Pyrogallolstruktur (Del) des B-Ringes bewirken eine effektive Hemmung der Topoisomerase I im niedrigen mikromolaren Bereich. Untersuchungen zur Stabilisierung des Cleavable Complex legen nahe, dass Del und Cy keine Topoisomerasegifte sind. Del und Cy können an isolierter Topoisomerase I ab Konzentrationen von 5 µM die Stabilisierung des Cleavable Complex durch 100 µM Camptothecin komplett verhindern. Mv, ein Anthocyanidin das nur marginale Hemmung auf die Topoisomerase I bewirkt, zeigte

keinen wesentlichen Einfluss auf die Stabilisierung des Camptothecin-induzierten kovalenten Topoisomerase I-DNA-Intermediates. Dies legt den Schluss nahe, dass die durch Cy und Del verursachten Effekte auf die Topoisomerase I-Hemmung, bzw. direkte Interaktion der Verbindungen mit dem Zielenzym, zurückzuführen sein könnte.

Tab. 5: Zusammengefasste Ergebnisse zur Topoisomerase I.

	Hemmung der katalytischen Aktivität	**Stabilisierung des Cleavable Complex**	**Cleavable Complex Ausbildung bei Koinkubation mit Cpt**
Delphinidin	2,5 µM	negativ	komplette Hemmung ab 5 µM
Cyanidin	5 µM	negativ	komplette Hemmung ab 5 µM
Pelargonidin	k. H. bis 100 µM	n. t.	n. t.
Paeonidin	k. H. bis 100 µM	n. t.	n. t.
Malvidin	k. H. bis 100 µM	negativ	kein Effekt bis 100 µM

n. t. nicht getestet; k. H. keine Hemmung;

4.2 Ergebnisse zur Topoisomerase II

Die Untersuchungen zur Beeinflussung von Topoisomerase II durch die Anthocyanidine wurden an rekombinanter humaner Topoisomerase IIα und IIβ durchgeführt. Die beiden Enzyme wurden freundlicherweise von Prof. Boege, Universitätsklinikum Düsseldorf, zur Verfügung gestellt. Zur Bestimmung der katalytischen Aktivität von Topoisomerase II wurde ein Dekatenierungsassay gewählt. Die Untersuchungen zur möglichen Stabilisierung des Cleavable Complex bei der Topoisomerase IIα und IIβ wurden sowohl in Cleavageassays an rekombinanter Topoisomerase IIα und IIβ, als auch in Immunoband-Depletionassays an der humanen embryonalen Nierenzelllinie HEK 293 durchgeführt.

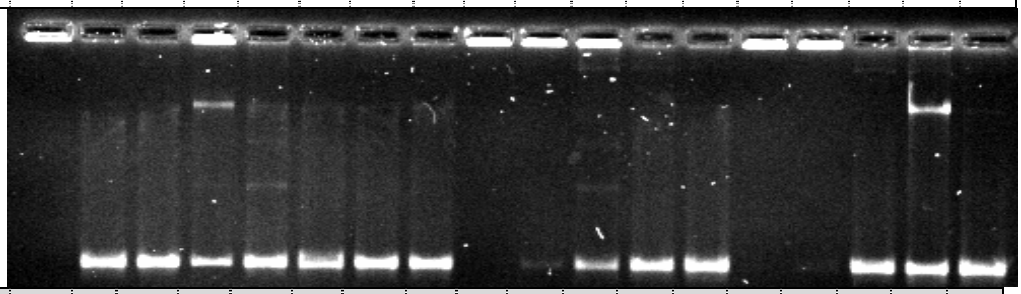
4.2.1 Katalytische Aktivität Topoisomerase II

Durch die Verwendung von Kinetoplasten-DNA (kDNA) als Substrat, die als hochmolekulares Netzwerk ineinander verknüpfter DNA-Doppelstrangzirkel vorliegt, wird spezifisch die katalytische Aktivität von Topoisomerase II erfasst. Das Enzym kann einen transienten Doppelstrangbruch in die DNA einführen, einen zweiten DNA-Doppelstrang durch die Lücke hindurchführen und den ersten Strang wieder verschließen. Nur aktive

Topoisomerase II kann folglich aus dem hochmolekularen Netzwerk der kDNA einzelne Minizirkel, die eine Größe von etwa 2,5 kb besitzen, herauslösen. Die freien Minizirkel können in ein Agarosegel migrieren, wohingegen die hochmolekulare kDNA in der Tasche verbleibt. Die Beeinflussung der katalytischen Aktivität wurde an rekombinanter Topoisomerase IIα und IIβ untersucht. In Abb. 37 sind je ein Dekatenierungsassay für Topoisomerase IIα (oben) und IIβ (unten) dargestellt.

Lane	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
kDNA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Topo IIα [40 ng]		+	+	*	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Mv [µM]			100	50														
Pg [µM]					100	50												
Pn [µM]							100	50										
Cy [µM]									10	7,5	5	2,5	1					
Del [µM]														10	7,5	5	2,5	1
DMSO [3,3%]		+																

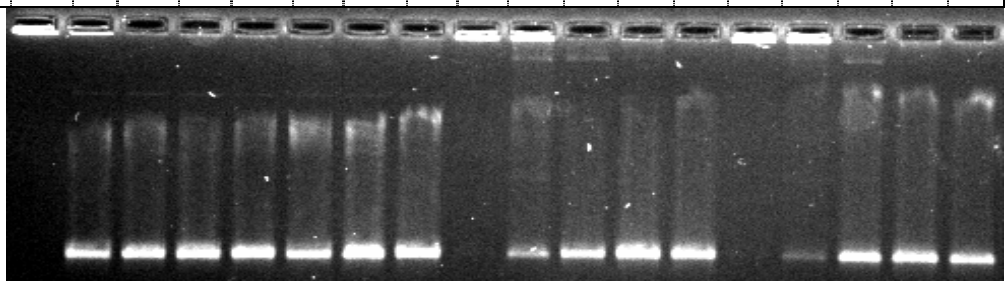
kDNA →



freie Minizirkel →

Lane	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
kDNA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Topo IIβ [40 ng]		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Mv [µM]			100	50														
Pg [µM]					100	50												
Pn [µM]							100	50										
Cy [µM]									10	7,5	5	2,5	1					
Del [µM]														10	7,5	5	2,5	1
DMSO [3,3%]		+																

kDNA →



freie Minizirkel →

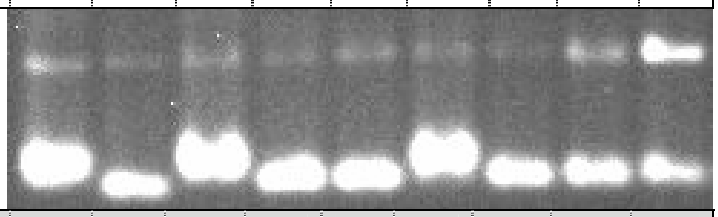
Abb. 37: Dekatenierungsassay mit Anthocyanidinen und Topoisomerase IIα (oben) und Topoisomerase IIβ (unten). (n=2-3) * zu wenig Topoisomerase IIα in Lane 4 pipettiert.

Ähnlich wie bei der Topoisomerase I bewirken die methoxylierten Verbindungen Mv und Pn, bis zu der höchst getesteten Konzentration von 100 µM keine Hemmung der Topoisomerase IIα oder IIβ (Abb. 37, Lane 3 und 7). In Lane 4 bei Topoisomerase IIα wurde zu wenig Enzym pipettiert, wodurch nicht genügend Enzym vorhanden war um das Substrat vollständig zu dekatenieren, und wird daher nicht berücksichtigt. Auch Pg, welches nur eine Hydroxygruppe im B-Ring an der 4'-Position trägt, erweist sich bis 100 µM als unwirksam an der Topoisomerase II (Abb. 37, Lane 5). Ebenfalls, fast analog zur Topoisomerase I, bewirken Del und Cy im niedrigen mikromolaren Bereich eine effektive Hemmung der Topoisomerase IIα und IIβ. Ab einer Konzentration von 7,5 µM Cy (Abb. 37, Lane 10) oder Del (Abb. 37, Lane 15) ist die katalytische Aktivität der Topoisomerase IIα und IIβ fast vollständig gehemmt, ab einer Konzentration von 10 µM Cy oder Del sind keine freien DNA-Minizirkel mehr zu erkennen (Abb. 37, Lane 9 und 14).

4.2.2 Topoisomerase II-Hemmstoff oder Gift?

Auch bei der Topoisomerase II unterscheidet man zwischen rein katalytischen Hemmstoffen und Topoisomerasegiften. In Cleavageassays sollte untersucht werden, ob die topoisomerasehemmenden Anthocyanidine Del und Cy den kovalenten Komplex zwischen Enzym und DNA im Zustand des DNA-Strangbruches stabilisieren. Die Inkubation verläuft analog zu den Untersuchungen an Topoisomerase I, nur dass hier im Falle der Inkubation mit humaner, rekombinanter Topoisomerase IIα oder IIβ in das Plasmid kein Einzelstrangbruch, sondern ein Doppelstrangbruch, eingeführt wird. Bei Inkubation mit Topoisomerasegiften wird der Doppelstrangbruch fixiert und, nach Verdau der Topoisomerase II, erhält man linearisierte Plasmid-DNA. Diese lassen sich mit einem ethidiumbromidhaltigen Agarosegel elektrophoretisch von der superspiralisierten und relaxierten Form abtrennen. Die Untersuchungen zur Stabilisierung des Cleavable Complex der Topoisomerase II wurden ebenfalls mit beiden Isoenzymen durchgeführt. Auch hier zeigte sich keine Diskriminierung einer Isoform. Abb. 38 zeigt das Gel eines Cleavageassay für Topoisomerase IIα (oben) sowie für Topoisomerase IIβ (unten) nach Inkubation mit Del, Cy und dem Topoisomerase II-Gift Etoposid (VP-16).

Lane	1	2	3	4	5	6	7	8	9
pUC18	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Topo IIα [300 ng]		+	+	+	+	+	+	+	+
Cy [µM]			50	10	1				
Del [µM]						50	10	1	
VP-16 [µM]									100
DMSO [3,3%]		+							



Lane	1	2	3	4	5	6	7	8	9
pUC18	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Topo IIβ [300 ng]		+	+	+	+	+	+	+	+
Cy [µM]			100	10	1				
Del [µM]						100	10	1	
VP-16 [µM]									100
DMSO [3,3%]		+							

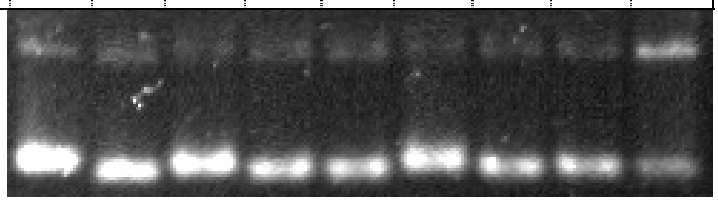


Abb. 38: Cleavageassay für Cy und Del mit Topoisomerase IIα (oben) und Topoisomerase IIβ (unten). (n=2-3)

Bei der Inkubation von pUC18 Plasmid-DNA, Topoisomerase II und der Positivkontrolle Etoposid (VP-16) erhält man unter den gewählten Versuchsbedingungen linearisierte Plasmid-DNA (Abb. 38, Lane 9), was auf die Stabilisierung des Cleavable Complex der Topoisomerase II im Zustand des DNA-Doppelstrangbruches zurückzuführen ist. Die Inkubationen mit bis zu 100 µM Del oder Cy (Abb. 38, Lane 3 und 6) zeigen keine linearisierte DNA, ein erster Hinweis, dass Del und Cy nicht als Topoisomerase II-Gifte wirken. Gleichwohl hemmen sie effizient die Aktivität der beiden Topoisomerase II-Isoenzyme. Im Gegensatz zu rein katalytischen Topoisomerase I-Hemmstoffen, die mit dem Enzym interagieren bevor der kovalente Enzym-DNA-Komplex gebildet wird, können beim katalytischen Zyklus der Topoisomerase II die Hemmstoffe sowohl vor, als auch nach Bildung des kovalenten Enzym-DNA-Komplexes mit „geöffneter“ DNA interagieren (siehe Kap. 2.2.2, Abb. 12, Schritte 2, 3 und 5). Wenn bei Koinkubation eines katalytischen Hemmstoffes mit dem Topoisomerasegift Etoposid die Bildung linearisierter DNA verhindert wird, würde dies auf eine Interaktion der Verbindung im katalytischen Zyklus hinweisen,

bevor das Intermediat mit dem geschnittenen DNA-Strang gebildet ist (siehe Kap. 2.2.2, Abb. 12, Schritte 2 oder 3). Alternativ könnte die Substanz auch direkt mit dem Zielenzym interagieren, was zu einem vergleichbaren Effekt bei der Koinkubation mit Topoisomerase II-Giften führen könnte. Kann die Koinkubation eines katalytischen Topoisomerase II-Hemmstoffes mit einem Topoisomerase II-Gift jedoch nicht die Stabilisierung des kovalenten Enzym-DNA-Intermediates verhindern oder reduzieren, so könnte dies ein Hinweis auf eine Interaktion mit einem „späten“ Schritt des katalytischen Zyklus (siehe Kap. 2.2.2, Abb. 12, Schritt 5) hinweisen. Eine gewisse Schutzfunktion gegenüber Topoisomerase II-Giften könnte also nur ermöglicht werden bei Interaktion der Verbindung mit dem Zielenzym bevor der kovalente Topoisomerase II-DNA-Komplex ausgebildet wird. Es sollte nun die Hypothese überprüft werden, ob in Gegenwart von Cy oder Del die Stabilisierung des Cleavable Complex durch das Topoisomerase II-Gift Etoposid verhindert werden kann. Dazu wurden dem Reaktionsansatz mit Plasmid und Topoisomerase II Del oder Cy zugesetzt, fünf Minuten inkubiert, anschließend Etoposid zugegeben und für 30 Minuten koinkubiert. Abb. 39 zeigt das Resultat eines Cleavageassay für Topoisomerase IIα und IIβ nach Koinkubation von Cy oder Del mit dem Topoisomerasegift Etoposid.

Lane	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
pUC18	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+
Topo II [300 ng]		α	α	α	α	α	α	α	α			β	β	β	β	β	β	β	β
Cy [µM]			10	10	1								10	10	1				
Del [µM]						10	10	1								10	10	1	
VP-16 [100 µM]				+	+		+	+	+					+	+		+	+	+
DMSO [6,6%]		+										+							

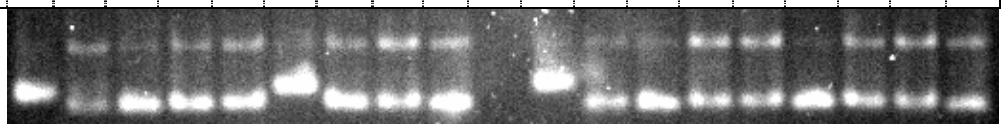
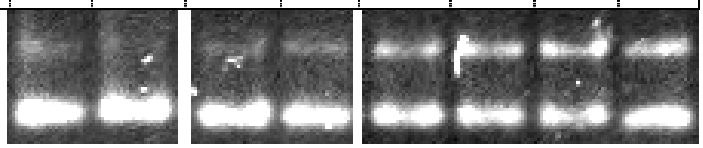


Abb. 39: Cleavageassay Topoisomerase IIα (Lanes 2 bis 9) und Topoisomerase IIβ (Lanes 12 bis 19), Koinkubation von Del oder Cy mit VP-16. (n=2-3)

Wie aus Abb. 39 ersichtlich, sind Del und Cy nicht in der Lage, die Stabilisierung des Cleavable Complex durch Etoposid bei Topoisomerase IIα (Abb. 39, Lanes 4, 5, 7-9) oder Topoisomerase IIβ (Abb. 39, Lanes 14, 15, 17-19) zu reduzieren oder zu verhindern. Bei jeder Inkubation mit Etoposid ist linearisierte DNA zu erkennen. Der gleiche Effekt konnte auch bei Konzentrationen bis zu 50 µM Cy oder Del beobachtet werden, 100 µM wurden nicht getestet. Auch für das nicht die Topoisomerase II hemmende Mv konnte bis zu einer Konzentration von 50 µM sowohl keine Stabilisierung des Cleavable Complex (Abb. 40,

Lane 3), als auch keine Reduktion der durch 100 µM Etoposid induzierten Cleavable Complex Stabilisierung (Abb. 40, Lane 8), detektiert werden (Abb. 40, Lane 5). In Abb. 40 ist ein repräsentativer Versuch mit Mv und Topoisomerase IIα (oben) und Topoisomerase IIβ (unten) dargestellt.

Lane	1	2	3	4	5	6	7	8
pUC18	+	+	+	+	+	+	+	+
Topo IIα [300 ng]		+	+	+	+	+	+	+
Mv [µM]			50	1	50	10	1	
VP-16 [µM]					100	100	100	100
DMSO [6,6%]		+						



Lane	1	2	3	4	5	6	7	8
pUC18	+	+	+	+	+	+	+	+
Topo IIβ [300 ng]		+	+	+	+	+	+	+
Mv [µM]			50	1	50	10	1	
VP-16 [µM]					100	100	100	100
DMSO [6,6%]		+						

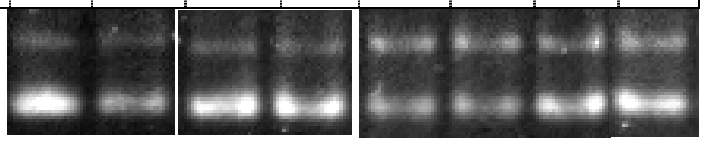


Abb. 40: Cleavageassay Topoisomerase IIα (oben) und Topoisomerase IIβ (unten), Inkubation mit Mv sowie Koinkubation mit Etoposid (VP-16). (n=2)

Del und Cy können nicht die Stabilisierung des kovalenten Komplexes sowohl der Topoisomerase IIα oder IIβ durch Etoposid verhindern, was eine Wirkung der Verbindungen analog zur Topoisomerase I ausschließen lässt. Dies lässt die Vermutung zu, dass sich der Wirkmechanismus der Anthocyane an der Topoisomerase I von dem Wirkmechanismus an der Topoisomerase II unterscheidet. Da sich bei der Koinkubation der Anthocyanidine mit Etoposid kein Effekt bei der Stabilisierung des Cleavable Complex zeigte, sollten die erzielten Resultate zur Stabilisierung des kovalenten Topoisomerase II-DNA-Intermediates zusätzlich mit einer weiteren Methode untermauert werden. Hierfür wurde ein Immuno-Band-Depletionassay gewählt. Es wurde versucht den Immunoband-Depletionassay mit der humanen Kolonkarzinomzelllinie HT29 zu etablieren. Dies führte jedoch Aufgrund eines zu geringen Gehaltes an Topoisomerase II-Isoenzymen dieser Zelllinie zu keinen reproduzierbaren, verlässlichen Ergebnissen. Im Rahmen dieser Arbeit konnte jedoch der

Immunoband-Depletionassay mit der Zelllinie HEK 293 (humane embryonale Nierenzelllinie) erfolgreich im Arbeitskreis etabliert werden. Hierfür werden die Zellen für 20 Minuten mit den Testsubstanzen inkubiert, anschließend lysiert und das Lysat einer SDS-PAGE unterzogen. Topoisomerasegifte bewirken, dass die Topoisomerase durch Stabilisierung des kovalenten Enzym-DNA-Intermediates an der DNA „fixiert“ wird und nicht in das SDS-Gel einwandert, wohingegen „freie“ Topoisomerase in das Gel migrieren kann. Anschließend wird diese dann mittels Western Blot auf eine Membran übertragen und immunochemisch detektiert. Eine Inkubation mit Topoisomerasegiften führt letztlich zu einer Abschwächung bzw. Verschwinden des Signals für die Topoisomerase. Als Erstantikörper wurden anti-Topoisomerase IIα und anti-Topoisomerase IIβ eingesetzt, als zusätzliche Ladungskontrolle diente ein anti-α-Tubulin Antikörper. Die Ergebnisse zum Immuno-Band-Depletionassay sind in Abb. 41A graphisch zusammengefasst, Abb. 41B zeigt einen repräsentativen Western Blot nach Inkubation mit Cy für Topoisomerase IIα und IIβ, sowie für α-Tubulin.

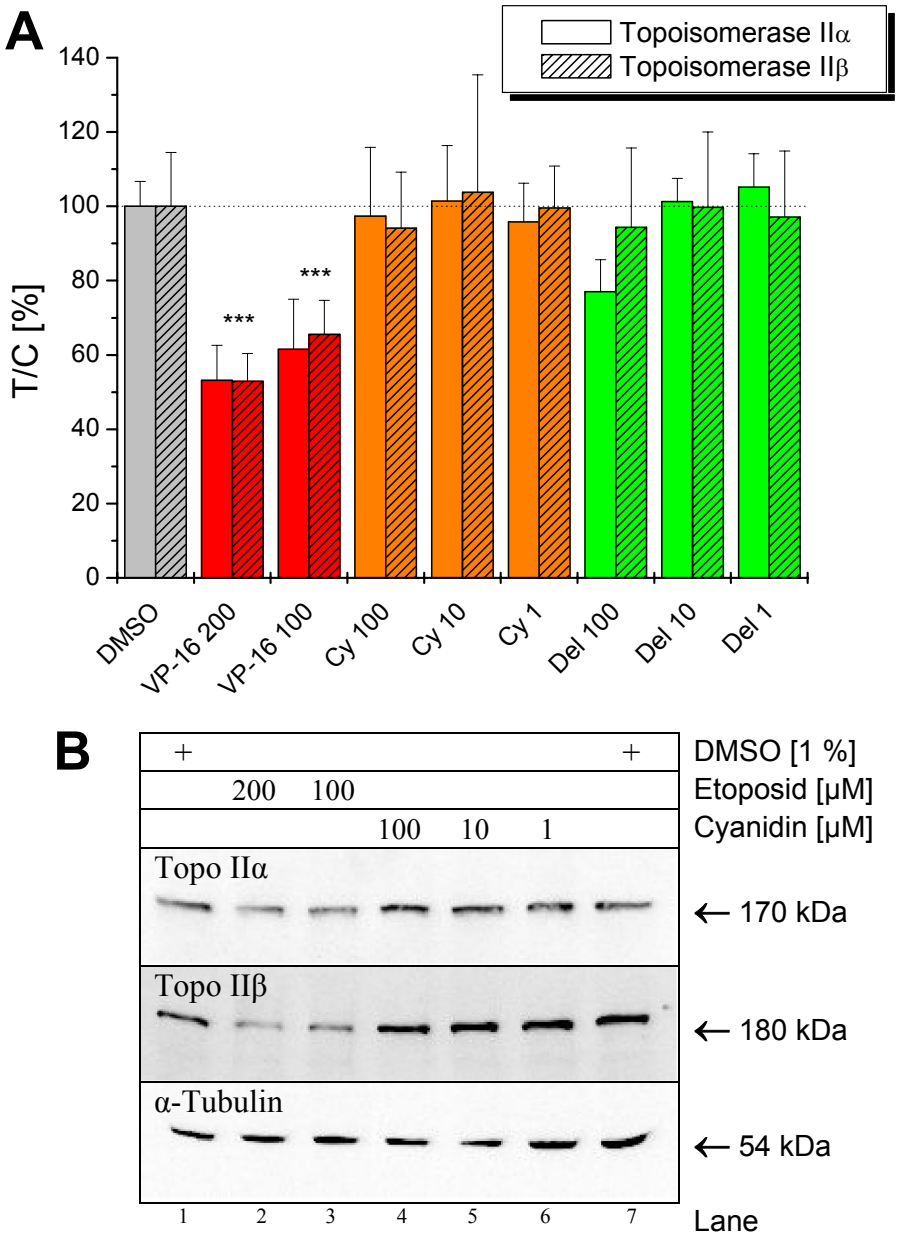


Abb. 41: Ergebnisse zum Immuno-Band-Depletionassay an HEK 293 Zellen. (**A**) Zusammenfassung der T/C-Werte bezogen auf die Kontrollinkubation mit DMSO. Balken ohne Muster sind für die Inkubationen mit Topoisomerase IIα, schraffierte Balken für die Inkubationen mit Topoisomerase IIβ. (n=4-6) (**B**) Repräsentativer Western Blot für die Inkubation von HEK 293 Zellen mit Cy und der Positivkontrolle Etoposid (VP-16). Topo: Topoisomerase. (Signifikanzlevel: *** $p<0{,}001$)

Inkubationen von HEK 293 Zellen mit 200 µM oder 100 µM Etoposid zeigten eine hoch signifikante Reduktion des Signals sowohl für Topoisomerase IIα, als auch für Topoisomerase IIβ (Abb. 41A). Die Intensität der Banden für die Inkubation mit 200 µM Etoposid beträgt ca. 53% der Kontrolle, bei 100 µM Etoposid liegt die Intensität der Topoisomerase II

Banden bei etwa 61% und 65% der Kontrolle. Die Inkubationen der HEK 293 Zellen mit bis zu 100 µM Cy oder Del zeigten keine signifikanten Unterschiede im Gehalt „freier“ Topoisomerase IIα oder Topoisomerase IIβ (Abb. 41A). Eine Inkubation bis zu 200 µM Cy oder Del war Aufgrund von Löslichkeitsproblemen nicht durchführbar. Diese Ergebnisse bestätigen die Befunde der Untersuchungen zur Stabilisierung des kovalenten Topoisomerase-DNA-Intermediates mit den rekombinanten Topoisomerase II-Enzymen. Die Ergebnisse sowohl des Cleavageassay mit rekombinanter Topoisomerase II als auch die Ergebnisse des Immunoband-Depletionassay lassen den Schluss zu, dass Del und Cy nicht als Topoisomerase II-Gifte wirken. In Abb. 41B ist ein typischer Western Blot für die Inkubation von HEK 293 Zellen mit der Positivkontrolle Etoposid (Abb. 41B, Lane 2 und 3) und verschiedener Konzentrationen Cy (Abb. 41B, Lane 4 bis 6) abgebildet. Vergleicht man die Banden bei der Lösungsmittelkontrolle DMSO (Abb. 41B, Lane 1 und 7) mit denen bei Inkubation mit Etoposid (Abb. 41B, Lane 2 und 3), so erkennt man deutlich die Reduktion des Signals durch die Inkubation mit dem Topoisomerase II-Gift. Die Intensität der Banden bei Inkubation mit Cy (Abb. 41B, Lane 4 bis 6) liegt im Bereich der Lösungsmittelkontrolle. Die bei der immunchemischen Detektion erhaltenen Banden wurden durch Größenvergleich mit einem auf dem Gel ebenfalls aufgetragenen Größenmarker bestimmt und zur Identifizierung verwendet. Die erhaltenen Werte von ca. 170 kDa für Topoisomerase IIα, 180 kDa für Topoisomerase IIβ und ca. 54 kDa für α-Tubulin stimmen mit den Literaturdaten überein. Der Gehalt an α-Tubulin, einem zellulären Protein, das wichtig ist für den Aufbau der Mitosespindel, den intrazellulären Vesikel-Transport und das Zytoskelett der Zelle, zeigte keine Veränderungen und diente als Aufarbeitungs- bzw. Ladungskontrolle.

4.2.3 Zusammenfassung der Ergebnisse zur Topoisomerase II

Zur besseren Übersicht ist eine Zusammenfassung der Daten zur Beeinflussung der Topoisomerase II in Tab. 6 aufgelistet. Da die Anthocyanidine keine isoenzymspezifischen Effekte zeigten, wird im Weiteren die Diskussion für Topoisomerase IIα und Topoisomerase IIβ zusammen unter Topoisomerase II geführt.

Tab. 6: Übersicht der Ergebnisse zur Topoisomerase II.

	Hemmung der katalytischen Aktivität	Stabilisierung des Cleavable Complex		Cleavable Complex Ausbildung bei Koinkubation mit VP-16 (Cleavageassay)
		Cleavageassay (rek. Enzyme)	Band Depletion (HEK 293)	
Delphinidin	7,5 µM	negativ	negativ	kein Effekt bis 100 µM
Cyanidin	7,5 µM	negativ	negativ	kein Effekt bis 100 µM
Pelargonidin	k. H. bis 100 µM	n. t.	n. t.	n. t.
Paeonidin	k. H. bis 100 µM	n. t.	n. t.	n. t.
Malvidin	k. H. bis 100 µM	negativ	n. t.	kein Effekt bis 100 µM

n. t. nicht getestet; k. H. keine Hemmung;

Es konnte gezeigt werden, dass nur die Anthocyanidine mit vicinalen Hydroxygruppen im B-Ring die katalytische Aktivität humaner Topoisomerase II ab einer Konzentration von 7,5 µM hemmen. Untersuchungen zur Stabilisierung des kovalenten Enzym-DNA-Intermediates der Topoisomerase II durch die Anthocyanidine wurden sowohl in einem zellfreien System mit rekombinanter Topoisomerase IIα + IIβ und Plasmid-DNA, als auch in HEK 293 Zellen untersucht. Del und Cy zeigten keine Stabilisierung des kovalenten Topoisomerase II-DNA-Komplexes. Bei Koinkubation mit Etoposid zeigen sie, im Gegensatz zur den Befunden an der Topoisomerase I, keine Beeinflussung des durch das Topoisomerase II-Gift stabilisierten Cleavable Complex. Aufgrund der Koinkubationsversuche mit Etoposid liegt die Vermutung nahe, dass Del und Cy möglicherweise in einen späten Schritt im katalytischen Zyklus der Topoisomerase II eingreifen. Ein hypothetischer Interaktionspunkt wäre eine Zwischenstufe nach Wiederverschluss des DNA-Strangbruches, wie z.B. der Komplex vor Freisetzung des passierten DNA-Stranges. Eine weitere mögliche Erklärung für die beobachteten Effekte könnte eine direkte Interaktion mit der Topoisomerase II sein. Jedoch müsste diese Interaktion in der gleichen Bindungsregion wie für Etoposid liegen und zusätzlich müsste Etoposid eine höhere Bindungsaffinität für diese Region aufweisen. Demnach würden die Anthocyanidine von Etoposid verdrängt und die Substanz könnte ihre Wirkung als Topoisomerasegift entfalten.

4.3 Interaktion der Anthocyanidine mit Doppelstrang-DNA

Eine Hemmung der Topoisomeraseaktivität kann jedoch nicht nur durch Angriff an dem Enzym oder dem kovalenten Enzym-DNA-Komplex erfolgen, sondern auch noch aus der Interaktion der Substanz mit der DNA resultieren [Tewey et al. 1984, Bailly 2000, Baraldi et al. 2004]. Zur Untersuchung der Interaktion der Anthocyanidine mit doppelsträngiger DNA wurden Kompetitionsassays mit Hoechst 33258 und Ethidiumbromid durchgeführt, um zu untersuchen, ob die Topoisomerasehemmung von Cy und Del möglicherweise zum Teil auf einer Interaktion mit der DNA beruht. Diese Interaktion der Anthocyanidine könnte eventuell die Struktur der DNA dahingehend modifizieren, dass die Topoisomerasen ihr natürliches Substrat nicht mehr erkennen und binden können. Bei den gewählten Verdrängungsassays führt eine Kompetition der Anthocyanidine mit dem jeweiligen Farbstoff um die gleiche Bindungsregion zu einer messbaren Fluoreszenzminderung. Im Falle von Ethidiumbromid wird die Substanz auf ihre Fähigkeit in die DNA zu interkalieren getestet, im Falle von Hoechst 33258 auf ihr Vermögen als Ligand der kleine Furche der DNA zu binden.

4.3.1 Verdrängung von EtBr / Interkalation in die DNA

Die Anthocyanidine sollten mittels eines Ethidiumbromid-Verdrängungsassays auf ihre Fähigkeit in die DNA zu interkalieren getestet werden. Die Versuchsdurchführung wurde auf ein 96-well-Mikrotiterplattenformat adaptiert. Der Assay wurde anschließend mit der Referenzsubstanz Actinomycin D neu etabliert. Der EC_{50}-Wert, das ist die Konzentration bei der die Fluoreszenz auf 50% der Kontrolle reduziert ist, lag im bisher in der Arbeitsgruppe durchgeführten Assay im Küvettenmaßstab für Actinomycin D bei 1,4 µM [Niederberger 1998]. In Abb. 42 ist die Dosis-Wirkungs-Kurve für Actinomycin D nach Umstellung in das Mikrotiterplattenformat gezeigt.

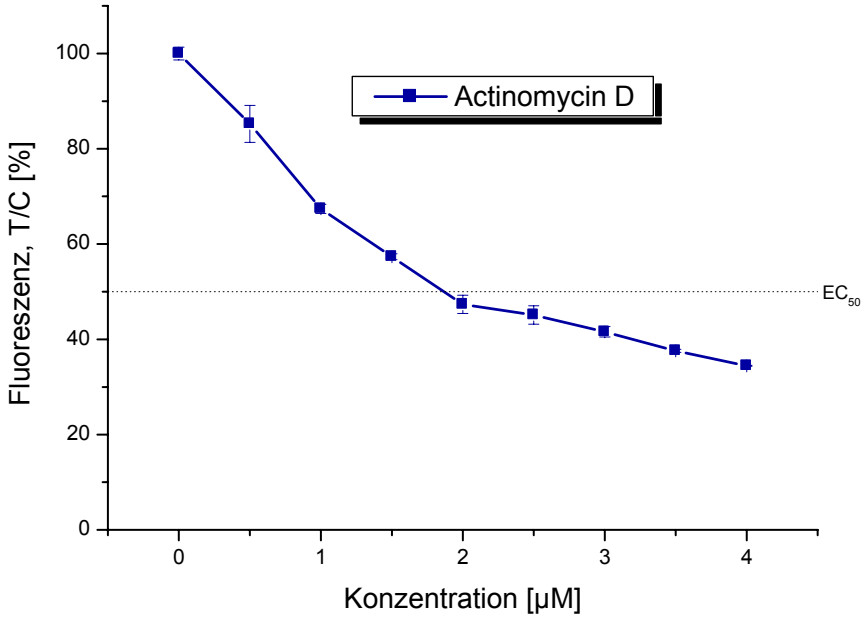


Abb. 42: Ethidiumbromid-Verdrängungsassay mit Referenz Actinomycin D. (n=5)

Nach linearer Regression wurde ein EC_{50}-Wert für Actinomycin D von 1,8 ± 0,2 µM berechnet, der mit dem Literaturwert von 1,4 µM [Niederberger 1998] recht gut übereinstimmt. Die Umstellung des Assay in das 96-well-Mikrotiterplattenformat liefert vergleichbare Ergebnisse zur bisherigen Methode und war somit erfolgreich. Die Ergebnisse zur Verdrängung von Ethidiumbromid aus Doppelstrang-DNA durch die Anthocyanidine sind in Abb. 43 dargestellt.

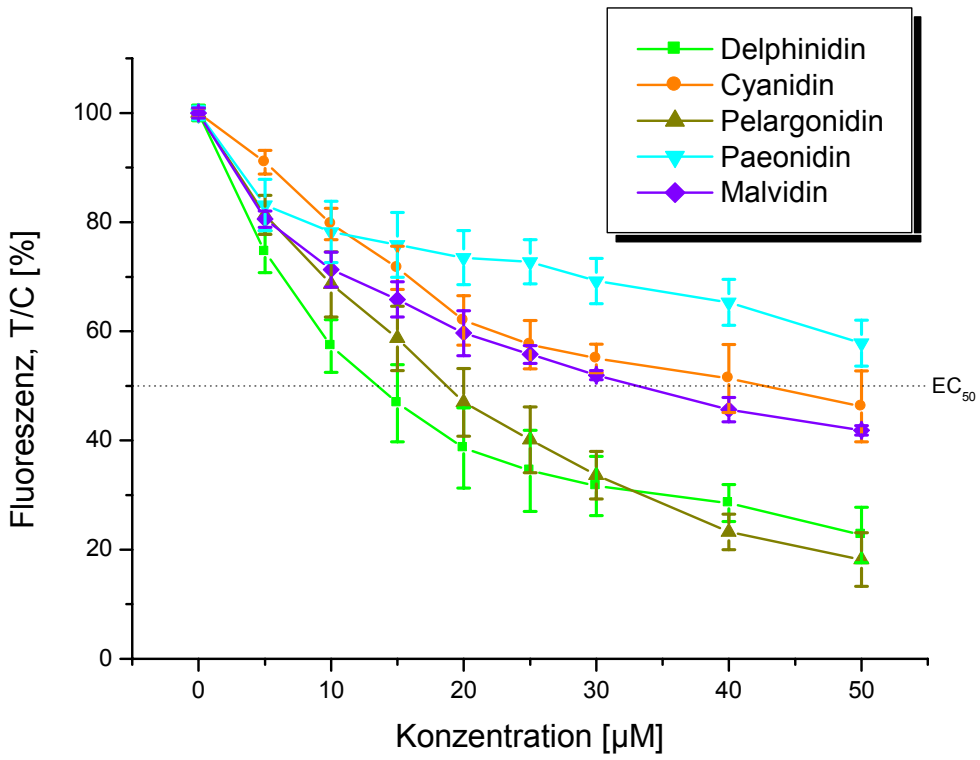


Abb. 43: Ethidiumbromid-Verdrängungsassay mit Anthocyanidinen. (n=4-5)

Alle getesteten Anthocyanidine waren in der Lage, Ethidiumbromid aus der DNA zu verdrängen. Am effektivsten zeigte sich dabei Del und Pg mit EC_{50}-Werten von 13,7 ± 1,5 µM für Del und 19,8 ± 2,1 µM für Pg. Die Verbindungen Mv und Cy erwiesen sich als etwas weniger effektive Interkalatoren mit EC_{50}-Werten für Mv von 33,4 ± 1,8 µM und Cy mit 42,0 ± 4,5 µM. Pn zeigte bis zur höchsten getesteten Konzentration von 50 µM lediglich eine Abnahme der Fluoreszenzintensität auf 57,8 ± 4,2 % der Kontrolle.

Del und Pg erweisen sich als ähnlich effektiv bei der DNA-Interkalation, jedoch bewirkt Pg im Gegensatz zu Del keinen Effekt an der Topoisomerase I oder der Topoisomerase IIα + IIβ. Ebenso sind Mv und Cy vergleichbar in ihrer Fähigkeit in die DNA zu interkalieren, jedoch bewirkt Cy eine effektive Hemmung der Topoisomerasen im Gegensatz zu Mv. Beide Vergleiche führen zu dem Schluss, dass die Fähigkeit der Anthocyanidine in die DNA zu interkalieren keinen wesentlichen Beitrag zu einer Hemmung der Topoisomerasen bewirkt. Auch der Vergleich zwischen Del und Cy zeigt, dass Del eine höhere Affinität zur DNA besitzt als Cy, beide Verbindungen jedoch identisch in ihrer Wirkung an den Topoisomerasen sind.

4.3.2 Verdrängung von Hoechst 33258 / Bindung an die kleine Furche

Die Affinität der Anthocyanidine als Ligand an die kleine Furche der DNA zu binden, wurde durch Verdrängung des Fluoreszenzfarbstoffes Hoechst 33258 bestimmt. Die Durchführung des Hoechst-Verdrängungsassays wurde, wie auch der Ethidiumbromid-Verdrängungsassay, ebenfalls erfolgreich auf eine Messung im 96-Loch-Mikrotiterplattenformat umgestellt. Als Referenzsubstanz zur Etablierung wurde Netropsin verwendet, welches im bisher durchgeführten Assay einen EC_{50}-Wert von 0,4 µM aufwies [Niederberger 1998]. Die erhaltene Dosis-Wirkungs-Kurve für Netropsin nach Umstellung der Versuchsdurchführung ist in Abb. 44 gezeigt.

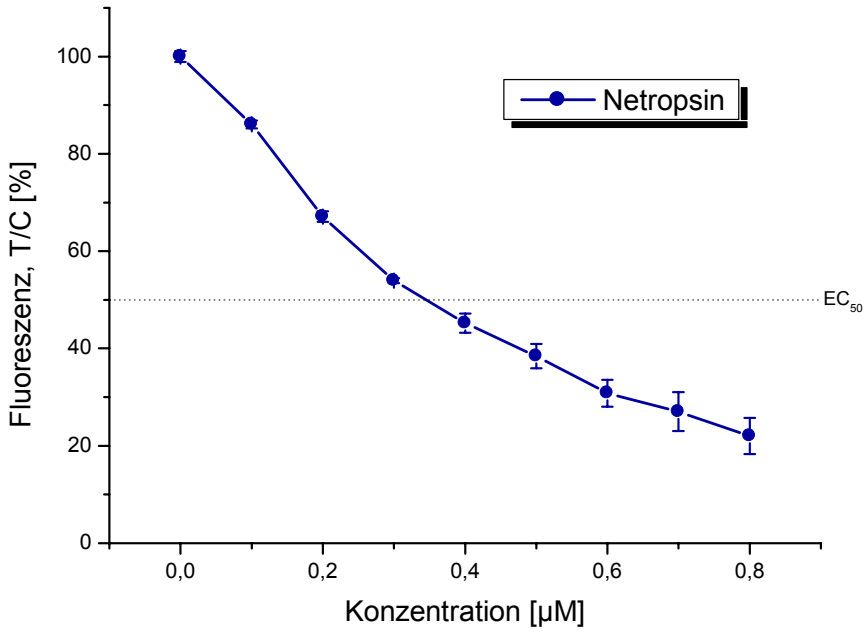


Abb. 44: Verdrängung von Hoechst 33258 durch Netropsin. (n=3)

Nach linearer Regression ergibt sich EC_{50}-Wert für Netropsin von 0,36 ± 0,06 µM. Dieser stimmt mit dem Wert von Niederberger [1998] von 0,4 µM sehr gut überein. Die Umstellung in das 96-well-Mikrotiterplattenformat liefert im vergleich zur bisher verwendeten Methode identische Ergebnisse und war somit ebenfalls erfolgreich. Die Ergebnisse zur Verdrängung von Hoechst 33258 als Ligand der kleinen Furche durch die Anthocyanidine sind in Abb. 45 dargestellt.

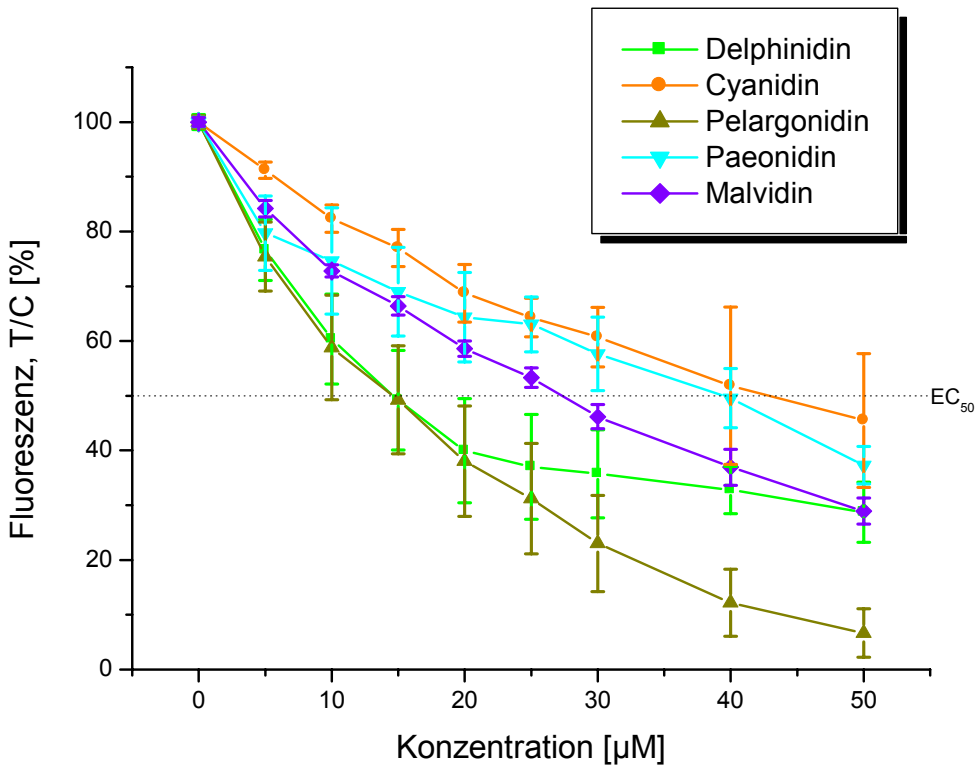


Abb. 45: Verdrängung von Hoechst 33258 aus der kleinen Furche der DNA durch Anthocyanidine. (n=3-5)

Alle getesteten Anthocyanidine waren in der Lage, Hoechst 33258 als Ligand der kleinen Furche zu verdrängen. Wie auch bei der Verdrängung von Ethidiumbromid sind Del und Pg die effektivsten Verbindungen. Der EC_{50}-Wert für Del von 15,2 ± 1,9 µM unterscheidet sich nicht von den 15,3 ± 2,0 µM für Pg, die beiden Verbindungen sind equipotent. Lediglich bei Konzentrationen ab 20 µM zeigt Pg einen stärkeren Abfall der Fluoreszenz im Vergleich zu Del. Die anderen drei getesteten Anthocyanidine sind ebenfalls in der Lage Hoechst 33258 als Ligand der kleinen Furche zu verdrängen. Die EC_{50}-Werte in zunehmender Reihenfolge sind: 28,0 ± 2,3 µM für Mv, 38,1 ± 3,4 µM für Pn und 43,5 ± 2,0 µM für Cy.

Vergleicht man diese Resultate mit den Ergebnissen zur Verdrängung von Ethidiumbromid, so erkennt man, dass Del, Pg, Cy und Mv vergleichbare EC_{50}-Werte aufweisen, Pn jedoch hier besser wirkt. Dies führt zu der Vermutung, dass Pn möglicherweise eine höhere Affinität zur kleinen Furche aufweist als zur großen Furche (Interkalation). Del und Pg erweisen sich als equipotent bei der Verdrängung von Hoechst 33258 als Ligand der kleinen Furche, analog zur Verdrängung von Ethidiumbromid. Das Pg bewirkt jedoch, im Gegensatz zu Del, weder an der Topoisomerase I noch an der Topoisomerase IIα oder IIβ einen Effekt. Auch der Vergleich zwischen Pn und Cy, die vergleichbar bezüglich der Verdrängung von Hoechst 33258 sind, Unterscheiden sich Grundsätzlich ihren Wirkungen an den Topoisomerasen. Del

und Cy, die fast identische Effekte an den Topoisomerasen bewirken, unterscheiden sich wesentlich in ihrer Fähigkeit Hoechst 33258 zu verdrängen, denn Del erweist sich hier als effektivste Verbindung, wohingegen Cy die geringste Wirkung aller getesteten Anthocyanidine bewirkt. Analog zur Verdrängung von Ethidiumbromid führen die Daten zur Verdrängung von Hoechst 33258 zu dem Schluss, dass die Affinität der Anthocyanidine zur kleinen Furche keinen wesentlichen Beitrag zur Hemmung der Topoisomerasen I oder II liefert.

4.4 Induktion von DNA-Schäden durch Anthocyanidine

Aufgrund der Tatsache, dass Anthocyanidine keine Topoisomerasegifte darstellen, erwartet man keine direkten Topoisomerase-vermittelten DNA-Schäden. Jedoch stellt sich die Frage, ob die in den vorangegangenen Kapiteln berichteten Befunde bezüglich der Interkalation in die DNA oder der Bindung an die kleine Furche der DNA, für die Integrität der DNA lebender Zellen relevant sind. Einige DNA-Interkalatoren oder auch als Liganden der kleinen Furche bindende Substanzen verändern die Struktur der DNA, wodurch ebenfalls DNA Strangbrüche, z.B. auch als Folge einer Cleavable Complex Stabilisierung, entstehen können [Tewey et al. 1987, Bailly 2000, Baraldi et al. 2004]. Eine mögliche Induktion von DNA Strangbrüchen durch die Anthocyanidine sollte mit Hilfe der Einzelzellgelektrophorese (Comet-Assay) untersucht werden. Dazu wurden HT29 Kolonkarzinomzellen für 1 h mit den Anthocyanidinen inkubiert und die DNA-Schäden im Comet-Assay bestimmt. Das Topoisomerase I-Gift Camptothecin, welches DNA-Schäden als Folge der Kollision des stabilisierten Cleavable Complex mit der Replikationsgabel oder der RNA-Polymerase verursacht, wurde als Referenz mitgeführt [Wu und Liu 1997]. Als Parameter für die Menge der DNA-Schäden wird die Tail Intensity (TI) erfasst. Die TI gibt die Menge der DNA im Kometenschweif prozentual im Vergleich zur DNA-Menge im Kometenkopf an. In Abb. 46 sind Beispiele für die Auswertung von Zellen mit dem Comet-Assay III-System (Perceptive Instruments, UK) abgebildet. Dargestellt sind Originalbilder, sowie die bei der Auswertung generierten Fehlfarbenbilder.

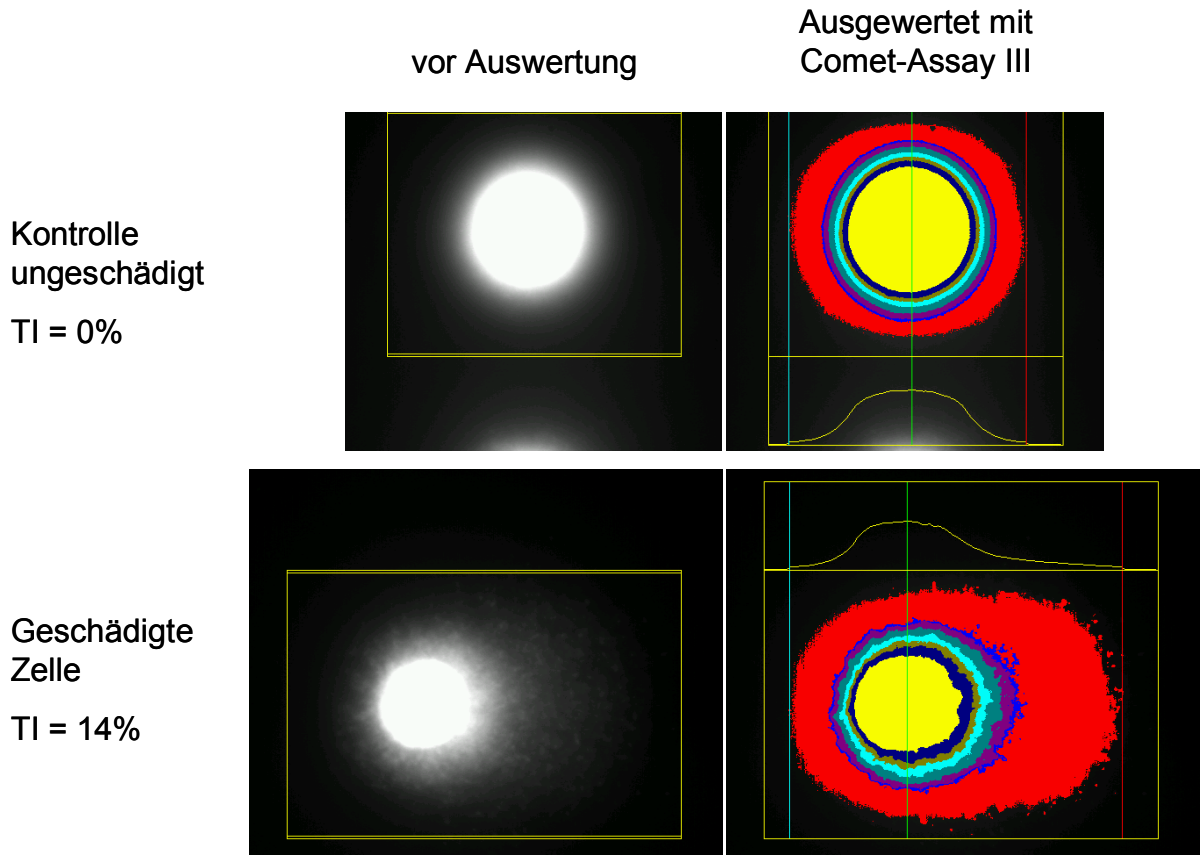


Abb. 46: Beispiele für die Auswertung mittels des Comet-Assay III-Systems. Dargestellt sind HT29 Zellen mit ungeschädigter DNA (oben) und mit DNA-Schäden (unten). Zur optischen Kontrolle der Messbereiche bei der Auswertung wird durch das Programm die Fluoreszenzintensität mit verschiedenen Farben dargestellt, von intensiv = gelb bis schwach = rot.

In Abb. 46 sind auf der linken Seite die Fluoreszenzaufnahmen von mit Ethidiumbromid gefärbten Zellen abgebildet und auf der rechten Seite die entsprechenden Fehlfarbenbilder, wie sie bei der Auswertung mit dem Comet-Assay III-System generiert werden. Bei der Auswertung erfolgt die Darstellung der unterschiedlichen Intensitäten mit verschiedenen Farben. Es ist darauf zu achten, dass bei der Auswertung die Messbereiche richtig gesetzt werden. Wie in Abb. 46 auf den Fehlfarbenbildern zu erkennen, ist der Messbereich mit einer hellblauen, grünen und roten Linie gekennzeichnet. Dabei markiert die hellblaue Linie den Anfang und die rote Linie das Ende des Messbereiches. Die grüne Linie markiert die Mitte des Kometenkopfes und ist für die Ermittlung des TI-Wertes wichtig, da bei der Berechung die vordere Hälfte des Kometen mathematisch auf die hintere abgebildet und abgezogen wird. Mit dem sich daraus ergebenden „Rest“ wird der TI-Wert, durch das Programm, berechnet.

Als weitere Hilfe wird zusätzlich noch der Intensitätsverlauf innerhalb des gelben Messrahmens graphisch dargestellt.

Abb. 47 zeigt die graphische Zusammenstellung der DNA-Schäden bei einstündiger Inkubation von HT29 Zellen mit dem Topoisomerasegift Camptothecin und den Anthocyanidinen.

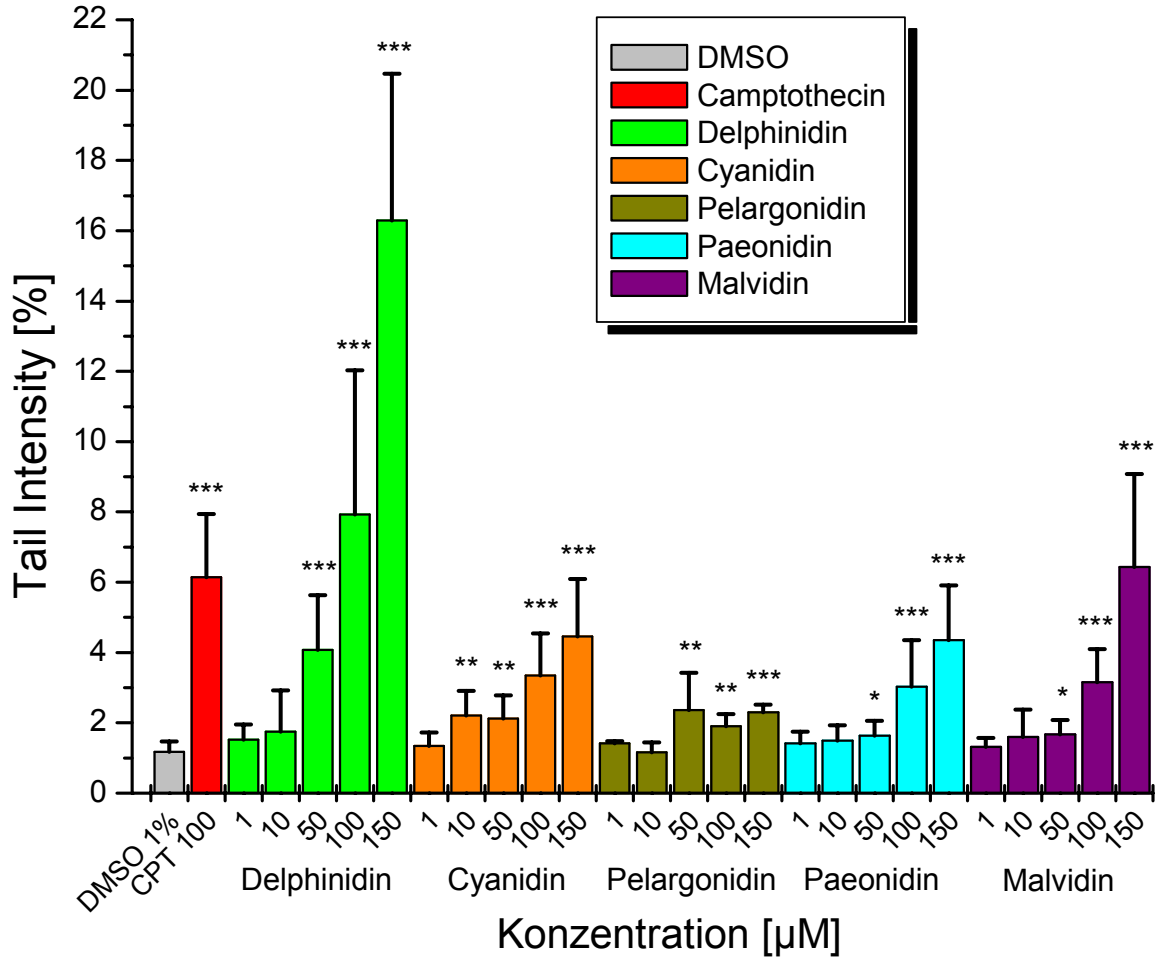


Abb. 47: Induktion von DNA Schäden in HT29 Zellen nach 1 h Inkubation mit den Testsubstanzen. CPT: Camptothecin (Signifikanzlevel: * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001; n = 4-6)

Die Positivkontrolle 100 µM Camptothecin zeigt einen hochsignifikanten Anstieg der DNA-Schäden mit einem TI-Wert von 6,14 ± 1,8 %. Bei allen getesteten Anthocyanidinen, mit Ausnahme des Pg, erkennt man eindeutig einen dosisabhängigen Anstieg der DNA-Schäden. Die erste signifikante Erhöhung der DNA-Schäden zeigt sich bei bereits 10 µM Cy mit einem TI-Wert von 2,21 ± 0,7 %, wohingegen bei den anderen Anthocyanidinen die 10 µM

Inkubation noch keinen signifikanten Effekt aufweist. Jedoch ist der Wert bei 10 µM Cy nur marginal gegenüber der Kontrolle erhöht. Eindeutiger ist der Effekt erst ab einer Konzentration von 50 µM Cy. Ab einer Konzentration von 50 µM weisen alle getesteten Anthocyanidine eine signifikante Erhöhung der DNA-Schäden im Vergleich zur DMSO-Kontrolle auf. Den stärksten Effekt, d.h. die meisten DNA-Schäden, zeigt Del mit TI-Werten von 7,93 ± 4,1 % bei 100 µM und 16,29 ± 4,2 % bei 150 µM. Jedoch ist anzumerken, dass der Gehalt an DNA-Schäden bei Inkubationen bis zu 100 µM, ausgenommen Del, nicht wesentlich gegenüber der Kontrolle erhöht ist (TI < 4%). Zusammenfassend kann man sagen, dass >50 µM Del, sowie bei 150 µM Cy, Pn und Mv, effektiv DNA-Schäden induziert werden, wohingegen geringere Konzentrationen, sowie die Inkubation mit Pg, nur marginale Effekte aufweisen. Für die TI-Werte der verschiedenen Analoga bei der höchsten getesteten Konzentration von 150 µM kann man folgende Reihe aufstellen Del >> Mv > Cy ≅ Pn > Pg.

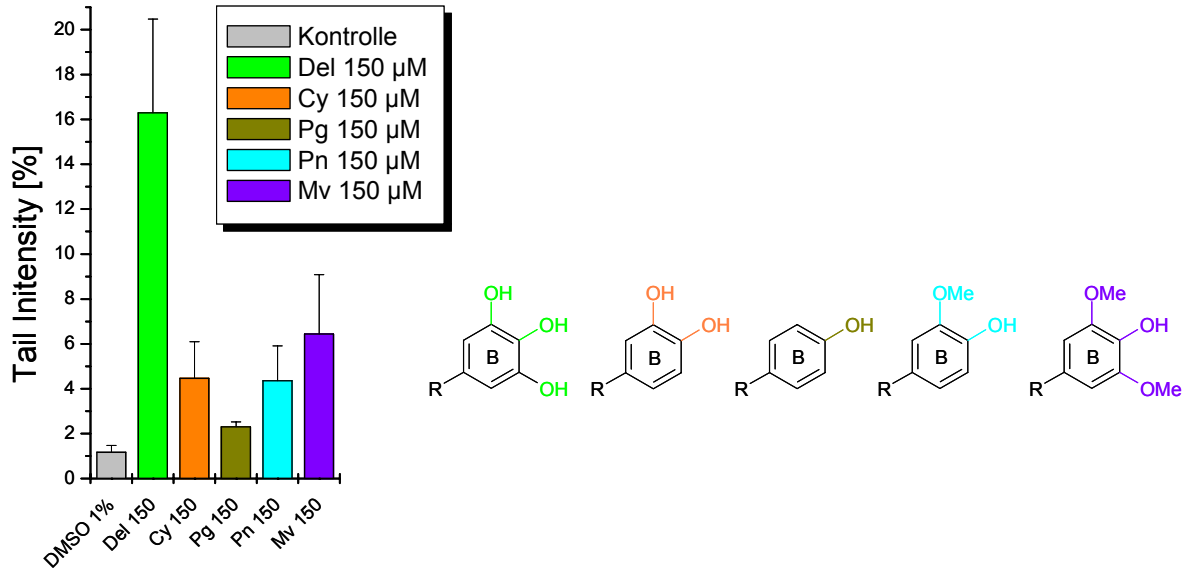


Abb. 48: DNA-Schäden (TI-Werte) nach 1h Inkubation von HT29 Zellen mit Anthocyanidinen (150 µM) und Substitutionsmuster des B-Ringes der Verbindungen.

Bei Auftragung der TI-Werte bei 150 µM Konzentration in Abhängigkeit des Substitutionsmusters im B-Ring der Anthocyanidine (Abb. 48), beginnend bei drei Hydroxygruppen über eine Hydroxygruppe bis zu 4'-hydroxy-3',5'-dimethoxy Substituierung, erkennt man einen u-förmigen Verlauf des Balkendiagramms. Die meisten DNA-Schäden bewirken die Verbindungen mit drei Substituenten im B-Ring (Del, Mv), gefolgt von den Substanzen mit zwei Substituenten (Cy, Pn). Das Pg mit nur einer Hydroxygruppe erwies sich in diesem System als am wenigsten effektiv. Hieraus lässt sich

folgern, dass die Anzahl der Substituenten mit der Induktion von DNA-Schäden positiv korreliert, d.h. bei drei Substituenten sieht man mehr DNA-Schäden als bei zwei oder einem Substituenten. Bei Vergleich der Art der Substituenten (Hydroxy ↔ Methoxy) deutet sich an, dass die DNA-Schäden bei Hydroxygruppen höher sind als bei Methoxygruppen (Vergleich Del mit Mv und Cy mit Pn).

4.5 Zusammenfassende Diskussion der Ergebnisse zu den Anthocyanidinen

In Tab. 7 ist ein Überblick über die Ergebnisse zu den Untersuchungen an der Topoisomerase I und der Topoisomerase IIα und IIβ aufgelistet, sowie die Daten zur Interkalation bzw. Bindung an die kleine Furche der DNA und die Induktion von DNA-Schäden in HT29 Kolonkarzinomzellen nach einstündiger Inkubation mit den Anthocyanidinen.

Tab. 7: Zusammenstellung der Ergebnisse zu den Anthocyanidinen.

	Delphinidin	Cyanidin	Pelargonidin	Paeonidin	Malvidin
Topo I katalytische Hemmung	Hemmung ab 2,5 µM	Hemmung ab 5 µM	k. H. bis 100 µM	k. H. bis 100 µM	k. H. bis 100 µM
Topo I Cleavable Complex Stabilisierung	Negativ	Negativ	n. t.	n. t.	Negativ
Topo I Verminderung Cpt-vermittelter Stabilisierung	Vollständige Hemmung ab 5 µM	Vollständige Hemmung ab 5 µM	n. t.	n. t.	Kein Effekt bis 100 µM
Topo IIα/β katalytische Hemmung	Vollständige Hemmung ab 7,5 µM	Vollständige Hemmung ab 7,5 µM	k. H. bis 100 µM	k. H. bis 100 µM	k. H. bis 100 µM
Topo IIα/β Cleavable Complex Stabilisierung	Negativ	Negativ	n. t.	n. t.	Negativ (Cleavageassay)
Topo IIα/β Verminderung VP-16-vermittelter Stabilisierung	Kein Effekt bis 100 µM	Kein Effekt bis 100 µM	n. t.	n. t.	Kein Effekt bis 100 µM
Interkalation / Verdrängung von EtBr EC_{50} [µM]	13,7 ± 1,5	42,0 ± 4,5	19,8 ± 2,1	> 50	33,4 ± 1,8
Bindung an die kleine Furche / Verdrängung von H 33258 EC_{50} [µM]	15,2 ± 1,9	43,5 ± 2,0	15,3 ± 2,0	38,1 ± 3,4	28,0 ± 2,3
Signifikante Induktion von DNA-Schäden	50 µM	50 µM	50 µM	50 µM	50 µM
Tail Intensity bei 150 µM Konzentration	16,3 ± 4,2 %	4,2 ± 1,6 %	2,7 ± 0,6 %	4,4 ± 1,6 %	6,4 ± 2,7 %

n. t. nicht getestet; k. H. keine Hemmung; EC_{50} Konzentration bei der der Messwert 50% der Kontrolle beträgt.

Von den fünf getesteten Anthocyanidinen sind lediglich die Analoga mit vicinalen Hydroxygruppen im B-Ring, Cy und Del, effektive Hemmstoffe humaner Topoisomerase I und Topoisomerase II, ohne zwischen den Isoformen IIα und IIβ zu diskriminieren. Ab einer Konzentration von 5 µM hemmen Cy und Del fast vollständig die katalytische Aktivität von Topoisomerase I und IIα + IIβ. Vergleicht man Cy und Del mit den effektivsten Topoisomerasehemmstoffe aus den anderen Flavonoidklassen, EGCG und Quercetin, so

zeigen diese ebenfalls Topoisomerasehemmung ab Konzentrationen von 2 bis 5 µM [Austin et al. 1992, Suzuki et al. 2001]. Die Anthocyanidine Cy und Del gehören also zu den potentesten Topoisomerasehemmstoffen aus der Klasse der Flavonoide. Für ein Grossteil der topoisomerasehemmenden Flavonoide ist eine Wirkung als Topoisomerasegift beschrieben, u.a. auch für Quercetin und EGCG [Austin et al. 1992, Boege et al. 1996]. Im Gegensatz dazu zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass Del und Cy nicht als Topoisomerasegifte wirken, d.h. sie stabilisieren nicht das kovalente Enzym-DNA-Intermediat (Cleavable Complex), sondern stellen vermutlich rein katalytische Topoisomeraseinhibitoren dar. Für Cy und Del konnte mittels rekombinanter Topoisomerase I gezeigt werden, dass bereits Konzentrationen von 5 µM ausreichen, um die Stabilisierung des Cleavable Complex durch 100 µM Camptothecin komplett zu verhindern. Niedrige Konzentrationen von Cy und Del könnten somit sogar eine „Schutzfunktion“ für die DNA vor Topoisomerase I-Giften erfüllen. Um zu überprüfen, ob diese Wirkung auch relevant für die DNA im zellulären System ist, könnten Versuche zur DNA-schädigenden Wirkung von Camptothecin bei Koinkubation mit Del oder Cy erfolgen. Anschließend sollten die DNA-Schäden nach der Koinkubation im Comet-Assay bestimmt werden. Im Gegensatz zur Topoisomerase I, können Cy und Del nicht die Stabilisierung des Cleavable Complex der Topoisomerase II durch Etoposid verhindern, gleichwohl stellen sie jedoch effektive Hemmstoffe der Topoisomerase II dar. Eine Mögliche Erklärung könnte sein, dass die Verbindungen entweder im katalytischen Zyklus der Topoisomerase II nach Ausbildung des Cleavable Complex eingreifen, oder beispielsweise in der gleichen Bindungsregion am Enzym wie Etoposid interagieren, jedoch mit geringerer Affinität. Beide Thesen würden zu den beobachteten Effekten passen. Zur Klärung welche Schritte im katalytischen Zyklus der Topoisomerase II beeinflusst werden könnte insbesondere ein Vergleich mit anderen Topoisomerasegiften oder katalytischen Hemmstoffen wie z.B. ICRF-187 von Interesse sein. ICRF-187 verknüpft die ATPase-Regionen der Topoisomerase II und hemmt somit den Transport des DNA-Stranges (T-Segment) und eine Rückformierung des Enzyms für einen neuen katalytischen Zyklus [Classen et al. 2003].

Für alle getesteten Anthocyanidine konnte gezeigt werden, dass sie im niedrigen mikromolaren Bereich (zwischen 15 µM und 50 µM) sowohl als Ligand an die kleine Furche der DNA binden, als auch in die DNA interkalieren können. Da sich beispielsweise Del und Pg in ihrem Verhalten bezüglich der Interkalation und Bindung an die kleine Furche fast identisch verhalten, Pg jedoch bis 100 µM keine Hemmung der Topoisomerase I oder II zeigt, kann man daraus folgern, dass diese DNA-interagierenden Eigenschaften keinen Beitrag zur

Topoisomerasehemmung durch Anthocyanidine leisten. Auch gibt es keine eindeutige Korrelation zwischen Substitutionsmuster und DNA-Interkalation/Bindung an die kleine Furche oder Topoisomerasehemmung und Interkalation/Bindung an die kleine Furche. Dies stimmt mit Ergebnissen von Webb und Ebeler [2004] recht gut überein. Die Autoren zeigten, dass Flavonoide anderer Flavonoidklassen teilweise ebenfalls topoisomerasehemmende und auch DNA interkalative Eigenschaften besitzen, jedoch keine eindeutige Korrelation zwischen der Topoisomerasegiftung und Interkalation besteht (Bestimmtheitsmaß R^2 = 0,213). Auch wenn im Falle der Anthocyanidine die direkte DNA-Interaktion im Hinblick auf die Topoisomerasehemmung nur von geringer Bedeutung ist, so scheint sie jedoch eine Rolle für die DNA-Integrität in lebenden Zellen zu spielen. Die einstündige Inkubation von HT29 Kolonkarzinomzellen zeigt, dass bei Inkubation mit Konzentrationen >50 µM signifikant DNA-Schäden induziert werden. Hier erweist sich Del als potenteste Verbindung mit einem TI-Wert von 16,3 ± 4,2% bei einer Inkubation von 150 µM. Bezüglich der beobachteten DNA-Schäden bei einer Konzentration von 150 µM kann folgende Reihe, mit abnehmender Potenz, aufgestellt werden: Del >> Mv > Cy ≅ Pn > Pg. Da die Induktion von DNA-Schäden bei allen getesteten Anthocyanidinen zu beobachten ist, ist es unwahrscheinlich, dass diese Schäden topoisomerasevermittelt sind, da zum einen Cy und Del nicht als Topoisomerasegifte wirken und zum anderen die nicht topoisomerasehemmenden Analoga ebenfalls DNA-Schäden induzieren. Wahrscheinlicher ist, dass bei hohen Substanzkonzentrationen eine Interaktion der Verbindungen mit der DNA (Interkalation/Bindung an die kleine Furche) zur Induktion der DNA-Schäden führt. Ebenfalls wäre es möglich, dass in solch hohen Substanzkonzentrationen pro-oxidative Effekte zu einer DNA-Schädigung beitragen könnten. Im Hinblick auf die Integrität der DNA von Zellen scheint also der verwendete Konzentrationsbereich von entscheidender Bedeutung.

Demnach stellt sich die Frage, ob diese *in-vitro*-Befunde relevant bezüglich der *in-vivo*-Situation sind, insbesonders im Hinblick auf die Lebensmittelsicherheit. Wie bereits in Kap. 2.5.2 erläutert, sind die Anthocyane relativ schlecht bioverfügbar. Wenn jedoch berücksichtigt wird das, trotz der schlechten Bioverfügbarkeit, immer noch Plasmaspitzenkonzentrationen von bis zu 1 µM erreicht werden [Kay et al. 2004], so liegt dieser Wert bereits in einem topoisomerasehemmenden Konzentrationsbereich. In wie weit jedoch die „normale“ Topologie zellulärer DNA beeinträchtigt wird, oder die Konsequenzen hieraus, bleiben unklar. Bei Vorgängen wie Beispielsweise Replikation, Reparatur oder Transkription sind Topologieänderungen essentiell. Auf der einen Seite liegen eine geringe systemische Konzentration der Verbindungen und eine geringe Aufnahmerate vor, andererseits muss

jedoch die lokale Situation im Gastrointestinaltrakt berücksichtigt werden. Hier könnten möglicherweise lokal wesentlich höhere Konzentrationen auftreten, insbesondere im Hinblick auf die Aufnahme von hoch konzentrierten Anthocyanzubereitungen durch Nahrungsergänzungsmittel. Hierbei sind lokale Konzentrationen nicht auszuschließen, bei denen die beschriebenen zellulären Effekten (z.B. DNA-Strangbrüche) beobachtet werden könnten. Über lokale Konzentrationen nach Aufnahme hoher Anthocyanmengen ist bis dato noch nichts bekannt. Hingegen bei einer Aufnahme von Anthocyanen in verzehrsüblichen Mengen, ist es eher unwahrscheinlich, dass DNA-strangbrechende Konzentrationen, sowohl systemisch als auch lokal, erreicht werden.

4.6 Untersuchungen zur TDP1

Die Tyrosyl-DNA-Phosphodiesterase 1 (TDP1) ist in der Lage, die Topoisomerase-DNA-Bindung zu hydrolysieren und somit das kovalent gebundene Enzym von der DNA zu lösen. Eine mögliche Konsequenz wäre eine Verringerung des DNA-strangbruchinduzierenden Potentials von Topoisomerasegiften. Dies würde voraussetzen, dass das Enzym eine Rolle in der „Reparatur" von Cleavable-Complex-vermittelten DNA-Strangbrüchen spielt. Im Rahmen dieser Arbeit sollte der Einfluss der TDP1 auf die DNA-schädigende Wirkung von Topoisomerasegiften untersucht werden. Der Arbeitsgruppe von Prof. Boege (Universitätsklinikum Düsseldorf) gelang die stabile Transfektion einer Zelllinie welche ein GFP-TDP1-Fusionsprotein überexprimiert. Im Rahmen einer Kooperation wurden uns folgende Zelllinien zur Verfügung gestellt:

- HEK 293: humane embryonale Nierenzelllinie (Parentalklon).
- HEK 293-GFP (**HEK-GFP**): Überexprimiert das „Green Fluorescent Protein".
- HEK 293-GFP-hTDP1 (**HEK-TDP1**): Überexprimiert ein Fusionsprotein aus GFP und der humanen Tyrosyl-DNA-Phosphodiesterase 1 (hTDP1).
- HEK 293-GFP-hTDP1-H263A (**HEK-H263A**): Überexprimiert ein Fusionsprotein aus GFP und hTDP1, wobei im katalytischen Zentrum der hTDP1 das Histidin 263 durch Alanin ersetzt ist ($TDP1^{H263A}$). Diese Variante ist katalytisch inaktiv.

Im der vorliegenden Arbeit sollte nun untersucht werden, ob TDP1 ein relevantes Reparaturenzym für Topoisomerasegift-vermittelte Strangbrüche und Zytotoxizität darstellt.

In den nächsten beiden Kapiteln werden die Ergebnisse zur Wachstumshemmung und Induktion von DNA-Schäden durch Topoisomerasegifte vorgestellt.

4.6.1 Wachstumsbeeinflussung durch Topoisomerasegifte an TDP1 überexprimierenden Zellen

Die Untersuchung der Wachstumsbeeinflussung durch Topoisomerasegifte an den Zelllinien HEK 293, HEK-GFP und HEK-TDP1 wurde mittels des MTT-Zytotoxizitätstests durchgeführt. Die Zellen wurden nach einer 48-stündigen Anwachsphase für 72 Stunden mit den Testsubstanzen inkubiert. Als Testsubstanzen wurden das Topoisomerase I-Gift Camptothecin und das Topoisomerase II-Gift Etoposid verwendet. Da die TDP1 normalerweise die 3'-Tyrosin-DNA-Phosphodiesterbindung hydrolysiert könnte die erhöhte TDP1 Expression, bei Inkubation mit Camptothecin, möglicherweise in einer verminderten Zytotoxizität resultieren. Camptothecin stabilisiert den kovalenten Komplex der Topoisomerase I mit der DNA, wobei das Enzym über einen 3'-Tyrosin-Phosphodiester an die DNA gebunden ist. Das Topoisomerasegift Etoposid stabilisiert den Cleavable-Complex mit der Topoisomerase II, welcher über eine 5'-Tyrosin-Phosphodiesterbindung verläuft. In Abb. 49 ist die Wachstumshemmung durch Camptothecin an den Zelllinien HEK 293, HEK-GFP und HEK-TDP1 dargestellt.

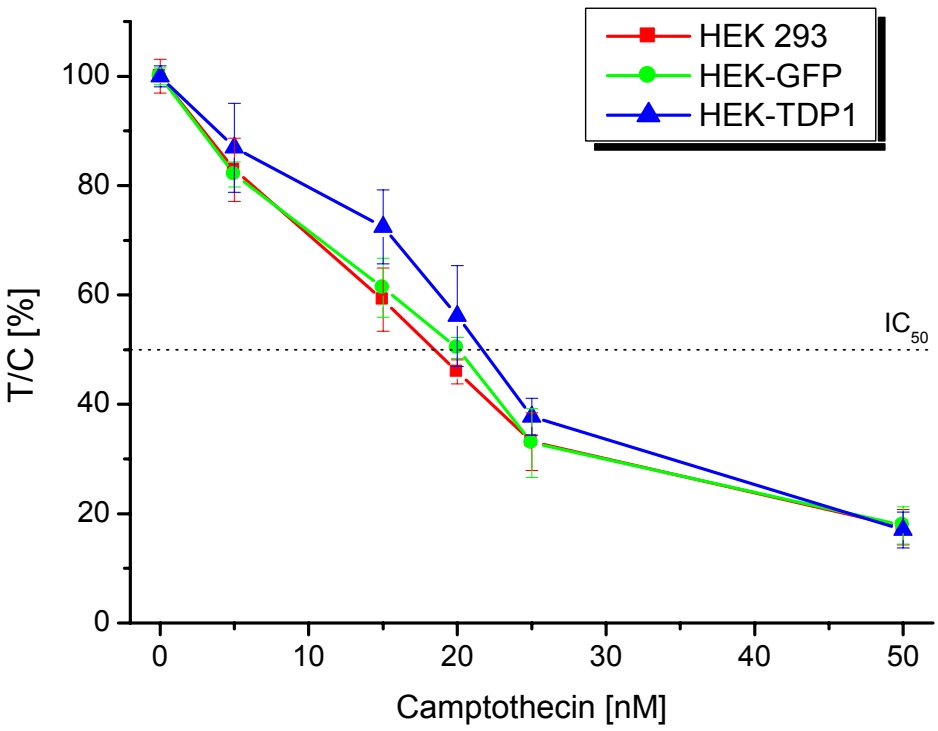


Abb. 49: MTT-Test mit 72-stündiger Inkubation Camptothecin. (n = 4-6)

Die Graphen für die Wachstumshemmung durch Camptothecin an den Zelllinien HEK 293 (Abb. 49, rot) und HEK-GFP (Abb. 49, grün) liegen fast übereinander. Die Zelllinie HEK-TDP1 (Abb. 49, blau), die das TDP1-Protein überexprimiert, liegt etwas oberhalb der beiden Vergleichszelllinien. Die IC_{50}-Werte liegen alle im niedrigen nanomolaren Bereich, mit 18,5 ± 1,6 nM für HEK 293 und 19,6 ± 1,1 nM für die HEK-GFP-Zelllinie. Der IC_{50}-Wert für die HEK-TDP1-Zelllinie liegt mit 21,6 ± 1,1 nM nur unwesentlich höher, was möglicherweise auf einen leichten Reparatur-/Resistenzeffekt der TDP1 hinweisen könnte. Da die IC_{50}-Werte aller drei Zelllinien in etwa dem gleichen Bereich liegen, unterscheiden sich die Werte nicht signifikant untereinander. Dieses Ergebnis schließt jedoch nicht zwangsläufig einen vermindernden Einfluss von TDP1 auf Camptothecin-vermittelte Strangbrüche aus, da für die zytotoxische Wirkung auch andere Effekte, wie z.B. Induktion von Apoptose über diverse Signalwege, eine Rolle spielen können. Die Inkubation der Zelllinien mit dem Topoisomerase II-Gift Etoposid ist in Abb. 50 gezeigt.

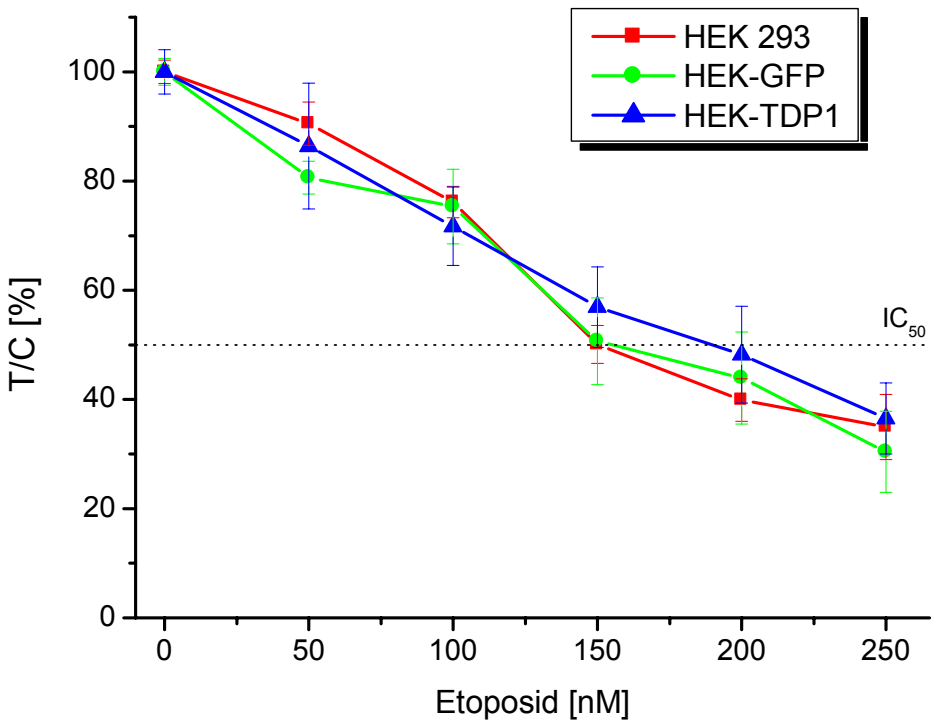


Abb. 50: MTT-Test mit 72-stündiger Inkubation Etoposid. (n = 4-6)

Auch bei der in Abb. 50 dargestellten Inkubation mit Etoposid ist der Verlauf der Graphen für die Zelllinien HEK 293 und HEK-GFP fast identisch. Im Konzentrationsbereich unter 100 nM verläuft auch der Graph für die HEK-TDP1-Zellinie identisch mit den beiden Kontrollzelllinien. Bei Konzentrationen über 100 nM deutet sich ansatzweise ein ähnlicher Effekt wie bei der Inkubation mit Camptothecin an. Der Graph für die HEK-TDP1 verläuft etwas oberhalb der Graphen von HEK 293 und HEK-GFP. Die IC_{50}-Werte für die Inkubationen mit Etoposid liegen im nanomolaren Bereich, mit 156 ± 24 nM für HEK 293, 173 ± 28 nM für HEK-GFP und 190 ± 25 nM bei Inkubation der HEK-TDP1-Zelllinie. Vergleicht man den Verlauf der Graphen inklusive der Fehlerbalken, so kann man sagen, dass sich die IC_{50}-Werte auch hier nicht wirklich unterscheiden. Man kann hier allenfalls von einem tendenziellen Reparatur-/Resistenzeffekt ausgehen, was so aus dem in der Literatur beschriebenen Wirkmechanismus der TDP1 nicht zu erwarten war, da bei der Topoisomerase II eine 5'-Tyrosin-Phosphodiesterbindung ausgebildet wird. Im Folgenden sollte der Einfluss der TDP1 auf das DNA-schädigende Potential von Camptothecin und Etoposid in Kurzzeitinkubationen untersucht werden.

4.6.2 Induktion von DNA-Schäden durch Topoisomerasegifte an TDP1 überexprimierenden Zellen

Mit Hilfe der Einzelzellgelelektrophorese (Comet-Assay) sollte, das DNA-strangbrechende Potential von Topoisomerasegiften an den HEK-Zelllinien untersucht werden. Der hauptsächliche Wirkmechanismus von Topoisomerasegiften beruht auf der Induktion von DNA-Schäden und den dadurch ausgelösten programmierten Zelltod, die Apoptose. Zusätzlich zu den Zelllinien HEK 293, HEK-GFP und HEK-TDP1 wurde noch die Zelllinie HEK-H263A untersucht. Diese Zelllinie überexprimiert ebenfalls das TDP1-Protein, jedoch ist in dieser Variante das katalytische Histidin an Position 263 durch Alanin ersetzt ($TDP1^{H263A}$), wodurch das Protein katalytisch nicht mehr aktiv ist. Zusätzlich zu den Topoisomerasegiften Camptothecin und Etoposid wurden das 1-Methyl-3-nitro-nitrosoguanidin (MNNG), getestet. MNNG induziert durch Methylierung, z.B. am N7 des Guanin, DNA-Strangbrüche und alkali-labile Stellen, also über einen nicht topoisomeraseabhängigen Mechanismus [Horathova et al. 1999]. Abb. 51 zeigt die Ergebnisse des Comet-Assay nach einer einstündigen Inkubationszeit der vier Zelllinien mit den Testsubstanzen.

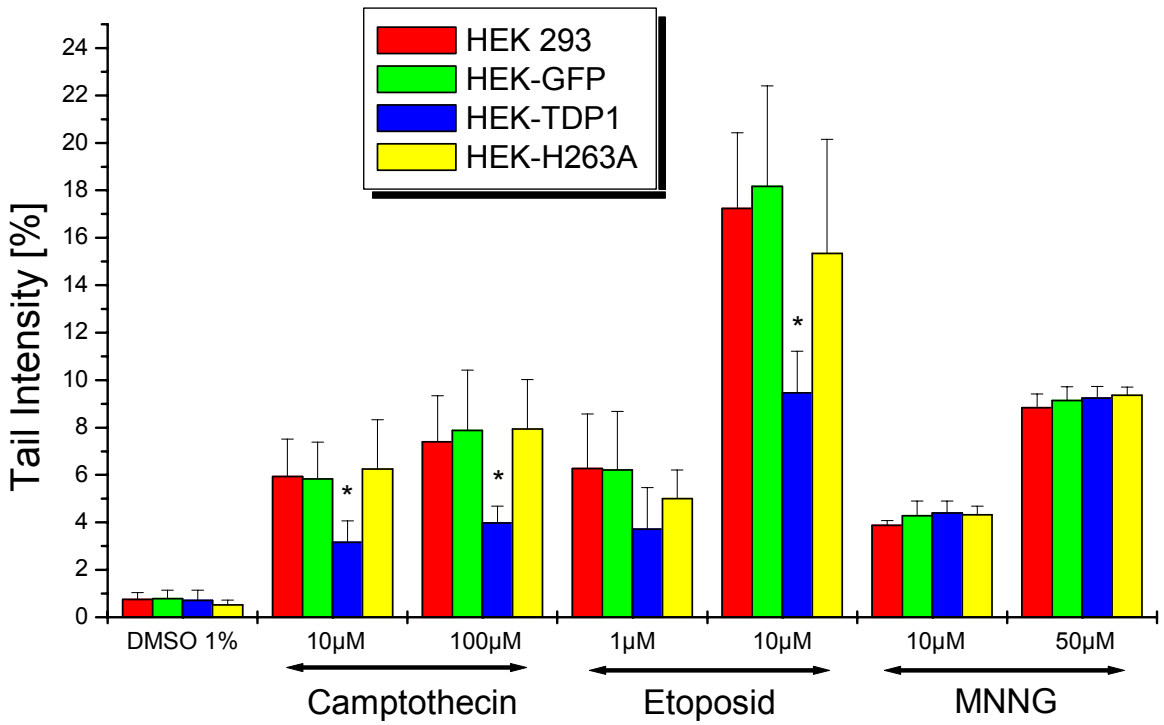


Abb. 51: DNA-Schäden nach einstündiger Inkubation der HEK-Zelllinien. Gezeigte Signifikanzen berechnet für die HEK-TDP1-Zelllinie gegen HEK 293, HEK-GFP und HEK-H263A. (Signifikanzlevel * $p<0,05$; n = 4-8)

Alle Inkubationen zeigen eine signifikante Erhöhung ($p<0,01$) der DNA-Schäden im Vergleich zur jeweiligen 1% DMSO-Kontrolle (Signifikanzen nicht gezeigt, berechnete Werte siehe Anhang). Bei Inkubation mit Camptothecin erkennt man bereits bei einer Konzentration von 10 µM eine signifikante Verringerung der DNA-Schäden an der HEK-TDP1-Zelllinie, jeweils verglichen mit HEK 293 ($p=0,021$), HEK-GFP ($p=0,024$) und HEK-H263A ($p=0,015$). Wird die Konzentration auf 100 µM Camptothecin erhöht, zeigt sich lediglich eine leichte Zunahme der DNA-Schäden, im Mittel von 6% Tail Intensity (TI) für HEK 293, HEK-GFP und HEK-H263A bei 10 µM, auf etwa 8% TI bei 100 µM Camptothecin. Auch bei Inkubation mit 100 µM Camptothecin ist deutlich die Reduktion der DNA-Schäden bei der HEK-TDP1-Zelllinie gegenüber den Vergleichszelllinien erkennbar (Abb. 51). Bei Inkubation mit 1 µM Etoposid deutet sich ein ähnlicher Effekt, eine Verringerung der DNA-Schäden an der HEK-TDP1 gegenüber den drei anderen Zelllinien, an. Jedoch ist die Verringerung bei 1 µM Etoposid nicht signifikant. Die Inkubation mit 10 µM Etoposid zeigt eine signifikante Verringerung der DNA-Schäden bei HEK-TDP1 im Vergleich zu HEK 293 ($p=0,002$), HEK-GFP ($p=0,004$) und auch HEK-H263A ($p=0,03$). Im Mittel lagen dabei die DNA-Schäden der drei Zelllinien bei 16,9% TI und zeigten bei der

erhöhten Expression der aktiven TDP1 eine Reduktion auf 9,5% TI. Die DNA-Schäden bei Inkubation mit MNNG lagen bei allen 4 getesteten Zelllinien im gleichen Bereich. Für die 10 µM Inkubation mit MNNG liegen die Schäden im Mittel bei 4,2% TI und stiegen bei Erhöhung der MNNG-Konzentration (50 µM) auf durchschnittlich 9,1% TI. Abb. 52 zeigt einige repräsentative Bilder von Kometen nach Inkubation der vier Zelllinien mit der Lösungsmittelkontrolle DMSO (1%) sowie mit 100 µM Camptothecin (Cpt), 10 µM Etoposid (VP-16) und 50 µM MNNG. Die Ethidiumbromid-Fluoreszenzintensität wird zur besseren Visualisierung und Kontrolle von dem Auswerteprogramm (hier Comet-Assay II, Perceptive Instruments, UK) in verschiedenen Farben dargestellt.

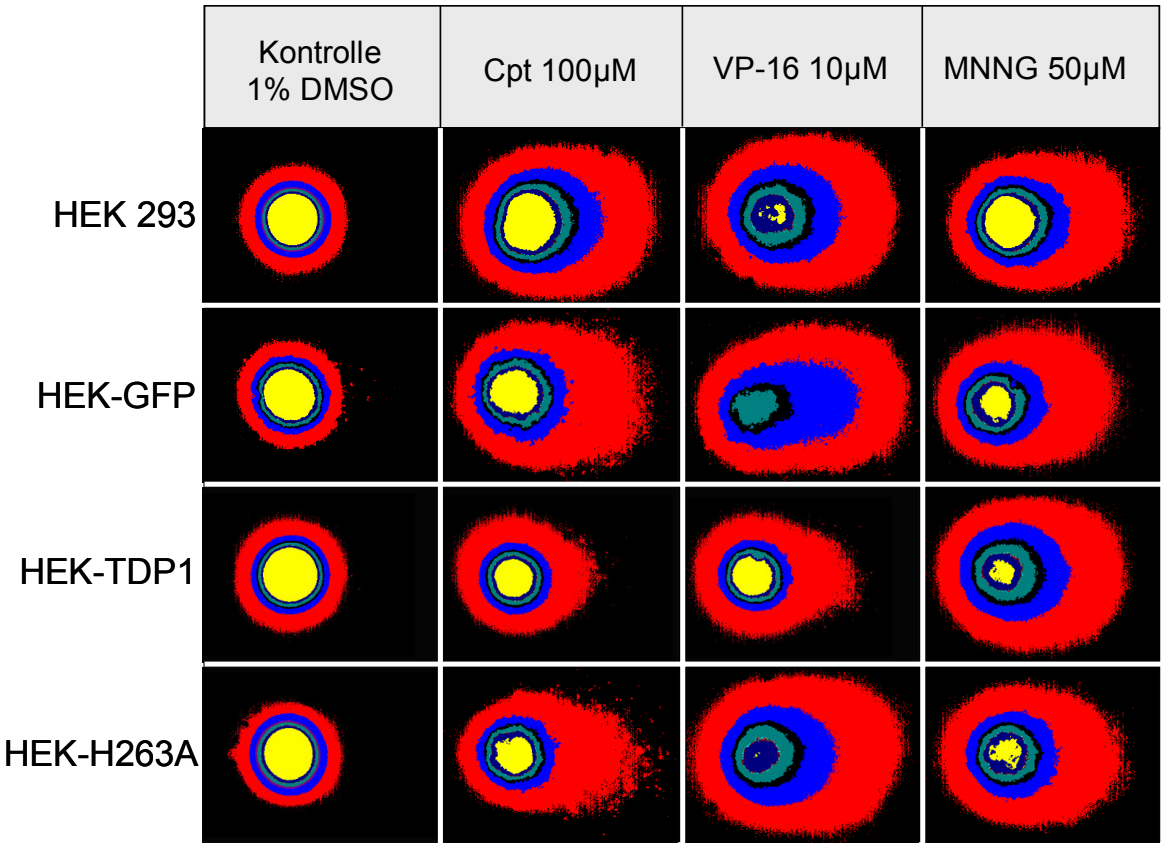


Abb. 52: DNA-Schäden nach einstündiger Inkubation der HEK-Zelllinien. Exemplarische Fehlfarbenbilder typischer Kometen. Ethidiumbromid-Fluoreszenzintensitäten werden durch das Auswerteprogramm (Comet-Assay II, Perceptive Instruments, UK) in Fehlfarben dargestellt. Die Fluoreszenzintensität wird in absteigender Reihenfolge in gelb, dunkelblau, petrol, schwarz, hellblau und rot dargestellt. (n=4-8)

Die Inkubation der vier Zelllinien für 1 h mit 1% DMSO zeigt keine DNA-Schäden, die DNA erscheint im Fluoreszenzmikroskop nach Anfärben mit Ethidiumbromid als runder Fleck.

Werden in den Zellen DNA-Strangbrüche induziert, wie bei den Inkubationen mit Camptothecin, Etoposid und MNNG, entstehen DNA-Fragmente, die bei der Elektrophorese im Agarosegel auf dem Objektträger weiter wandern als eine intakte, hochmolekulare DNA. Im Fluoreszenzmikroskop erscheint das typische Bild eines Kometen. Vergleicht man die Kometen in Abb. 52 bei der HEK-TDP1-Zelllinie nach Inkubation mit Camptothecin oder Etoposid mit den Kometen der anderen drei Zelllinien, so erkennt man eine deutliche Verringerung des Kometenschweifes bei der HEK-TDP1-Zelllinie. Bei der Inkubation mit Etoposid erkennt man sogar bei HEK 293, HEK-GFP und HEK-H263A, aufgrund der starken DNA-Schäden und der Fragmentierung, dass die Intensität im Kometenkopf so weit abnimmt, dass sie nicht mehr mit Gelb dargestellt wird, im Gegensatz zur HEK-TDP1 (siehe Abb. 52, Spalte 3 VP-16). Wie auch aus der graphischen Darstellung in Abb. 51 ersichtlich, zeigen die Bilder nach Inkubation aller vier Zelllinien mit 50 µM MNNG kaum Unterschiede, da die DNA-Schäden alle im gleichen TI-Bereich liegen (Abb. 52, Spalte 4 MNNG).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine katalytisch aktive TDP1 eine wichtige Rolle bei der Reparatur von Topoisomerase I-DNA-Addukten spielt. Eine eindeutige Resistenz gegen die Topoisomerasegifte (Camptothecin und Etoposid) ist im MTT-Test nicht erkennbar, was vermutlich an der durch die lange Inkubationszeit bedingten hohen Rate an DNA-Schäden liegen könnte. Hier könnten vielleicht kürzere Inkubationszeiten bei gleichzeitiger Erhöhung der Konzentration der Topoisomerasegifte ein eindeutigeres Ergebnis aufzeigen. Die TDP1 könnte nicht nur eine Rolle bei der Verhinderung von DNA-Schäden oder Reparatur der letalen Komplexe spielen, sondern auch noch eine bislang unbekannte „Entscheidungs-/Signalfunktion“ über Leben und Tod der Zelle, eine These die auch von Liu et al. [2004] und Barthelmes et al. [2004] formuliert wurde. Dies würde bedeuten, dass bei einer geringen Menge an Topoisomerase-DNA-Komplexen eine Reparatur erfolgen könnte, wohingegen bei einer hohen Rate dieser Komplexe eher pro-apoptotische Signale ausgelöst werden. Deutlich zeigt sich die Rolle der Reparatur bei der Kurzzeitinkubation mit dem Topoisomerasegift Camptothecin bei Bestimmung der DNA-Schäden im Comet-Assay. Die erhöhte TDP1 Expression in der HEK-TDP1-Zelllinie resultiert in einer signifikanten Verminderung der DNA-Schäden, verglichen mit den Zelllinien HEK 293, HEK-GFP und HEK-H263A. Unterstützt werden diese Beobachtungen durch Untersuchungen sowohl von Barthelmes et al. [2004], die zeigen konnten, dass man durch Inkubation mit Camptothecin stark TDP1-überexprimierende Zellen selektionieren kann, als auch durch Untersuchungen von Nivens et al. [2004] die zeigen, dass eine TDP1-Überexpression zu einer Resistenz der transformierten

Zellen gegen Camptothecin führt. Erstaunlicherweise zeigte sich in der vorliegenden Arbeit auch bei der Inkubation mit dem Topoisomerase II-Gift Etoposid, welches ursprünglich als Negativkontrolle gedacht war, eine ebenfalls deutliche Reduktion der DNA-Schäden bei einer Überexpression der TDP1. Diese Ergebnisse deuten erstmals darauf hin, dass die TDP1 auch eine Rolle bei der Reparatur von Topoisomerase II-vermittelten DNA-Schäden besitzt, jedoch ist ihre Funktion dabei noch unklar. Die Untersuchungen mit der katalytisch inaktiven Mutante $TDP1^{H263A}$ zeigen eindeutig, dass diese „Reparatureffekte“ mit der katalytischen Aktivität des Proteins verknüpft sind. In diesem Fall ist kein Unterschied zur Parentalzelllinie HEK 293 oder HEK-GFP im Comet-Assay auszumachen. Jedoch kann man nicht davon ausgehen, dass die erhöhte TDP1-Expression zu einer generellen „Resistenz“ gegenüber DNA-schädigenden Agenzien oder Induktion von Reparaturenzymen führt, da die TDP1-Expression keinen Einfluss auf die MNNG-induzierten DNA-Schäden hat. Es findet vermutlich also keine „Hochregulation“ DNA-reparierender Enzyme statt. Bei allen getesteten Zelllinien werden durch MNNG sowohl bei 50 µM als auch 100 µM im gleichen Maße, konzentrationsabhängig, DNA-Schäden induziert. Jedoch könnte die TDP1 eine Rolle bei Tumoren spielen, die eine Resistenz gegen die bei der Chemotherapie eingesetzten Topoisomerasegifte entwickeln. Hierbei wäre interessant die TDP1-Expression in verschiedenen Tumoren nach Behandlung mit chemotherapeutisch genutzten Topoisomerasegiften zu untersuchen, insbesondere ob eine Resistenz des Tumors in Zusammenhang steht mit einer TDP1-Expression. Demnach könnte das Ziel weiterer Forschungen sein, spezifische TDP1-Hemmstoffe zu finden oder zu entwickeln. Die TDP1 könnte möglicherweise als Co-Target bei der chemotherapeutischen Behandlung mit Topoisomerasegiften genutzt werden, um eine Tumorresistenz zu umgehen oder um die Effektivität und Spezifität der Wirkstoffe zu erhöhen.

5 Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Anthocyanidine Delphinidin (Del), Cyanidin (Cy), Pelargonidin (Pg), Paeonidin (Pn) und Malvidin (Mv) hinsichtlich ihrer Beeinflussung humaner Topoisomerase I und II zu untersuchen. Ein Schwerpunkt lag bei der Aufklärung des Wirkmechanismus dieser Verbindungen bezüglich einer Stabilisierung des Cleavable Complex, möglichen Interaktionen mit der DNA und die Relevanz dieser Effekte für die Integrität zellulärer DNA.

Von den getesteten Anthocyanidinen zeigten Pn, Pg und Mv keine Hemmung der katalytischen Aktivität von Topoisomerase I aus MCF-7 Kernextrakt. Lediglich die Analoga mit vicinalen Hydroxygruppen am B-Ring, Del und Cy, bewirkten eine effektive Hemmung der Topoisomerase I im niedrigen mikromolaren Bereich. Untersuchungen zur Stabilisierung des Cleavable Complex mittels rekombinanter humaner Topoisomerase I zeigten, dass Del und Cy keine Topoisomerasegifte, sondern katalytische Inhibitoren sind. Del und Cy können bereits in topoisomerasehemmenden Konzentrationen (5 µM) die Stabilisierung des Cleavable Complex durch 100 µM Camptothecin komplett verhindern. Diese deutet auf eine Interaktion im katalytischen Zyklus der Topoisomerase hin, bevor der DNA-Strang geschnitten wird, und unterstützt die Einteilung der Verbindungen als rein katalytische Topoisomerase I-Inhibitoren. Del und Cy könnten möglicherweise sogar eine Schutzfunktion vor mit der Nahrung aufgenommenen Topoisomerase I-Giften besitzen.

Weiterhin wurden die Anthocyanidine auf die Beeinflussung humaner Topoisomerase IIα und IIβ getestet. Da sich bei den Untersuchungen herausstellte, dass keine Unterschiede in der Wirkung an Topoisomerase IIα und IIβ vorlagen, werden im Folgenden die Ergebnisse allgemein für Topoisomerase II zusammengefasst. Ähnlich wie bei der Topoisomerase I bewirken nur die Anthocyanidine mit vicinalen Hydroxygruppen im B-Ring, Del und Cy, eine effektive Hemmung der katalytischen Aktivität rekombinanter Topoisomerase II im niedrigen mikromolaren Konzentrationsbereich. Sowohl in einem zellfreien System mit rekombinanter Topoisomerase II und Plasmid-DNA, als auch in HEK 293 Zellen, bewirken Del und Cy keine Stabilisierung des Cleavable Complex der Topoisomerase IIα oder IIβ. Im Gegensatz zur Wirkung an der Topoisomerase I waren Del und Cy nicht in der Lage die Stabilisierung des kovalenten Enzym-DNA-Intermediates der Topoisomerase II durch Etoposid zu beeinflussen. Dies könnte bedeuten, dass die Beeinflussung von Del und Cy im katalytischen Zyklus der Topoisomerase II erst nach Einführung des DNA-Strangbruches erfolgt.

Für alle getesteten Anthocyanidine konnte gezeigt werden, dass sie im niedrigen mikromolaren Bereich, zwischen 15 µM und 50 µM, sowohl an die kleine Furche der DNA binden, als auch in die DNA interkalieren können. Da sich beispielsweise Del und Pg in ihrem Verhalten bezüglich der Interkalation und Bindung an die kleine Furche fast identisch verhalten, Pg jedoch bis 100 µM keine Hemmung der Topoisomerase I oder II zeigt, kann man daraus folgern, dass diese DNA-interagierenden Eigenschaften keinen wesentlichen Beitrag zur Topoisomerasehemmung durch die Anthocyanidine leisten.

Auch wenn im Falle der Anthocyanidine die direkte DNA-Interaktion im Hinblick auf die Topoisomerasehemmung nur von geringer Bedeutung ist, so scheint sie jedoch relevant bezüglich der Integrität zellulärer DNA zu sein. Die einstündige Inkubation von HT29 Kolonkarzinomzellen zeigte, dass bei Inkubation mit den Anthocyanidinen in Konzentrationen >50 µM, signifikant DNA-Schäden induziert werden. Für die Potenz, DNA-Schäden bei 150 µM zu induzieren kann folgende Reihe (mit abnehmender Potenz) aufgestellt werden: Del >> Mv > Cy ≅ Pn > Pg.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Del und Cy potente Hemmstoffe humaner Topoisomerasen sind. Sie wirken jedoch nicht wie die klassischen Topoisomerasegifte Camptothecin oder Etoposid über die Stabilisierung des kovalenten Topoisomerase-DNA-Komplexes, sondern stellen rein katalytische Inhibitoren dar. Del und Cy könnten sogar die DNA vor Topoisomerase I-Giften schützen, da sie zumindest am isolierten Enzym die Stabilisierung des Cleavable Complex der Topoisomerase I durch Camptothecin effektiv verhindern. Bei höheren Substanzkonzentrationen (>50 µM) gewinnt vermutlich der DNA-interagierende Effekt zunehmend Bedeutung, was sich in der Induktion von DNA-Schäden äußert. Im Hinblick auf die Integrität der DNA lebender Zellen scheint der jeweilige Konzentrationsbereich von entscheidender Bedeutung zu sein.

Ein weiterer Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit war es, den Einfluss der Überexpression der Tyrosyl-DNA-Phosphodiesterase 1 (TDP1) nach Inkubation mit Topoisomerasegiften zu untersuchen. Die TDP1 ist in der Lage, die 3'-Tyrosin-DNA-Phosphodiesterbindung zu hydrolysieren und somit die kovalent gebundene Topoisomerase von der DNA zu lösen. Die TDP1 könnte somit eine Reparaturfunktion bei der Stabilisierung des kovalenten Topoisomerase-DNA-Komplexes erfüllen. Untersuchungen zum Zellwachstum von HEK 293 Zellen mittels MTT-Zytotoxiziätsassay zeigten nach 72 stündiger Inkubation mit den Topoisomerasegiften Camptothecin (Topo I) und Etoposid (Topo II) keinen signifikanten Wachstumsvorteil bei Überexpression der TDP1. Betrachtet man jedoch die Induktion von

DNA-Schäden bei Kurzzeitinkubationen (1h) von Camptothecin im Comet-Assay, so erkennt man eine signifikante Reduktion der DNA-Schäden bei Überexpression der TDP1. Ist bei der TDP1 das katalytische Histidin 263 gegen Alanin ausgetauscht, steigen die DNA-Schäden auf das gleiche Niveau wie bei nicht TDP1-überexprimierenden Zellen, d.h. es findet keine Reparatur statt. Daraus lässt sich folgern, dass das Histidin 263 essentiell für die Reparaturfunktion der TDP1 ist. Erstaunlicherweise zeigte sich auch bei der Inkubation mit dem Topoisomerase II-Gift Etoposid, welches ursprünglich als Negativkontrolle gedacht war, der gleiche Reparatureffekt. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die TDP1 auch eine Rolle bei der Reparatur von Topoisomerase II-vermittelten DNA-Schäden besitzt, jedoch ist der genaue Mechanismus noch unklar. Untersuchungen mit dem DNA-methylierenden Agens 1-Methyl-3-nitro-nitrosoguanidin (MNNG) deuten darauf hin, dass keine „Hochregulation" DNA-reparierender Enzyme stattfindet, da hier bei allen getesteten Zelllinien im gleichen Maße DNA-Schäden induziert werden. Jedoch könnte die TDP1 eine Rolle bei Tumoren spielen, die eine Resistenz gegen die bei der Chemotherapie eingesetzten Topoisomerasegifte entwickeln. Die nunmehr erzielten Ergebnisse eröffnen erstmals die Möglichkeit den Comet-Assay, unter Verwendung der unterschiedlichen TDP1-Klone, zum Auffinden von TDP1-Hemmstoffen einzusetzen. Das Ziel weiterer Forschungen könnte sein, spezifische TDP1-Hemmstoffe zu finden oder zu entwickeln, um die TDP1 als therapeutisches Co-Target bei der Chemotherapie zu nutzen.

6 Material und Methoden

6.1 Zellkultur

Alle sterilen Zellkulturmaterialien stammen von folgenden Firmen: Sarstedt, Greiner oder Nunc.

6.1.1 Verwendete Zelllinien

HT29 Zelllinie (ACC 299)

Die Tumorzelllinie HT29 wurde 1964 aus einem primären Kolon Adenokarzinom Tumor einer 44-jährigen kaukasischen Frau etabliert. Der Karyotyp der Zelle ist hypertriploid mit 17,5% Polyploidie. Die Verdopplungsdauer beträgt etwa 40-60 Stunden [DSMZ, Braunschweig].

MCF-7 Zelllinie (ACC 105)

1970 wurde aus dem pleuralen Erguss einer 69-jährigen Patientin mit metastasierendem Mammakarzinom, nach Strahlen- und Hormontherapie, die humane Zelllinie MCF-7 gewonnen [Soule et al. 1973]. Diese Mammakarzinomzelllinie ist gut differenziert und stellt ein etabliertes in-vitro Testsystem mit einer ungefähren Verdopplungsdauer von 50 Stunden dar. MCF-7 wachsen als Xenograft-Modell auf Nacktmäusen [Gottardis et al. 1988]. Der Karyotyp der Zelle ist hypotetraploid mit 8% Polyploidie [DSMZ, Braunschweig].

HEK 293 Zelllinien (ACC 305)

Die Zelllinie HEK 293 ist eine humane embryonale Nierenzelllinie, welche von Graham et al. [1977] durch Transformation mit einem Adenovirus Typ 5 generiert und etabliert wurde.

In der vorliegenden Arbeit wurden HEK 293-Zellen, welche verschiedene Proteine stabil überexprimieren, verwendet [Barthelmes et al. 2004].

- HEK 293-GFP (**HEK-GFP**): Überexprimiert das „Green Fluorescent Protein".
- HEK 293-GFP-hTDP1 (**HEK-TDP1**): Überexprimiert ein Fusionsprotein aus GFP und der humanen Tyrosyl-DNA-Phosphodiesterase 1 (hTDP1).
- HEK 293-GFP-hTDP1-H263A (**HEK-H263A**): Überexprimiert ein Fusionsprotein aus GFP und hTDP1, wobei im katalytischen Zentrum der hTDP1 das Histidin 263 durch Alanin ersetzt ist. Diese Variante ist katalytisch inaktiv.

Die Zelllinien HEK 293, HEK-GFP, HEK-TDP1 und HEK-H263A wurden freundlicherweise von Prof. Boege, Universitätsklinikum Düsseldorf, zur Verfügung gestellt.

6.1.2 Kultivierung von Zellen

Die oben beschriebenen Zelllinien werden als Monolayer in Kulturflaschen mit einer Fläche von 80 cm^2 oder 175 cm^2 im Brutschrank bei 37°C, 5% CO_2 und 95% rel. Luftfeuchtigkeit kultiviert. Unter diesen *in-vitro* Bedingungen müssen den Zellen essentielle Substanzen zugeführt und Abbauprodukte so lange wie möglich neutralisiert werden. Diese Aufgaben werden von dem Kulturmedium übernommen. Um die Zellen und das Medium vor eventuellem Bakterienbefall zu schützen, wird letzterem Antibiotika zugegeben. Als Medium wurden für die MCF-7 Zelllinie das 300 mg/l L-Glutamin-haltige RPMI-1640 (Gibco-Invitrogen #21875-034) verwendet, für die HT29 und HEK 293 Zelllinien DMEM (Gibco-Invitrogen #41965-039). Pro 500 ml Medium werden 50 ml hitzeinaktiviertes Fötales Kälber Serum (FKS), sowie 5 ml Penicillin/Streptomycin (10000 Einheiten / 10000 µg pro ml) zugesetzt. Zur Selektions- und Expressionskontrolle bei den HEK-GFP, HEK-TDP1 und HEK-H263A-Zelllinien wird dem Medium 0,4 µg/ml Puromycin (Sigma # P-8833) zugesetzt.

6.1.3 Passagieren von Zellen

Nachdem die Monolayerkulturen ein konfluentes Wachstum erreicht haben, wird das verbrauchte Medium abgesaugt. Der Zellrasen wird mit etwa 5 ml PBS gewaschen, um Mediumreste zu entfernen. Bei den HT29 und MCF-7 Zellen überschichtet man mit etwa 2-3 ml Trypsin-Lösung und inkubiert bei 37°C, bis ein Ablösen der Zellen zu erkennen ist. Die abgelösten Zellen werden in 8 ml frischem Medium aufgenommen, um das Trypsin zu inaktivieren. Die HEK-Zelllinien werden entweder durch starkes Klopfen an die Flasche

abgelöst, oder wird der Zellrasen für 30-180 Sekunden mit wenigen Millilitern PBS/EDTA inkubiert. Anschließend werden die abgelösten Zellen in frischem Medium resuspendiert. Je nach gewünschter Dichte und Wachstumsdauer wird ein Teil der Zellsuspension wieder in die Flasche zurückgegeben und mit 40 ml frischem Medium aufgefüllt. Nach 2-3 Passagen erfolgt die weitere Kultivierung in einer frischen Kulturflasche. Grundsätzlich ist darauf zu achten, dass Monolayer mit hoher Passagenzahl ihre physiologischen Eigenschaften stark verändern können. Daher sollten die Zelllinien von Zeit zu Zeit verworfen und neue Zellstocks in Kultur genommen werden [Lindl 2000].

10x PBS (phosphate buffered saline)

1710 mM NaCl

100 mM Na_2HPO_4

34 mM KCl

18 mM KH_2PO_4

Mit H_2O_{bidest} auffüllen, pH 7,4 ; auf 1x verdünnte Lösungen autoklavieren

PBS/EDTA

1x PBS

625 µM EDTA

Trypsin-Lösung

500 mg Trypsin (Rinderpankreas, 3,6 U/mg)

250 mg EDTA

100 ml 10x PBS

Mit H_2O_{bidest} auf 1000 ml auffüllen, über Nacht auf Eis rühren, pH-Wert überprüfen (7,0-7,4), steril filtrieren (Porengröße 0,22 µm) und aliquotieren (5 ml).

Lagerung bei -20°C

6.1.4 Zellzahlbestimmung

Die Zellzahlbestimmung erfolgt mittels der Neubauer-Zählkammer (Hämacytometer). Das Deckglas wird leicht angefeuchtet und so auf die Zählkammer gelegt das am Rand die sog. Newton'schen Ringe (regenbogenfarbene Schlieren) zu erkennen sind. Erst dann hat das Deckglas den exakten Abstand zur Zählkammer. Die Zellen werden, wie im vorigen

Abschnitt beschrieben, trypsiniert. 100 µl der Zellsuspension und werden mit 100 µl Trypanblau-Lösung versetzt, um tote Zellen blau anzufärben. Der Zwischenraum der Zählkammer wird mit dieser Suspension befüllt, indem man die Pipettenspitze an die Kante des Deckglases ansetzt, wobei die Kapillarkräfte die Suspension in den Zwischenraum saugen. Dabei ist darauf zu achten, dass nicht zu viel Lösung in die Kammer pipettiert wird, da ansonsten das auszuzählende Volumen nicht korrekt ist. Die Neubauer-Zählkammer besteht aus neun großen Quadraten. Jedes dieser Quadrate hat eine Fläche von 1 mm^2. Dies ergibt bei einer Tiefe von 0,1 mm ein Volumen von 0,1 µl. Es werden die vier Eck-Quadrate ausgezählt und die Zellzahl gemittelt. Dieser Mittelwert wird mit dem Verdünnungsfaktor 2 sowie mit 10^4 multipliziert. Daraus sich die Anzahl der Zellen pro Milliliter [Lindl 2000].

Trypanblau-Lösung

0,4%	Trypanblau
0,81%	NaCl
0,06%	KH_2PO_4

6.1.5 Einfrieren von Zellen

Die Zellen werden, wie in Kap. 6.1.3 beschrieben, abtrypsiniert und das Trypsin durch Zugabe von 8 ml frischem, serumhaltigem Medium inaktiviert. Die Zellsuspension wird in 1 ml Aliquote aufgeteilt und mit jeweils 100 µl DMSO versetzt. Anschließend werden die Zellen bei –20°C eingefroren und nach 24h bei –80°C im Biofreezer gelagert. Die Langzeitlagerung erfolgt in flüssigem Stickstoff. Alternativ können die Zellen auch in einer mit Kunststofffolie umwickelten Styroporbox direkt bei -80°C eingefroren werden.

6.1.6 Auftauen von Zellen

Die Zellen werden im Wasserbad bei 37°C aufgetaut, und zügig zu 20% FKS-haltigem Medium pipettiert. Dadurch wird die 10%ige, und damit toxische DMSO-Konzentration, auf etwa 1% herabgesetzt. Die Zellsuspension wird bei 800 U/min (~ 130 ×*g*) für 4 Minuten zentrifugiert, der Überstand abdekantiert. Das weitgehend DMSO-freie Zellpellet wird mit 5 ml 20% FKS-haltigem Medium resuspendiert, in eine kleine Kulturflasche (25 cm^2) überführt und bis zur nächsten Passage bei 37°C, 5% CO_2 und 95% rel. Luftfeuchte kultiviert.

Sobald die Zellzahl und die Zelldichte groß genug ist, wird bei der nächsten Passage wieder auf 10 % FKS-haltiges Medium umgestellt.

6.1.7 Mycoplasmenscreening

Mycoplasmen sind die kleinsten, sich selbst vermehrenden Prokaryonten und können vielfältig in den Zellstoffwechsel eingreifen. Diese bakterienähnlichen Kleinstlebewesen leben in enger Vergesellschaftung mit Tier- und Pflanzenzellen [Alberts et al. 2003]. Die Zellkulturen sollten regelmäßig auf Mycoplasmen getestet werden, da sie Sterilfilter ungehindert passieren können. Für den Test werden Zellen auf Objektträgern ausgestreut und für mindestens 24-48 Stunden im Brutschrank (37°C, 5% CO_2, 95% rel. Luftfeuchte) kultiviert. Nach Entfernen des Mediums werden die Objektträger mit –20°C kaltem Methanol abgespült und für mindestens 30 Minuten in –20°C kaltem Methanol belassen, um die Zellen auf dem Objektträger zu fixieren. Anschließend werden einige Tropfen DAPI/SR 101-Färbelösung auf den Objektträger pipettiert. Unter dem Fluoreszenzmikroskop erscheinen Zellkern und DNA aufgrund des DAPI blau, Proteine sind durch SR 101 rot gefärbt. Die DNA der Mycoplasmen wird ebenfalls durch das DNA-bindende DAPI angefärbt. Mycoplasmen erscheinen als kleine, blau leuchtende, gleichmäßig rund geformte Punkte um den Zellkern und im Zytoplasma, teilweise sitzen sie auch auf den Zellen außen auf [Lindl 2000].

DAPI/SR 101-Lösung

200 mM Tris
200 mM NaCl
8 µM DAPI (4´,6´-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid)
50 µM SR 101 (Sulforhodamin 101)
In H_2O_{bidest} lösen und pH 7,6 einstellen

6.2 Untersuchungen zur Zytotoxizität – MTT-Test

Zur Untersuchung der Zytotoxizität verschiedener Topoisomerasegifte an den HEK 293 Zellen sowie den transfizierten Zelllinien HEK-GFP und HEK-TDP1 wurde der MTT-Test gewählt. Der Test misst die Aktivität mitochondrialer Dehydrogenasen lebender Zellen, unabhängig davon, ob sie momentan DNA synthetisieren oder nicht. Bei toten Zellen ist keine

Dehydrogenaseaktivität mehr vorhanden. Der Vorteil liegt in der wenig zeitaufwendigen Bewältigung großer Serien unter Vermeidung teurer Radioisotope und Zählapparaturen. Das schwach gelbe 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium Bromid (MTT) dringt in die Zellen ein, sein Tetrazoliumring wird durch Dehydrogenasen aktiver Mitochondrien aufgebrochen, es entsteht das alkohollösliche, dunkelblaue Formazan (siehe Abb. 53). Das Detergenz SDS lysiert die Zellen und setzt das Formazan frei. Die Intensität der Formazanlösung wird photometrisch, bei 570 nm, bestimmt [Lindl 2000; Roche Manual Cell proliferation Kit I 2003]

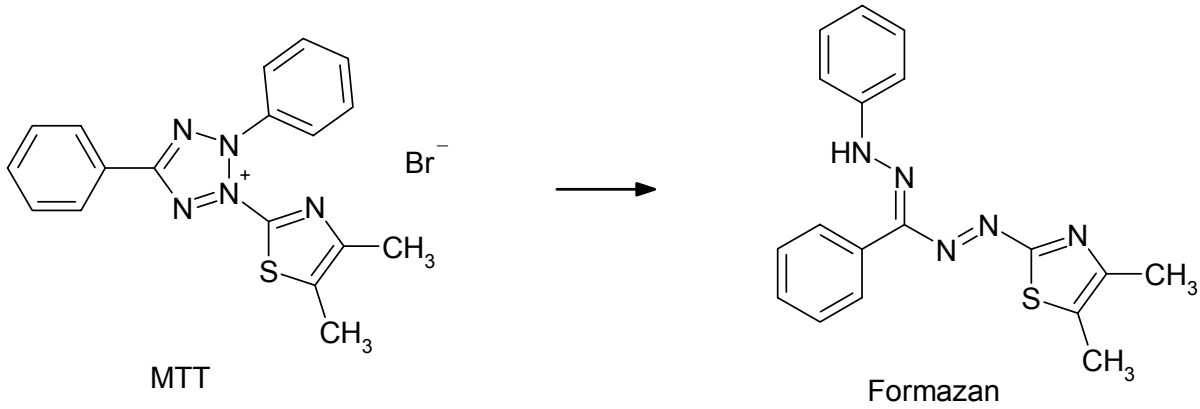


Abb. 53: Metabolisierung von MTT zum farbigen Formazan durch viable Zellen.

Die Durchführung des Testes konnte nicht nach der Standardvorgehensweise in 96-well Mikrotiterplatten (MTP) durchgeführt werden, da die HEK Zellen nach 48h Anwachszeit und 72h Inkubationszeit nicht mehr viabel waren und sich auch nicht für kürzere Zeiten in den 96-well Platten kultivieren ließen. Die Durchführung erfolgte daher nach einer modifizierten Methode. Sämtliche Inkubationsschritte wurden im Brutschrank (37°C, 5% CO_2, 95% rel. Luftfeuchte) durchgeführt.

Durchführung:

- 1×10^4 HEK Zellen werden in 24-well Platten ausgestreut, 1 ml Medium pro Well.
- Zellen 48h anwachsen lassen.
- Medium absaugen und durch Inkubationsmedium ersetzen (DMSO-Endkonzentration 0,1%).
- Inkubation für 72h im Brutschrank.
- Umpipettieren entsprechender Aliquots in 96-well Platten:

  - Die Zellen werden durch mehrmaliges Resuspendieren (8-10 Hübe) mit einer 1 ml Eppendorf-Pipette vom Boden des Wells gelöst.
  - Äußere Reihen einer sterilen MTP mit 200 µl Kupfersulfatlösung befüllen
  - Es werden pro Ansatz 100 µl Zellsuspension in die 96-well MTP überpipettiert (jeweils in Doppelbestimmung durchführen).
- Zugabe von 10 µl MTT-Lösung in jedes Inkubationswell der MTP.
- 4h Inkubation.
- Zugabe von 100 µl SDS-Lösung in jedes Inkubationswell der MTP.
- Inkubation über Nacht (16 h).
- MTP bei 570 nm vermessen.

Kupfersulfat-Lösung

10% $CuSO_4$ in H_2O_{dest}, steril filtriert

MTT-Lösung

5 mg/ml MTT in PBS-Lösung

Steril filtrieren, bei 2-8°C für etwa 4 Wochen haltbar (lichtgeschützt)

SDS-Lösung

10% SDS in 0,01 M HCl

6.3 Untersuchungen zur DNA-strangbrechenden Wirkung mittels Einzelzellgelelektrophorese – Comet-Assay

Die Einzelzellgelelektrophorese, auch Comet-Assay genannt, dient zur Untersuchung von zellulären DNA-Schäden. Diese können entweder direkt an der DNA entstehen, z.B. Modifikationen durch Substanzen oder UV-Strahlung, oder aber auch indirekt wie beispielsweise durch Topoisomerasegifte. Die Methode des Comet-Assay hat den Vorteil, dass sie relativ schnell, einfach und kostengünstig durchzuführen ist. Die Zellen werden nach Behandlung mit Substanz in Agarose aufgenommen und auf Objektträger aufgebracht. Es folgt eine Lyse der Zellen und anschließend wird die DNA bei pH ≥ 13 entwunden. Bei dieser alkalischen Variante des Comet-Assays werden Doppelstrangbrüche, Einzelstrangbrüche und alkalilabile Stellen erfasst [Fairbairn et al. 1995]. Nach elektrophoretischer Auftrennung wird

die DNA mit Ethidiumbromid angefärbt und die Objektträger am Fluoreszenzmikroskop ausgewertet (λ_{ex} = 546 ± 12 nm; $\lambda_{em} \geq$ 590 nm). Durch DNA-Strangbrüche kommt es zur Bildung von kleineren Fragmenten, welche im elektrischen Feld weiter wandern als eine intakte, hochmolekulare DNA, die als runder Fleck im Mikroskop erscheint. Bei DNA-Strangbrüchen sieht das Bild im Mikroskop aus wie ein Komet, wobei die Menge an DNA im Kometenschweif direkt mit der Menge an DNA-Schäden korreliert. Die Durchführung erfolgte nach der Methode von Gedik et al. [1992] mit leichten Modifikationen.

6.3.1 Vorbereiten der Objektträger (OT)

- einseitig aufgeraute Objektträger (OT) verwenden.
- 0,5% NMA (normal melting agarose in PBS) erhitzen.
- auf die raue Seite der OT 40 µl einer 0,5%igen NMA pipettieren, und mit Hilfe eines zweiten OT einen dünnen Agarosefilm ausstreichen und auf einer Heizplatte kurz trocknen lassen.
- zweimal 65 µl 0,5% NMA im Abstand von etwa 0,5 cm auf die OT pipettieren und sofort mit je einem Deckglas abdecken und auf eisgekühlter Unterlage aushärten lassen.
- vorbereitete OT sind in einer feuchten Objektträger-Kammer bei 4°C für ca. 5 Tage lagerfähig.

6.3.2 Inkubation der Zellen

Inkubation von HT29

Es werden 3 × 10^5 HT29 Zellen in 5 ml Kulturmedium (10% FKS, 1% Pen/Strep) in kleine Petrischalen (A=21,5 cm^2) ausgestreut und für 48h anwachsen gelassen. Das Medium wird abgesaugt und durch Inkubationsmedium (serumfrei), mit den entsprechenden Substanzkonzentrationen, ersetzt. Die Inkubation erfolgt für 1 h im Brutschrank (37°C, 5% CO_2, 95% rel. Luftfeuchte). Anschließend wird das Inkubationsmedium entfernt, die Petrischalen zweimal mit 1 ml PBS gespült und 0,5ml Trypsin-Lösung zugegeben. Nach 90 Sekunden Inkubation im Brutschrank wird 0,5 ml serumhaltiges Medium zugegeben, um das Trypsin zu inaktivieren, und die Platten mit einem Zellschaber (keinen Kunststoffwischer verwenden!) abgeschabt und die Suspension in ein Eppendorf-Tube (in Eis stellen) überführt. Die Schalen werden ein zweites Mal mit 0,5 ml serumhaltigem Medium gespült und die beiden Lösungen vereinigt. Wenn alle Platten abtrypsiniert sind, wird die Viabilität, sowie die

Zellkonzentration in jeder Probe bestimmt. Dazu werden 50 µl Zellsuspension mit 50 µl Trypanblau-Lösung vermischt und im Mikroskop mittels Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Die Viabilität errechnet sich dabei nach folgender Formel:

$$\text{Viabilität [\%]} = \frac{\text{Anzahl lebender (farblos) Zellen}}{\text{Anzahl lebender + toter (blau) Zellen}}$$

Die Viabilität sollte dabei über 80% liegen, da bei geringeren Viabilitäten zelltodbedingte DNA-Schäden nicht ausgeschlossen werden können.

Inkubation der HEK-Zelllinien

Die Inkubation der HEK 293, HEK-GFP, HEK-TDP1 und HEK-H263A-Zellen erfolgte in Suspension. Die Zellen werden aus der Kulturflasche geerntet und die Zellsuspension auf eine Konzentration von 10^6 Zellen/ml eingestellt. In ein steriles Kunststoffröhrchen werden 10 µl DMSO bzw. Substanz (100x in DMSO gelöst) pipettiert und 990 µl Zellsuspension zugegeben. Die Inkubation erfolgt für 60 Minuten im Schüttelwasserbad bei 37°C. Die Inkubation wird gestoppt, indem die Röhrchen auf Eis gestellt werden. Die Zellen werden vorsichtig resuspendiert und die Viabilität, analog zur Inkubation der HT29 Zellen, bestimmt.

6.3.3 Auftragen der Zellen auf die Objektträger

- Von jeder Probe werden 2 Aliquots mit je etwa 70.000 Zellen entnommen und zentrifugiert bei 4°C, 2000 U/min (ca. 425 ×*g*), 10min.
- 1%ige LMA (low melting agarose in PBS) vorsichtig erhitzten bis Verflüssigung und Klärung der Agaroselösung eintritt.
- mit einen leeren OT und einem Deckglas die Temperatur und Konsistenz der Agarose überprüfen. Sie sollte leicht pipettierbar sein und sich unter dem Deckglas vollständig verteilen.
- Deckgläser vorsichtig seitlich von den vorbereiteten OT entfernen.
- von zentrifugierten, auf Eiswasser gelagerten Aliquots, Überstand verwerfen.

- Zellpellet mit 65 µl heißer LMA maximal mit 3-4 Hüben resuspendieren und noch heiß auf die NMA-Schicht der OT pipettieren. Sofort mit einem Deckglas luftblasenfrei abdecken.
- OT auf eisgekühlter Unterlage kurz aushärten lassen.
- Deckgläser vorsichtig entfernen und OT für mindestens eine Stunde in Lysepuffer bei 4°C belassen.

6.3.4 Elektrophorese und Auswertung der Objektträger

- Die Elektrophoresekammer wird auf Eis gekühlt.
- Die OT mit der Gelschicht nach oben und ohne Deckgläser auf die Plattform der Gelkammer legen und mit zusätzlichen OT fixieren.
- Gelkammer mit Elektrophoresepuffer (4°C) auffüllen bis die OT etwa 2 mm mit Puffer bedeckt sind.
- Equilibrierung der OT für 20 min (Kammer abdunkeln).
- Elektrophorese bei 25 Volt und 300 mA für 20 min, wobei die Voltzahl konstant eingestellt wird und die richtige Stromstärke durch Zugabe bzw. Entfernen von Pufferlösung erreicht wird.
- OT aus der Kammer entnehmen und 3 x 5 min in einer Färbekammer mit Neutralisationspuffer bei 4°C waschen.
- Pro Gelschicht werden 40 µl einer EtBr-Färbelösung aufgetropft und mit einem Deckglas abgedeckt.
- Die OT können für etwa drei bis vier Tage in einer feuchten Kammer bei 4°C gelagert werden.

Die Auswertung der Objektträger erfolgt am Fluoreszenzmikroskop mit einer Quecksilberdampflampe als Lichtquelle und einem nachgeschalteten CY-3-Filter, um spezifisch das Ethidiumbromid anzuregen (Anregung: $\lambda = 512 \pm 12$ nm; Emission $\lambda \geq 590$ nm). Das Bild wird von einer CCD-Kamera aufgenommen, an einen PC weitergeleitet und mit einer speziellen Software erfasst. Die HEK-Zelllinien wurden dabei mit dem Comet Assay II-System, die HT29-Zellen mit dem Comet Assay III-System, beide von Perceptive Instruments, ausgewertet. Der OT wird mäanderförmig durchmustert. Pro Deckglas werden 50 einzelne, sich nicht überlagernde Zellen ausgewertet. Als Auswertungsparameter wurde

die sog. „tail intensity“, das ist die Intensität des Kometenschweifes in Prozent verglichen mit der Intensität des Kometenkopfes der gleichen Zelle, erfasst.

Lysepuffer-Stammlösung

2,5 M NaCl
100 mM EDTA
100 mM Tris
In H_2O_{bidest} lösen, pH 10 einstellen und 1% N-Laurylsarcosin zufügen

Lysepuffer-Gebrauchslösung

89% (v/v) Lysepuffer-Stammlösung
10% (v/v) DMSO (techn.)
1% (v/v) Triton-X 100

Elektrophoresepuffer-Stammlösung

10 M NaOH
200 mM EDTA (pH 10)

Elektrophoresepuffer-Gebrauchslösung

45 ml 10M NaOH
7,5 ml 200 mM EDTA (pH 10)
Mit H_2O_{bidest} auf 1,5l auffüllen

Neutralisationspuffer

0,4 M Tris/HCl (pH 7,5)

PBS für Agarose (pH 7,4)

137 mM NaCl
2,7 mM KCl
1,5 mM KH_2PO_4
8,1 mM Na_2HPO_4

NMA (normal melting agarose)

0,5% (w/v) NMA in PBS, etwa 50 ml ansetzen

LMA (low melting agarose)

0,8% (w/v) LMA in PBS, etwa 50 ml ansetzen

Die einmal angesetzten Agaroselösungen können beliebig oft erwärmt und wieder verwendet werden. Es ist dabei aber auf ausreichenden Ersatz des verdampften PBS zu achten. Das Schmelzen kann auf der Heizplatte oder in der Mikrowelle erfolgen.

Ethidiumbromid(EtBr)-Färbelösung

EtBr-Stammlösung (10 mg/ml) mit H_2O_{bidest} auf 20 µg/ml verdünnen

Zusammensetzung von Trypsin-Lösung sowie PBS für die Zellkultur siehe Kap. 6.1.3

6.4 Untersuchungen zur DNA-Interaktion

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Fähigkeit der Anthocyanidine in die doppelsträngige DNA zu interkalieren und an die kleine Furche der DNA zu binden, untersucht. Dazu wurden nachfolgend beschriebene Fluoreszenz-Kompetitions-Assays mit Kalbsthymus-DNA durchgeführt.

6.4.1 Interkalation in die DNA – Verdrängung von EtBr

Dieser Test gibt Aufschluss über die Fähigkeit von Substanzen sich zwischen die Basenpaare doppelsträngiger DNA zu schieben, also zu interkalieren. Als Referenz dient hierbei Ethidiumbromid, welches in die doppelsträngige DNA interkaliert und dabei stark fluoresziert [Glazer und Rye 1992]. Der Verdrängungsassay wurde nach der Methode von Morgan et al. [1979] durchgeführt. Dabei wurde das Testprotokoll modifiziert um in 96-well-Platten messen zu können. Abb. 54 zeigt ein typisches Beladungsschema. Die Fluoreszenzmessung erfolgte an einem Mikrotiterplattenphotometer bei einer Anregungswellenlänge von 544 nm und einer Emissionswellenlänge von 590 nm. Zur Leerwertbestimmung wird die Platte leer vermessen, der Nullwert wird mit ethidiumbromidhaltiger Pufferlösung (ohne DNA) und DMSO ermittelt. Als Kontrollwert (100%) dient die Fluoreszenz von ethidiumbromidhaltiger Pufferlösung mit DMSO und Kalbsthymus-DNA. Durch Zugabe von interkalierenden Substanzen findet dabei eine Verdrängung von Ethidiumbromid aus der DNA statt, was eine

Fluoreszenzminderung zur Folge hat. Eine mögliche Eigenfluoreszenz der Substanzen wird ebenfalls ermittelt und vom Messwert abgezogen.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Nullwert	Kontrollwert	K1	K2	K3	K4	K5	K6	K7	K8	K9	K10
B												
C												
D												
E												
F		EFKW	EFK1	EFK2	EFK3	EFK4	EFK5	EFK6	EFK7	EFK8	EFK9	EFK10
G												
H												

Abb. 54: Beladungsschema einer MTP für Fluoreszenzverdrängungsassays; K1-K10: Substanzkonzentrationen; EFKW: Eigenfluoreszenz-Kontrollwert; EFK1-EFK10: Eigenfluoreszenz bei verschiedenen Substanzkonzentrationen

Für die Messung einer 96-well-Platte werden folgende Mengen an Pufferlösung benötigt:

- 4 ml 1x EtBr (1 µM), ohne DNA
- 5,5 ml 2x EtBr (2 µM), ohne DNA
- 10 ml 2x EtBr (2 µM), mit 2x DNA (48 µl Stammlösung)

Die Substanzen werden zweifach konzentriert in 1,5 ml Pufferlösung angesetzt (1% DMSO).

Die 96-well-Platte wird leer vermessen und anschließend wie folgt befüllt:

- 1x EtBr (ohne DNA) : je 200 µl in A-H / 1
- 2x EtBr (ohne DNA) : je 100 µl in F-H / 2-10
- 2x Substanzlösung / DMSO : je 100 µl in A-H / 2-10
- 2x EtBr 2x DNA : je 100 µl in A-E / 2-10
- Platte erneut vermessen.

Die Auftragung der gemessenen Fluoreszenz-Werte gegen die Substanzkonzentration ergibt eine Kurve, aus welcher sich der EC_{50}-Wert ermitteln lässt. Der EC_{50}-Wert ist die Konzentration, bei der die Fluoreszenz um 50% reduziert ist.

Pufferlösung

9,3 mM NaCl

2 mM Na-Acetat

0,1 mM EDTA

In H_2O_{bidest} lösen und pH-Wert von 7,0 einstellen, Lagerung bei 4°C

DNA-Stammlösung

2 mg/ml Kalbsthymus-DNA in Pufferlösung gelöst, Lagerung bei -20°C

Ethidiumbromid-Lösung

10 mM EtBr in H_2O_{bidest}, Lagerung bei 4°C

Mit H_2O_{bidest} auf 1 mM verdünnen und davon 1 µl/ml bei 1x EtBr, bzw. 2 µl/ml bei 2x EtBr zugeben.

6.4.2 Bindung an die kleine Furche – Verdrängung von Hoechst 33258

Dieser Test gibt Aufschluss über die Fähigkeit von Substanzen, sich an die kleine Furche der DNA (minor groove) anzulagern. Als Referenzsubstanz wird hierbei der Fluoreszenz-Farbstoff Hoechst 33258 (H33258) verwendet. H33258 lagert sich in die kleine Furche der DNA, mit einer speziellen Affinität zu A/T reichen Regionen, an [Abu-Daya und Fox 1997]. Die Struktur eines DNA-dodecamer/Farbstoff-Komplexes wurde von Teng et al. [1988] mittels Röntgenstrukturanalysen aufgeklärt. Nach Zusatz von Substanzen, die auch an die kleine Furche der DNA binden können, findet eine Verdrängung von H33258 statt, was mit einer Abnahme der Fluoreszenzintensität einhergeht. Die Fluoreszenzmessung erfolgte an einem Mikrotiterplattenphotometer bei einer Anregungswellenlänge von 355 nm und einer Emissionswellenlänge von 460 nm. Zur Leerwertbestimmung wird die Platte leer vermessen, der Nullwert wird mit farbstoffhaltiger Pufferlösung (ohne DNA) und DMSO ermittelt. Beide werden von den Messwerten abgezogen. Als Kontrollwert (100%) dient die Fluoreszenz von farbstoffhaltiger Pufferlösung mit DMSO und Kalbsthymus-DNA. Eine mögliche Eigenfluoreszenz der Substanzen wird ebenfalls ermittelt und vom Messwert abgezogen. Die Beladung einer 96-well-Platte erfolgte dabei analog zum EtBr-Verdrängungsassay (siehe Kap. 6.4.1, Abb. 54).

Für die Messung einer 96-well-Platte werden folgende Mengen an Pufferlösung benötigt:

- 4 ml 1x H33258 (1 µM), ohne DNA
- 5,5 ml 2x H33258 (2 µM), ohne DNA
- 10 ml 2x H33258 (2 µM), mit 2x DNA (48 µl Stammlösung)

Die Substanzen werden 2-fach Konzentriert in 1,5 ml Pufferlösung angesetzt (1% DMSO).

Die 96-well-Platte wird leer vermessen und anschließend wie folgt befüllt:

- 1x H33258 (ohne DNA) : je 200 µl in A-H / 1
- 2x H33258 (ohne DNA) : je 100 µl in F-H / 2-10
- 2x Substanzlösung / DMSO : je 100 µl in A-H / 2-10
- 2x H33258 2x DNA : je 100 µl in A-E / 2-10
- Platte erneut vermessen.

Die Auftragung der gemessenen Fluoreszenz-Werte gegen die Substanzkonzentration ergibt eine Kurve, aus welcher sich der EC_{50}-Wert ermitteln lässt.

Pufferlösung

9,3 mM NaCl

2 mM Na-Acetat

0,1 mM EDTA

In H_2O_{bidest} lösen und pH-Wert von 7,0 einstellen, Lagerung bei 4°C

DNA-Stammlösung

2 mg/ml Kalbsthymus-DNA in Pufferlösung gelöst, Lagerung bei -20°C

Bisbenzimid H33258-Lösung (Hoechst-Farbstoff)

1 mM H33258 in H_2O_{bidest}, Lagerung bei -20°C

Von dieser Lösung 1 µl/ml bei 1x H33258, bzw. 2 µl/ml bei 2x H33258 zugeben.

6.5 Untersuchung humaner Topoisomerasen

In eukaryontischen Zellen werden 2 Klassen von Topoisomerasen unterschieden: Topoisomerase I und Topoisomerase II. Zur Untersuchung der katalytischen Aktivität von Topoisomerase I wurde der Relaxationsassay mit Kernextrakt aus MCF-7-Zellen gewählt, für

Topoisomerase II, welche als rekombinantes Enzym zur Verfügung stand, wurde der Dekatenierungsassay durchgeführt. Eingehendere Untersuchungen zum Wirkmechanismus und Unterscheidung, ob ein katalytischer Inhibitor oder ein Topoisomerasegift vorliegt, wurden mit Cleavageassays und Immunoband-Depletion (nur Topo II) durchgeführt.

6.5.1 Gewinnung von Kernextrakt

Zur Testung der katalytischen Aktivität von Topoisomerase I im Relaxationsassay kann topoisomerasehaltiger Kernextrakt verwendet werden. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde ein Kernextrakt aus der humanen Mammakarzinomzelllinie MCF-7 hergestellt und verwendet.

Kernextrakt-Aufarbeitung

- Die Zellen werden in Kulturflaschen (A=175 cm^2) kultiviert und wie in Kap. 6.1.3 beschreiben abtrypsiniert.
- Für die Kernextrakt-Herstellung sollten 10^6 bis 3×10^8 Zellen verwendet werden.
- Zellen bei 800 U/min (~ 130 ×*g*) für 10 Minuten zentrifugieren.
- Überstand verwerfen, Pellet mit PBS resuspendieren.
- Zentrifugation bei 800 U/min (~ 130 ×*g*) für 10 Minuten, Überstand verwerfen.

Alle nachfolgenden Schritte sind auf Eis durchzuführen:

- Pellet in 7,5 ml eiskaltem Lysepuffer resuspendieren, 500 µl Lysepuffer mit Triton X-100 zugeben, kurz mischen.
- Lyse für 15 Minuten auf Eis.
- Lösung für 5 Minuten bei 1000 U/min (180 ×*g*) und 4°C zentrifugieren, Überstand verwerfen.
- Pellet in 500 µl Lysepuffer resuspendieren.
- 10 µl der Kernsuspension mit 90 µl Trypanblau-Lösung vermischen und die Kernzahl in der Neubauer Zählkammer bestimmen.
- Kernsuspension 5 Minuten bei 3000 U/min (ca. 4000 ×*g*) und 4°C zentrifugieren, Überstand abpipettieren.
- Pellet mit entsprechender Menge Extraktionspuffer resuspendieren, dass eine Kernzahl von 3×10^7 Kerne/ml vorliegt.
- Lyse der Kerne durch langsame Zugabe von 10%vol 5 M NaCl.

- Präzipitation der DNA für 20 Minuten auf Eis.
- Zentrifugation des Kernrohextraktes bei 14000 U/min (ca. 21000 ×*g*) für 10 Minuten bei 4°C.
- Überstand vorsichtig, ohne die ausgefällte DNA (Pellet) einzuziehen, in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überpipettieren.
- 1,5-fache Volumen an Glycerin zugeben und mischen.
- Aliquotieren und Lagerung bei -20°C.

Lysepuffer

0,3M	Saccharose
0,5 mM	EGTA (pH 8,0)
60 mM	KCl
15 mM	NaCl
15 mM	HEPES (pH 7,5)
150 µM	Spermin
50 µM	Spermidin

Lysepuffer mit Triton X-100

Lysepuffer und Triton X-100 im Verhältnis 13,5:1 mischen

Extraktionspuffer

100 mM	NaCl
5 mM	KH_2PO_4
1 µl/ml	ß-Mercaptoethanol
5 µl/ml	200 mM PMSF (in DMSO) kurz vor Gebrauch zusetzen

Zusammensetzung PBS und Trypan-Blau siehe Kapitel 6.1.3.

6.5.2 Katalytische Aktivität von Topo I – Relaxationsassay

Im Relaxationsassay wird durch die katalytische Aktivität von Topoisomerasen superspiralisierte Plasmid-DNA (supercoiled) in die entspannte Form (relaxiert) überführt. Diese beiden Plasmidformen können durch Agarosegelelektrophorese getrennt werden, wobei

superspiralisiertes Plasmid weiter in das Gel migriert als die relaxierte Form. Nach der elektrophoretischen Auftrennung wird das Gel mit Ethidiumbromid angefärbt und im Lumi-Imager™ detektiert. Da sowohl Topoisomerase I, als auch Topoisomerase II superspiralisiertes Plasmid relaxieren können, wird der Assay in Abwesenheit von ATP durchgeführt, wodurch nur die katalytische Aktivität von Topoisomerase I aus dem Kernextrakt erfasst wird. Durch Zugabe von Testsubstanz wird überprüft, ob die Topoisomerase noch in der Lage ist, die DNA zu relaxieren.

- 250 ng superspiralisierte pUC18-Plasmid-DNA wird mit Kernextrakt versetzt, wobei in Vorversuchen die Menge an Kernextrakt ermittelt wird, die gerade ausreicht, um die gesamte Plasmid-DNA in 30 Minuten bei 37°C zu relaxieren.
- Inkubation der Proben für 30 Minuten bei 37°C.
- Stopp der Inkubation durch Zugabe von 10%vol SDS (5%) und 10%vol Proteinase K-Lösung (10 mg/ml).
- Inkubation der Proben für 30 Minuten bei 37°C.
- Zugabe einer entsprechenden Menge 6x Ladepuffer.
- Aufbringen eines Aliquots auf ein 1%iges Agarose-Gel mit anschließender Elektrophorese bei 50-60V für etwa 2 Stunden in TAE-Puffer.
- Färben des Gels im Ethidiumbromidbad (10 µg/ml) für 20 Minuten.
- Messung der Fluoreszenz der Banden bei 600 nm im Lumi-Imager™.

In Tabelle 8 ist ein Pipettierschema für den Relaxationsassay dargestellt.

Tabelle 8: Pipettierschema Relaxationsassay.

Lösungen (Mengenangaben in µl)	**pUC18**	**pUC + KE**	**pUC + KE + Hemmstoff**
H_2O_{bidest}	17	14	13
Saltmix I	3	3	3
Tris/HCl	3	3	3
KCl (1 M)	3	3	3
pUC18 (250 ng)	4	4	4
Hemmstoff / DMSO	-	-	1
Kernextrakt MCF-7 1:10 verd.	-	3	3
Inkubation bei 37°C für 30 Minuten			
5% SDS-Lösung	3	3	3
Proteinase K (10 mg/ml)	3	3	3
Inkubation bei 37°C für 30 Minuten			
6x Ladepuffer	7	7	7

Saltmix I

100 mM $MgCl_2$

5 mM DTT (1,4-Dithiothreitol)

5 mM EDTA

0,3 mg/ml BSA

Tris/HCl

100 mM Tris (pH 7,9)

50x TAE-Puffer (vor Gebrauch 1:50 verdünnen)

242 g Tris Base

57,1 ml Eisessig

100 ml 0,5M Na_2-EDTA (pH 8,0)

Mit H_2O_{bidest} auf 1l auffüllen

6x Ladepuffer

0,25%	Bromphenolblau
30%	Glycerol

6.5.3 Katalytische Aktivität von Topo II – Dekatenierungsassay

Von Topoisomerase II sind 2 Isoformen bekannt: Topoisomerase IIα mit einem Molekulargewicht von 170 kDa und Topoisomerase IIβ mit 180 kDa. Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten rekombinanten humanen Topoisomerase II-Enzyme (aus Hefe-Expressionssystem) wurden freundlicherweise von Prof. Boege, Universitätsklinikum Düsseldorf, zur Verfügung gestellt. Die Konzentrationen lagen dabei für Topoisomerase IIα bei 4 mg/ml, für Topoisomerase IIβ bei 2 mg/ml, jeweils in 50% Glycerol.
Zur Untersuchung der katalytischen Topoisomerase II Aktivität wurden Dekatenierungsassays durchgeführt. Als Substrat wird hierbei Kinetoplasten DNA (kDNA) aus *Crithidia fasciculata* verwendet. Diese besteht aus ineinander verknoteten DNA-Zirkeln (meist 2,5 kb), woraus ein hochmolekulares Netzwerk entsteht, welches nicht in ein Agarose-Gel migrieren kann. Nur durch die katalytische Aktivität von Topoisomerase II, welche einen transienten Doppelstrangbruch einführt und einen kompletten zweiten DNA-Strang hindurchführen kann, können aus dem Netzwerk einzelne Minizirkel freigesetzt werden. Durch Zugabe von Testsubstanz wird überprüft, ob die Topoisomerase noch in der Lage ist, einzelne DNA-Minizirkel aus dem Netzwerk freizusetzen. Nach der elektrophoretischen Auftrennung wird das Agarose-Gel mit Ethidiumbromid angefärbt und im Lumi-Imager™ detektiert.

- 200 ng kDNA wird mit 40 ng rekombinanter Topoisomerase II für 60 Minuten bei 37°C inkubiert.
- Stopp der Inkubation durch Zugabe von 10%vol Proteinase K (1 mg/ml in 10% SDS)
- Inkubation bei 37°C für 30 Minuten.
- Zugabe einer entsprechenden Menge 6x Ladepuffer.
- Aufbringen eines Aliquots auf ein 1%iges Agarose-Gel mit anschließender Elektrophorese bei 50-60V für etwa 2 Stunden in TAE-Puffer.
- Färben des Gels im Ethidiumbromidbad (10 µg/ml) für 20 Minuten.
- Messung der Fluoreszenz der Banden bei 600 nm im Lumi-Imager™.

In Tabelle 9 dargestellt ist ein Pipettierschema für den Relaxationsassay.

Tabelle 9: Pipettierschema Dekatenierungsassay.

Lösungen (Mengenangaben in µl)	**kDNA**	**kDNA + Topo II**	**kDNA + Topo II + Hemmstoff**
H_2O_{bidest}	19,6	18,6	17,6
Saltmix II	3	3	3
Tris/HCl	3	3	3
KCl (1 M)	3,6	3,6	3,6
kDNA (250 ng/µl)	0,8	0,8	0,8
Hemmstoff / DMSO	-	-	1
Topoisomerase II (40 ng)	-	1	1
Inkubation bei 37°C für 60 Minuten			
Proteinase K (1 mg/ml in 10% SDS)	3	3	3
Inkubation bei 37°C für 30 Minuten			
6x Ladepuffer	5	5	5

Saltmix II

50 mM $MgCl_2$

5 mM DTT (1,4-Dithiothreitol)

5 mM EDTA

0,3 mg/ml BSA

10 mM ATP

Tris/HCl

500 mM Tris (pH 7,9)

50x TAE-Puffer (vor Gebrauch 1:50 verdünnen)

242 g Tris

57,1 ml Eisessig

100 ml 0,5M Na_2-EDTA (pH 8,0)

Mit H_2O_{bidest} auf 1l auffüllen

6x Ladepuffer

0,25%	Bromphenolblau
30%	Glycerol

Verdünnungslösung für rekombinante Topoisomerase II

50 mM	Tris/HCl (pH 7,5)
400 mM	NaCl
1 mM	DTT
50%	Glycerol

6.5.4 Stabilisierung des Cleavable Complex – Cleavageassay

Wie bereits in Kapitel 2.2.3.2 erläutert, stabilisieren Topoisomerasegifte das kovalente Enzym-DNA-Intermediat, den so genannten Cleavable Complex, im Zustand des DNA-Strangbruches. Wird die Topoisomerase durch Proteinase K verdaut, bleibt das Plasmid mit dem Strangbruch übrig. Wenn Topoisomerase I vorlag, so ist das ein Plasmid mit einem Einzelstrangbruch oder auch „open circular"-Form genannt. Wurde der Komplex mit Topoisomerase II stabilisiert, findet man linearisierte Plasmide, da sich die Verdrillung und damit die aufgebaute Torsionsspanung durch den Doppelstrangbruch abbauen kann. Durch eine modifizierte Agarosegelelektrophorese mit Ethidiumbromid können nun diese „open circular" (oc) und linearisierten Plasmide von der superspiralisierten und relaxierten Form separiert werden. Der Assay wird mit aufgereinigter rekombinanter humaner Topoisomerase (aus Hefe-Expressionssystem) durchgeführt. Die hier verwendeten Enzyme Topoisomerase I (2 mg/ml), Topoisomerase IIα (4 mg/ml) sowie Topoisomerase IIβ (2 mg/ml) wurden freundlicherweise von Prof. Boege, Universitätsklinikum Düsseldorf, zur Verfügung gestellt.

- 250 ng superspiralisierte pUC18-Plasmid-DNA wird mit Topoisomerase (50 ng bei Topoisomerase I und 300 ng bei Topoisomerase II) inkubiert.
- Inkubation der Proben für 30 Minuten bei 37°C.
- Stopp der Inkubation durch Zugabe von 10%vol SDS (5%) und 10%vol Proteinase K-Lösung (10 mg/ml).
- Inkubation der Proben für 30 Minuten bei 37°C.
- Zugabe einer entsprechenden Menge 6x Ladepuffer.

- Aufbringen eines Aliquots auf ein 1%iges Agarose-Gel (mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid) und anschließende Elektrophorese bei 10V über Nacht in TAE-Puffer.
- Färben des Gels im Ethidiumbromidbad (10 µg/ml) für 20 Minuten.
- Messung der Fluoreszenz der Banden bei 600 nm im Lumi-Imager™.

Bei den Koinkubationsexperimenten wurden die Anthocyanidine 5 Minuten im kompletten Ansatz vorinkubiert, anschließend das Topoisomerasegift Camptothecin (Topo I) oder Etoposid (Topo II) zugegeben und nach dem oben genannten Schema weiter verfahren.

In Tabelle 10 ist ein Pipettierschema für den Cleavageassay wiedergegeben.

Tabelle 10: Pipettierschema Cleavageassay.

Lösungen (Mengenangaben in µl)	**pUC18**	**pUC + Topo**	**pUC + Topo + Hemmstoff**
H_2O_{bidest}	17	16	15
Saltmix I / II	3	3	3
Tris/HCl	3	3	3
KCl (1 M)	3	3	3
pUC18 (250 ng)	4	4	4
Hemmstoff / DMSO	-	-	1
Topoisomerase (Topo I 50 ng; Topo II 300 ng)	-	1	1
Inkubation bei 37°C für 30 Minuten			
5% SDS-Lösung	3	3	3
Proteinase K (10 mg/ml)	3	3	3
Inkubation bei 37°C für 30 Minuten			
6x Ladepuffer	7	7	7

Saltmix I

100 mM	$MgCl_2$
5 mM	DTT (1,4-Dithiothreitol)
5 mM	EDTA
0,3 mg/ml	BSA

Saltmix II

50 mM	$MgCl_2$
5 mM	DTT (1,4-Dithiothreitol)
5 mM	EDTA
0,3 mg/ml	BSA
10 mM	ATP

Tris/HCl

100 mM	Tris (pH 7,9)

50x TAE-Puffer (vor Gebrauch 1:50 verdünnen)

242 g	Tris Base
57,1 ml	Eisessig
100 ml	0,5M Na_2-EDTA (pH 8,0)

Mit H_2O_{bidest} auf 1l auffüllen

6x Ladepuffer

0,25%	Bromphenolblau
30%	Glycerol

Verdünnungslösung für rekombinante Topoisomerase

50 mM	Tris/HCl (pH 7,5)
400 mM	NaCl
1 mM	DTT
50%	Glycerol

6.5.5 Immunoband-Depletion Topoisomerase II

Der Immunoband-Depletion Assay wurde nach der Methode, beschrieben in Christensen et al. [2002], mit leichten Modifikationen, durchgeführt. Das Prinzip des Immunoband-Depletion Assay ist in Abb. 55 gezeigt. Bei Inkubation von Zellen mit Topoisomerasegiften wird die Topoisomerase, durch Stabilisierung des „Cleavable Complex“, an der DNA „fixiert“. Werden die Zellen lysiert und einer Polyacrylamid-Gelelektrophorese unterzogen, kann die durch das Topoisomerasegift an der DNA „fixierte“ Topoisomerase nicht in das Gel laufen (siehe Abb. 55, rechte Seite). Bei nicht mit Topoisomerasegiften behandelten Zellen läuft die Topoisomerase bei der Elektrophorese ins Gel und kann nach Western Blot und anschließender Inkubation mit spezifischen Antikörpern detektiert werden (siehe Abb. 55, linke Seite).

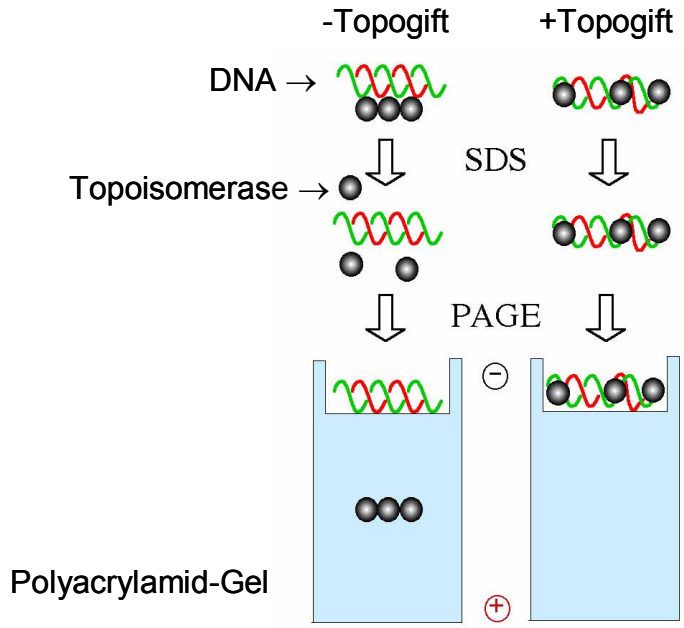


Abb. 55: Prinzip Band Depletion Assay; SDS Natriumdodecylsulfat, PAGE Polyacrylamid-Gelelektrophorese.

6.5.5.1 Inkubation der Zellen und Probenvorbereitung

- Die HEK 293 Zellen werden wie in Kap. 6.1.3 beschrieben abtrypsiniert und die Zellzahl bestimmt.
- Pro Ansatz werden 1 – 2 × 10^6 Zellen in ein Eppendorf Tube pipettiert.
- Zentrifugation bei 800 U/min (~130 ×*g*) für 3 Minuten.

- Überstand abpipettieren und Zellen in 100 µl vorgewärmtem Medium, mit entsprechenden Substanzkonzentrationen, vorsichtig resuspendieren.
- Inkubation bei 37°C für 20 Minuten, Proben ab und zu anschnippen damit sich die Zellen nicht zu sehr absetzen.
- Alternativ können die Zellen bei 800 U/min (~130 ×*g*) für 3 Minuten zentrifugiert, das Medium entfernt und mit vorgewärmtem PBS (mit entsprechender Substanzkonzentration) wieder suspendiert werden.
- Zugabe von 100 µl 2x Laemmli-Puffer (mit entsprechenden Substanzkonzentrationen um eventuelle Cleavage-Komplexe stabil zu halten), Proben auf Eis stellen.
- Behandlung mit dem Ultraschallstab für 10 Sekunden.
- Proben 10 Minuten auf 95°C im Thermomixer erhitzen.
- Zugabe von 2 µl 1 M DTT.
- 20-30 µl können pro Lane bei der SDS-PAGE beladen werden.

4x Laemmli-Puffer Stammlösung

0,5 M	Tris/HCl (pH 6,8)
8%	SDS
0,08%	Bromphenolblau
8%	Glycerol

2x Laemmli-Puffer, immer frisch ansetzen

500 µl	4x Laemmli-Puffer Stammlösung
20 mM	DTT (20 µl einer 1M Lösung)
20 mM	EDTA (80 µl einer 250 mM Lösung)
2 mM	PMSF (20 µl einer 100 mM Lösung)
2,5M	Harnstoff (250 µl einer 10M Lösung)

Mit H_2O_{bidest} auf 1 ml auffüllen (130 µl)

6.5.5.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-Gelelektrophorese stellt heutzutage das Standardverfahren zur Trennung von Proteinen dar. Dabei werden die Proteine vor Ihrer Trennung mit SDS in der Hitze denaturiert. Niedermolekulare Thiole wie ß-Mercaptoethanol oder DTT bewirken eine

Reduzierung der intramolekularen Disulfidbrücken, der Zusatz von SDS und Harnstoff bewirkt eine Auffaltung der Proteine. Durch das SDS wird zusätzlich eine Eigenladung der Proteine überdeckt, so dass man eine konstante Nettoladung pro Masseneinheit erhält. Da eine lineare Beziehung zwischen dem Logarithmus der jeweiligen Molekulargewichte und der relativen Wanderungsstrecken besteht, können mit Hilfe von Markerproteinen die Molekulargewichte der Proben bestimmt werden. Bei der hier angewandten diskontinuierlichen Gelelektrophorese durchlaufen die Proben zunächst ein weitporiges Sammelgel (4% Acrylamid-Gel). Durch den pH-Wert des Sammelgels (pH 6,8) liegen die im Puffer enthaltenen Glycinatanionen protoniert vor, wodurch der Ladungstransport nur über die Proteine und Chloridionen stattfindet. Beim Eintritt in das Trenngel ändert sich neben der kleineren Porengröße auch der pH-Wert auf 8,8, wodurch das Glycin nun deprotoniert vorliegt und den Ladungstransport übernimmt. Dies hat zur Folge, dass die Proteine langsamer werden und an der Gelgrenze eine Schärfung der Banden stattfindet. Die Proteine werden im Trenngel aufgrund ihrer Größe aufgetrennt und anschließend über Western Blot detektiert.
Die Auftrennung der Proteine erfolgte im Rahmen dieser Arbeit in einem 7%igen SDS-Polyacrylamid-Gel mit dem Bio-Rad Mini Protean II-System.

Gießen der Trenn- und Sammelgele

Wasser, Tris, Acrylamid und SDS werden zusammenpipettiert und durch leichtes Schwenken gemischt. Anschließend pipettiert man APS (Ammoniumperoxodisulfat) als Radikalstarter und TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin) als Radikalstabilisator hinzu, schwenkt noch einmal kurz und gießt mit einer Pipette das Polyacrylamid-Gel in eine spezielle Apparatur zwischen zwei Glasplatten. Die Geldicke von 0,75 cm wird dabei durch die verwendeten Spacer bestimmt. Das Trenngel wird mit Butanol überschichtet, um eine gerade Oberfläche zu erhalten.

Tab. 11: Rezept für ein 7%iges Acrylamid-Gel (Trenngel).

2,54 ml	H_2O_{bidest}
1,23 ml	1,5M Tris (pH 8,8)
1,15 ml	Acrylamid (30%)
49,2 µl	SDS (10%)
24,6 µl	APS (10%)
2,46 µl	TEMED

Nachdem das Gel auspolymerisiert ist wird das Butanol abgeschüttet, kurz mit Wasser gespült und die Glasplatten vor Einfüllen des Sammelgels getrocknet. Anschließend wird ein 4%iges Sammelgel über das Trenngel gegossen. Mittels eines Kammes werden Taschen im Sammelgel ausgespart, die später mit der Probe bzw. mit einem SDS-Molekulargewichtsstandard befüllt werden. Nachdem das Sammelgel auspolymerisiert ist, werden die Geltaschen mit einer Kanüle von nicht polymerisierten Gelresten befreit.

Tab. 12: Rezept für ein 4%iges Acrylamid-Gel (Sammelgel).

1,2 ml	H_2O_{bidest}
0,5 ml	0,5M Tris (pH 6,8)
0,25 ml	Acrylamid (30%)
20 µl	SDS (10%)
20 µl	APS (10%)
2 µl	TEMED

Von den in Kap 6.5.5.1 hergestellten Proben wurden 20-30 µl pro Lane beladen, in die äußeren Taschen wird jeweils 15 µl Marker (SeeBlue® Plus2) gefüllt. Die Molekulargewichte des verwendeten Markers sind in Tabelle 13 aufgelistet. Die Kammer wurde mit 1x Laufpuffer gefüllt und die Gelelektrophorese erfolgte bei einer konstanten Spannung von 100-120V für 2-2,5 Stunden.

Tab. 13: Molekulargewichte des Markers SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Standard (Invitrogen).

Myosin	250 kDa
Phosphorylase B	148 kDa
BSA	98 kDa
Glutamin Dehydrogenase	64 kDa
Alkohol Dehydrogenase	50 kDa
Carboanhydrase	36 kDa
Myoglobin Red	22 kDa
Lysozym	16 kDa
Aprotinin	6 kDa
Insulin, B-Kette	4 kDa

10x Laufpuffer

2M	Glycin
250 mM	Tris/HCl, pH 8,3
1%	SDS

Acrylamid (30%): wässrige Lösung mit 0,8% N,N´-Methylenbisacrylamid (Roth).

6.5.5.3 Western Blot

Der Transfer der Proteine aus dem SDS-Gel erfolgt beim Western Blot auf eine Nitrozellulosemembran mittels „semi-dry-Verfahren“ [Towbin et al. 1979]. Die Whatmanpapiere (Filterpapiere), die Nitrocellulosemembran und das SDS-Gel werden vor Beginn des Blots in 1x Blottingpuffer equilibriert. Der schematische Aufbau eines semi-dry-Western Blots ist in Abb. 56 dargestellt. Der Transfer erfolgt bei 50 mA/Gel über 90 Minuten. Anschließend wird die Membran für 1 Stunde in Blocking-Lösung bei Raumtemperatur inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen für den Erstantikörper abzusättigen. Danach erfolgt die Inkubation mit Antikörpern und Detektion mittels Chemolumineszenz am Lumi-Imager™.

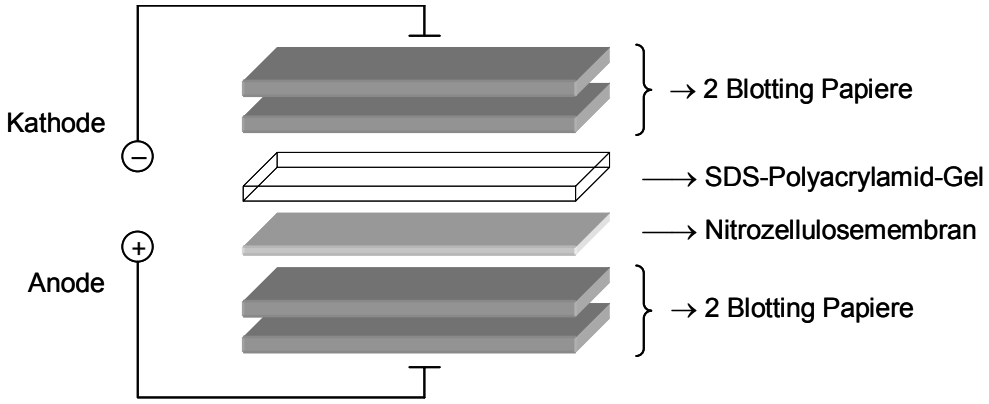


Abb. 56: Schematischer Aufbau eines Western Blots.

Detektion des Western Blots

- Inkubation der geblockten Membran mit dem Primärantikörper über Nacht bei 4°C.
- Membran 3 x 5 Minuten mit Waschlösung waschen.
- Inkubation mit dem Horseradish-Peroxidase(HRP)-gekoppelten Zweitantikörpers für 60 Minuten bei Raumtemperatur.
- Membran 3 x 5 Minuten mit Waschlösung waschen.
- Membran 1 Minute in 10 ml LumiGLO® unter leichtem Schwenken inkubieren.
- Detektion der Chemolumineszenz im Lumi-Imager™.

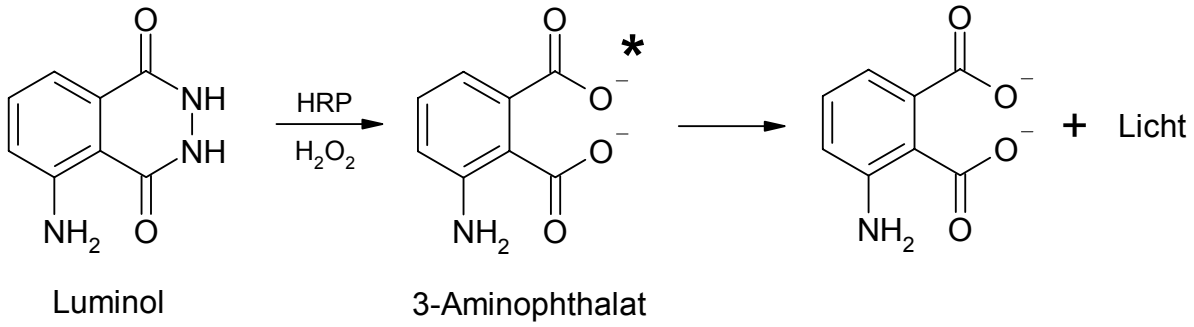


Abb. 57: Chemolumineszenzreaktion von LumiGLO®, HRP Horseradish-Peroxidase.

2x Blottingpuffer

78 mM	Glycin
96 mM	Tris
0,074%	SDS
40% (v/v)	Methanol

20x TBS

2,6M	NaCl
0,4M	Tris/HCl (pH 7,6)

Blocking-Lösung

1x	TBS
5%	Milchpulver
0,1%	Tween-20

Waschlösung

1x	TBS
0,3%	Tween-20

LumiGLO® Detektionslösung (Cell Signaling Technology #7003)

500 µl	20x LumiGLO®
500 µl	20x Peroxid
9 ml	H_2O_{bidest}

Antikörper

rabbit Anti-Topo IIα (H-231) 1:500 in Blocking-Lösung (Santa Cruz BT #sc-13058)
rabbit Anti-Topo IIβ (H-286) 1:500 in Blocking-Lösung (Santa Cruz BT #sc-13059)
mouse Anti-α-Tubulin 1:500 in Blocking-Lösung (Santa Cruz BT #sc-5286)
goat Anti-Rabbit HRP-conj 1:2000 in Blocking-Lösung (Cell Signaling Technology #7074)
goat Anti-Mouse HRP-conj 1:2000 in Blocking-Lösung (Santa Cruz BT #sc-2005)

6.6 Gewinnung von pUC18-Plasmid-DNA

Als Substrat beim Relaxationsassay, sowie den Assays zur Untersuchung der Stabilisierung des Cleavable Complex, wird superspiralisierte Plasmid-DNA benötigt. Dabei sollte der Anteil an relaxiertem Plasmid oder „open circular“ Plasmid-DNA möglichst gering sein. Die Isolierung des Plasmids pUC18 erfolgt aus transformierten *Escherichia coli* DH5α mittels eines QIAGEN Plasmid Maxi Kit.

6.6.1 Plasmid-Maxipräparation

Die Plasmide werden durch alkalische Lyse und Aufreinigung an Anionentauscher-Harz-Säulen (im Kit enthalten) gewonnen, wobei man bis zu 500 µg Plasmid/Säule des Maxi-Kits erhält. Die Plasmid-Maxipräparation erfolgte nach dem Handbuch des QIAGEN-Kits:

1. In ein steriles Kunststoffröhrchen werden 5 ml LB_{amp}-Medium gegeben und mit einigen Mikrolitern eines Glycerolstocks von E.coli DH5α angeimpft (→ Vorkultur).
2. Die Lösung wird in einem Bakterienschüttler für etwa 8 h bei 37°C und 160 U/min inkubiert.
3. 200 ml LB_{amp}-Medium werden mit 1 - 2,5 ml Lösung der Vorkultur beimpft und über Nacht (14-16 h) bei 37°C im Bakterienschüttler (160 U/min) inkubiert. Die Kultur sollte dabei eine Zelldichte von 3-4 × 10^9 Zellen pro ml erreichen (≅ Pelletgewicht von 3 g/ml Medium).
4. Die Kultur wird in sterile Zentrifugationsgefässe aufgeteilt und bei 4°C für 15 Minuten bei 6000 U/min (ca. 5500 ×*g*) zentrifugiert.
5. Der Überstand wird abgeschüttet und die Pellets in insgesamt 10 ml Puffer P1 aufgenommen.
6. Zugabe von 10 ml Puffer P2, vorsichtig mischen und 5 min bei RT inkubieren.
7. Zugabe von 10 ml Puffer P3, 15-20 min auf Eis inkubieren.
8. Zentrifugation bei 20.000x g für 30 min bei 4°C.
9. Equilibrierung der QIAGEN-Säule mit 10 ml Puffer QBT.
10. Der Zentrifugationsüberstand wird über einen Faltenfilter auf die Säule gegeben und zweimal mit Puffer QC gewaschen.
11. Elution der gebundenen Plasmid-DNA mit 15 ml Puffer QF.
12. Präzipitation der DNA durch Zugabe von 10,5 ml Isopropanol.
13. Mischen und Zentrifugieren bei 15.000 ×*g* für 30 min bei 4°C.
14. Das Pellet wird mit 5 ml 70%igem Ethanol gewaschen und erneut bei 15.000 ×*g* für 10 min bei 4°C zentrifugiert.
15. Der Überstand wird vorsichtig abgeschüttet und das Pellet für 5-10 min getrocknet.
16. Die pelletierte Plasmid-DNA wird (je nach Pelletgrösse) in 200-500 µl H_2O_{bidest} resuspendiert.
17. Nach Bestimmung der Konzentration und der Reinheit wird die Lösung aliquotiert und die Aliquots bei -20°C gelagert.

Die Bestimmung der DNA-Konzentration und Reinheit erfolgt durch Messung der Absorption der Probe bei 260 und 280 nm mittels eines UV-Spektrometers.
Die Konzentration wird dabei über folgende Formel ermittelt:
$OD_{260} \times 50$ = DNA-Gehalt in µg/ml
Der Quotient aus OD_{260}/OD_{280} gibt Auskunft über die Reinheit der Aufarbeitung und sollte bei einem Wert von ≥ 1,7 liegen.

LB-Medium (Luria-Bertani-Medium)

10 g Bacto-Trypton
5 g Hefe-Extrakt
10 g NaCl
pH 7,0 einstellen und mit H_2O_{bidest} auf 1000 ml auffüllen, autoklavieren

Puffer P1 (Resuspensionspuffer)

50 mM Tris/HCl, pH 8,0
10 mM EDTA
100 µg/ml RNAse A

Puffer P2 (Lysepuffer)

200 mM NaOH
1% (w/v) SDS

Puffer P3 (Neutralisationspuffer)

3 M Kaliumacetat (pH 5,5)

Puffer QBT (Equilibrierungspuffer)

750 mM NaCl
30 mM 3-[N-Morpholino]propansulfonsäure (MOPS) (pH 7,0)
15% (v/v) Isopropanol
0,15% (v/v) Triton X-100

Puffer QC (Waschpuffer)

1 M NaCl

50 mM MOPS (pH 7,0)

15% (v/v) Isopropanol

Puffer QF (Elutionspuffer)

1,25 M NaCl

50 mM Tris/HCl (pH 8,5)

15% (v/v) Isopropanol

6.6.2 Restriktionsverdau

Die Überprüfung des amplifizierten Plasmids erfolgt durch Verdau mit Restriktionsenzymen und anschließender Auftrennung der Fragmente im Agarose-Gel. Die dabei entstehenden Fragmente werden auf die korrekten Größen überprüft. Abb. 58 zeigt ein repräsentatives Agarosegel eines Restriktionsverdaus.

Tab 14: Pipettierschema Restriktionsverdau.

Lösung (Mengenangaben in µl)	**unverdaut**	**Pvu II**	**Eco RI**	**Rsa I**	**Bgl I**
H_2O_{bidest}	9,7	11,5	12,2	11,5	11,9
Cut-Puffer	-	1,5	1,5	1,5	1,5
Plasmid *	0,3	1	0,3	1	0,6
Restriktionsenzym	-	1	1	1	1
6x Ladepuffer	2	3	3	3	3

* bei einer Konzentration von ca. 550ng/µL

1. Die Proben werden in entsprechend angegebener Reihenfolge bis inklusive Restriktionsenzym zusammenpipettiert (siehe Tab. 14). Der Restriktionsverdau erfolgt im Wasserbad bei 37°C für 60 Minuten.
2. Zugabe von 6x Ladepuffer, Probe kurz mischen und anschließend im 1,3%igen Agarosegel (1,5 µg/ml Ethidiumbromid) auftrennen.

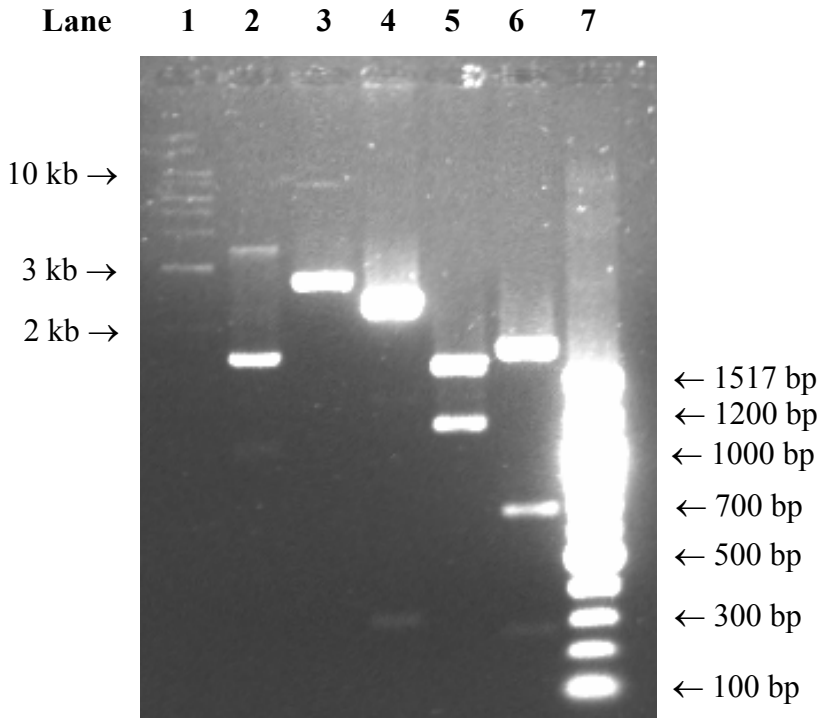


Abb. 58: Repräsentatives Bild eines Restriktionsverdaus von pUC18-Plasmid-DNA; Lane 1: 1kb DNA-Leiter NEB, Lane 2: pUC18 unverdaut, Lane 3: Eco RI-Verdau, Lane 4: Pvu II-Verdau, Lane5: Bgl I-Verdau, Lane 6: Rsa I-Verdau, Lane 7: 100bp DNA-Leiter NEB

In Tabelle 15 sind die berechneten Fragmente, sowie die durch Vergleich mit Größenmarkern (Abb. 58 Lane 1 und 7) abgeschätzten Fragmentgrößen, dargestellt. Vergleicht man die „Soll"-Werte mit den abgeschätzten, erkennt man eine sehr gute Übereinstimmung bei allen Fragmenten. Bei dem exprimierten und isolierten Produkt handelt es sich also um das gewünschte pUC18-Plasmid.

Tab. 15: Überprüfung der Fragmentgrößen nach Restriktionsverdau zu Abb. 58.

Enzym	Anzahl Schnitte	Schnitt bei AS	Fragmentgrößen (soll) [bp]	Fragmentgrößen (Gel) [bp]
Eco RI	1	450	2686	~2700
Pvu II	2	306, 628	322, 2364	~310, ~2400
Bgl I	2	245, 1813	1118, 1568	~1100, ~1600
Rsa I	3	168, 439, 2178	271, 676, 1739	~270, ~690, ~1750

Cut-Puffer Restriktionsendonucleasen

Eco RI	Eco RI+ Puffer (MBI Fermentas)
Pvu II	G+ Puffer (MBI Fermentas)
Bgl I	Y+/Tango Puffer (MBI Fermentas)
Rsa I	O+ Puffer (MBI Fermentas)

TAE-Puffer (50x) vor Gebrauch 1:50 verdünnen

242g	Tris Base
57,1 ml	Eisessig
100 ml	0,5 M EDTA (pH 8,0)

pH 8,5 einstellen und mit H_2O auf 1000 ml auffüllen.

6x Agarose Gelladepuffer

0,25%	Bromphenolblau
30%	Glycerol

Marker

1 kb	DNA Ladder (NEB)
100 bp	DNA Ladder (NEB)

6.7 Geräte

Autoklav:	Systec 5075 EL Autoklav (Systec)
Bakterienschüttler:	Tisch: Edmund Bühler SM 30 Aufsatz: Edmund Bühler TH 30
Blotting:	Semi-Phor™ (Hoefer Scientific Instruments)
Brutschrank:	WTB-Binder CO_2-Brutscharnk CB 210 (Binder)
Chemolumineszenz und Geldokumentation	Lumi-Imager™ (Boehringer Mannheim) Lumi-Imager Analyst 3.1 Software (Boehringer Mannheim)

Comet-Assay-Auswertesystem:	Comet-Assay II (Perceptive Instruments) Comet-Assay III (Perceptive Instruments) jeweils in Verwendung mit Fluoreszenzmikroskop Axioskop (Zeiss) und Objektiv Plan Neofluar 100x/1,3
Elektrophorese:	Power Pac 200 (Bio-Rad) Power Pac 300 (Bio-Rad) Sub Cell GT (Bio-Rad) Mini Protean II-System (Bio-Rad)
Kühl-/ Gefrierschränke:	Liebherr Premium (4°C, -20°C) Biofreezer MDF-U50V (Sanyo)
Magnetrührer:	MR 3002 (Heidolph)
Microplate-Reader:	Modell 450 (Bio-Rad) Fluoroskan Ascent FL (Labsystems)
Mikroskopie:	Durchlicht-/Fluoreszenz-Mikroskop, Typ Axioskop (Zeiss) Fluoreszenzfiltereinsatz 365, FT 395, LP 420 (Farbgläser mit Breitbandcharakter, UV-Anregung BP 450-490; FT 510; LP 520) Objektiv Plan Neofluar 100x/1,3 oil Objektiv Plan Neofluar 63x/1,25 oil Okular PL 10x Inversmikroskop Axiovert 25 (Zeiss)
pH-Meter	pH-Meter 766 Calimatic (Knick) Messkette: Mettler Toledo, Inlab 408/120
Pipetten/Zubehör	Multipette Plus (Eppendorf) Eppendorf Research P2,5 bis P5000 (Eppendorf) Pipettus Akku (Hirschmann Laborgeräte)

	Pipettenspitzen (Greiner)
Rüttler/Schüttler	Überkopfschüttler Heto Lab Equipment Type RK 10-VS Schüttler 3015 (GFL)
Sterilbank:	KR-130 BW (Kojair) LaminAir HLB 2448 GS (Heraeus)
Thermomixer:	Thermomixer 5436 (Eppendorf)
Trockenschrank:	Heraeus, Memmert
Ultraschallstab:	Labsonic 2000 (B. Braun)
Vakuumpumpe:	Vakuumsaugpumpe Laboport® (KNF Neuberger)
Vortex:	Vortex MS Minishaker IKA ®
Waagen:	Analysenwaage CP64-0CE (Sartoritus) Grobwaage 1574 MP8-2 (Sartorius)
Wasserbad:	SW-20C (Julabo) EC (Julabo)
Zentrifugen:	Zytozentrifuge 5804R (Eppendorf) Tischzentrifuge 5415 (Eppendorf) Tischzentrifuge 5417R (Eppendorf) J2-21 Centrifuge (Beckmann)

6.8 Reagenzien

Chemikalien allgemein

Acrylamid 30% wässrige Lösung mit 0,8% N,N´-Methylenbisacrylamid (Roth)

Agarose: peqGOLD Universal Agarose (peqlab)

Low melting agarose (Biorad)

Normal melting agarose (Biorad)

Ampicillin (Roth)

APS (Roth)

ATP (Sigma)

Baco-Trypton (ICN)

Bromphenolblau (Sigma)

BSA (ICN)

$CuSO_4$ (Merck)

DAPI / SR101 (Partec)

DMSO (Fluka)

DTT (Roth)

EDTA (Merck)

Eisessig (Roth)

Ethidiumbromid (Roth)

Ethanol p.A. (Roth)

Glycerol (Merck)

Glycin (Serva)

Harnstoff (Serva)

HCl (J.T. Baker)

Hefe-Extrakt (Gibco BRL)

HEPES (Roth)

Hoechst 33258 (Fluka)

Kalbsthymus-DNA (Fluka)

KCl (Merck)

kDNA (Topogen)

LumiGLO (Cell Signaling Technology)

Methanol (Roth)

$MgCl_2$ (Merck)

Milchpulver (Roth)

MTT (Sigma)

Na_2HPO_4 (Merck)

Na-Acetat (Merck)

NaCl (Merck)

NaOH (Merck)

PMSF (Alexis)

Puromycin (Sigma)

Saccharose (Merck)

SDS (Sigma)

Spermidin (Sigma)

Spermin (Sigma)

ß-Mercaptoethanol (Roth)

TEMED (Roth)

Tris (Roth)

Triton® X-100 (Sigma)

Trypanblau (Sigma)

Trypsin (Serva)

Tween-20 (Sigma)

Zellkultur

DMEM (Invitrogen)

RPMI 1640 (Invitrogen)

FKS (Invitrogen)

Penicillin / Streptomycin (Invitrogen)

Marker

1kb DNA-Ladder (NEB)

100bp DNA-Ladder (NEB)

SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Standard (Invitrogen)

Enzyme

Restriktionsendonuclease Eco RI (MBI Fermentas)

Restriktionsendonuclease Pvu II (MBI Fermentas)

Restriktionsendonuclease Bgl I (MBI Fermentas)

Restriktionsendonuclease Rsa I (MBI Fermentas)

Proteinase K (Sigma)

Topoisomerase I (2 mg/ml)*

Topoisomerase IIα (4 mg/ml)*

Topoisomerase IIβ (2 mg/ml)*

* Rekombinante Topoisomerasen wurden freundlicherweise von Prof. Boege, Universitätsklinikum Düsseldorf, zur Verfügung gestellt.

Substanzen

Etoposid (Sigma)

MNNG (Sigma)

Camptothecin (Sigma)

Cyanidinchlorid (Prof. Winterhalter, TU Braunschweig)

Delphinidinchlorid (Extrasynthese)

Malvidinchlorid (Extrasynthese)

Paeonidinchlorid (Extrasynthese)

Pelargonidinchlorid (Extrasynthese)

6.9 Verbrauchsmaterialien

Elektrophorese:	3MM Papiere (Whatman) oder Immunoblotpapiere (Roth)
	Hybond™-C Nitrozellulosemembran (Amersham Pharmacia)
Mikrotiterplatten 96-well:	PS-Mikroplatte 96K F-Form (Greiner)
Zellkultur / Comet-Assay:	Superfrost® Objektträger (Roth)
	Deckgläser (Roth)
	Neubauer-Zählkammer (Roth)

Alle hier nicht aufgeführte Plastikware oder sterilen Zellkulturmaterialien wurden von den Firmen Sarstedt, Greiner oder Nunc bezogen.

7 Literatur

Abu-Daya A, Fox KR (1997) Interaction of minor groove binding ligands with long AT tracts, *Nucleic Acids Res*, **25**, 4962-9

Alberts B, Johnson A, Lewis J *et al.* (2003) Molekularbiologie der Zelle, 4. Auflage, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co, Weinheim

Austin CA, Marsh KL (1998) Eukaryotic DNA topoisomerase II beta, *Bioessays*, **20**, 215-26

Austin CA, Patel S, Ono K, Nakane H, Fisher LM (1992) Site-specific DNA cleavage by mammalian DNA topoisomerase II induced by novel flavone and catechin derivatives, *Biochem J*, **282**, 883-889

Bailly C (2000) Topoisomerase I poisons and suppressors as anticancer drugs, *Curr Med Chem*, **7**, 39-58

Baraldi PG, Bovero A, Fruttarolo F, Preti D, Tabrizi MA, Pavani MG, Romagnoli R (2004) DNA minor groove binders as potential antitumor and antimicrobial agents, *Med Res Rev*, **24**, 475-528

Barthelmes HU, Habermeyer M, Christensen MO, Mielke C, Interthal H, Pouliot JJ, Boege F, Marko D (2004) TDP1 overexpression in human cells counteracts DNA damage mediated by topoisomerases I and II, *J Biol Chem*, **279**, 55618-25

Belitz HD, Grosch W, Schieberle P (2001) Lehrbuch der Lebensmittelchemie, 5. vollständig überarbeitete Auflage, Springer Verlag Berlin; Heidelberg; New York

Bell A, Kittler L, Lober G, Zimmer C (1997) DNA binding properties of minor groove binders and their influence on the topoisomerase II cleavage reaction, *J Mol Recognit*, **10**, 245-255

Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L (2003) Biochemie, 5. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg

Berger JM (1998) Structure of DNA topoisomerases, *Biochim Biophys Acta*, **1400**, 3-18

BgVV (2002) Toxikologische und ernährungsphysiologische Aspekte der Verwendung von Mineralstoffen und Vitaminen in Lebensmitteln Teil I: Mineralstoffe (einschließlich Spurenelemente) vom 18.01.2002 (www.bfr.bund.de/cd/945)

Bitsch I, Janssen M, Netzel M, Strass G, Frank T (2004a) Bioavailability of anthocyanidin-3-glycosides following consumption of elderberry extract and blackcurrant juice, *Int J Clin Pharmacol Ther*, **42**, 293-300

Bitsch R, Netzel M, Sonntag S, Strass G, Frank T, Bitsch I (2004b) Urinary Excretion of Cyanidin Glucosides and Glucuronides in Healthy Humans After Elderberry Juice Ingestion, *J Biomed Biotechnol*, **2004**, 343-345

Bocs C, Buhler C, Forterre P, Bergerat A (2001) DNA topoisomerases VI from hyperthermophilic archaea, *Methods Enzymol*, **334**, 172-9

Boege F (1996) Analysis of eukaryotic DNA topoisomerases and topoisomerase-directed drug effects, *Eur J Clin Chem Clin Biochem*, **34**, 873-88

Boege F, Straub T, Kehr A, Boesenberg C, Christiansen K, Andersen A, Jakob F, Kohrle J (1996) Selected novel flavones inhibit the DNA binding or the DNA religation step of eukaryotic topoisomerase I, *J Biol Chem*, **271**, 2262-70

Borde V, Duguet M (1998) The mapping of DNA topoisomerase sites in vivo: a tool to enlight the functions of topoisomerases, *Biochimie*, **80**, 223-233

Bub A, Watzl B, Heeb D, Rechkemmer G, Briviba K (2001) Malvidin-3-glucoside bioavailability in humans after ingestion of red wine, dealcoholized red wine and red grape juice, *Eur J Nutr*, **40**, 113-20

Burden DA, Kingma PS, Froelich-Ammon SJ, Bjornsti MA, Patchan MW, Thompson RB, Osheroff N (1996) Topoisomerase II.etoposide interactions direct the formation of drug-induced enzyme-DNA cleavage complexes, *J Biol Chem*, **271**, 29238-44

Burden DA, Osheroff N (1998) Mechanism of action of eukaryotic topoisomerase II and drugs targeted to the enzyme, *Biochim Biophys Acta*, **1400**, 139-54

Cao G, Muccitelli HU, Sanchez-Moreno C, Prior RL (2001) Anthocyanins are absorbed in glycated forms in elderly women: a pharmacokinetic study, *Am J Clin Nutr*, **73**, 920-6

Carey JF, Schultz SJ, Sisson L, Fazzio TG, Champoux JJ (2003) DNA relaxation by human topoisomerase I occurs in the closed clamp conformation of the protein, *Proc Natl Acad Sci*, **100**, 5640-5

Champoux JJ (2001) DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism, *Annu Rev Biochem*, **70**, 369-413

Champoux JJ, Dulbecco R (1972) An activity from mammalian cells that untwists superhelical DNA--a possible swivel for DNA replication, *Proc Natl Acad Sci*, **69**, 143-6

Chen AY, Yu C, Gatto B, Liu LF (1993) DNA minor groove-binding ligands: a different class of mammalian DNA topoisomerase I inhibitors, *Proc Natl Acad Sci*, **90**, 8131-8135

Chen G, Templeton D, Suttle DP, Stacey DW (1999) Ras stimulates DNA topoisomerase II alpha through MEK: a link between oncogenic signaling and a therapeutic target, *Oncogene*, **18**, 7149-60

Chowdhury AR, Sharma S, Mandal S, Goswami A, Mukhopadhyay S, Majumder HK (2002) Luteolin, an emerging anti-cancer flavonoid, poisons eukaryotic DNA topoisomerase I, *Biochem J*, **366**, 653-61

Chrencik JE, Staker BL, Burgin AB, Pourquier P, Pommier Y, Stewart L, Redinbo MR (2004) Mechanisms of camptothecin resistance by human topoisomerase I mutations, *J Mol Biol*, **339**, 773-84

Christensen MO, Larsen MK, Barthelmes HU, Hock R, Andersen CL, Kjeldsen E, Knudsen BR, Westergaard O, Boege F, Mielke C (2002) Dynamics of human DNA topoisomerases IIalpha and IIbeta in living cells, *J Cell Biol*, **157**, 31-44

Classen S, Olland S, Berger JM (2003) Structure of the topoisomerase II ATPase region and its mechanism of inhibition by the chemotherapeutic agent ICRF-187, *Proc Natl Acad Sci*, **100**, 10629-34

Clifford MN (2000) Anthocyanins – nature, occurence and dietary burden, *J Sci Food Agric*, **80**, 1063-1072

Connelly JC, Leach DR (2004) Repair of DNA covalently linked to protein, *Mol Cell*, **13**, 307-316

Constantinou A, Mehta R, Runyan C, Rao K, Vaughan A, Moon R (1995) Flavonoids as DNA topoisomerase antagonists and poisons: structure-activity relationships, *J Nat Prod*, **58**, 217-25

Corbett AH, Hong D, Osheroff N (1993) Exploiting mechanistic differences between drug classes to define functional drug interaction domains on topoisomerase II. Evidence that several diverse DNA cleavage-enhancing agents share a common site of action on the enzyme, *J Biol Chem*, **268**, 14394-8

Corbett AH, Osheroff N (1993) When good enzymes go bad: conversion of topoisomerase II to a cellular toxin by antineoplastic drugs, *Chem Res Toxicol*, **6**, 585-97

Corbett KD, Berger JM (2004) Structure, molecular mechanisms, and evolutionary relationships in DNA topoisomerases, *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, **33**, 95-118

Davies DR, Interthal H, Champoux JJ, Hol WG (2002) The crystal structure of human tyrosyl-DNA phosphodiesterase, Tdp1, *Structure*, **10**, 237-248

Davies DR, Interthal H, Champoux JJ, Hol WG (2004) Explorations of peptide and oligonucleotide binding sites of tyrosyl-DNA phosphodiesterase using vanadate complexes, *J Med Chem*, **47**, 829-37

Debethune L, Kohlhagen G, Grandas A, Pommier Y (2002) Processing of nucleopeptides mimicking the topoisomerase I-DNA covalent complex by tyrosyl-DNA phosphodiesterase, *Nucleic Acids Res*, **30**, 1198-204

Depeint F, Gee JM, Williamson G, Johnson IT (2002) Evidence for consistent patterns between flavonoid structures and cellular activities, *Proc Nutr Soc*, **61**, 97-103

Desai SD, Liu LF, Vazquez-Abad D, D'Arpa P (1997) Ubiquitin-dependent destruction of topoisomerase I is stimulated by the antitumor drug camptothecin, *J Biol Chem*, **272**, 24159-64

Dietary Supplements: A Framework for Evaluating Safety (2004) Committe on the Framework for Evaluating the Safety of the Dietary Supplements, National Research Council, INSTITUE OF MEDICINE and NATIONAL RESEARCH COUNCIL, *The National Academies Press*, Washington D.C.; ISBN 0-309-09110-1

Donaldson MS (2004) Nutrition and cancer: A review of the evidence for an anti-cancer diet, *Nutr J*, **3**, 19

Duthie GG, Gardner PT, Kyle JA (2003) Plant polyphenols: are they the new magic bullet?, *Proc Nutr Soc*, **62**, 599-603

Errington F, Willmore E, Leontiou C, Tilby MJ, Austin CA (2004) Differences in the longevity of topo IIalpha and topo IIbeta drug-stabilized cleavable complexes and the relationship to drug sensitivity, *Cancer Chemother Pharmacol*, **53**, 155-62

Fairbairn DW, Olive PL, O'Neill KL (1995) The comet assay: a comprehensive review, *Mutat Res*, **339**, 37-59

Favot L, Martin S, Keravis T, Andriantsitohaina R, Lugnier C (2004) Involvement of cyclin-dependent pathway in the inhibitory effect of delphinidin on angiogenesis, *Cardiovasc Res*, **59**, 479-87

Felgines C, Talavera S, Gonthier MP, Texier O, Scalbert A, Lamaison JL, Remesy C (2003) Strawberry anthocyanins are recovered in urine as glucuro- and sulfoconjugates in humans, *J Nutr*, **133**, 1296-301

Felix CA (1998) Secondary leukemias induced by topoisomerase-targeted drugs, **1400**, 233-255

Felsenfeld G, Groudine M (2003) Controlling the double helix, *Nature,* **421**, 448-453

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**, 423-35

Fritz J (2004) Biologische Wirkung von Flavonoiden: Anthocyanidine im Vergleich zu anderen Flavonoidklassen und Isoflavonmetabolite im Vergleich zu den Ausgangsverbindungen, Diplomarbeit an der Technischen Universität Kaiserslautern, Fachbereich Lebensmittelchemie und Umwelttoxikologie

Froelich-Ammon SJ, Osheroff N (1995) Topoisomerase poisons: harnessing the dark side of enzyme mechanism, *J Biol Chem*, **270**, 21429-32

Galati G, O'Brien PJ (2004) Potential toxicity of flavonoids and other dietary phenolics: significance for their chemopreventive and anticancer properties, *Free Radic Biol Med*, **37**, 287-303

Galvano F, La Fauci L, Lazzarino G, Fogliano V, Ritieni A, Ciappellano S, Battistini NC, Tavazzi B, Galvano G (2004) Cyanidins: metabolism and biological properties, *J Nutr Biochem*, **15**, 2-11

Gedik CM, Ewen SW, Collins AR (1992) Single-cell gel electrophoresis applied to the analysis of UV-C damage and its repair in human cells, *Int J Radiat Biol*, **62**, 313-20

Gellert M, Mizuuchi K, O'Dea MH, Nash HA (1976) DNA gyrase: an enzyme that introduces superhelical turns into DNA, *Proc Natl Acad Sci*, **73**, 3872-6

Glazer AN, Rye HS (1992) Stable dye-DNA intercalation complexes as reagents for high-sensitivity fluorescence detection, *Nature*, **359**, 859-61

Gordaliza M, Castro MA, del Corral JM, Feliciano AS (2000) Antitumor properties of podophyllotoxin and related compounds, **6**, 1811-39

Gottardis MM, Robinison SP, Jordan VC (1988) Estradiol-stimulated growth of MCF-7 tumors implanted in athymic mice: a model to study the tumoristatic action of tamoxifen*, J Steroid Biochem*, **30**, 311-4

Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R (1977) Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5, *J Gen Virol*, **36**, 59-74

Hanai R, Caron PR, Wang JC (1996) Human TOP3: a single-copy gene encoding DNA topoisomerase III, *Proc Natl Acad Sci*, **93**, 3653-7

Hande KR (1998) Clinical applications of anticancer drugs targeted to topoisomerase II, *Biochim Biophys Acta*, **1400**, 173-84

Hardy CD, Crisona NJ, Stone MD, Cozzarelli NR (2003) Disentangling DNA during replication: a tale of two strands, *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, **359**, 39-47

Heng HH, Goetze S, Ye CJ, Liu G, Stevens JB, Bremer SW, Wykes SM, Bode J, Krawetz SA (2004) Chromatin loops are selectively anchored using scaffold/matrix-attachment regions, *J Cell Sci*, **177**, 999-1008

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

Horvathova E, Slamenova D, Gabelova A (1999) Use of single cell gel electrophoresis (comet assay) modifications for analysis of DNA damage, *Gen Physiol Biophys*, **18**, 70-4

Hou DX (2003) Potential mechanisms of cancer chemoprevention by anthocyanins, *Curr Mol Med*, **3**, 149-59

Hou DX, Fujii M, Terahara N, Yoshimoto M (2004) Molecular Mechanisms Behind the Chemopreventive Effects of Anthocyanidins, *J Biomed Biotechnol*, **2004**, 321-325

Hsiang YH, Hertzberg R, Hecht S, Liu LF (1985) Camptothecin induces protein-linked DNA breaks via mammalian DNA topoisomerase I, *J Biol Chem*, **260**, 14873-8

Hwang Y, Rhodes D, Bushman F (2000) Rapid microtiter assays for poxvirus topoisomerase, mammalian type IB topoisomerase and HIV-1 integrase: application to inhibitor isolation, *Nucleic Acids Res*, **28**, 4884-92

Interthal H, Pouliot JJ, Champoux JJ (2001) The tyrosyl-DNA phosphodiesterase Tdp1 is a member of the phospholipase D superfamily, *Proc Natl Acad Sci*, **98**, 12009-14

Isaacs RJ, Davies SL, Sandri MI, Redwood C, Wells NJ, Hickson ID (1998) Physiological regulation of eukaryotic topoisomerase II, *Biochim Biophys Acta*, **1400**, 121-37

Juan CC, Hwang JL, Liu AA, Whang-Peng J, Knutsen T, Huebner K, Croce CM, Zhang H, Wang JC, Liu LF (1988) Human DNA topoisomerase I is encoded by a single-copy gene that maps to chromosome region 20q12-13.2, *Proc Natl Acad Sci*, **85**, 8910-3

Kang SY, Seeram NP, Nair MG, Bourquin LD (2003) Kang SY, Seeram NP, Nair MG, Bourquin LD, *Cancer Lett*, **194**, 13-9

Karlson P. Doenecke D, Koolman J (1994) Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler, 14. neubearbeitete Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart

Kay CD, Mazza G, Holub BJ, Wang J (2004) Anthocyanin metabolites in human urine and serum, *Br J Nutr*, **91**, 933-42

Klingbeil MM, Englund PT (2004) Closing the gaps in kinetoplast DNA network replication, *Proc Natl Acad Sci*, **101**, 4333-4

Kong JM, Chia LS, Goh NK, Chia TF, Brouillard R (2003) Analysis and biological activities of anthocyanins, *Phytochemistry*, **64**, 923-33

Kulling SE, Watzl B (2003) Phytoestrogene, *Ernährungs-Umschau*, **50**, 234-39

Laco GS, Collins JR, Luke BT, Kroth H, Sayer JM, Jerina DM, Pommier Y (2002) Human topoisomerase I inhibition: docking camptothecin and derivatives into a structure-based active site model, *Biochemistry*, **41**, 1428-35

Lapidot T, Harel S, Granit R, Kanner J (1998) Bioavailability of Red Wine Anthocyanins As Detected in Human Urine, *J Agric Food Chem*, **46**, 4297-4302

Larsen AK, Escargueil AE, Skladanowski A (2003) Catalytic topoisomerase II inhibitors in cancer therapy, *Pharmacol Ther*, **99**, 167-81

Larsen AK, Gobert C (1999) DNA topoisomerase I in oncology: Dr Jekyll or Mr Hyde?, *Pathol Oncol Res*, **5**,

Larsen AK, Skladanowski A, Bojanowski K (1996) The roles of DNA topoisomerase II during the cell cycle, *Prog Cell Cycle Res*, **2**, 229-39

Lila MA (2004) Anthocyanins and Human Health: An In Vitro Investigative Approach, *J Biomed Biotechnol*, **2004**, 306-313

Lindl T (2000) Zell- und Gewebekultur: Einführung in die Grundlagen sowie ausgewählte Methoden und Anwendungen, 4. überarbeitete und erweiterte Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg

Lisby M, Olesen JR, Skouboe C, Krogh BO, Straub T, Boege F, Velmurugan S, Martensen PM, Andersen AH, Jayaram M, Westergaard O, Knudsen BR (2001) Residues within the N-terminal domain of human topoisomerase I play a direct role in relaxation, *J Biol Chem*, **276**, 20220-7

Liu C, Pouliot JJ, Nash HA. (2002) Repair of topoisomerase I covalent complexes in the absence of the tyrosyl-DNA phosphodiesterase Tdp1, *Proc Natl Acad Sci*, **99**, 14970-5

Liu C, Pouliot JJ, Nash HA (2004) The role of TDP1 from budding yeast in the repair of DNA damage, *DNA Repair (Amst)*, **3**, 593-601

Mazza G, Kay CD, Cottrell T, Holub BJ (2002) Absorption of anthocyanins from blueberries and serum antioxidant status in human subjects, *J Agric Food Chem*, **50**, 7731-7

Mazza G, Miniati E (1993) Anthocyanins in Fruits, Vegetables and Grains, *CRC Press: Boca Raton*

Manach C, Scalbert A, Morand C, Remesy C, Jimenez L (2004) Polyphenols: food sources and bioavailability, *Am J Clin Nutr*, **79**, 727-47

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**, 318-25

Markovits J, Linassier C, Fosse P, Couprie J, Pierre J, Jacquemin-Sablon A, Saucier JM, Le Pecq JB, Larsen AK (1989) Inhibitory effects of the tyrosine kinase inhibitor genistein on mammalian DNA topoisomerase II, *Cancer Res*, **49**, 5111-7

Martin-Cordero C, Lopez-Lazaro M, Pinero J, Ortiz T, Cortes F, Ayuso MJ (2000) Glucosylated isoflavones as DNA topoisomerase II poisons, J Enzyme Inhib, **15**, 455-60

McGhie TK, Ainge GD, Barnett LE, Cooney JM, Jensen DJ (2003) Anthocyanin glycosides from berry fruit are absorbed and excreted unmetabolized by both humans and rats, *J Agric Food Chem*, **51**, 4539-4548

Meiers S, Kemeny 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**, 958-62

Meyer KN, Kjeldsen E, Straub T, Knudsen BR, Hickson ID, Kikuchi A, Kreipe H, Boege F (1997) Cell cycle-coupled relocation of types I and II topoisomerases and modulation of catalytic enzyme activities, **136**, 775-788

Mittra B, Saha A, Chowdhury AR, Pal C, Mandal S, Mukhopadhyay S, Bandyopadhyay S, Majumder HK (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, *Mol Med*, **6**, 527-41

Mo YY, Wang C, Beck WT (2000) A novel nuclear localization signal in human DNA topoisomerase I, *J Biol Chem*, **275**, 41107-13

Morgan AR, Lee JS, Pulleyblank DE, Murray NL and Evans DH (1979) Review: ethidium fluorescenceassays. Part 1. Physiochemical studies, *Nucleid Acid Res*, **7**, 547-569

Mülleder U, Murkovic M, Pfannhauser W (2002) Urinary excretion of cyanidin glycosides, J Biochem Biophys Methods, **53**, 61-66

Muller MT (1985) Quantitation of eukaryotic topoisomerase I reactivity with DNA. Preferential cleavage of supercoiled DNA, *Biochim Biophys Acta*, **824**, 263-7

Murkovic M (2002) Physiologische Wirkungen der Anthocyane, *Ernährung und Medizin*, **17**, 167-172

Murkovic M, Adam U, Pfannhauser W (2000) Analysis of anthocyane glycosides in human serum, *Fresenius J Anal Chem*, **366**, 379-81

Niederberger E (1998) Mechanismusorientierte Untersuchungen zur antineoplastischen Wirkung von Naturstoffen und Naturstoffderivaten, Dissertation im Fachbereich Biologie der Universität Kaiserslautern

Nivens MC, Felder T, Galloway AH, Pena MM, Pouliot JJ, Spencer HT (2004) Engineered resistance to camptothecin and antifolates by retroviral coexpression of tyrosyl DNA phosphodiesterase-I and thymidylate synthase, *Cancer Chemother Pharmacol*, **53**, 107-15

Oberlies NH, Kroll DJ (2004) Camptothecin and taxol: historic achievements in natural products research, *J Nat Prod*, **67**, 129-35

Okura A, Arakawa H, Oka H, Yoshinari T, Monden Y (1988) Effect of genistein on topoisomerase activity and on the growth of [Val 12]Ha-ras-transformed NIH 3T3 cells, *Biochem Biophys Res Commun*, **157**, 183-9

Osheroff N (1998) DNA topoisomerases, *Biochim Biophys Acta*, **1400**, 1-2

Plo I, Liao ZY, Barcelo JM, Kohlhagen G, Caldecott KW, Weinfeld M, Pommier Y (2003) Association of XRCC1 and tyrosyl DNA phosphodiesterase (Tdp1) for the repair of topoisomerase I-mediated DNA lesions, *DNA Repair*, **2**, 1087-100

Pommier Y (2004) Camptothecins and topoisomerase I: a foot in the door. Targeting the genome beyond topoisomerase I with camptothecins and novel anticancer drugs: importance of DNA replication, repair and cell cycle checkpoints, *Curr Med Chem Anti-Canc Agents*, **4**, 429-34

Pommier Y, Kerrigan D, Hartman KD, Glazer RI (1990) Phosphorylation of mammalian DNA topoisomerase I and activation by protein kinase C, J Biol Chem, **265**, 9418-22

Pommier Y, Pourquier P, Fan Y, Strumberg D (1998) Mechanism of action of eukaryotic DNA topoisomerase I and drugs targeted to the enzyme, *Biochim Biophys Acta*, **1400**, 83-105

Pommier Y, Pourquier P, Urasaki Y, Wu J, Laco GS (1999) Topoisomerase I inhibitors: selectivity and cellular resistance, *Drug Resist Updat*, **2**, 307-318

Pourquier P, Pommier Y (2001) Topoisomerase I-mediated DNA damage, Adv Cancer Res, **80**, 189-216

Postow L, Crisona NJ, Peter BJ, Hardy CD, Cozzarelli NR (2001) Topological challenges to DNA replication: conformations at the fork, *Proc Natl Acad Sci*, **98**, 8219-8226

Ramirez-Mares MV, Chandra S, de Mejia EG (2004) In vitro chemopreventive activity of Camellia sinensis, Ilex paraguariensis and Ardisia compressa tea extracts and selected polyphenols, *Mutat Res*, **554**, 53-65

Raymond AC, Rideout MC, Staker B, Hjerrild K, Burgin AB Jr (2004) Analysis of human tyrosyl-DNA phosphodiesterase I catalytic residues, *J Mol Biol*, **338**, 895-906

Renaud S, de Lorgeril M (1992) Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease, *Lancet*, **339**, 1523-6

Robinson MJ, Corbett AH, 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**, 3638-43

Roche Manual Cell proliferation Kit I (MTT), Version 3, 2003, Roche Diagnostics, Penzberg, Germany

Römpp online, Version 2.6 vom 17. Februar, Georg Thieme Verlag 2005

Ross JA (2000) Dietary flavonoids and the MLL gene: A pathway to infant leukemia?, *Proc Natl Acad Sci*, **97**, 4411-3

Ross JA, Potter JD, Reaman GH, Pendergrass TW, Robison LL (1996) Maternal exposure to potential inhibitors of DNA topoisomerase II and infant leukemia (United States): a report from the Children's Cancer Group, *Cancer Causes Control*, **7**, 581-90

Scharrer A, Ober M (1981) Anthocyanosides in the treatment of retinopathies, Klin Monatsbl Augenheilkd, 178, 386-9

Seeram NP, Zhang Y, Nair MG (2003) Inhibition of proliferation of human cancer cells and cyclooxygenase enzymes by anthocyanidins and catechins, *Nutr Cancer*, **46**, 101-106

Sordet O, Khan QA, Kohn KW, Pommier Y (2003) Apoptosis induced by topoisomerase inhibitors, *Curr Med Chem Anti-Canc Agents*, **3**, 271-290

Soule HD, Vazguez J, Long A, Albert S, Brennan M (1973) A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma, *J Natl Cancer Inst*, **51**, 1409-1413

Stewart L, Ireton GC, Champoux JJ (1997) Reconstitution of human topoisomerase I by fragment complementation, *J Mol Biol*, **369**, 355-72

Stewart L, Redinbo MR, Qiu X, Hol WG, Champoux JJ (1998) A model for the mechanism of human topoisomerase I, *Science*, **729**, 1534-41

Strick R, Strissel PL, Borgers S, Smith SL, Rowley JD (2000) Dietary bioflavonoids induce cleavage in the MLL gene and may contribute to infant leukemia, *Proc Natl Acad Sci*, **97**, 4790-5

Strick R, Strissel PL, Gavrilov K, Levi-Setti R (2001) Cation-chromatin binding as shown by ion microscopy is essential for the structural integrity of chromosomes, *J Cell Biol*, **155**, 899-910

Sukhanova A, Grokhovsky S, Zhuze A, Devy J, Pluot M, Oleinikov V, Nabiev I (2003) Camptothecin conjugated with DNA minor-groove binder netropsin: enhanced lactone stability, inhibition of human DNA topoisomerase I and antiproliferative activity, Anticancer Res, **23**, 2609-16

Tall JM, Seeram NP, Zhao C, Nair MG, Meyer RA, Raja SN (2004) Tart cherry anthocyanins suppress inflammation-induced pain behavior in rat, *Behav Brain Res*, **153**, 181-8

Tan KB, Dorman TE, Falls KM, Chung TD, Mirabelli CK, Crooke ST, Mao J (1992) Topoisomerase II alpha and topoisomerase II beta genes: characterization and mapping to human chromosomes 17 and 3, respectively, *Cancer Res*, **52**, 231-4

Teng MK, Usman N, Frederick CA, Wang AH (1988) The molecular structure of the complex of Hoechst 33258 and the DNA dodecamer d(CGCGAATTCGCG), *Nucleic Acids Res*, **16**, 2671-90

Tewey KM, Chen GL, Nelson EM, Liu LF (1984) Intercalative antitumor drugs interfere with the breakage-reunion reaction of mammalian DNA topoisomerase II, *J Biol Chem*, **259**, 9182-9187

Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979) Electrophoretic Transfer of Proteins from Polyacrylamide Gels to Nitrocellulose Sheets: Procedure and some Applications, *PNAS*, **76**, 4350-4354

van Driel R, Fransz PF, Verschure PJ (2003) The eukaryotic genome: a system regulated at different hierarchical levels, *J Cell Sci*, **116**, 4067-75

Wall ME, Wani MC, Cook CE, Palmer KH, McPhail AT, Sim GA (1966) Plant Antitumor Agents. I. The Isolation and Structure of Camptothecin, a Novel Alkaloidal Leukemia and Tumor Inhibitor from Camptotheca acuminate, 88, 3888-90

Watzl B, Briviba K, Rechkemmer G (2002) Anthocyane, *Ernährungs-Umschau*, **49**, 148-150

Watzl B, Rechkemmer G (2001) Flavonoide, *Ernährungs-Umschau*, **48**, 498-502

Wang JC (1971) Interaction between DNA and an Escherichia coli protein omega, *J Mol Biol*, **55**, 523-33

Webb MR, Ebeler SE (2004) Comparative analysis of topoisomerase IB inhibition and DNA intercalation by flavonoids and similar compounds: structural determinates of activity, *Biochem J*, **384**, 527-41

Williams CA, Grayer RJ (2004) Anthocyanins and other flavonoids, *Nat Prod Rep*, **21**, 539-573

Wilstermann AM, Osheroff N (2003) Stabilization of eukaryotic topoisomerase II-DNA cleavage complexes, *Curr Top Med Chem*, **3**, 321-38

Wiseman S, Mulder T, Rietveld A (2001) Tea flavonoids: bioavailability in vivo and effects on cell signaling pathways in vitro, **3**, 1009-21

Wu J, Liu LF (1997) Processing of topoisomerase I cleavable complexes into DNA damage by transcription, *Nucleic Acids Res*, **25**, 4181-6

Yamashita N, Kawanishi S (2000) Distinct mechanisms of DNA damage in apoptosis induced by quercetin and luteolin, *Free Radic Res*, **33**, 623-33

Yang SW, Burgin AB Jr, Huizenga BN, Robertson CA, Yao KC, Nash HA (1996) A eukaryotic enzyme that can disjoin dead-end covalent complexes between DNA and type I topoisomerases, *Proc Natl Acad Sci*, **93**, 11534-9

Yu D, Khan E, Khaleque MA, Lee J, Laco G, Kohlhagen G, Kharbanda S, Cheng YC, Pommier Y, Bharti A (2004) Phosphorylation of DNA topoisomerase l by the c-Abl tyrosine kinase confers camptothecin sensitivity, *J Biol Chem*, **279**, 51851-61

8 Anhang

Anhangsverzeichnis

Verwendete Formeln . . . . . S. 157
Daten zu Abbildungen 41A . . . . . S. 159
Daten zu Abbildungen 42 . . . . . S. 161
Daten zu Abbildungen 43 . . . . . S. 162
Daten zu Abbildungen 44 . . . . . S. 164
Daten zu Abbildungen 45 . . . . . S. 165
Daten zu Abbildungen 47 . . . . . S. 167
Daten zu Abbildungen 49 . . . . . S. 169
Daten zu Abbildungen 50 . . . . . S. 171
Daten zu Abbildungen 51 . . . . . S. 173

Verwendete Formeln

Lineare Regression: y = A + B*x nach Origin 6.0 mit Messpunkten (x/y):

y-Achseabschnitt (A):

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

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_{50}-Wert:

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

Fehler des IC_{50}-Wertes (m_{IC50}):

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

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

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

Standardabweichung (σ_{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):

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

x^* : Testwert

Ausreißerkriterium:	x* = Ausreißer, wenn r >	1,409	bei n = 3
		1,645	bei n = 4
		1,757	bei n = 5
		1,814	bei n = 6
		1,848	bei n = 7
		1,870	bei n = 8

Daten zu Abb. 41A

Abb. 41A Ergebnisse zum Immuno-Band-Depletionassay an HEK 293 Zellen.

Topoisomerase IIα

Datum	Kontr.	Fehler Kontr.		VP-16 200 µM	VP-16 100 µM
24.08.2004	100	0,4		65,61	69,88
19.08.2004	100				
17.08.2004	100	17		55,38	81,10
11.09.2004	100	2,7		50,32	53,81
23.07.2004	100			46,46	55,70
15.06.2004	100	9,1		57,00	64,19
08.06.2004	100	12,5			68,44
11.09.2004	100	5,6		42,81	
			Mittelwert	**52,93**	**65,52**
			Fehler	**7,47**	**9,18**
		Signifikanz zur Kontrolle	**P=**	0,000000003	0,0000007

Datum	Kontr.	Fehler Kontr.		Cy 100 µM	Cy 10 µM	Cy 1 µM
24.08.2004	100	0,4		113,80	120,05	111,31
19.08.2004	100			110,78	111,93	92,11
17.08.2004	100	17		97,79	85,37	82,47
11.09.2004	100	2,7		67,01	88,35	97,27
			Mittelwert	**97,34**	**101,43**	**95,79**
			Fehler	**18,5**	**14,9**	**10,4**
		Signifikanz zur Kontrolle	**p=**	0,78	0,86	0,55

Datum	Kontr.	Fehler Kontr.		Del 100 µM	Del 10 µM	Del 1 µM
23.07.	100			87,56	110,07	
15.06.	100	9,1		66,44	97,62	
08.06.	100	12,5		77,04		96,17
11.09.	100	5,6			96,14	114,16
			Mittelwert	**77,02**	**101,28**	**105,17**
			Fehler	**8,6**	**6,2**	**9,0**
		Signifikanz zur Kontrolle	**p=**	0,058	0,84	0,54

Abb. 41A Ergebnisse zum Immuno-Band-Depletionassay an HEK 293 Zellen.

Topoisomerase IIβ

Datum	Kontr.	Fehler Kontr.		**VP-16 200 µM**	**VP-16 100 µM**
24.082004.	100			39,17	53,60
19.08.2004	100	13,4			55,49
17.08.2004	100			52,87	58,69
12.08.2004	100	15,5		41,95	63,54
13.07.2004	100			62,58	69,54
23.06.2004	100	4,6		60,99	57,03
15.06.2004	100			61,30	91,57
08.06.2004	100				42,70
			Mittelwert	**53,14**	**61,52**
			Fehler	**9,47**	**13,48**
		Signifikanz zur Kontrolle	**p=**	0,000000008	0,0000003

Datum	Kontr.	Fehler Kontr.		**Cy 100 µM**	**Cy 10 µM**	**Cy 1 µM**
24.08.2004	100			91,44	76,83	
19.08.2004	100	13,4			157,29	97,41
17.08.2004	100			91,60		
12.08.2004	100	15,5		117,68	95,58	114,36
09.08.2004	100			75,56	85,31	86,92
			Mittelwert	**94,07**	**103,75**	**99,56**
			Fehler	**15,1**	**31,6**	**11,3**
		Signifikanz zur Kontrolle	**p=**	0,51	0,8	0,96

Datum	Kontr.	Fehler Kontr.		**Del 100 µM**	**Del 10 µM**	**Del 1 µM**
23.07.2004	100			70,35		
13.07.2004	100			78,31	86,92	
23.06.2004	100	4,6		124,36	133,86	114,85
15.06.2004	100			104,21	82,38	79,31
08.06.2004	100				95,62	
			Mittelwert	**94,31**	**99,69**	**97,08**
			Fehler	**21,4**	**20,3**	**17,8**
		Signifikanz zur Kontrolle	**p=**	0,57	0,97	0,74

Daten zu Abb. 42

Abb. 42: Ethidiumbromid-Verdrängungsassay mit Referenz Actinomycin D.

Actinomycin D [µM]

Messung	0	Fehler	0,5	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4
1	100,0	0,87				50,2411	48,39	42,68		
2	100,0	1,07	78,77	67,50						
3	100,0	1,51	88,10	66,68	58,19	44,90	44,28	42,63	37,13	34,41
4	100,0	1,95	85,50	66,50	57,09	46,82	44,34	40,33	37,76	34,58
5	100,0		88,54	68,89	56,73	47,39	43,40	40,66	37,85	34,30
Mittelwert	**100,0**	**1,35**	**85,23**	**67,39**	**57,34**	**47,34**	**45,10**	**41,57**	**37,58**	**34,43**
Fehler.			**3,90**	**0,94**	**0,62**	**1,91**	**1,93**	**1,08**	**0,32**	**0,11**

Bestimmung des IC_{50}-Wertes Ethidiumbromid-Vverdrängungsassay:

Regression nach Origin 6.0 mit y = A + B*x

Substanz	Lineare Regression	IC_{50} [µM]	A	m_A	B	m_B
Actinomycin D	0-2 µM	1,8 ± 0,2	98,102	2,33956	-26,642	1,91025

Daten zu Abb. 43

Abb. 43: Ethidiumbromid-Verdrängungsassay mit Anthocyanidinen.

Delphinidin [µM]

Datum	0	Fehler	5	10	15	20	25	30	40	50
1	100,0	1,37	74,96	57,95	50,95	43,6274	41,01			
2	100,0	1,69								
3	100,0	1,54	74,31	59,18	48,04	43,02	36,38	34,41	32,39	17,82
4	100,0	2,11	79,91	62,61	53,31	41,90	38,51	36,50	29,09	29,67
6	100,0	0,47	69,12	49,50	35,07	25,95	21,91	24,09	24,12	20,63
Mittelwert	**100,0**	**1,44**	**74,58**	**57,31**	**46,84**	**38,63**	**34,45**	**31,67**	**28,53**	**22,71**
Fehler			**3,82**	**4,82**	**7,05**	**7,34**	**7,43**	**5,42**	**3,40**	**5,06**

Cyanidin [µM]

Datum	0	Fehler	5	10	15	20	25	30	40	50
1	100,0	0,70	88,23	75,96	67,62	57,721	51,28		43,84	38,91
2	100,0	1,38	91,31	77,92	67,91	59,28	59,14	56,97	58,11	48,79
3	100,0	0,87	91,77	83,48	75,55	65,94	61,26	57,55	56,90	50,00
4	100,0	0,49	89,20	78,39	69,96	58,19	53,51	50,85		54,94
5	100,0	0,85	94,40	82,58	77,12	68,86	62,70	54,79	46,69	38,55
Mittelwert	**100,0**	**0,86**	**90,98**	**79,67**	**71,63**	**62,00**	**57,58**	**55,04**	**51,38**	**46,24**
Fehler			**2,15**	**2,88**	**3,95**	**4,53**	**4,44**	**2,63**	**6,22**	**6,47**

Pelargonidin [µM]

Datum	0	Fehler	5	10	15	20	25	30	40	50
1	100,0	0,89								
2	100,0	2,60	85,18	74,28	65,26	55,75	47,51	37,62	26,25	21,81
3	100,0	0,43	84,70	74,78	63,73	49,53	44,23	37,98	26,74	23,93
4	100,0	0,64	77,72	62,93	54,53	42,89	36,33	31,10	20,36	15,11
5	100,0	1,17	77,77	62,40	51,33	39,77	32,45	27,84	19,62	11,81
Mittelwert	**100,0**	**1,15**	**81,34**	**68,60**	**58,71**	**46,99**	**40,13**	**33,64**	**23,24**	**18,17**
Fehler			**3,60**	**5,94**	**5,92**	**6,17**	**6,02**	**4,32**	**3,27**	**4,91**

Paeonidin [µM]

Datum	0	Fehler	5	10	15	20	25	30	40	50
1	100,0	0,38	84,32	82,85	79,11	77,1405	75,87	70,47	67,80	63,38
2	100,0	1,71	89,61	84,63	83,98	79,56	77,57	75,36	70,66	
3	100,0	1,52	82,13	73,84	70,40	69,59	69,05	66,12	63,00	57,05
4	100,0	1,40	76,56	71,50	69,93	67,74	68,41	64,76	59,77	53,13
Mittelwert	**100,0**	**1,25**	**83,15**	**78,20**	**75,85**	**73,51**	**72,73**	**69,18**	**65,31**	**57,85**
Fehler			**4,68**	**5,63**	**5,95**	**4,96**	**4,05**	**4,15**	**4,21**	**4,23**

Malvidin [µM]

Datum	0	Fehler	5	10	15	20	25	30	40	50
1	100,0	0,57								
2	100,0	0,72	82,08	76,21	70,97	66,72				
3	100,0	1,18	80,65	71,82	65,91	58,14	57,69	52,40	46,68	41,18
4	100,0	1,77	78,12	67,60	62,09	56,23	53,79	50,80	42,54	41,34
5	100,0	0,31	81,35	69,56	64,42	57,58	55,83	52,69	47,74	43,07
Mittelwert	**100,0**	**0,91**	**80,55**	**71,30**	**65,85**	**59,67**	**55,77**	**51,96**	**45,66**	**41,86**
Fehler			**1,49**	**3,20**	**3,25**	**4,13**	**1,60**	**0,83**	**2,24**	**0,86**

Bestimmung des IC_{50}-Wertes Ethidiumbromid-Vverdrängungsassay:

Regression nach Origin 6.0 mit y = A + B*x

Substanz	Lineare Regression	IC_{50} [µM]	A	m_A	B	m_B
Del	10-20 µM	13,7 ± 1,5	75,61333	2,02841	-1,868	0,13048
Cy	20-50 µM	42,0 ± 4,5	70,72155	1,42427	-0,49314	0,04103
Pg	10-30 µM	19,8 ± 2,1	85,014	2,68113	-1,77	0,12639
Pn	-	>50 µM	-	-	-	-
Mv	20-40 µM	33,4 ± 1,8	73,32429	0,83899	-0,69771	0,02826

Daten zu Abb. 44

Abb. 44: Verdrängung von Hoechst 33258 durch Netropsin.

Netropsin [µM]

Datum	0	Fehler	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8
1	100,0	0,99	85,25	66,01	53,40	43,2471	35,94	28,02	23,01	18,33
2	100,0	1,24	86,81	68,20	54,49	47,17	40,92	33,60	31,03	25,69
3	100,0	1,16	82,57	63,69	51,51	41,88	36,01	29,01	25,46	19,53
Mittelwert	**100**	**1,13**	**84,88**	**65,97**	**53,13**	**44,10**	**37,62**	**30,21**	**26,50**	**21,19**
Fehler			**1,8**	**1,8**	**1,2**	**2,2**	**2,3**	**2,4**	**3,4**	**3,2**

Bestimmung des IC_{50}-Wertes Hoechst 33258-Vverdrängungsassay:

Regression nach Origin 6.0 mit y = A + B*x

Substanz	Lineare Regression	IC_{50} [µM]	A	m_A	B	m_B
Netropsin	0,2-0,5 µM	0,36 ± 0,06	84,324	3,7682	-94,77	10,25574

Daten zu Abb. 45

Abb. 45: Verdrängung von Hoechst 33258 aus der kleinen Furche der DNA durch Anthocyanidine.

Delphinidin [µM]

Datum	0	Fehler	5	10	15	20	25	30	40	50
1	100,0	1,51	77,73	63,56	52,44	44,052	41,11	38,10	36,35	
2	100,0	1,44	82,88	68,37	58,33	49,07	46,18	44,19	35,27	34,20
3	100,0	1,13	69,32	49,08	36,79	26,86	23,82	24,92	26,76	23,21
Mittelwert	**100,0**	**1,36**	**76,64**	**60,34**	**49,19**	**39,99**	**37,04**	**35,74**	**32,79**	**28,71**
Fehler			**5,59**	**8,20**	**9,09**	**9,51**	**9,57**	**8,04**	**4,29**	**5,50**

Cyanidin [µM]

Datum	0	Fehler	5	10	15	20	25	30	40	50
270204	100,0	1,75	89,14	78,45	71,28	61,0647	65,34	64,21	67,09	62,51
020304A	100,0	0,86	91,52	86,24	81,88	77,06	69,21	67,03	67,46	
020304B	100,0	0,47	92,40	83,03	76,94	66,38	61,88			
190504	100,0	1,24	93,07	81,97	76,77	68,25	59,04	52,76	39,55	34,33
210604A	100,0	0,71	89,92	81,97	78,12	70,91	65,93	58,95	53,23	39,64
210604B	100,0	1,48							31,82	
Mittelwert	**100,0**	**1,09**	**91,21**	**82,33**	**77,00**	**68,73**	**64,28**	**60,73**	**51,83**	**45,49**
Fehler			**1,48**	**2,49**	**3,40**	**5,27**	**3,50**	**5,44**	**14,36**	**12,23**

Pelargonidin [µM]

Datum	0	Fehler	5	10	15	20	25	30	40	50
1	100,0	1,04				56,4051	48,31	38,90	22,86	14,86
2	100,0	0,34	83,99	72,08	63,16	52,23	45,43	35,43	20,77	12,72
3	100,0	2,26	69,10	49,97	41,58	29,88	23,20	16,84		
4	100,0	0,82	73,18	54,45	42,94	32,03	25,02	16,83		
Mittelwert	**100,0**	**1,12**	**75,42**	**58,83**	**49,23**	**42,64**	**35,49**	**27,00**	**21,81**	**13,79**
Fehler			**6,28**	**9,54**	**9,87**	**11,80**	**11,44**	**10,24**	**1,04**	**1,07**

Paeonidin [µM]

Datum	0	Fehler	5	10	15	20	25	30	40	50
1	100,0	1,42	89,39	88,30	80,48	75,9386	68,76	66,48	56,55	
2	100,0	0,62	75,15	67,63	62,69	57,73	56,60	50,38	43,49	33,94
3	100,0	0,48	74,65	67,95	63,93	59,36	63,80	56,05	48,62	40,66
Mittelwert	**100,0**	**0,84**	**79,73**	**74,63**	**69,03**	**64,35**	**63,05**	**57,64**	**49,56**	**37,30**
Fehler			**6,83**	**9,67**	**8,11**	**8,22**	**4,99**	**6,67**	**5,37**	**3,36**

Malvidin [µM]

Datum	0	Fehler	5	10	15	20	25	30	40	50
1	100,0	0,30	82,09	71,62	65,17	57,8858	54,12	46,22	36,96	27,43
2	100,0	1,49	84,71	72,55	65,30	57,36	50,77	43,43	32,87	27,08
3	100,0	0,54	85,77	74,24	68,77	60,59	55,07	48,86	41,02	32,29
Mittelwert	**100,0**	**0,78**	**84,19**	**72,80**	**66,41**	**58,61**	**53,32**	**46,17**	**36,95**	**28,93**
Fehler			**1,55**	**1,09**	**1,67**	**1,41**	**1,85**	**2,22**	**3,33**	**2,38**

Bestimmung des IC_{50}-Wertes H33258-Vverdrängungsassay:

Regression nach Origin 6.0 mit y = A + B*x

Substanz	**Lineare Regression**	**IC_{50} [µM]**	**A**	**m_A**	**B**	**m_B**
Del	5-20 µM	15,2 ± 1,9	86,815	3,13622	-2,422	0,22904
Cy	20-50 µM	43,5 ± 2,0	84,03052	0,96346	-0,78238	0,02776
Pg	5-25 µM	15,3 ± 2,0	83,304	3,12827	-2,1836	0,15864
Pn	25-50 µM	38,1 ± 3,3	88,34271	2,37904	-1,00566	0,06344
Mv	15-40 µM	84,324	3,7682	1,87917	-1,17165	0,06862

Daten zu Abb. 47

Abb. 47: Induktion von DNA Schäden in HT29 Zellen nach 1 h Inkubation mit den Testsubstanzen.

Signifikanzen (p-Wert) berechnet auf die Kontrolle 1% DMSO.

	Kontrolle	Cyanidin [µM]				
Datum	1% DMSO	1	10	50	100	150
08.07.2003	1,34	1,515	1,285	1,73	3,595	7,04
31.07.2003	1,055					
13.08.2003	1,32					
15.07.2003	1,625	0,735	2,195	1,29	4,56	3,575
20.08.2003	1,32	1,135	1,96	1,77	1,285	2,1
22.07.2003		1,9	3,445	3,25		
06.08.2003						
31.03.2004	1,04	1,39	2,175	2,27		
05.04.2004	1,07					
14.04.2004	0,495					
15.04.2004	1,285			1,645	2,78	4,785
21.04.2004				2,885	4,46	4,795
05.05.2004	0,63			1,16	2,7	2,72
Mittelwert	**1,12**	**1,34**	**2,21**	**2**	**3,23**	**4,17**
Stabwn.	**0,32**	**0,39**	**0,7**	**0,7**	**1,13**	**1,62**
Signifikanz p-Wert		**0,307**	**0,002**	**0,004**	**1,40E-04**	**9,47E-05**

	Delphinidin [µM]				
Datum	1	10	50	100	150
08.07.2003	2,045	4,035	2,72	7,875	14,215
31.07.2003	1,345	0,97	6,36	15,855	22,92
13.08.2003	1,125	0,88	2,555	4,895	16,375
20.08.2003	2,01	1,125			
06.08.2003	1,05	1,75	4,64	5,08	11,655
14.04.2004				5,955	
Mittelwert	**1,52**	**1,75**	**4,07**	**7,93**	**16,29**
Stabwn.	**0,43**	**1,18**	**1,56**	**4,1**	**4,18**
Signifikanz p-Wert	**0,089**	**0,164**	**1,90E-04**	**3,10E-04**	**1,90E-07**

	Malvidin [µM]				
Datum	1	10	50	100	150
08.07.2003	1,56	1,895	1,685	3,89	
22.07.2003	1,485	2,97	2,405	4,565	9,82
06.08.2003	1,095	1,255	1,235	1,94	
31.03.2004	0,905	1,05	1,37	2,64	6,13
05.04.2004	1,51	0,76	1,63	2,75	3,35
Mittelwert	**1,31**	**1,59**	**1,67**	**3,16**	**6,43**
Stabwn.	**0,26**	**0,79**	**0,41**	**0,94**	**2,65**
Signifikanz p-Wert	**0,3**	**0,15**	**0,02**	**6,90E-05**	**1,39E-04**

	Pelargonidin [µM]				
Datum	1	10	50	100	150
31.03.2004	1,48	1,445	2,695	1,55	2,61
05.04.2004	1,355	0,875	0,925		
15.04.2004			3,46	2,25	2,125
21.04.2004			2,835	3,17	3,45
Mittelwert	**1,42**	**1,16**	**2,48**	**2,32**	**2,73**
Stabwn.	**0,06**	**0,28**	**0,94**	**0,66**	**0,55**
Signifikanz p-Wert	**0,26**	**0,87**	**0,0029**	**0,0023**	**1,80E-04**

	Peonidin [µM]						Cpt [µM]
Datum	1	10	50	100	150	Datum	100
31.03.2004	1,09	1,045	1,3		2,79	04.06.	9,21
05.04.2004	1,755	1,925	1,385	1,7		08.07.	
14.04.2004						15.07.	
15.04.2004			2,225	4,35	5,91	22.07.	5,01
21.04.2004			2,595	4,095		31.07.	5,925
							5,14
							5,195
						06.08.	6,435
							4,805
							5,41
							9,915
						12.08.	4,33
Mittelwert	**1,42**	**1,49**	**1,88**	**3,38**	**4,35**		**6,14**
Stabwn.	**0,33**	**0,44**	**0,55**	**1,19**	**1,56**		**1,8**
Signifikanz p-Wert	**0,297**	**0,24**	**0,012**	**4,40E-04**	**2,90E-04**		**1,60E-07**

Daten zu Abb. 49

Abb. 49: MTT-Test mit 72-stündiger Inkubation Camptothecin.

HEK 293, Camptothecin [nM]

Messung	0	Fehler	5	15	20	25	50
1	100,0	2,99	86,57				11,20
2	100,0	1,73	83,89	54,76	42,78		15,35
3	100,0	2,52	82,89	62,22		27,34	20,42
4	100,0				44,55	43,44	22,59
5	100,0	11,29	72,13	50,02	45,85		
6	100,0	1,79		62,43	47,05	28,79	16,05
7	100,0	1,63	88,97	66,19	49,34	31,15	18,73
8	100,0	4,04				33,33	17,30
9	100,0	1,06				34,94	18,70
Mittelwert	**100,0**	**3,38**	**82,89**	**59,13**	**45,92**	**33,17**	**17,54**
Fehler			**5,79**	**5,87**	**2,22**	**5,26**	**3,24**

HEK 293-GFP (HEK-GFP), Camptothecin [nM]

Messung	0	Fehler	5	15	20	25	50
1	100,0	3,92	82,62				11,82
2	100,0	7,99			48,35	27,63	21,94
3	100,0	4,19			51,23	30,18	22,27
4	100,0	4,65				30,66	15,22
5	100,0	4,61				35,23	
6	100,0	6,07	79,53	65,69	47,02	41,48	19,09
7	100,0	5,31	79,17	67,53	52,17	44,21	
8	100,0	3,87	84,31	54,64	50,97	26,56	17,52
9	100,0	2,17	84,56	57,44	52,03	27,42	17,07
Mittelwert	**100,0**	**4,75**	**82,04**	**61,32**	**50,30**	**32,92**	**17,85**
Fehler			**2,30**	**5,42**	**1,93**	**6,30**	**3,42**

HEK 293-GFP-hTDP1 (HEK-TDP1), Camptothecin [nM]

Messung	0	Fehler	5	15	20	25	50
1	100,0	2,33	90,17				10,27
2	100,0	7,18	84,69	69,16	50,34	33,72	17,24
3	100,0	2,92	88,85	68,39	48,65	34,99	20,13
4	100,0	3,70	78,04	69,02	66,76	41,32	16,66
5	100,0	4,97	72,51	64,84	66,71	40,87	20,42
6	100,0	3,72	99,16	83,50	63,02		20,21
7	100,0	3,27	98,17	79,89	64,01		19,60
8	100,0	0,40	83,55		44,01		14,25
9	100,0	1,05	87,23		45,79		14,59
Mittelwert	**100,0**	**3,28**	**86,93**	**72,47**	**56,16**	**37,73**	**17,04**
Fehler			**8,12**	**6,76**	**9,21**	**3,40**	**3,29**

Bestimmung des IC_{50}-Wertes MTT-Test mit Camptothecin:

Regression nach Origin 6.0 mit y = A + B*x

Zelllinie	Lineare Regression	IC_{50} [nM]	A	m_A	B	m_B
HEK 293	0-25 nM	18,5 ± 1,6	99,27922	2,83639	-2,66778	0,17056
HEK-GFP	0-25 nM	19,6 ± 1,1	98,65117	1,36868	-2,47773	0,11423
HEK-TDP1	15-25 nM	21,6 ± 1,1	124,9333	2,49844	-3,474	0,1224

Daten zu Abb. 50

Abb. 50: MTT-Test mit 72-stündiger Inkubation Etoposid.

HEK 293, Etoposid [nM]

Messung	0	Fehler	50	100	150	200	250
1	100,0	1,43	90,19	74,76			37,31
2	100,0	5,77			44,64	34,72	24,68
3	100,0	5,39	95,56		50,28	40,76	32,25
4	100,0	1,30	85,85	72,60		36,25	
5	100,0	0,26		81,16		45,11	
6	100,0	5,04		75,36	51,09	42,59	39,14
7	100,0	4,52		77,09	54,31		41,46
Mittelwert	**100,0**	**3,39**	**90,53**	**76,19**	**50,08**	**39,89**	**34,97**
Fehler			**3,97**	**2,87**	**3,48**	**3,88**	**5,97**

HEK 293-GFP (HEK-GFP), Etoposid [nM]

Messung	0	Fehler	50	100	150	200	250
1	100,0	8,35	84,48	71			38,33
2	100,0	0,50	81,67		43,62	39,48	33,27
3	100,0	1,63	82,72		45,54	40,35	34,85
4	100,0	1,10	76,56			30,52	16,96
5	100,0	1,02				34,54	28,69
6	100,0	4,03		68,18	58,44	51,43	
7	100,0	4,58		70,21	62,08	56,03	
8	100,0	1,18		83,64		48,56	
9	100,0	1,08	77,81	83,56	43,71	50,40	
Mittelwert	**100,0**	**2,61**	**80,65**	**75,32**	**50,68**	**43,91**	**30,42**
Fehler			**2,99**	**6,82**	**7,94**	**8,42**	**7,41**

HEK 293-GFP-hTDP1 (HEK-TDP1), Etoposid [nM]

Messung	0	Fehler	50	100	150	200	250
1	100,0	2,57	89,97	71,6883			42,90
2	100,0	8,68			48,47	33,56	24,50
3	100,0	14,74			46,51	38,49	29,48
4	100,0	2,94		77,07	60,64	55,78	40,42
5	100,0	4,70		81,81	64,70	57,45	37,92
6	100,0	2,01		62,06	51,03	44,92	37,18
7	100,0	2,82	70,85	65,95	54,17	49,69	43,19
8	100,0	1,72	98,38		62,71	57,44	
9	100,0	2,43			67,17		
	100,0						
Mittelwert	**100,0**	**4,73**	**86,40**	**71,72**	**56,92**	**48,19**	**36,51**
Fehler			**11,52**	**7,17**	**7,37**	**8,86**	**6,51**

Bestimmung des IC_{50}-Wertes MTT-Test mit Etoposid:

Regression nach Origin 6.0 mit y = A + B*x

Zelllinie	Lineare Regression	IC_{50} [nM]	A	m_A	B	m_B
HEK 293	50-150 nM	156 ± 24	114,1584	5,77966	-0,41156	0,05259
HEK-GFP	50-200 nM	173 ±28	93,95648	4,02658	-0,25369	0,03395
HEK-TDP1	0-200 nM	190 ± 25	99,27686	3,7265	-0,25876	0,02749

Daten zu Abb. 51

Abb. 51: DNA-Schäden nach einstündiger Inkubation der HEK-Zelllinien.

HEK 293

Zelllinie		HEK						
Konz.		K	VP-16 1µM	VP-16 10µM	Cpt10µM	Cpt 100µM	MNNG 10µM	MNNG 50µM
comet 020502	TI [%]		8,53	15,59	6,16	7,87		
comet 130502	TI [%]	0,81	4,85	18,06				
comet 010702	TI [%]		8,46	21,96	7,74	9,52		
comet 040702	TI [%]	1,15	3,23	13,35	3,89	4,81		
comet 040304	TI [%]	0,96					3,67	8,25
comet 100304	TI [%]	0,52						9,42
comet 110304	TI [%]	0,38					4,075	
Mittelwert		**0,76**	**6,27**	**17,24**	**5,93**	**7,4**	**3,87**	**8,84**
Fehler		**0,28**	**2,3**	**3,19**	**1,58**	**1,95**	**0,2**	**0,58**
Signifikanz zur Kontrolle			**0,00227**	**1,95 E-05**	**8,32 E-04**	**6,44 E-04**	**7,06 E-05**	**4,81 E-06**

HEK 293-GFP (HEK-GFP)

Zelllinie		HEK-GFP						
Konz.		K	VP-16 1µM	VP-16 10µM	Cpt10µM	Cpt 100µM	MNNG 10µM	MNNG 50µM
comet 020502	TI [%]	1,33	4,99	15,36	6,3	8,67		
comet 130502	TI [%]	0,53		19,08		6,03		
comet 010702	TI [%]		9,64	24,64	7,46	11,66		
comet 040702	TI [%]	1,31	4	13,57	3,72	5,15		
comet 260204	TI [%]	0,66					4,56	
comet 270204	TI [%]	0,36					4,85	
comet 040304	TI [%]	1,04					3,21	8,56
comet 100304	TI [%]	0,56						9,72
comet 110304	TI [%]	0,485					4,495	
Mittelwert		**0,78**	**6,21**	**18,16**	**5,83**	**7,88**	**4,28**	**9,14**
Fehler		**0,36**	**2,46**	**4,24**	**1,56**	**2,54**	**0,63**	**0,58**
Signifikanz zur Kontrolle			**3,85 E-04**	**9,97 E-07**	**2,93 E-05**	**3,4 E-05**	**5,96 E-07**	**1,42 E-08**

HEK 293-GFP-hTDP1 (HEK-TDP1)

Zelllinie		HEK-TDP1						
Konz.		K	VP-16 1µM	VP-16 10µM	Cpt10µM	Cpt 100µM	MNNG 10µM	MNNG 50µM
comet 020502	TI [%]	1,76	3,8	8,11		3,88		
comet 130502	TI [%]	0,76		11,39	2,31	4,19		
comet 010702	TI [%]	1,63	7,47		3,74			
comet 040702	TI [%]	0,66	2,41	11,81	2,56	2,94		
comet 160104	TI [%]	0,4	2,8	10,06				
comet 200104	TI [%]	0,79	3,42	8,34	4,88	5,14		
comet 220104	TI [%]	0,46	2,35		2,64	3,68		
comet 260204	TI [%]	0,58					3,77	
comet 270204	TI [%]	0,47						
comet 040304	TI [%]	0,43						
comet 100304	TI [%]	0,51					4,42	9,74
comet 110304	TI [%]	0,355					5,01	8,735
comet 230304	TI [%]	0,41		7,07	2,9			
Mittelwert		**0,71**	**3,71**	**9,46**	**3,17**	**3,97**	**4,4**	**9,24**
Fehler		**0,44**	**1,76**	**1,75**	**0,89**	**0,72**	**0,51**	**0,5**
Signifikanz zur Kontrolle			**4,3 E-05**	**1,12 E-11**	**6,73 E-07**	**7,51 E-09**	**1,07 E-08**	**5,64 E-12**

HEK 293-GFP-hTDP1-H263A (HEK-H263A)

Zelllinie		HEK-H263A						
Konz.		K	VP-16 1µM	VP-16 10µM	Cpt10µM	Cpt 100µM	MNNG 10µM	MNNG 50µM
comet 160104	TI [%]	0,89	6,63	21,93	10,17	11,32		
comet 200104	TI [%]	0,81		12,47	5,47	6,14		
comet 220104	TI [%]	0,4	3,74	20,3	5,84	8,03		
comet 280104	TI [%]	0,22		10,02		6,21		
comet 050204	TI [%]	0,49	4,62					
comet 260204	TI [%]	0,49					4,09	
comet 270204	TI [%]	0,68					3,84	
comet 040304	TI [%]	0,46					4,74	9,48
comet 100304	TI [%]	0,36					4,62	9,71
comet 110304	TI [%]	0,395						8,9
comet 230304	TI [%]	0,49		11,98	5,82			
Mittelwert		**0,52**	**5**	**15,34**	**6,26**	**7,93**	**4,32**	**9,36**
Fehler		**0,2**	**1,21**	**4,81**	**2,07**	**2,1**	**0,37**	**0,34**
Signifikanz zur Kontrolle			**1,41 E-07**	**1,67 E-07**	**6,39 E-07**	**7,61 E-08**	**3,5 -E12**	**9,71 E-16**

Signifikanzrechnung Zelllinie HEK-TDP1 zu HEK 293, HEK-GFP und HEK-H263A

Konzentration	Berechnung Zelllinie 1 → 2	Signifikanz p
VP-16 1 µM	HEK-TDP1 → HEK 293	0,113
	HEK-TDP1 → HEK-GFP	0,166
	HEK-TDP1 → HEK-H263A	0,348
VP-16 10 µM	HEK-TDP1 → HEK 293	0,0022
	HEK-TDP1 → HEK-GFP	0,0038
	HEK-TDP1 → HEK-H263A	0,033
Cpt 10 µM	HEK-TDP1 → HEK 293	0,021
	HEK-TDP1 → HEK-GFP	0,024
	HEK-TDP1 → HEK-H263A	0,015
Cpt 100 µM	HEK-TDP1 → HEK 293	0,021
	HEK-TDP1 → HEK-GFP	0,023
	HEK-TDP1 → HEK-H263A	0,0104
MNNG 10 µM	HEK-TDP1 → HEK 293	0,35
	HEK-TDP1 → HEK-GFP	0,82
	HEK-TDP1 → HEK-H263A	0,85
MNNG 50 µM	HEK-TDP1 → HEK 293	0,65
	HEK-TDP1 → HEK-GFP	0,91
	HEK-TDP1 → HEK-H263A	0,81

Veröffentlichungen

Veröffentlichungen aus dieser Arbeit:

Posterbeitrag
Habermeyer M., Bottler C. und Marko D.
Anthocyanidine als Hemmstoffe humaner Topoisomerasen I und II – Bedeutung für die Integrität der DNA
32. Deutscher Lebensmittelchemikertag in München, 09. – 11. Okt. 2003

Posterbeitrag
Doris Marko and Michael Habermeyer
Induction of DNA strandbreaks by Anthocyanins?
1st International Conference on Molecular Research in Environmental Medicine (MRIEM) in Düsseldorf, 18. – 20. März 2004

Posterbeitrag
Doris Marko and Michael Habermeyer
Induction of DNA strandbreaks by Anthocyanins?
95th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research (AACR) in Orlando, 27. – 31. März 2004

Posterbeitrag
Doris Marko and Michael Habermeyer
Anthocyanidins as inhibitors of topoisomerases – relevance for DNA integrity
18th Meeting of the European Association for Cancer Research (EACR) in Innsbruck, 03. – 06. Juli 2004

Diskussionsvortrag
Michael Habermeyer und Doris Marko
Induktion von DNA-Schäden durch Anthocyanidine?
33. Deutscher Lebensmittelchemikertag in Bonn, 13. – 15. Sept. 2004

Publikation
Barthelmes HU, Habermeyer M, Christensen MO, Mielke C, Interthal H, Pouliot JJ, Boege F, Marko D (2004) TDP1 overexpression in human cells counteracts DNA damage mediated by topoisomerases I and II. *J Biol Chem*, **279**, 55618-25

Publikation
Habermeyer M, Fritz J, Barthelmes HU, Christensen MO, Larsen MK, Boege F, Marko D (2005) Anthocyanidins modulate the activity of human DNA topoisomerases I and II and affect genomic stability, Chem Res Tox, submitted

Weitere Veröffentlichungen:

Posterbeitrag
Marko D, Kemény M, Bernardy E, Habermeyer M, Frank O und Hofmann T;
In vitro-Studien zur Hemmung des Tumorzellwachstums durch ein Bräunungsprodukt der Maillard-Reaktion
30. Deutsche Lebensmittelchemikertag in Braunschweig, 10. – 12. Sept. 2001

Posterbeitrag
Marko D, Kemény M, Habermeyer M, Bernardy E, Meiers S, Weyand U;
Anthocyanidins potently interfere with signalling cascades regulating cell proliferation
SKLM-Symposium "Functional Food: Safety Aspects" in Karlsruhe, 05. – 07. Mai 2002
Wiley-VCH Verlag, Weinheim 2004, ISBN 3-527-27765-X

Posterbeitrag
Marko D, Kemény M, Habermeyer M, Weyand U, Jakobs S, Frank O and Hofmann T
Maillard-Derived Chromophores Inhibiting The Of Human Tumor Cells *In-Vitro*
93rd Annual Meeting American Association for Cancer Research in San Francisco, 06. – 10. April 2002

Posterbeitrag
K.-H. Merz, N. Graf v. Keyserlingk, S. Vatter, M. Habermeyer and G. Eisenbrand
Novel pteridine-based inhibitors of cAMP phosphodiesterases: promising antineoplastic agents
14th EORTC-NCI-AACR Meeting on „Molecular Targets and Cancer Therapeutics",in Frankfurt am Main, 19. – 22. Nov. 2002

Posterbeitrag
Marko D, Habermeyer M, Weyand U, Frank O und Hofmann T
Einfluss von aromaaktiven 3-(2*H*)-Furanonen auf das Wachstum humaner Tumorzellen
31. Deutscher Lebensmittelchemikertag in Frankfurt, 09. – 11. Sept. 2002

Diskussionsvortrag
Michael Habermeyer, Monika Kemény, Ulrike Weyand, Ellen Niederberger, Oliver Frank, Thomas Hofmann und Doris Marko
Einfluss von Maillard-Reaktionsprodukten auf das Wachstum humaner Tumorzellen
63. Jahrestagung des Regionalverbandes Süd-West der Lebensmittelchemischen Gesellschaft in Gießen, 31. März bis 01. April 2003

Posterbeitrag
Merz K-H, Marko D, Habermeyer M, Hofmann A, Fiebig H-H and Eisenbrand G
Phenanthridine Based Inhibitors Of Topoisomerase I And/Or II
94th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research (AACR) in Toronto, 05. – 09. April 2003

Posterbeitrag
Merz KH, Mühlbeyer S, Habermeyer M, Hofmann A, Marko D, Fiebig HH, and Eisenbrand G
N-Methyl Phenanthridinium Chlorides As Novel Inhibitors Of Topoisomerases I And/Or II
Joint-Symposium of the Central European Society for Anticancer Drug Research (CESAR) in Freiburg, 18. – 21. Juni 2003

Posterbeitrag
M. Habermeyer, M. Kemény, U. Weyand, E. Niederberger, H.J. Schmitz, O. Frank, T. Hofmann and D. Marko
Maillard-type chromophores inhibiting the growth of human tumor cells
EURO FOOD CHEM XII "Strategies for safe food" in Brügge, 24. – 26. Sept. 2003

Publikation
Marko D, Kemeny M, Bernardy E, Habermeyer M, Weyand U, Meiers S, Frank O, Hofmann T
Studies on the inhibition of tumor cell growth and microtubule assembly by 3-hydroxy-4-[(E)-(2-furyl)methylidene]methyl-3-cyclopentene-1,2-dione, an intensively coloured Maillard reaction product.
Food Chem Toxicol. 2002 Jan;40(1):9-18

Publikation
Wagner B, Jakobs S, Habermeyer M, Hippe F, Cho-Chung YS, Eisenbrand G, Marko D
7-Benzylamino-6-chloro-2-piperazino-4-pyrrolidino-pteridine, a potent inhibitor of cAMP-specific phosphodiesterase, enhancing nuclear protein binding to the CRE consensus sequence in human tumour cells.
Biochem Pharmacol. 2002 Feb 15;63(4):659-68.

Publikation
Marko D, Habermeyer M, Kemeny M, Weyand U, Niederberger E, Frank O, Hofmann T
Maillard reaction products modulating the growth of human tumor cells in vitro.
Chem Res Toxicol. 2003 Jan;16(1):48-55.

Dank

Zuerst möchte ich mich noch einmal bei Doris bedanken, die mir die Möglichkeit zur Promotion auf diesem interessanten Thema ermöglichte, sowie für die vielen Anregungen und Diskussionen während meiner Promotionszeit und das in mich gesetzte Vertrauen.

Herrn Prof. Eisenbrand danke ich für die wohlwollende Unterstützung und das Interesse an meiner Promotion, sowie für die Eröffnung eines neuen „Arbeitsfeldes".

Ulli und Morten vom AK Prof. Boege in Düsseldorf danke ich für die stete Hilfsbereitschaft bei Fragen zu Topoisomerasen oder des Band-Depletion-Assay, sowie für die paar Tage die ich bei Ihnen verbringen durfte.

Für die schöne Zeit während des Studiums, den vielen Stunden im Labor oder auch Abends danke ich Tina und Jochen Zeller, Sandra Schwarz, Christoph Huber, Christian Berzel, Carolin Hausherr, Stephan Mühlbeyer, Tina Heine und Sandra Anbari-Rüth.

Meinen Diplomanden Andreas Hofmann, Florian Füller und Jessica Fritz möchte ich danken. Ich hoffe sie konnten etwas von mir lernen, so wie ich von ihnen. Des Weiteren natürlich auch meinen Forschungspraktikanten und Seminaristen.

Ein großer Dank geht an Frau Dr. Sandra Jakobs für ihre stete Freundlichkeit, unermüdliche Hilfsbereitschaft, Freundschaft und die „zügige" durchsicht des Manuskriptes.

Meinen Kolleginnen Melanie Kern, Dr. Sandra Vatter, Nicole Puppel, Jessica Fritz und Zeina Tjaden für die angenehme Atmosphäre sowohl im Labor als auch im Büro und die stete Bereitschaft einen Kaffee mitzutrinken.

Vom Arbeitskreis Eisenbrand danke ich Herrn Rainer Scheuermann für die stete Hilfsbereitschaft bei allen kleinen technischen Fragen, sowie Sandra Schäfer, Tamara Weisel, Dr. Karl-Heinz Merz, Daniel Bertow, Jochen Zeller, Frankie Hippe, Dr. Matthias Baum und all den anderen für die tolle Zusammenarbeit.

Ein Dank geht natürlich auch an unsere Sekretärinnen Heike Syring und Ingrid Hemm, die die Arbeitskreise verwaltungs- und organisationstechnisch am Leben erhalten.

Melanie und Thomas, „Familie Kothe/Jakobs“, Sandra, Jessi und Moni für eure Freundschaft und die Freizeitbeschäftigungen.

Danken möchte ich auch Hennicke, Mario, Holger und Siggi, die die Leidenschaft für das „*uisge beatha“* mit mir teilen. Also Jungs, „Sláinte mhath“ !

Vor allem danke ich meiner Familie, die mir das Studium ermöglichte und ohne die eine solche Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Und natürlich Petra – Danke!

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name:	Michael Habermeyer
Wohnort:	Konrad-Adenauer-Str. 35
	67663 Kaiserslautern
Geburtsdatum:	07.04.1975
Geburtsort:	Pirmasens
Familienstand:	ledig
Staatsangehörigkeit:	deutsch

Schulausbildung:

08/1981-07/1985	Grundschule Kirchberg, Pirmasens
08/1985-06/1994	Hugo-Ball-Gymnasium, Pirmasens
10.06.1994	Abitur

Wehrdienst:

07/1994-06/1995	Grundwehrdienst beim 2. ABC-Abwehrbataillon 310 in Zweibrücken

Studium:

10/1995-03/2001	Studium der Lebensmittelchemie an der Universität Kaiserslautern
27.10.1998	Diplom-Zwischenprüfung / staatliche Vorprüfung
01/2000-04/2000	Forschungspraktikum in der Fachrichtung Lebensmittelchemie und Umwelttoxikologie der Universität Kaiserslautern mit dem Thema „Einfluss ausgewählter Maillard-Produkte auf die in-vitro Polymerisation von Tubulin“
06.09.2000	Erste Staatsprüfung
10/2000-03/2001	Diplomarbeit an der Universität Kaiserslautern, Fachbereich Chemie, Fachrichtung Lebensmittelchemie und Umwelttoxikologie mit dem Thema „Untersuchungen zur zellulären Wirkung ausgewählter Maillardprodukte“ mit der Note „sehr gut“
30.03.2001	Abschluss des Studiengangs Diplom Lebensmittelchemie und erste Staatsprüfung mit der Gesamtnote „sehr gut“

06/2001-10/2004	Promotionsarbeit im Arbeitskreis von Frau PD Dr. D. Marko, Fachbereich Chemie, Fachrichtung Lebensmittelchemie und Umwelttoxikologie, Molekulare Ernährungsforschung
10/2001-09/2003	Promotionsstipendiat nach dem LGFG

Aktivitäten an der Hochschule:

11/1999 und 11/2000	Arbeit als studentische Hilfskraft im Anfängerpraktikum Lebensmittelchemie
04.-08.03.2002	Lehrgang über Strahlenschutz an der Technischen Akademie Südwest, Universität Kaiserslautern Erwerb der Sachkunde im Strahlenschutz