

**Einfluss von Luteolin auf die DNA-Integrität in  
Kolonkarzinomzellen:  
Rolle des Arylhydrokarbon Rezeptors**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

**Natalie Stobbe-Maicherski**

aus Schumanowka

Düsseldorf, August 2014

aus dem Leibniz-Institut für Umweltmedizinische Forschung (IUF) gGmbH  
(Wissenschaftlicher Direktor: Prof. Dr. med. Jean Krutmann)

Gedruckt mit der Genehmigung der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. Ellen Fritsche  
Korreferent: Prof. Dr. Peter Proksch

Tag der mündlichen Prüfung: 18.11.2014

*Нет преград человеческой мысли.*

*С. П. Королев*

*Der menschliche Gedanke hat keine Grenzen.*

*S. P. Korolev*

## Inhaltsverzeichnis

<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>V</b>
<b>Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>VII</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>VIII</b>
<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>XI</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>XIII</b>
<b>1. Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1. Der Arylhydrokarbon Rezeptor.....	2
1.2. Fremdstoffmetabolisierende Cytochrom-P450-abhängige Monooxygenasen.....	8
1.3. Metabolismus und Toxizität von Benzo(a)pyren.....	10
1.4. DNA-Schadensantwort.....	12
1.5. Flavonoide.....	15
1.6. Luteolin.....	17
1.7. Zielsetzung.....	20
<b>2. Material &amp; Methoden.....</b>	<b>21</b>
2.1. Allgemeines.....	21
2.2. Zellkultur.....	21
2.2.1 <i>Kultivierung humaner Zellen.....</i>	<i>21</i>
2.2.2 <i>Kryokonservierung und Revitalisierung der Zellen.....</i>	<i>22</i>
2.2.3 <i>Belastung der Zellen.....</i>	<i>22</i>
2.3 Zytotoxizitätsassay.....	23
2.4 Proliferationsassay.....	24
2.5 Genexpressionsanalysen.....	24
2.5.1. RNA-Analytik.....	24
2.5.1.1. <i>Isolierung und Quantifizierung der Gesamt-RNA.....</i>	<i>24</i>

---

2.5.1.2.	<i>Reverse Transkription Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)</i> .....	25
2.5.1.3.	<i>Polymerase-Kettenreaktion (PCR) / Quantitative Real-time PCR</i> .....	25
2.5.2.	<i>Western Blot Analysen</i> .....	27
2.5.2.1.	<i>Isolierung von Gesamtprotein</i> .....	27
2.5.2.2.	<i>Proteinbestimmung</i> .....	27
2.5.2.3.	<i>Proteinauftrennung unter denaturierenden Bedingungen</i> .....	27
2.5.2.4.	<i>Elektrotransfer von Proteinen auf PVDF-Membranen</i> .....	28
2.5.2.5.	<i>Immunologischer Nachweis spezifischer Proteine</i> .....	28
2.5.2.6.	<i>Chemilumineszenz-Detektion</i> .....	29
2.5.2.7.	<i>Densitometrische Auswertung</i> .....	31
2.6.	<i>Nachweis der DNA-Schädigung</i> .....	31
2.6.1.	<i>Immunzytochemische Färbung</i> .....	31
2.6.2.	<i>Comet-Assay</i> .....	32
2.6.3.	<i>Durchflusszytometrie mit der Nicoletti-Färbung</i> .....	34
2.7.	<i>Nachweis der ROS-Bildung mit Hilfe des DCF-Assays</i> .....	35
2.8.	<i>EROD-Assay</i> .....	35
2.9.	<i>Statistik</i> .....	37
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>38</b>
3.1.	<i>Einfluss von Luteolin und Benzo(a)pyren auf die Viabilität der Kolonkarzinom-Zelllinien Caco-2 und HCT116</i> .....	38
3.2.	<i>Einfluss von Luteolin auf die Expression der B(a)P-metabolisierenden Enzyme in Caco-2 Zellen</i> .....	39
3.3.	<i>Etablierung der AHR-profizienten und AHR-defizienten HCT116 Zellen</i> .....	41
3.4.	<i>Effekte von Luteolin auf die Expression der B(a)P-metabolisierenden Enzymen in AHR-profizienten und AHR-defizienten HCT-Zellen</i> .....	43

---

3.5.	Nachweis der B(a)P-induzierten DNA-Schädigung in Kolonkarzinomzellen.....	46
3.5.1	<i>Detektion von BPDE-DNA-Addukten mittels Immunfluoreszenz- Methode.....</i>	<i>46</i>
3.5.2	<i>Nachweis der B(a)P-induzierten DNA-Schädigung im Comet-Assay.....</i>	<i>48</i>
3.6.	Einfluss von Luteolin auf die B(a)P-induzierte Bildung der DNA-Einzelstrangbrüchen.....	49
3.7.	Effekte von Luteolin auf den B(a)P-induzierten Zellzyklusarrest in den HCT-EV und HCT-shAHR Zellen.....	51
3.8.	Einfluss von Luteolin auf die CYP1A1-Aktivität.....	53
3.9.	Einfluss von Luteolin auf die Proliferation der HCT-EV und HCT-shAHR Zellen.....	55
3.10.	Einfluss von Luteolin auf die Expression der Östrogenrezeptoren.....	56
3.11.	Effekte von Luteolin und B(a)P auf die intrazelluläre ROS-Bildung in HCT-EV und HCT-shAHR Zellen.....	57
3.12.	Untersuchung der Luteolin-induzierten DNA-Doppelstrangbruchbildung.....	60
3.13.	Untersuchung der Luteolin-induzierten AHR-abhängigen p53-Aktivierung.....	63
3.14.	Einfluss von Luteolin auf die Expression der p21/Cip1 und p27/Kip1-Gene in HCT-EV und HCT-shAHR Zellen.....	64
3.15.	Untersuchung der Luteolin-induzierten Aktivierung der Chk-1-, Chk-2- und JNK1-Kinasen in HCT-EV und HCT-shAHR Zellen.....	66
<b>4.</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>69</b>
4.1.	Einfluss von Luteolin auf die B(a)P-induzierte DNA-Schädigung.....	69
4.1.1.	<i>Effekte von Luteolin auf die Expression der B(a)P-metabolisierenden Enzyme in Caco-2 Zellen.....</i>	<i>69</i>
4.1.2.	<i>AHR-abhängige Effekte von Luteolin auf B(a)P-induzierte DNA- Schädigung in HCT-EV und HCT-shAHR Zellen.....</i>	<i>72</i>
4.2.	AHR-abhängigen Effekte von Luteolin auf die DNA-Integrität der Kolonkarzinomzellen.....	77

---

4.3. Einordnung der Arbeit.....	89
<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>91</b>
<b>Danksagung.....</b>	<b>109</b>
<b>Eidesstattliche Erklärung.....</b>	<b>110</b>

---

## Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1:** Struktureller Aufbau der humanen bHLH/PAS-Proteinen: AHR, ARNT und AHRR
- Abbildung 2:** Der AHR-Signalweg
- Abbildung 3:** Die CYP1A1 vermittelte Aktivierung von B(a)P zum ultimativen Kanzerogen
- Abbildung 4:** Chemische Struktur des Flavonoids Luteolin
- Abbildung 5:** Untersuchung der Zellviabilität nach der Belastung mit Luteolin und BaP
- Abbildung 6:** Einfluss von Luteolin auf die Expression von CYP1A1, COX-2 und GSTA2 in Caco-2 Zellen
- Abbildung 7:** Untersuchung der basalen AHR-mRNA-Expression und der induzierten CYP1A1-mRNA-Expression in HCT-EV und HCT-shAHR Zellen
- Abbildung 8:** Konstitutive mRNA-Expression der Cyclooxygenase-2 in HCT116- und Caco2-Zelllinien
- Abbildung 9:** CYP1A1-, GSTA2- und EPHX1-mRNA-Expression nach der Belastung mit Luteolin und 3-MC in HCT-EV und HCT-shAHR Zellen
- Abbildung 10:** Immunfluoreszenzfärbung der BPDE-DNA-Addukte in HCT-EV Zellen
- Abbildung 11:** Immunfluoreszenzfärbung mit dem anti-BPDE-Antikörper nach der Behandlung mit Luteolin
- Abbildung 12:** Nachweis der B(a)P-induzierten DNA-Schädigung im alkalischen Comet-Assay
- Abbildung 13:** Effekte von Luteolin auf die B(a)P-induzierte DNA-Schädigung
- Abbildung 14:** Zellzyklusanalyse; S-Phase-Arrest nach der Behandlung mit B(a)P und Luteolin



- 
- Abbildung 15:** Bestimmung der EROD-Aktivität nach der Behandlung mit B(a)P und Luteolin
- Abbildung 16:** Untersuchung der Zellproliferation nach der Inkubation mit Luteolin
- Abbildung 17:** mRNA-Expression der Östrogenrezeptoren alpha und beta und des GREB1-Gens
- Abbildung 18:** Intrazellulärer ROS-Status nach der Inkubation mit Luteolin
- Abbildung 19:** Untersuchung der Luteolin-induzierten DNA-Doppelstrangbildung
- Abbildung 20:** Bildung von  $\gamma$ H2AX nach der Belastung mit Luteolin
- Abbildung 21:** Bestimmung der p53-Proteinmenge nach der Belastung mit Luteolin
- Abbildung 22:** mRNA-Expression der p21/Cip1- und p27/Kip1-Gene nach der Inkubation mit Luteolin
- Abbildung 23:** Effekte von Luteolin auf die Expression der Chk-1- und die Aktivierung der Chk-2-Kinasen
- Abbildung 24:** Einfluss von Luteolin auf die Aktivierung der JNK1-Kinase
- Abbildung 25:** Überprüfung der Luteolin-vermittelten Aktivierung der Vav3-Rac1-Signalkaskade
- Abbildung 26:** Luteolin-induzierter S-Phase-Arrest

**Tabellenverzeichnis**

- Tabelle 1:** Substanzklassen und Beispiele von AHR-bindenden Verbindungen
- Tabelle 2 :** Übersicht zum Ausplattieren der Zellen für verschiedene Experimente
- Tabelle 3 :** Liste der verwendeten Substanzen
- Tabelle 4:** Sequenzen der verwendeten Primer-Paare
- Tabelle 5:** Liste der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Antikörper
- Tabelle 6:** Verwendeten Antikörper für die immunzytochemische Färbung der BPDE-DNA-Addukten

---

## Abkürzungsverzeichnis

A/A	Antibiotikum / Antimykotikum
AA	Acrylamid / Bisacrylamid
Abb.	Abbildung
AHR	Arylhydrokarbon Rezeptor
AHRR	AHR Repressor
AS	Aminosäure
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ARNT	<i>AHR Nuclear Translocator</i>
ATM	<i>Ataxia Telangiectasia Mutated</i>
ATR	<i>ATM-Rad3-related</i>
B(a)P	Benzo(a)pyren
BER	Basen-Exzisions-Reparatur
BPDE	B(a)P-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxid
BrdU	5-Brom-2'-desoxyuridin
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
Ca.	circa
C-terminal	Carboxy-terminal
Cdc25	<i>Cell Division Cycle 25-Phosphatase</i>
CDK	<i>Cyclin-Dependent-Kinase</i>
cDNA	<i>copy DNA</i>
Chk-1	<i>Checkpoint kinase 1</i>
Chk-2	<i>Checkpoint kinase 2</i>
CisPt	Cisplatin
COX-2	Cyclooxygenase 2
c-Src-Kinase	<i>cell sarcoma</i> Tyrosinkinase
CTB	<i>Cell Titer Blue Assay</i>
CYP1A1	Cytochrom-P450-Monooxygenase 1A1
DCF	Dichlorofluorescein
DEPC	Diethyldicarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid

---

DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNA-DSB	DNA-Doppelstrangbruch
DNA-ESB	DNA-Einzelstrangbruch
dNTP	Desoxy-Nukleotidtriphosphat
ECL	<i>Enhanced Chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
EPHX1	Epoxidhydrolase 1
ER	<i>Estrogen receptor</i>
ERK	<i>Extracellular-Signal Regulated Kinase</i>
EROD	7-Ethoxyresorufin-O-Deethylase
FACS	<i>Fluorescence-Activated Cell Sorting</i>
FCS	<i>Fetal Calf Serum</i> , fetales Kälberserum
GREB1	<i>Growth Regulation by Estrogen in Breast Cancer 1</i>
GSTA2	Glutathion-S-Transferase 2
h	Stunde
HAK	halogenierte aromatische Kohlenwasserstoffe
HR	homologe Rekombination
HRP	<i>Horseradish-Peroxidase</i>
JNK1	c-Jun-NH <sub>2</sub> -terminale-Kinase 1
LDH	Laktat-Dehydrogenase
LMP	<i>Low Melting Point Agarose</i>
Lut	Luteolin
M	Mol
3-MC	3-Methylcholanthren
mg	Milligramm
ml	Milliliter
μl	Mikroliter
mM	Milli Mol
μM	Mikro Mol
mRNA	<i>messenger RNA</i>
N-terminal	Amino-terminal
NADPH	Hydridionenübertragendes Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat

---

NER	Nukleotid-Exzisions-Reparatur
NHEJ	<i>Non-Homologous End-Joining</i>
Nm	Nanometer
o.g.	oben genannt
PAK	polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe
PAS	PER-ARNT-SIM
PBS	<i>Phosphate-buffered Saline</i>
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PMSF	Phenylmethylylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidendifluorid
qRT-PCR	quantitative <i>Real-Time</i> PCR
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
TBST	Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween 20
TCDD	2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-p-dioxin
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TNF $\alpha$	Tumor Nekrose Faktor Alpha
Tris	Tris-(hydroxymethylmethan)-aminomethan
U	Unit
u.a.	unter anderem
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumenprozent
Vgl.	vergleiche
w/v	Gewichtsprozent
XRE	<i>Xenobiotic response elements</i>

Die Abkürzung von chemischen Elementen und Verbindungen erfolgte nach der IUPAC-Nomenklatur.

## Zusammenfassung

Das Flavonoid Luteolin gehört zur Gruppe der pflanzlichen Polyphenole, die in vielen Pflanzen als Sekundärmetaboliten gebildet werden. Laut Ergebnissen epidemiologischer Studien korreliert eine erhöhte Aufnahme von Flavonoiden mit einem verminderten Risiko für Darmkrebs. Die Entstehung von Vorstufen des Darmkrebs' kann durch orale Aufnahme von indirekten Kanzerogenen wie Benzo(a)pyren (B(a)P) begünstigt werden, welche seine genotoxischen Eigenschaften erst nach einer metabolischen Aktivierung entfalten können. Die Umwandlung des B(a)P zum hochreaktiven Metaboliten wird durch den zentralen Regulator des Fremdstoffmetabolismus Arylhydrokarbonrezeptor (AHR) initiiert. Interessanterweise ist auch Luteolin in der Lage, den AHR-Signalweg zu antagonisieren.

Da Luteolin in der Literatur als eine geeignete Substanz zur Chemoprävention verschiedener Krebserkrankungen (u.a. Darmkrebs) vorgeschlagen wird und es außerdem Hinweise auf sein genotoxisches Potential gibt, sollten beide Endpunkte in der vorliegenden Arbeit untersucht werden. Der postulierte chemopräventive Mechanismus von Luteolin beruht auf Interaktion mit dem AHR Signalweg. Aus diesem Grund wurden zunächst Effekte dieses Flavonoids auf die metabolische B(a)P-Aktivierung im etablierten Darmzellmodell Caco-2 sowie in den Kolonkarzinomzellen HCT116, in denen der AHR-Signalweg mittels shRNA-Technik erfolgreich gehemmt wurde, untersucht. Die Zellen mit dem AHR-*knockdown* (HCT-shAHR) zeigten im Vergleich zu den Leervektor-Kontrollzellen (HCT-EV) eine signifikant verminderte Expression des AHR und seines Zielgens CYP1A1. Expressionsanalysen der B(a)P-metabolisierenden Gene CYP1A1 und GSTA2 in AHR-profizienten Caco-2 und HCT-EV Zellen zeigten, dass Luteolin die B(a)P-stimulierte Zunahme deren Transkriptmengen dosisabhängig inhibiert. Auch bei der anschließenden Überprüfung der CYP1A1-Aktivität bewirkte die Inkubation der HCT-EV Zellen mit Luteolin eine signifikante Hemmung der B(a)P-induzierten Enzymaktivität. In den HCT-shAHR Zellen wurde erwartungsgemäß keine Änderung in der Expression AHR-abhängiger B(a)P-metabolisierender Gene sowie keine messbare CYP1A1-Enzymaktivität beobachtet. Die Resultate der indirekten Bestimmung der BPDE-DNA-Addukt-Bildung im Comet-Assay weisen darauf hin, dass Luteolin in der Lage ist, die B(a)P-induzierte DNA-Schädigung signifikant abzumildern. Verantwortlich für diesen Effekt ist die in den Genexpressionsanalysen und im EROD-Assay gezeigte AHR-abhängige Hemmung der CYP1A1-Expression und dessen Enzymaktivität. Um die beobachtete Reduktion der B(a)P-induzierten DNA-Schädigung durch Luteolin zu bestätigen, ist eine weitere direkte Messung des B(a)P-DNA-Addukt-Levels notwendig, die jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht etabliert werden konnte.

Neben den protektiven Eigenschaften von Luteolin gegenüber der B(a)P-induzierten DNA-Schädigung wurde als nächstes die Beeinflussung der DNA-Integrität durch die Luteolin-Behandlung in

Kolonkarzinomzellen untersucht. Initial wurde eine Luteolin-vermittelte Hemmung der Zellproliferation beobachtet. Die in den HCT-EV und HCT-shAHR Zelllinien durchgeführten Zellzyklusanalysen zeigten, dass niedrige Luteolin-Konzentrationen (5-10  $\mu\text{M}$ ) in HCT-EV eine signifikant höhere S-Phase-Arretierung als in den HCT-shAHR Zellen bewirken. Die Bestimmung der Teilungsrate der HCT-EV Zellen deutete darauf hin, dass nicht die verstärkte Zellproliferation die Zellzyklusblockade auslöst sondern andere Vorgänge wie Luteolin-induzierte DNA-Schädigung für die Initiierung des S-Phase-Arrests verantwortlich sind. Die Überprüfung des genotoxischen Potentials dieses Flavonoids ergab in HCT-EV Zellen eine höhere dosisabhängige Zunahme der DNA-Doppelstrangbrüche und der intrazellulären  $\gamma\text{H2AX}$ -Proteinmenge als in HCT-shAHR Zellen. Zudem konnte festgestellt werden, dass die verstärkte Bildung der DNA-Doppelstrangbrüche in diesen Zellen mit der erhöhten Phosphorylierung der JNK1-Kinase sowie mit der signifikant erhöhten intrazellulären Akkumulierung des p53-Proteins korreliert. Darüber hinaus wurde in HCT-EV Zellen eine signifikant höhere Expression des p53-abhängigen CDK2-Inhibitorproteins p21/Cip1 beobachtet, welches für die verstärkte Initiierung der Zellzyklusblockade verantwortlich sein könnte. Die gezeigte Luteolin-vermittelte Induktion der DNA-Doppelstrangbrüchen könnte laut Literatur auf seiner Fähigkeit zur Hemmung der DNA-Topoisomerase-Enzymen I / II beruhen. Die mechanistische Aufklärung der DNA-schädigenden Wirkweise von Luteolin in Abhängigkeit vom aktiven AHR-Signalweg könnte eine neue Perspektive für das chemotherapeutische Potential dieses Naturstoffes liefern.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass Luteolin durch die Interaktion mit dem aktiven AHR-Signalweg chemopräventive Effekte gegenüber der B(a)P-induzierten DNA-Schädigung ausüben kann. Dennoch ist die unkontrollierte Aufnahme von Luteolin als ein präventives Mittel gegen Krebserkrankungen aufgrund der beobachteten AHR-abhängigen genotoxischen Eigenschaften nicht bedenkenlos.

---

## Abstract

The flavonoid luteolin belongs to a group of naturally occurring polyphenolic compounds. Results of epidemiological studies indicate that the increased intake of flavonoids with a plant-rich diet can reduce the incidence of colorectal cancer. The development of colorectal cancer pre-stages can be promoted due to the dietary intake of indirect carcinogens like benzo(a)pyrene (B(a)P), which require a metabolic activation in order to interact with cellular DNA and provoke gene mutations. The transformation of B(a)P to its mutagenic metabolite is initiated by the key regulator of the drug metabolism the aryl hydrocarbon receptor (AHR). Interestingly, several studies have demonstrated the ability of luteolin to antagonize the AHR-pathway.

Even though, the results from several studies indicate that luteolin may be a suitable chemopreventive agent against cancer, other studies exhibited potential genotoxic properties of this flavonoid. The present study was performed to investigate and characterize these different effects of luteolin. The postulated chemopreventive mechanism of this flavonoid depends on direct interaction with the AHR. Therefore initially the effects of luteolin on the metabolic activation of B(a)P were examined in an established model for colon cell biology, Caco-2, and in HCT116 colon carcinoma cells. In stable transfected AHR-knockdown HCT116 cells (HCT-shAHR) AHR-signaling was significantly repressed compared to the respective empty vector control cells (HCT-EV). Gene expression analyses of the B(a)P-activating enzymes CYP1A1 and GSTA2 revealed that luteolin can significantly reduce the B(a)P-stimulated expression of these genes in AHR-proficient Caco-2 and HCT-EV cells. Along the same line the subsequent measurement of CYP1A1-activity revealed a significant luteolin-mediated inhibition of B(a)P-induced enzyme activity. The inhibition of CYP1A1 gene expression and specific enzyme activity resulted in a significant mitigation of B(a)P-induced DNA damage as determined by the comet assay, an established method to measure B(a)P-induced DNA-damage. As expected, treatment of HCT-shAHR cells with luteolin showed no effect on the expression of AHR target genes and the CYP1A1-activity. To confirm the demonstrated AHR-dependent effects of luteolin on the metabolic activation of B(a)P in colon cells, a direct determination of DNA-adduct level should be performed in future follow-up studies.

Beside the protective properties of luteolin against the B(a)P-induced DNA-damage the present study raised concerns with regard to the influence of luteolin on DNA integrity. Initially, a luteolin-mediated inhibition of cell cycle progression was observed. The results of cell cycle analyses indicated that low doses of luteolin can initiate a significant stronger S-phase arrest in HCT-EV compared to HCT-shAHR cells. This effect was not mediated by an increased rate of proliferation but by the induction of DNA double strand breaks (DNA-DSB). This observation was supported by a higher intracellular  $\gamma$ H2AX protein amount in AHR-proficient cells. Furthermore the luteolin-induced DNA-DSB correlated with



an increased phosphorylation of the JNK1-kinase as well as with an enhanced accumulation of p53 in these cells. Also, the gene expression of the p53-dependent endogenous CDK inhibitor protein p21/Cip1 was significantly increased in HCT-EV, which might be responsible for the enhanced initiation of the S-phase arrest in comparison to HCT-shAHR cells. In accordance with literature the demonstrated induction of DNA double strand breaks by luteolin could be due to its ability to inhibit the enzyme DNA topoisomerase I / II. The clarification of the mechanism of luteolin-mediated genotoxic effects depending on interaction with the AHR-pathway may give a new perspective for a chemotherapeutical potential of this flavonoid.

In summary the results of the present work indicate, that the flavonoid luteolin exhibits chemopreventive properties against B(a)P-induced DNA-damage. However, the AHR-dependent genotoxic properties of luteolin observed in this study, raised doubts regarding its uncontrolled usage as a cancer preventive in humans.

## 1. Einleitung

Darmkrebs ist eine der häufigsten diagnostizierten Krebserkrankungen in den westlichen Industrienationen. Nach Informationen der deutschen Krebshilfe erkranken jährlich über 62.000 Menschen in Deutschland an einem bösartigen Tumor im Darm und für rund 26.000 Menschen verläuft diese Krebserkrankung tödlich (Homepage des Robert-Koch-Instituts, 2013). Im Hinblick auf die Anzahl der Neuerkrankungen steht Darmkrebs bei Frauen und Männern nach Brust- und Prostatakrebs an zweiter Stelle und stellt somit die häufigste Krebsform in Deutschland dar. Als Ursachen der Entstehung der Kolonkarzinomen werden neben genetischen Faktoren, die zur erhöhten Neigung zur Ausbildung der Darmtumor-Vorstufen führen (Familiäre adenomatöse Polyposis und hereditäres nicht-polypöses Kolon-Karzinom), auch Lebens- und Ernährungsgewohnheiten betrachtet. So erhöht eine ballaststoffarme, fett- und fleischreiche Ernährung, regelmäßiger Alkoholkonsum, wenig Bewegung und Übergewicht das Risiko, an Darmkrebs zu erkranken (Chao et al., 2005; Giovannucci, 2001).

Der Gastrointestinaltrakt des Menschen stellt eine erste Kontaktstelle zwischen Lebensmittelbestandteilen, oral verabreichten Arzneimitteln, Schadstoffen (Pestizid-Rückstände, Lebensmittelkontaminanten) und Körperzellen dar. Da die Darmschleimhaut (Mukosa) auf die Resorption der Nahrungsmoleküle spezialisiert ist, ist auch die Auseinandersetzung mit potentiell toxischen Fremdstoffen, die mit der Nahrung aufgenommen werden, nicht vermeidbar. Um die Bioverfügbarkeit dieser Schadstoffe und deren mögliche adverse Wirkung im Organismus zu reduzieren, ist die Mukosa mit einer Reihe von Schutzmechanismen ausgestattet. Gelangen fremde Substanzen in den Organismus, wird eine Entgiftungsmaschinerie in Form von Eliminierungs- oder bei toxischen Substanzen Detoxifizierungsreaktionen in Gang gesetzt (Marquardt & Schäfer, 2004). Diesen Vorgang bezeichnet man auch als Fremdstoffmetabolismus. Obwohl die Leber als Hauptentgiftungsorgan angesehen wird, beschäftigen sich immer mehr Studien mit der Bedeutung des Fremdstoffwechsels im Dünndarm. Seit den 70-er Jahren ist bekannt, dass die Ausstattung des Dünndarms mit fremdstoffmetabolisierenden Enzymen ausreichend ist, um eine Vielzahl der Arzneimitteln und Fremdstoffe, wie Benzo(a)pyren, zu metabolisieren (Rifkind et al., 1978).

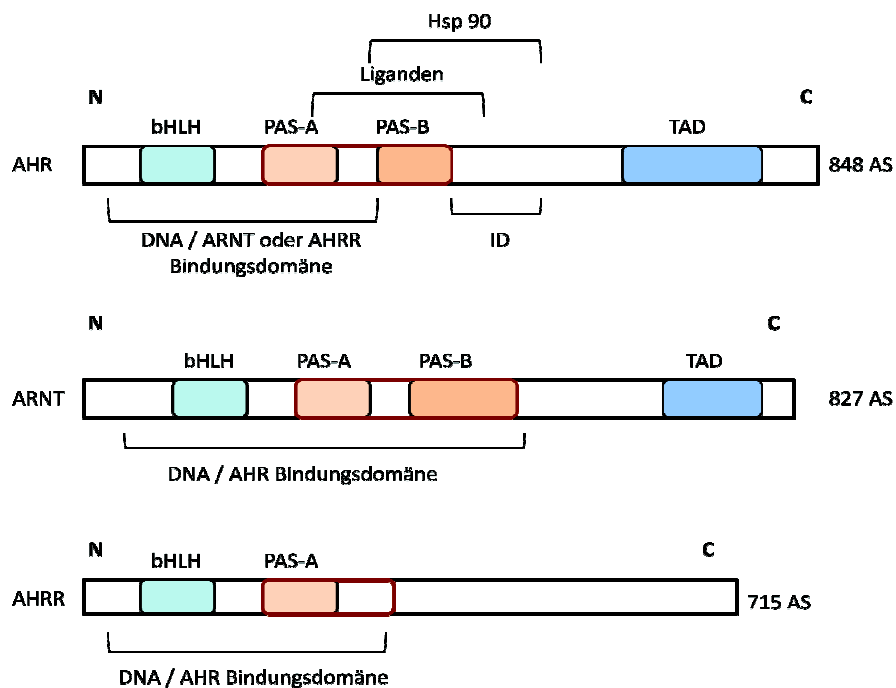
## 1.1. Der Arylhydrokarbon Rezeptor

Der Arylhydrokarbon Rezeptor (AHR) stellt einen endogenen ligandenaktivierten Transkriptionsfaktor dar, der durch eine Vielzahl von Umwelttoxinen aktiviert wird und ihre toxischen und biochemischen Effekte vermitteln kann. Zur Gruppe der klassischen Liganden gehören Dioxine, polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK) und halogenierte aromatische Kohlenwasserstoffe (HAK). Diese Umweltchemikalien kommen ubiquitär vor und können vielfältige adverse toxikologische Effekte beim Menschen induzieren. Der wohl bekannteste Vertreter der Dioxin-Gruppe ist die anthropogene Chemikalie 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-p-dioxin (TCDD). TCDD wurde 1976 bei einem tragischen Chemieunfall in Seveso bekannt und geriet 2004 in den Schlagzeilen der Medien als Vergiftungssubstanz bei dem Anschlag auf den ehemaligen ukrainischen Präsidenten Viktor Juschtschenko. Die Exposition der Menschen gegenüber TCDD kann vielfache toxische Effekte, wie Teratogenität, Tumorpromotion, Schädigung des Immunsystems und der Leber, endokrine Störungen sowie Hautstörungen in Form der Chloraknebildung, hervorrufen (Bock & Köhle, 2006; Fernandez-Salguero et al., 1996; Mimura et al., 1997).

Der AHR wurde 1976 durch Ligandenbindungsanalysen mit radioaktiv markiertem Dioxin von Alan Poland et al. erstmals identifiziert und beschrieben (Poland et al., 1976). Anfang der 90-er Jahre gelang schließlich die Isolierung und Aufreinigung des Rezeptorproteins mit Hilfe des <sup>125</sup>I-markierten 2-Azido-3-iodo-7-8-dibrombenzo-p-dioxins (Bradfield et al., 1991). Die spätere Aufklärung der molekularen Gen- und Proteinstruktur des AHRs und etwa zeitgleiche Identifizierung des ARNT-Proteins als dessen Bindungspartner führten zur nachfolgenden mechanistischen Aufklärung des AHR-Signalweges (Matsushita et al., 1993; Reisz-Porszasz et al., 1994; Reyes et al., 1992).

Das humane AHR-Gen kodiert ein aus 848 Aminosäuren bestehendes Protein mit der molekularen Masse von 96 kDa (Dolwick et al., 1993) und wird in verschiedenen Geweben, beispielsweise in der Lunge, in der Leber, im Thymus, in den Testes (Carver et al., 1994) und im Darm, exprimiert. Der AHR sowie zwei andere in den AHR-Signalweg involvierte Proteine AHR *Nuclear Translocator* (ARNT) und AHR *Repressor* (AHRR) gehören zur Superfamilie der *basic Helix-Loop-Helix* (bHLH)-PAS Transkriptionsfaktoren und sind in der Abbildung 1 dargestellt. Die charakteristischen Strukturmerkmale dieser Proteine sind die bHLH- und PAS-Domänen. Die bHLH-Domäne ist am N-terminalen Ende des AHRs lokalisiert und ist für die DNA-Bindung sowie Protein/Protein-Dimerisierung verantwortlich (Gu et al., 2000). Innerhalb dieser Domäne sind außerdem In- und Exportsignale (*Nuclear Translocator Sequence*, *Nuclear Export Sequence*) integriert (Ikuta et al., 1998; Berg & Pongratz, 2001). Diese bestimmen die Lokalisation des Proteins in der Zelle (Moroi et al., 1999). Eine weitere typische Untereinheit der bHLH/PAS-Proteinen ist die sogenannte *Per* (*period*)-

ARNT-Sim (*single minded*)-Domäne (PAS-Domäne), deren Bezeichnung von den ersten identifizierten Proteinen mit diesem Motiv abgeleitet wird.



**Abbildung 1: Struktureller Aufbau der humanen bHLH/PAS-Proteine: AHR, ARNT und AHRR**

AS – Aminosäuren, bHLH – *basic Helix-Loop-Helix*-Domäne, Hsp 90 – Hitzeschockprotein-Dimer 90 kDa, ID – Inaktivierungsdomäne, PAS – PER-ARNT-SIM-Domäne, TAD – Transaktivierungsdomäne, N – aminoterminales Ende, C – carboxyterminales Ende

Die in *Drosophila melanogaster* identifizierten Proteine Per und Sim sind strukturell homolog mit dem AHR (Whitelock et al, 1999). Die PAS-Domäne besteht aus 250 bis 300 Aminosäuren und ist in zwei weitere Untereinheiten, PAS A und PAS B, unterteilt, die durch einen weniger konservierten Spacer getrennt sind (Crews, 1998). Diese Domäne beeinflusst die Interaktion mit Chaperon-Molekülen wie Hsp 90, die Dimerbildung mit den Proteinen der bHLH/PAS-Familie sowie die Bindung der Liganden an den AH-Rezeptor (Fukunaga et al., 1995; Reisz-Porszasz et al., 1994). Das C-terminale Ende der bHLH/PAS-Proteinen ist im Vergleich zu den vorher beschriebenen stark konservierten bHLH- und PAS-Domänen weniger konserviert. Dort ist eine glutaminreiche Transaktivierungsdomäne lokalisiert, die eine Vielzahl von stimulatorischen und inhibitorischen Untereinheiten enthält.

In vielen Studien wurde gezeigt, dass der AHR in der Lage ist, eine Vielfalt an strukturell unterschiedlichen Substanzen zu binden. Diese Stoffe können anthropogener, biogener sowie endogener Herkunft sein. In der Literatur werden AHR-Liganden in zwei große Kategorien unterteilt. Die erste Kategorie umfasst „klassische“ AHR-Liganden. Diese weisen, ähnlich wie TCDD, eine

aromatische, planare chemische Struktur auf und verfügen über hydrophobe Eigenschaften. In der zweiten Kategorie sind Verbindungen untergebracht, die eher über von TCDD stark abweichende physikochemische oder strukturelle Eigenschaften verfügen. Solche Substanzen werden als „nicht-klassische“ AHR-Liganden bezeichnet. Liganden beider Kategorien sind in der Lage, den Rezeptor aktivierend (Agonist) oder hemmend (Antagonist) zu beeinflussen. Um die hohe Diversität der Stoffe, die als Agonisten oder Antagonisten des AHR auftreten können, zu verdeutlichen, sind in der Tabelle 1 repräsentative Beispiele aufgelistet.

Stoffklasse	Beispiele
<b>Halogenierte aromatische Kohlenwasserstoffe (HAK)</b>	3,3',4,4',5-Pentachlorobiphenyl (PCB 126) 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzofuran
<b>Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK)</b>	Benzo(a)pyren (BaP) 7,12-Dimethyl-benz(a)anthracen 3-Methylcholanthren (3-MC)
<b>Indolderivate</b>	6-Formylindol(3,2,-b)carbazol (FICZ) 2-(1'H-Indol-3'-carbonyl)-thiazol-4-carboxylsäure-methylester
<b>Alkaloide</b>	Annomontin Berberin Rutaecarpin
<b>Polyphenole</b>	Curcumin Resveratrol Quercetin
<b>Arzneimittel</b>	Diclofenac Omeprazol Sulindac

**Tabelle 1:** Substanzklassen und Beispiele von AHR-bindenden Verbindungen (Quelle: Abel & Haarmann-Stemmann, 2010).

Die klassischen AHR-Liganden repräsentieren die am besten charakterisierte Gruppe exogener Substanzen, die meist als Folge anthropogener Aktivitäten entstehen und in der Umwelt weit verbreitet sind. Zu diesen hoch affinen Stoffen, größtenteils AHR-Agonisten, gehören toxische HAH wie polychlorierten und polybromierten Dibenzo-p-dioxine (PCDD), Dibenzofurane (PCDF), Biphenyle (PCB) sowie viele PAK und PAK-ähnliche Substanzen (Poland & Knutson, 1982; Safe, 1990; Denison et al., 2002). Zur Gruppe der PAK zählen unter anderem Benzo(a)pyren, 3-Methylcholanthren und Benzanthracen (Denison & Nagy, 2003).

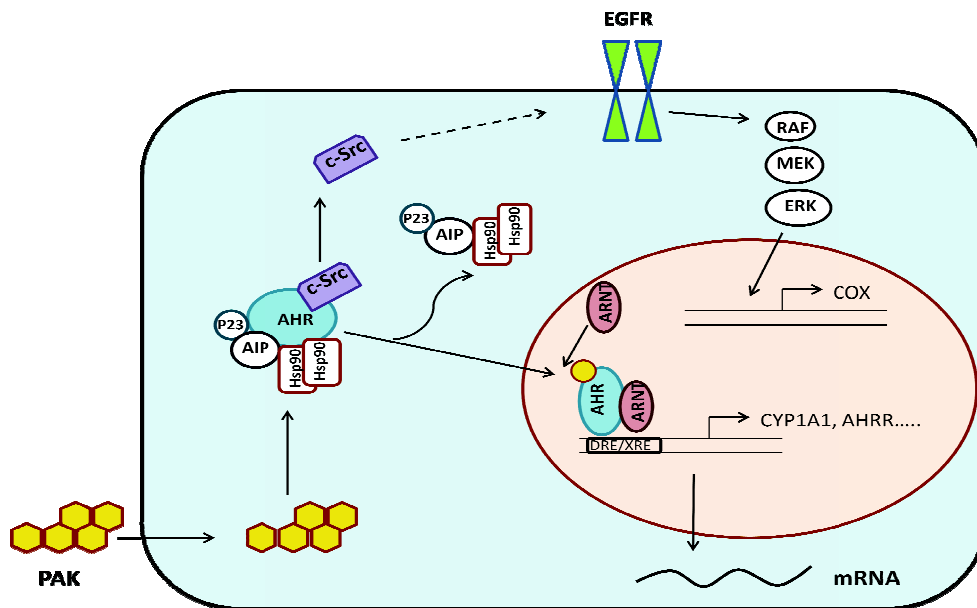
Im Vergleich zu den klassischen AHR-Liganden verfügen die nicht-klassischen Liganden über eine schwache bis mittlere Bindungsaffinität zum Rezeptor. Auch diese Kategorie umfasst ein breites Spektrum von Substanzklassen mit synthetischem oder natürlichem Ursprung. Zu den synthetischen Verbindungen gehören beispielsweise der Arzneistoff Omeprazol (Quattrochi & Tukey, 1993), welcher als Magensäureblocker therapeutisch eingesetzt wird, die Pestizide Carbaryl und Thiapendazol (Delescluse et al., 2001), die als schwache Cholinesterase-Hemmer fungieren, der Chitinsynthese-Inhibitor Diflubenzuron sowie viele andere Pharmazeutika.

Die natürlichen Verbindungen entstehen durch biologische Prozesse und werden nochmals in exogene Stoffe, die über die Nahrung in den Organismus gelangen, und endogene Verbindungen, die im Körper gebildet werden, unterteilt. Zu den natürlich vorkommenden Liganden werden hauptsächlich Bestandteile aus den pflanzlichen Lebensmitteln wie Flavonoide, Polyphenole, Alkaloide und Indolderivate gezählt. Als bekannteste Beispiele seien hier Indolo-3-Carbinol (Bjeldanes et al., 1991), Quercetin (Ciolino et al., 1999), Resveratrol (Ciolino et al., 1998), Curcumin (Ciolino et al., 1998) und Luteolin (Bothe et al., 2010, Zhang et al., 2003) zu benennen.

Die Gruppe der endogenen AHR-Liganden besteht größtenteils aus Tryptophan-Derivaten (Rannug et al., 1987; Rannug & Fritsche, 2006). In der Arbeit von Fritsche et al. (2007) konnte die hohe Bindungsaffinität des 6-Formylindol-(3,2-b)-carbazols (FITZ) zum AHR und die daraus resultierende Aktivierung AHR-Zielgene gezeigt werden. Weiterhin sind 2-(1'H-Indol-3'-carbonyl)-thiazol-4-carboxylsäure-methylester (Song et al., 2002), Abbauprodukte des Hämoglobins (Phelan et al., 1998), Steroidhormone (Jinno et al., 2006) und einige Prostaglandine (Seidel et al., 2001) in der Lage, die AHR-Aktivität zu beeinflussen.

In Abwesenheit eines Liganden liegt der AHR als zytosolisches Multiproteinkomplex vor. Dieser besteht aus einem 90 kDa-großen Hitzeschockprotein-Dimer (Hsp 90) (Chen & Perdew, 1994; Denis et al., 1988), dem Hsp 90-assoziierten Ko-Chaperon p23-Protein (Cox et al., 2004; Kazlauskas et al., 1999) und dem Immunophilin-Homologen *AHR interacting protein* (AIP) (Carver & Bradfield, 1997; Ma & Whitlock, 1997) sowie der assoziierten Tyrosin-Protein-Kinase c-Src (Enan & Matsumura, 1996). Die Hsp 90 Proteine stabilisieren die offene Konformation des Rezeptors durch ihre Bindung an die PAS-Ligandenbindungs- und die bHLH-DNA-Bindungsdomänen (Perdew & Bradfield, 1996). Dadurch wird die hohe Bereitschaft zur Ligandenbindung gewährleistet. AIP trägt ebenfalls zur AHR-Stabilität im Zytosol bei, indem es zusammen mit p23 die Translokation des inaktiven Rezeptors in den Zellkern und die nachfolgende Aktivierung der Genexpression verhindert. Außerdem schützt das AIP-Protein den AHR vor Ubiquitinierung und dem nachgeschalteten proteasomalen Abbau (Kazlauskas et al., 2000). Die c-Src-Kinase ist mit dem zytosolischen AHR-Multiproteinkomplex über Hsp90 Proteine assoziiert (Köhle et al., 1999).

Im Falle einer Ligandenbindung an den AHR wird eine Konformationsänderung des Rezeptors ausgelöst (Abbildung 2). Diese führt zur Freilegung der Kernlokalisations-Sequenz und zur Translokation des AHR in den Zellkern (Pollenz et al., 1994; Kazlauskas et al., 2001). Während des Translokationsprozesses kommt es zum Zerfall des Multiproteinkomplexes, wobei die c-Src-Kinase im Zytoplasma verbleibt und in der Lage ist, membranständigen Rezeptoren zu phosphorylieren und somit die nachgeschalteten Signalwege zu aktivieren (Köhle et al., 1999; Fritsche et al., 2007).



**Abbildung 2: Der AHR-Signalweg**

AHR – Arylhydrokarbon Rezeptor, AIP – *Immunophilin-like AHR-Interacting Protein*, ARNT – *AHR Nuclear Translocator*, AHRR – *AHR Repressor*, COX – *Cyclooxygenase*, c-Src – *Tyrosin-Proteinkinase*, CYP1A1 – *Cytochrom-P450-1A1*, EGFR – *Epidermal Growth Factor Receptor*, ERK – *Extracellular-Signal Regulated Kinase*, Hsp 90 – *Hitzeschockprotein 90 kDa*, MEK – *Mitogen-activated Protein Kinase Kinase*, PAK – *polyzyklische Kohlenwasserstoffe*, RAF – *Rapidly Accelerated Fibrosarcoma*, DER / XRE – *Dioxin / Xenobiotic Responsive Elements*

Im Zellkern bildet der AHR ein Heterodimer mit seinem Bindungspartner ARNT (Reyes et al., 1992). Der entstandene AHR-ARNT-Komplex wirkt als Transkriptionsfaktor, der mit hoher Affinität an spezifische DNA-Bereiche in den Promotor- oder Enhancer-Regionen bindet. Die sogenannten Xenobiotika-responsiven Elemente enthalten in ihrer Kernsequenz eine für die Bindung essentielle Basenabfolge 5'-GCGTG-3' (Denison et al., 1988; Swanson et al., 1995). Die Interaktion des Transkriptionsfaktors mit der Kernsequenz führt zur Änderung der lokalen Chromatinstruktur und ermöglicht somit die Bindung an den Promotor und die nachfolgende Induktion der Expression AHR-abhängiger Gene. Die Beendigung des aktivierten AHR-Signalweges erfolgt durch den Export des Rezeptors aus dem Zellkern mit Hilfe der Kernexport-Sequenz und anschließender proteasomalen

Degradierung des AHR. Die Regulation der AHR-Aktivität kann außerdem durch den AHR-Repressor moduliert werden (Haarmann-Stemmann et al., 2007).

Die Zielgene des AHR kodieren für fremdstoffmetabolisierende Enzyme Phase I und Phase II. Zu den AHR-abhängigen Phase I Enzymen gehören vor allem die Vertreter der Cytochrom-P450-1 – Familie, CYP1A1, CYP1A2 und CYP1B1 sowie die Aldehyhydrogenase-3 (ALDH1A3). In der Phase II-Gruppe werden NADPH-Quinon-Oxidoreduktase (NQO1), UGT-Glycuronosyltransferase (UGT1A6) und Glutathion-S-Transferase (GSTA1, Ya) durch den AHR reguliert (Nebert et al., 2000). Die koordinierte transkriptionelle Induktion der vorher erwähnten fremdstoffmetabolisierenden Enzyme zeigt, dass der AHR-Signalweg in erster Linie an einer effektiven Detoxifizierung von Fremdstoffen beteiligt ist und somit eine schützende Funktion vor exogenen chemischen Substanzen und deren Metaboliten ausübt (Bradshaw et al., 2002). Neben den Enzymen des Fremdstoffwechsels wird die Expression von Genen, deren Produkte in die Regulation der Zellproliferation, Zelldifferenzierung und Apoptose involviert sind, durch den AHR moduliert (Abel & Haarmann-Stemmann, 2010; Elferink et al., 2003; Frauenstein et al., 2013; Puga et al., 2002). Dazu gehören beispielsweise die Zellzyklusregulatoren p27/Kip1 und p21/Cip1, das pro-apoptische Bax (*Bcl-2-associated X Protein*), TGF-alpha und TGF-beta (*Transforming Growth Factor*) sowie verschiedene Interleukine wie IL-1 $\beta$  oder IL-2 (Haarmann-Stemmann et al., 2009; Gramatzki et al., 2009; Rowland & Gustafsson, 1997)

Neben dem „klassischen“ AHR-Signalweg wurde 1996 von Enan & Matsumura ein alternativer Signalweg beschrieben, der ebenfalls nach der Ligandenbindung des AHR initiiert wird. Dieser sogenannte alternative Signalweg wird über die c-Src-Kinase vermittelt. Fritsche et al. (2007) zeigten, dass die Bestrahlung der humanen Keratinozyten mit UVB eine Induktion der CYP1A1 und COX-2 Transkription initiiert. Die induzierte Expression beider Gene konnte durch chemische oder shRNA-vermittelte AHR-Hemmung als auch durch spezifische Hemmung der c-Src-Kinase stark reduziert werden (Fritsche et al., 2007). In der Hypothese wird angenommen, dass nach der Freisetzung der c-Src-Kinase aus dem AHR-Multiproteinkomplex eine Phosphorylierung und Aktivierung der membranständigen Rezeptoren wie des epidermalen Wachstumsfaktors EGFR erfolgt. Der EGFR initiiert zelluläre MAP-Kinasen-Signalwege, wodurch es zu der Phosphorylierung von ERK1/2 und nachgeschalteter transkriptioneller Induktion der COX-2 kommt. In dieser Arbeit wird somit gezeigt, dass AHR in der Lage ist, die UVB-induzierten COX-2-Regulation zu beeinflussen, und eine bedeutende Rolle bei den UV-vermittelten Entzündungsprozessen spielt.

Darüber hinaus konnte in vielen Studien gezeigt werden, dass AHR eine wichtige Rolle bei der chemischen Kanzerogenese spielt. Untersuchungen verschiedener Krebsarten des Menschen, wie Tumore der Lunge, Leber, Pankreas, Prostata und Brust, belegen, dass AHR-Expression in diesen malignen Tumorgeweben stark erhöht ist (Hayashibara et al., 2003; Kashani et al., 1998; Koliopoulos



et al., 2002; Liu et al., 2013; Pinpin et al., 2003; Vogel et al., 2011). Ergebnisse diverser Studien an Mausmodellen demonstrieren außerdem die Relevanz des AHR bei den Prozessen der Tumorigenese. So führt die Ausschaltung des AHR-Gens bei Versuchstieren zur Resistenz gegenüber der Kanzerogenität von B(a)P und anderen PAK (Nakatsuru et al., 2004; Shimizu et al., 2000). Im Vergleich dazu weisen transgene Mäuse mit einem konstitutiv-aktiven AHR eine verstärkte Tendenz zur Tumorentstehung und Tumorpromotion auf (Andersson et al., 2002; Moennikes et al., 2004). Matsumoto et al. (2007) zeigen in ihren Studien mit AHR-profizienten und AHR-defizienten Mäusen, dass die Anwesenheit des funktionellen Rezeptors für die Entstehung der Lungentumore durch PAK-kontaminierten Luftpartikeln ausschlaggebend ist. Dabei spielt vor allem die Aktivierung des CYP1A1-Enzyms durch AHR eine Schlüsselrolle. In einer anderen Studie wurde der Einfluss von AHR auf die Darmkanzerogenese untersucht (Kawajiri et al., 2009). Im Gegensatz zur vorherigen Studie deuten die Ergebnisse dieser Arbeit darauf hin, dass AHR-Defizienz in Mäusen zur höheren Suszeptibilität gegenüber spontan entstandenen Darmtumoren führt. Kawajiri et al. (2009) demonstrierten, dass die zusätzliche Induktion des AH-Rezeptors durch natürlichen Liganden, wie Indolderivate, zur verstärkten Interaktion mit dem Wnt- $\beta$ -Catenin-Signalweg führt und die Prozesse der Tumorentstehung im Darm stark inhibiert. Damit wird in dieser Arbeit eine weitere Funktion des AHR als Tumorsuppressorprotein aufgedeckt.

Die Befunde der vorgestellten Studien unterstreichen die pathophysiologische Relevanz des AHR im Hinblick auf die Entstehung und Progression von Krebserkrankungen. Aus diesem Grund sind weitere Untersuchungen zur Prävention der malignen Erkrankungen mit dem Fokus auf die AHR-Aktivität von besonderem Interesse.

## **1.2. Fremdstoffmetabolisierende Cytochrom-P450-abhängige Monooxygenasen**

Der Mensch ist täglich einer Vielzahl von chemischen Fremdstoffen ausgesetzt. Die Aufnahme dieser fremdartigen Substanzen löst in den Zellen eine Kaskade von Entgiftungsreaktionen aus, die als Fremdstoffmetabolismus bezeichnet werden. Dieser Prozess umfasst drei Phasen. In der Phase-I werden gering wasserlösliche Substanzen durch den Einbau beziehungsweise Demaskierung, funktioneller Gruppen funktionalisiert. Die entstandenen Intermediate werden in der Phase-II unter Energieverbrauch an bestimmte Kosubstrate gekoppelt. Durch diese Modifizierungen wird die Polarität der Verbindung stark erhöht, die mit ihrer steigenden Wasserlöslichkeit einhergeht. Der Fremdstoff kann nun in der Phase-III über spezielle Transportsysteme aus den Zellen und anschließend über Galle oder Nieren aus dem Körper ausgeschieden werden.

Zu den typischen Vertretern der Phase-I-Enzyme gehören Oxidoreduktasen wie Cytochrom-P450-abhängigen Monooxygenasen und Cyclooxygenase-2 sowie Hydrolasen, beispielsweise

Epoxidhydrolasen und Glucuronidasen. In der Phase-II sind Enzyme wie Glutathion-S-Transferase, UDP-Glucuronosyltransferase, Sulfotransferase und einige weitere aktiv (Marquardt & Schäfer, 2004; Greim & Deml, 1996).

Die Cytochrom-P450-abhängigen Monooxygenasen (CYP) bilden eine große Superfamilie von Enzymen, die eine prosthetische Häm-Gruppe im aktiven Zentrum aufweisen. In Eukaryonten sind diese membranständigen Enzyme mit der Cytochrom-P450-Reduktase assoziiert und im endoplasmatischen Retikulum lokalisiert. Die enzymatische Aktivität der CYPs besteht in der Oxidierung der spezifischen Substrate durch den Transfer eines Sauerstoffatoms aus dem molekularen Sauerstoff.

Nach derzeit gültiger Nomenklatur werden die CYPs in Abhängigkeit ihrer Sequenzverwandtschaft in Familien und Unterfamilien eingeteilt. Das einzelne Enzym trägt die Bezeichnung CYP und eine Folge von Ziffern und Buchstaben (zum Beispiel CYP1A1). Mitglieder einer Familie weisen eine mindestens 40%-ige Aminosäuresequenz-Identität auf und sind mit der ersten Zahl klassifiziert (CYP1). Enzyme mit Homologien von mehr als 55% bilden Unterfamilien und sind mit einem Buchstaben gekennzeichnet (CYP1A). Einzelne Isoenzyme der Unterfamilien können bis 97% homologe Sequenzen haben und sind durch eine weitere Zahl definiert (CYP1A1).

Die Mehrzahl der CYP-Enzyme wird in der Leber exprimiert. Neben der Leber finden sich die relativ höchsten Enzymaktivitäten in den Epithelzellen des Gastrointestinaltraktes und der Blase, in den Clara-Zellen der Lunge und in den proximalen Tubuluszellen der Niere. Da sich die Expression und die Aktivität der meisten CYP-Enzyme organ- und substratspezifisch induzieren lässt, kann zwischen den basalen und induzierbaren Enzymaktivitäten unterschieden werden. Induktion durch ein Substrat erfolgt dabei durch die Aktivierung eines zytosolisch lokalisierten Rezeptors (Arylhydrokarbon Rezeptor, konstitutiver Androstan Rezeptor und Pregnan X Rezeptor). Dieser fungiert im aktiven Zustand als Transkriptionsfaktor und induziert die Genexpression der CYP-Enzyme durch Bindung an sogenannten „*xenobiotic response elements*“ (XRE) im Promotorbereich des Gens (Greim & Deml, 1996).

Für den Fremdstoffmetabolismus sind im Wesentlichen die CYP-Familien 1-3 von Bedeutung. Die CYP1-Familie beinhaltet drei Mitglieder: CYP1A1, CYP1A2 und CYP1B1. Diese Enzyme sind auf die Oxidierung der planaren lipophilen Substrate wie TCDD und PAK, aber auch endogenen Stoffen wie Steroidhormone spezialisiert (Tsuchiya et al., 2004) und werden als klassische Zielgenen des AHR-Signalweges betrachtet. Die Funktionalisierung der typischen CYP1-Substrate führt jedoch nicht immer zur anschließenden Detoxifizierung dieser Substanzen durch Phase II-Enzyme. In manchen Fällen kann sie eine Aktivierung zu reaktiven Intermediaten, welche in der Lage sind, zelluläre Makromoleküle zu binden und zu schädigen, auslösen. Aus historischer Sicht wird vor allem Isoenzym CYP1A1 für die Aktivierung polyzyklischer aromatischer Kohlenwasserstoffe (PAK) zu ultimativen

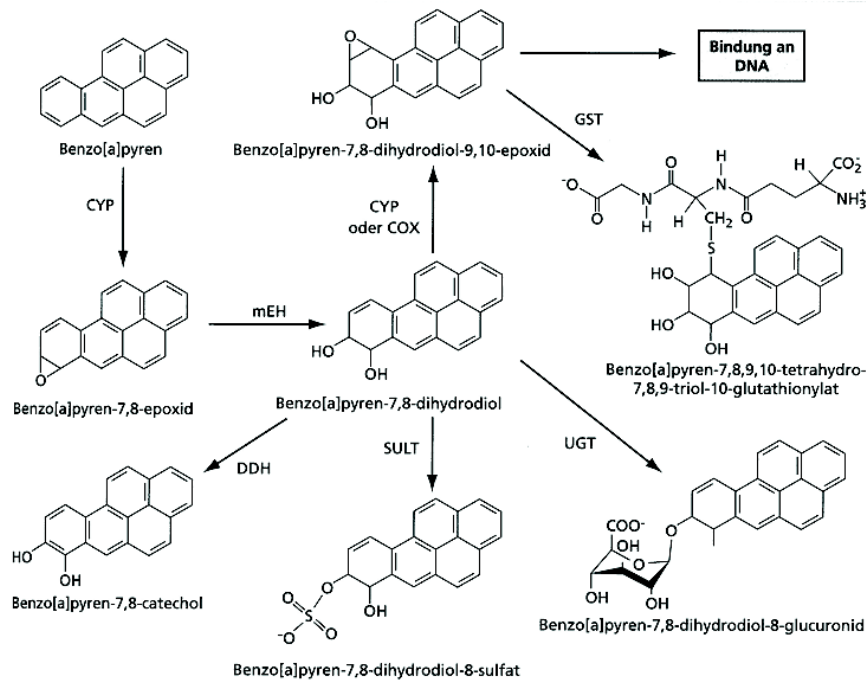
Kanzerogenen verantwortlich gemacht (Marquardt & Schäfer, 2004; Greim & Deml, 1996). Nachfolgend wird die CYP1A1-abhängige metabolische Aktivierung eines typischen Vertreters der PAK-Gruppe Benzo(a)pyren zum genotoxischen Metaboliten vorgestellt.

### 1.3. Metabolismus und Toxizität von Benzo(a)pyren

Benzo(a)pyren (B(a)P) gehört zur Gruppe polyzyklischer aromatischer Kohlenwasserstoffe (PAK), die in der Umwelt ubiquitär verbreitet sind. Chemisch betrachtet sind PAK planare Verbindungen, die aus zwei bis sieben Kohlenwasserstoffringen bestehen. Diese Verbindungen entstehen bei unvollständigen Verbrennungsprozessen organischer Materialien wie Holz, Kohle oder Öl. Ein großer Teil der PAK gelangen durch Naturprozesse wie Waldbrände oder Vulkanausbrüche in die Umwelt. Die wesentlichen Emissionsquellen entstehen jedoch durch menschliche Verbrennungsaktivitäten: aus industriellen Verbrennungsprozessen, Feuerstellen oder Tabakrauch. B(a)P und andere PAK finden sich oft, an Staub- und Rußpartikeln gebunden, als Kontaminanten in der Luft und nach der Sedimentation in Wasser, in Böden und pflanzlichen Lebensmitteln. Zahlreiche Studien, die sich mit menschlicher Exposition gegenüber PAK über Nahrungsmitteln beschäftigten, deuten darauf hin, dass die größte Aufnahme dieser Substanzen nicht über die Luft sondern über die Nahrung aufgenommen wird (Dennis et al., 1991; Kazerouni et al., 2001; Phillips, 1999). In Lebensmitteln können PAK, einschließlich B(a)P, nicht nur als Verunreinigungen auftreten, sondern durch die thermische Zubereitung wie durch Rösten, Braten, Frittieren und Räuchern, *de novo* entstehen (Dennis et al., 1991). Eine weitere wichtige Quelle für die Exposition gegenüber B(a)P ist der Zigarettenrauch.

Viele Vertreter der PAK-Gruppe sind als indirekte genotoxische Kanzerogene beschrieben. Durch ihre hydrophoben Eigenschaften sind sie in ihrem Reaktionsverhalten eher träge und benötigen eine metabolische Aktivierung durch die Enzyme des Fremdstoffmetabolismus, um die reaktiven kanzerogenen Eigenschaften entfalten zu können. Die metabolische Aktivierung von B(a)P ist in der Abbildung 3 dargestellt. Sie erfolgt über einen mehrstufigen Prozess. Im ersten Schritt der Epoxidierung sind vor allem die Enzyme der CYP1-Familie, dessen Expression durch den Arylhydrokarbon Rezeptor reguliert wird, beteiligt. Das gebildete B(a)P-7,8-epoxid wird rasch von der mikrosomalen Epoxidhydrolase zum Diol umgesetzt. Dieses sekundäre Metabolit kann nun durch Konjugation mit Glucuronsäure oder Sulfat detoxifiziert werden oder durch eine weitere CYP1- bzw. COX-2-vermittelte Oxidation zum stark reaktiven mutagenen Metabolit B(a)P-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxid (BPDE) werden. Die entstandenen BPDE-Moleküle sind in der Lage, mit der zellulären DNA Addukte zu bilden und somit Mutationen auszulösen. Aufgrund der sterischen Hinderung können diese Moleküle praktisch nicht durch Epoxidhydrolase entgiftet werden. Ihre Inaktivierung kann nur

durch die Glutathion-S-Transferase vermittelte Konjugation mit Glutathion zu Stande kommen. Die Effizienz dieser Entgiftungsreaktion reicht jedoch nicht aus, um die kanzerogene Wirkung des BPDE vollständig zu unterdrücken.



**Abbildung 3: Die CYP1A1-vermittelte Aktivierung von B(a)P zum ultimativen Kanzerogen**

Das B(a)P-Molekül wird durch CYP1A-Enzyme epoxidiert und anschließend durch die Epoxidhydrilase zum 7,8-Dihydrodiol überführt. Die weitere Metabolisierung von B(a)P kann in zwei möglichen Schritten ablaufen. Schritt 1: Detoxifizierung erfolgt durch Konjugationsreaktionen mit Glucuronsäure oder Sulfat zum 7,8-Catechol. Schritt 2: Bildung des reaktiven BPDE-Metaboliten mittels einer CYP1A1- oder Cyclooxygenase (COX)-vermittelten Oxidation. Durch die Entstehung einer weiteren Epoxidgruppe ist dieses Molekül in der Lage, an die zelluläre DNA zu binden. (Quelle: Marquardt & Schäfer, 2004).

In Tierexperimenten hat sich B(a)P im Vergleich zu weiteren PAK als eine der potentesten krebsauslösenden Substanzen erwiesen (Howard & Fazio, 1980). So führt die Fütterung der Versuchstiere mit B(a)P unter anderem zur Ausbildung von Magentumoren, Lungenadenomen und Leukämie (Rigdon & Neal, 1966; Rigdon et al., 1967; Rigdon & Neal, 1969). Das kanzerogene Potential dieser Substanz beruht, wie vorher beschrieben, auf deren metabolischen Aktivierung zum reaktiven BPDE-Metaboliten, welches kovalente Bindungen mit der DNA eingehen und die DNA-Addukt-Bildung auslösen kann. Da der BPDE-Entstehungsprozess stark durch die AHR-abhängigen CYP1A- sowie COX-2-Enzyme beeinflusst wird, kann eine chemische Inhibierung deren Expression die B(a)P-vermittelte Genotoxizität abmildern. Somit wird die bedeutende Rolle des AHR bei der Chemoprävention gegenüber der PAK-induzierten Kanzerogenese verdeutlicht. Tatsächlich weisen die Ergebnisse der Studie von Shimizu et al. (2000) auf die erhöhte Resistenz gegenüber den kanzerogenen Wirkungen von B(a)P in AHR-defizienten Mäusen.

Epidemiologische Studien deuten auf einen Zusammenhang zwischen der Aufnahme der PAK-Substanzen und dem Auftreten von Darmkrebs hin. Untersuchungen einer klinischen Fall-Kontroll-Studie konnten eine Korrelation zwischen der erhöhten B(a)P-Aufnahme durch den täglichen Verzehr vom gegrillten oder gebratenen Fleisch und dem erhöhten Risiko der Ausbildung der Darmkrebs-Vorstufen (Adenoma) bei Patienten feststellen (Sinha et al., 2005). Aktuelle Ergebnisse weiterer epidemiologischen Studien weisen allerdings darauf hin, dass das Risiko, an Darmkrebs zu erkranken, mit einer erhöhten Aufnahme pflanzlicher Lebensmittel sinkt (Rossi et al., 2006; Theodoratou et al., 2007; Terry et al., 2001). Verantwortlich dafür werden insbesondere sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe gemacht.

#### 1.4. DNA-Schadensantwort

Die genomische DNA ist täglich verschiedenen Arten des genotoxischen Stresses ausgesetzt. Dieser Prozess kann sowohl durch endogene als auch durch exogene Faktoren initiiert werden. Als endogene Quelle für die DNA-schädigende Wirkung werden hauptsächlich die Nebenprodukte des aeroben Stoffwechsels, die sogenannten reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), angesehen. Diese Moleküle sind aufgrund ihres starken Redoxpotentials, in der Lage verschiedene zelluläre Makromoleküle anzugreifen und diese zu oxidieren (Ames & Gold, 1991; Imlay & Linn, 1988). Die Reaktion von ROS mit der DNA führt zur Generierung der oxidierten Basen oder Zuckerresten, die Mutationen und DNA-Einzelstrangbrüchen zur Folge haben (Friedberg, 2004; Mello-Filho et al., 1984). Darüber hinaus können weitere zelluläre Prozesse, wie Hydrolyse oder fehlerhafte Replikation, die DNA-Integrität negativ beeinflussen. Zu den exogenen DNA-schädigenden Agentien werden verschiedene Strahlenarten wie UV- und ionisierende Strahlen und mutagene Chemikalien wie PAK, Alkylanzien, Toxine gezählt. In Folge der Wechselwirkung dieser Faktoren mit der DNA kann eine Vielzahl verschiedener DNA-Modifikationen in Form von veränderten Basen und DNA-Addukten entstehen oder die Bruchbildung in einem oder in beiden DNA-Strängen induziert werden.

Da die Zellteilung ein grundlegender Prozess im Organismus ist, sind die Zellen bestrebt, die gestörten DNA-Bereiche so schnell wie möglich zu reparieren und somit die Anhäufung von Mutationen, die die genomische Instabilität und die Entartung der spezialisierten Zellen hervorrufen können, zu verhindern. Die dafür entwickelten zellulären DNA-Reparaturmechanismen umfassen ein komplexes Netzwerk an Sensoren und Signalwegen, die durch verschiedene Enzyme gesteuert und umgesetzt werden. Anhand ihrer Spezialisierung für eine bestimmte Art des DNA-Schadens werden in den betroffenen Zellen bestimmte Reparaturmechanismen eingeleitet. Diese werden grob in drei Gruppen eingeteilt: 1) direkte Reversion der DNA-Schädigung 2) Reparatur der Doppelstrangbrüchen via der Homologen Rekombination (HR)- oder *Non-Homologous End-Joining* (NHEJ)-Prozesse und

3) Exzision der geschädigten DNA-Bereiche durch die Basen-Exzisions- (BER), Nukleotid-Exzisionsreparatur (NER) oder *Mismatch*-Reparatur (MMR) (Friedberg, 2006).

Den BER und NER ist gemeinsam, dass sie die modifizierten DNA-Bereiche durch das Herausschneiden und die anschließende Neusynthese reparieren können. Die BER ist vor allem für die Entfernung der oxidierten, alkylierten oder deaminierten Basen zuständig. Im Unterschied dazu werden von der NER die sogenannten „*bulky lesions*“ erkannt. Diese DNA-Modifikation kann beispielsweise durch UV-Strahlung als Photoprodukte (Emmert et al. 2000; Mitchell & Nairn 1989) oder durch die Chemikalien wie PAK, Cisplatin (Bowden et al., 2010) und andere in Form von DNA-Addukten induziert werden (Hiddemann & Bartram, 2009; Friedberg, 2006).

Beim Vorliegen eines DNA-Doppelstrangbruches können zwei unabhängige Mechanismen HR und NHEJ in Gang gesetzt werden. Der wichtigste Unterschied zwischen den beiden Reparaturmechanismen ist, dass das NHEJ für die Verbindung der freien DNA-Enden keine homologe Sequenz benötigt (Critchlow & Jackson, 1998), während der HR-Vorgang ohne einer homologen DNA-Sequenz nicht erfolgen kann (Christman et al., 2003).

Um Zellen mit geschädigter DNA eine schnelle und effiziente Reparatur zu ermöglichen, wird in diesen ein Zellzyklusarrest initiiert. In Abhängigkeit von der Art des vorliegenden DNA-Schadens kann dieser Prozess durch zwei parallele Signalwege - ATM-Chk-2- und ATR-Chk-1 - aktiviert werden. Die sogenannten Sensorproteine ATM (*Ataxia Telangiectasia Mutated*) und ATR (*ATM-Rad3-related*) gehören zu der *PI-3-kinase-like* Familie (Li & Zou 2005) und sind für die Transduktion des DNA-Schaden-Signals zu den nachgeschalteten Effektorproteinen, die meist in die zelluläre Vorgänge wie Proliferation, DNA-Reparatur und Apoptose involviert sind, zuständig (Harper & Elledge, 2007; Shiloh, 2003; Zhou & Elledge, 2000). Als wichtige Mediatoren dieser Signalkaskade gelten die *Checkpoint*-Kinasen-1 und -2 (Chk-1 und Chk-2), da sie die Phosphorylierung der Effektorproteine wie Cdc25-Phosphatasen (*Cell Division Cycle 25-Phosphatasen*), verschiedener DNA-Reparaturproteine oder Transkriptionsfaktoren p53 und E2F initiieren (Lukas et al., 2004).

In vorherigen Studien konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung des ATM-Chk-2 Signalweges in erster Linie durch die Bildung der DNA-DSB eingeleitet wird. Die ATR-Chk-1-Kinasen-Kaskade reagiert dagegen auf die replikationspezifische Schäden und Basenmodifikationen nach Einwirkung von UV-Strahlen und bestimmten Chemikalien (Shiloh, 2001, Zou & Elledge, 2003). In der Literatur gibt es allerdings Hinweise auf eine Wechselwirkungsbeziehung zwischen beiden Signalkaskaden. Die durch beispielsweise  $\gamma$ -Strahlung induzierten DNA-DSB können zur Aktivierung beider Signalkaskaden führen. Es wird vermutet, dass die dabei eingeleitete Phosphorylierung der ATR-Kinase durch das aktivierte ATM-Protein erfolgt (Harper & Elledge, 2007). Die Aktivierung beider Signalkaskaden führt über mehrere Zwischenschritte zu einer Hemmung spezifischer Cyclin/CDK-Komplexe, die für die Progression bestimmter Zellzyklusphasen notwendig sind.

Einer der prominentesten Mediatoren der Zellzyklusblockade in Folge einer DNA-Schädigung und der anschließenden Reparatur- oder Apoptoseprozessen ist das Tumorsuppressorprotein p53. Aufgrund der aufgezählten Eigenschaften wird dieses Protein in der Literatur als „Wächter des Genoms“ bezeichnet (Lane, 1992). Erfolgt in den Zellen eine DNA-Schädigung, wird p53 posttranslational stabilisiert, wodurch seine verstärkte intrazelluläre Akkumulierung eingeleitet wird. Die Stabilisierung des p53 erfolgt meist durch eine spezifische Phosphorylierung, die dieses Protein vor einer proteasomalen Degradation schützt (Ahn et al., 2004). Laut Literaturangaben können an der Phosphorylierung des p53-Proteins verschiedene Kinasen beteiligt sein. So sind die ATM und ATR-Kinasen in der Lage, die Zunahme des p53-Proteins durch die direkte Phosphorylierung oder über die Aktivierung der Chk-1- und Chk-2-Kinasen zu fördern (Banin et al., 1998; Canman et al., 1998; Khanna et al., 2000; Shieh et al., 2000; Tibbetts et al., 1999). Außerdem wird die Fähigkeit zur p53-Stabilisierung und zum dessen Schutz vor dem enzymatischen Abbau der c-Jun-NH<sub>2</sub>-terminale-Kinase-1 (JNK1) zugeschrieben (Shi et al., 2007), die durch genotoxischen Stress in den Zellen aktiviert werden kann (Dent et al., 2003; Karin et al., 1998). Einige Studien berichten, dass der JNK-p53-Signalweg vor allem bei der Initiierung der Apoptose in Folge der DNA-DSB-Bildung durch Hemmung der DNA-Topoisomerasen-Aktivität oder Bestrahlung mit  $\gamma$ -Strahlen eine wichtige Rolle spielt (Sordet et al., 2003; Verheij et al., 1998).

Die intrazelluläre Akkumulierung des p53 vermittelt in den geschädigten Zellen Transkription und Aktivierung von zahlreichen nachgeschalteten Effektorproteinen. So wird in diesen Zellen eine verstärkte Expression der p53-abhängigen Gene beobachtet, die unter anderem die pro-apoptotischen Bcl2-Familienmitglieder und den *Cyclin-Dependent-Kinase* (CDK)-Inhibitor p21/Cip1 umfassen (Harper et al., 1993; Xiong et al., 1993). Der CDK-Inhibitor p21/Cip1 gehört zusammen mit einem weiteren Inhibitorprotein p27/Kip1 zur Familie der Cip1/Kip1-Inhibitoren, die hauptsächlich in den G<sub>0</sub>-, G<sub>1</sub>- und S-Phasen des Zellzyklus exprimiert werden. Beide Proteine sind an der Regulation der Aktivität von Zellzyklus-regulierenden CyclinA/-, CyclinE/- und CyclinD/CDK-Komplexe beteiligt, wobei sie ihre inhibitorischen Effekte durch die direkte Bindung an die aktiven Cyclin/CDK-Komplexe ausüben (Hall et al., 1995). Im Vergleich zum p21/Cip1 wird die Expression und Aktivität des p27/Kip1-Proteins nicht durch p53 sondern durch verschiedene mitogene und antiproliferative Signale bestimmt (Slingerland & Pagano, 2000).

In verschiedenen Studien konnte demonstriert werden, dass die Induktion der p53-p21/Cip1-Signalkaskade in den meisten Fällen mit dem Zellzyklusarrest in den G<sub>1</sub>- und S-Phasen assoziiert ist. Als Ursache dafür wird die Hemmung der Cyclin E/CDK2- und Cyclin A/CDK2-Komplexe durch das p21/Cip1 angesehen, da diese den Übergang zwischen den G<sub>1</sub>- und S-Phasen sowie die Progression der S-Phase kontrollieren (Brown et al., 1997; Deng et al., 1995; Waldman et al., 1995; Steeg & Abrams, 1997). Darüber hinaus ist aus der Literatur bekannt, dass die Arretierung der Zellen in den

G1-S-Phasen in Folge einer DNA-Schädigung auch über einen alternativen p53-unabhängigen Weg erfolgen kann, wobei die Inhibierung der für beide Phasen wichtigen CDK2-Kinase initiiert wird. Die Phosphorylierung dieses Proteins wird über die Cdc25A-Phosphatase vermittelt, dessen Aktivität vor allem in den G1-S- und dem sogenannten Intra-S-Phase-Kontrollpunkten verstärkt wird. Wenn eine DNA-Schädigung in den Zellen während der S-Phase-Progression erfolgt, wird das Cdc25A über den ATM-Chk-2-Signalweg phosphoryliert. Dieser Vorgang führt zu der raschen Ubiquitinierung und anschließenden Degradierung der Phosphatase, wodurch die Aktivierung der CDK2-Kinase nicht mehr möglich ist. Dies hat einen über mehrere Stunden anhaltenden S-Phase-Arrest in den Zellen zur Folge. In der Literatur finden sich allerdings auch Hinweise in Bezug auf die Induktion der Cdc25A-Phosphatase durch die Chk-1-Kinase. Diese erfolgt allerdings unabhängig vom ATR-Protein und ist vermutlich auf die Interaktion dieser Kinase mit ATM zurückzuführen (Harper & Elledge, 2007).

Die Initiierung der Zellzyklusblockade in Folge einer DNA-Schädigung ermöglicht den betroffenen Zellen die Reparatur geschädigter DNA-Bereiche oder die Einleitung der Apoptose, wenn die entstandenen DNA-Schäden irreversibel sind (Bartek & Lukas, 2001; Falck et al., 2001).

### 1.5. Flavonoide

Flavonoide sind sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe, die eine weite Verbreitung im Pflanzenreich finden. Sie kommen in fast allen Obst- und Gemüsearten und in einigen Getreidearten und Tee vor. Die höchsten Anreicherungen dieser polyphenolischen Verbindungen finden sich in den photosyntheseaktiven Epidermiszellen verschiedener Pflanzenteilen (Manach et al., 1996), wo sie aus Phenylalanin über den Shikimat- und Phenylpropionid-Weg synthetisiert werden (Forkmann, 1993). Flavonoide werden anhand der strukturellen Unterschiede in sechs Gruppen unterteilt: Flavonole, Flavanole (oder Catechine), Flavanone, Flavone, Anthocyanine und Isoflavonoide (Watzl et al., 2001).

In höheren Pflanzen übernehmen Flavonoide durch ihre Beteiligung an Wachstums- und Differenzierungsvorgängen sowie Oxido-Reduktions-Prozessen der Photosynthese wichtige Stoffwechselfunktionen. Darüber hinaus sind sie aufgrund ihrer antioxidativen, fungiziden und bakteriziden Eigenschaften am pflanzlichen Abwehrsystem beteiligt und haben eine wichtige Funktion in den Schutzmechanismen der Pflanzen gegen die UV-Strahlung (Brouillard et al., 1988; Harborne et al., 2000).

Aufgrund ihrer weiten Verbreitung im Pflanzenreich werden Flavonoide dem menschlichen und tierischen Organismus kontinuierlich mit der Nahrung zugeführt. Da jedoch die meisten Polyphenole in der Natur nicht frei (Aglykon) sondern als Glykoside vorkommen (Aisling & O'Brien, 2002), sind in der Literatur zwei Aufnahmewege im Darm beschrieben. Die Aglykone werden im Dünndarm über die passive Diffusion aufgenommen und anschließend in der Leber über Konjugation mit



Glukuronsäure, Sulfat- oder Methylgruppe metabolisiert. Die entstandenen Metabolite werden dann mit dem Gallensaft ausgeschieden (Yang et al., 2001). Lange Zeit wurde angenommen, dass glykosylierte Flavonoide erst einen mikrobiellen Verdau im Dickdarm erfahren müssen, um in der Aglykon-Form absorbiert zu werden. Neuere Studien weisen jedoch darauf hin, dass bestimmte Glykoside auch über aktive Transportmechanismen in die Zellen des Dünndarms aufgenommen werden können (Yang et al., 2001).

Die Entdeckung von Flavonoiden ermöglichte den Forschern die Durchführung von epidemiologischen Studien, in denen eine Verbindung zwischen der Aufnahme dieser polyphenolischen Verbindungen mit wichtigen Nahrungsquellen wie Olivenöl, Wein, Tee und dem Auftreten verschiedener chronischer Erkrankungen untersucht werden konnte. Diese Studien weisen auf eine negative Korrelation zwischen der Flavonoidaufnahme und dem Risiko für Krankheiten wie kardiovaskulären Erkrankungen, Diabetes und Krebs hin (Boyer & Liu, 2004; Renoud & Lorgetil, 1992). Die Ergebnisse aktueller Forschung berichten, dass die beobachteten positiven Effekte von Flavonoiden auf ihrem hohen antioxidativen Potential und der Fähigkeit mit zahlreichen Enzymsystemen zu interagieren und zelluläre Signalwege (Apoptose, Zellproliferation und Zelldifferenzierung) zu modulieren beruhen (Croizier et al., 2009; Williams et al., 2004). So sind viele Vertreter der Flavonoidgruppe als agonistische oder antagonistische Liganden des Arylhydrokarbon Rezeptors (AHR) beschrieben (Abel & Haarmann-Stemann, 2010; Denison & Nagy, 2003; Moon et al., 2006). Da dieser Rezeptor eine zentrale Rolle im Fremdstoffmetabolismus spielt (Bock & Köhle 2006), kann die Beeinflussung der AHR-Aktivität durch Flavonoide auf das Gleichgewicht zwischen den Toxifizierungs- und Detoxifizierungsreaktionen toxischer Substanzen auswirken. So kann die Inhibierung des AHR-Signalweges durch pflanzliche Polyphenole protektiv gegen die chemikalien-induzierte DNA-Schädigung in den Zellen wirken (Ciolino et al., 1998; Takemura et al., 2010). Zahlreiche Untersuchungen weisen darauf hin, dass potente AHR-Inhibitoren, wie beispielsweise Resveratrol, Luteolin oder Grüntee-Catechin (-)-Epigallocatechin-3-gallat (EGCG), ihr chemopräventives Potential durch die hemmende Eigenschaft entfalten können (Bothe et al., 2010; Ciolino et al., 1998; Palermo et al., 2003). Viele dieser Naturstoffe sind außerdem in der Lage, auch mit anderen Transkriptionsfaktoren und Zelloberflächenrezeptoren zu interferieren und zeigen somit ein breites Wirkspektrum auf.

Viele Studien sprechen für die anti-kanzerogene Wirkung der Flavonoide in der Initiations- und der Promotionsphase der Krebsbildung. Hier beobachtet man eine besonders positive Wirkung bei Catechinen, Flavonolen und Isoflavonen (Kawamori et al., 1999; Mahmud et al., 2000 Messina et al., 1994; Thompson et al., 2000). Außer den vorgestellten pharmakologischen Eigenschaften der Flavonoide werden diese im Zusammenhang mit der Prävention bestimmter Krankheitsformen, den sogenannten 'free radical diseases', diskutiert. Zu diesen Krankheiten werden Arteriosklerose, Herz-

Kreislauf-Erkrankungen, bestimmte kanzerogene Tumorformen und chronische Entzündungen gerechnet (Middleton et al., 2000).

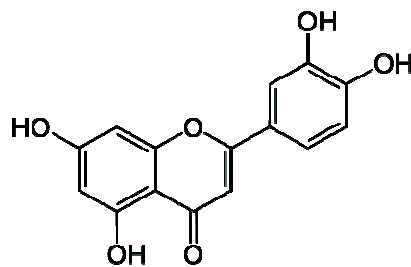
Aufgrund der vermeintlich nur positiven Effekte von Flavonoiden, die meist nur in *in-vitro* Studien nachgewiesen werden konnten, werden einige Verbindungen dieser Substanzklasse von der Lebensmittelindustrie als Nahrungsergänzungsmittel auf dem Markt angeboten. Bemerkenswert dabei ist, dass für präventive Zwecke laut Empfehlung der Hersteller mehrere Gramm pro Tag der Flavonoid-Präparate aufgenommen werden müssen, obwohl es zurzeit nur unzureichende Erkenntnisse bezüglich des toxischen Potentials dieser Naturstoffe vorliegen. Insbesondere in höheren Konzentrationen können Flavonoide auch toxische Eigenschaften entfalten. Sie können beispielsweise als Prooxidantien und Inhibitoren von Replikation- und Reparatursystemen agieren (Skibola und Smith 2000).

Wie schon vorher erwähnt, verfügen Flavonoide über anti-kanzerogene Eigenschaften. Epidemiologische Studien deuten darauf hin, dass eine erhöhte Aufnahme von pflanzlichen Polyphenolen mit einem verringerten Risiko mit Krebserkrankungen, beispielsweise Darmkrebs, zu erkranken einhergeht (Rossi et al., 2006; Theodoratou et al., 2007). Trotz der Erkenntnisse aus den epidemiologischen Studien, ist es wichtig anzumerken, dass die Konzentrationen, die notwendig sind, um im Zell- und Tiermodell protektive Effekte auszulösen, oft über denen liegen, die durch die tägliche Aufnahme der Flavonoide mit der Nahrung und eine moderate Einnahme von Nahrungsergänzungsmitteln erreicht werden können (Nagle et al., 2006). Aus diesem Grund ist die Identifizierung neuer Pflanzeninhaltsstoffe, die geringe Toxizität aufweisen und ihre Wirkung bei chemikalieninduzierten Kanzerogenese in bereits niedrigen Konzentrationen entfalten, von großer Bedeutung. Solche Substanzen können die Entwicklung neuer chemopräventiven Strategien in Form von Supplementierungen, die zur Reduzierung der Krebsneuerkrankungen beitragen, erfolgreich vorantreiben.

## **1.6. Luteolin**

Der in dieser Arbeit untersuchte Flavonoid Luteolin oder 3,4,5,7-Tetrahydroxyflavon ist ein Vertreter der Flavon-Gruppe und kommt in Gemüse und Obstsorten wie Sellerie, Zwiebeln, Broccoli, Karotten und Äpfel in glykosylierter Form vor. Nach der Aufnahme wird Luteolin-Aglykon durch eine Hydrolyseungsreaktion freigesetzt (Hempel et al., 1999) und kann in der Darm-Mukosa durch Konjugation mit der Glycuronsäure metabolisiert werden (Shimoi et al., 1998). Aufgrund seiner hohen Thermostabilität finden sich auch im gekochten Gemüse noch hohe Konzentrationen an Luteolin (Le Marchand, 2002).

Die in der Abbildung 4 dargestellte chemische Struktur dieses Naturstoffes verleiht ihm eine Fähigkeit, an zahlreichen biochemischen und biologischen Prozessen zu beteiligen. Durch seine antioxidativen Eigenschaften ist Luteolin in der Lage, die zellulären Makromoleküle vor Schädigung durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) zu schützen (Robak et al., 1988; Brown & Rice-Evans, 1998). In einigen *in vitro* Experimenten konnten außerdem die anti-inflammatorischen Fähigkeiten dieses Flavonoids gezeigt werden. So führte die Präinkubation muriner Makrophagen (RAW264.7) mit Luteolin zur Hemmung der mit bakteriellem Lipopolysaccharid induzierten TNF $\alpha$  und IL-6-Freisetzung.



**Abbildung 4:** Chemische Struktur des Flavonoids Luteolin

Diese Zytokine spielen eine bedeutende Rolle in den Entzündungsantworten im Organismus, indem sie Aktivierung weiterer Transkriptionfaktoren wie *Nuclear Factor kappa B* (NF $\kappa$ B), der Mitglieder der mitogenaktivierten Proteinkinase (MAPK) sowie der Stresskinase p38 und c-Jun NH2-terminale Kinase (JNK) auslösen (Chen et al., 2004; Chen et al., 2007; Xagorari et al., 2001; Xagorari et al., 2002). Die gezeigte Inhibierung dieses Signalweges durch Luteolin deutet darauf hin, dass dieser Flavonoid in der Lage ist, die akuten und chronischen Entzündungsprozesse stark zu beeinflussen.

Die anti-inflammatorische Aktivität von Luteolin kann zudem auf seine anti-karzinogene Fähigkeiten hindeuten, da die Krebsentstehung in vielen Organen oft durch entzündliche Reaktionen begünstigt wird. Es gibt in der Tat zahlreiche Studien, in denen gezeigt werden konnte, dass dieser Naturstoff die Induktion der Apoptose in den Krebszellen sowie Inhibierung der Zellproliferation, Metastasierung und Angiogenese fördert. Die Luteolin-induzierte Apoptose kann sowohl über extrinsische als auch über intrinsische Signalwege erfolgen. Die Studien von Horinaka et al. (2005) und Selvendiran et al. (2007) berichten, dass die Transkription der Todesrezeptoren DR5 (*Death Receptor 5*) und Fas, die unentbehrlich in der extrinsischen Apoptose sind, durch Luteolin erhöht wird. Zusätzlich ist dieser Flavonoid in der Lage, die intrinsische Apoptose durch Inhibierung der DNA-Topoisomerasen (Chowdhury et al., 2002; Yamashita et al., 2000) und damit verbundenen DNA-Schädigung sowie Aktivierung des Tumorsuppressorproteins p53 einzuleiten. Andererseits kann Luteolin die Apoptose in den Krebszellen durch Hemmung der Überlebenssignalwege wie PI3K/AKT, NF $\kappa$ B und MAPK

---

begünstigen. Eine weitere Eigenschaft dieses Polyphenols ist die Fähigkeit, in den Zellzyklus der Krebszellen einzugreifen. In einigen Arbeiten wurde demonstriert, dass die Behandlung der murinen und humanen Tumorzelllinien, beispielsweise aus Magen, Prostata, Haut und Darm, zum Arrest in den G1- oder G2/M-Phasen des Zellzyklus führt (Casagrande & Darbon, 2001; Kobayashi et al., 2002; Li et al., 2005; Matsukawa et al., 1993). Dieser Effekt kann eine anschließende Einleitung des programmierten Zelltodes zur Folge haben und zeigt somit eine weitere Möglichkeit der anti-karzinogenen Aktivität von Luteolin. Darüber hinaus kann Luteolin auch weitere maligne Prozesse der Angiogenese und Metastasierung beeinflussen, indem es Transkription und Sekretion wichtiger Proteine wie *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) und Matrixmetalloproteasen (MMP) hemmt (Ende & Gebhardt, 2004; Hasebe et al., 2003).

Luteolin wird die Fähigkeit, in verschiedene zelluläre Prozesse durch Wechselwirkungen mit wichtigen Effektorproteinen einzugreifen, zugeschrieben. Bei den Untersuchungen zur Interaktion zwischen dem AHR-Signalweg und verschiedenen Flavonoiden in den Krebszelllinien MCF7 und HepG2 erwies sich Luteolin als einer der potentesten AHR-Antagonisten (Zhang et al., 2003). Diese Ergebnisse unterstützen die Befunde einer älteren Studie, in der gezeigt werden konnte, dass Luteolin zu den Naturstoffen gehört, die die zytosolische Transformation des AHR nach der Belastung mit TCDD blockieren (Ashida et al., 2000). Aufgrund der zentralen Rolle des AHR im Fremdstoffmetabolismus und in der Aktivierung von PAK zu mutagenen bzw. kanzerogenen Metaboliten kann die antagonisierende Wirkung von Luteolin für die Prävention der PAK-induzierter Krebserkrankungen interessant sein.

### 1.7. Zielsetzung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Untersuchung des chemopräventiven Potentials des Flavonoids Luteolin gegenüber der B(a)P-induzierten DNA-Schädigung in humanen Kolonkarzinomzellen mit dem funktionellen AHR. Aufgrund der zahlreichen Hinweise auf die genotoxischen Eigenschaften dieses Naturstoffes sollen zudem neue Erkenntnisse über die DNA-schädigende Effekte von Luteolin in Abhängigkeit vom aktiven AHR-Signalweg gewonnen werden.

Folgende Fragestellungen sollen untersucht werden:

1. Ist Luteolin in der Lage den AHR-Signalweg zu modulieren und den B(a)P-Metabolismus zu beeinflussen? Welche Art der Interaktion besteht zwischen dem Flavonoid und AHR?
2. Welchen Einfluss hat Luteolin auf die Proliferation der AHR-profizienten und AHR-defizienten HCT116 Zellen? Über welchen Prozess wird die Luteolin-induzierte Zellzyklusblockade initiiert?
3. Welche intrazellulären Signalwege werden bei dem Luteolin-vermittelten Zellzyklusarrest AHR-abhängig aktiviert?

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sollen einen Aufschluss über die chemopräventive Wirkung des Luteolins gegenüber der B(a)P-induzierten Mutagenese liefern. Ein besonderes Augenmerk wird dabei auf die Fähigkeit dieses Flavonoids in expositionsrelevanten Konzentrationen die Aktivität des AHR-Systems zu modulieren und somit vor metabolischer Aktivierung des pro-kanzerogenen B(a)P im Darm zu schützen gelegt. Darüber hinaus soll die experimentelle Arbeit mit humanen Kolonkarzinomzellen zur Aufklärung der bereits beschriebenen genotoxischen Eigenschaften von Luteolin beitragen, wobei die Untersuchungen des molekularen Wirkmechanismus in Abhängigkeit vom AHR-Aktivitätsstatus von besonderem Interesse sind.

## 2. Material & Methoden

### 2.1. Allgemeines

Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien entsprachen der p.a. Qualität und wurden, soweit nicht anders vermerkt, von den Firmen Sigma-Aldrich (München), Roth (Karlsruhe), Invitrogen (Karlsruhe), Merck (Darmstadt) bezogen. Die verwendeten Puffer und Lösungen wurden mit Reinstwasser hergestellt. Bei der RNA-analytischen Methode wurde mit Diethylcarbonat versetztes Wasser (DEPC-Wasser) verwendet.

### 2.2. Zellkultur

#### 2.2.1 Kultivierung humaner Zellen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene adhärent wachsende HCT116-Zellpopulationen und Caco-2 Zelllinie verwendet. Die Zelllinie HCT116 stammt ursprünglich aus dem kolorektalen Tumorgewebe eines männlichen Patienten und ist durch eine Mutation im *ras*-Onkogen ausgezeichnet. Die Caco-2 Zellen sind heterogenen humanen Zellen aus dem epithelialen kolorektalen Adenokarzinom eines 72-jährigen männlichen Patienten. Die Besonderheit dieser Zelllinie ist, dass sie durch ihre enzymatische Ausstattung und der Fähigkeit, ein geschlossenes Monolayer mit differenzierten Zellen zu bilden, der humanen Dünndarmmukosa sehr ähnlich ist (Chantret et al., 1988). Aus diesem Grund sind Caco-2 Zellen als ein geeignetes *in vitro*-Modell für die Untersuchungen zur Interaktion von Metabolismus und Transport im menschlichen Dünndarm etabliert.

#### Verwendete Zelllinien:

wt HCT116	epitheliale Kolonkarzinomzellen, Medium: MEM + 10% (v/v) FCS + 50.000 U A/A
HCT-EV (Empty Vector)	stabile Transfektion mit pCL1P.THCP, geneticinresistent Medium: MEM + 10% (v/v) FCS + 50.000 U A/A + 150mg/l G418 (Geneticin, Biochrom, Berlin)
HCT-shAHR	stabile Transfektion mit pCL1P.THCP mit AHR-gerichteter shRNA Sequenz, geneticinresistent Medium: MEM + 10% (v/v) FCS + 50.000 U A/A + 150mg/l G418 (Geneticin, Biochrom, Berlin)

Caco-2                      epitheliale kolorektale Adenokarzinomzellen,  
Medium: RPMI 1640 + 20% (v/v)FCS + 50.000 U A/A

Alle Zelllinien wurden in oben aufgeführten Nährmedien unter Standardbedingungen (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>) kultiviert. MEM und RPMI Medien, fötales Kälberserum (FCS), Penicillin / Streptomycin (A/A, 10.000 U / 10 mg/ml), PBS (*Phosphate-buffered Saline*), Trypsin-EDTA-Lösung (0,5 mg/ml / 0,22 mg/ml) wurden von Firma PAA Laboratories GmbH bezogen.

Die Zellen wurden alle 3-4 Tage nach Erreichen der 80-90%-gen Konfluenz passagiert oder für die Experimente ausgesät. Dafür wurde das Nährmedium abgenommen, die Zellen mit PBS gewaschen und mit Trypsin-EDTA-Lösung versetzt. Nach etwa 3-5 Minuten Inkubation bei 37 °C konnten die abgelösten Zellen in frisches Medium aufgenommen werden und auf neue Zellkulturflaschen oder Multi-Well-Platten verteilt werden.

### **2.2.2. Kryokonservierung und Revitalisierung der Zellen**

Für die Langzeitlagerung wurden die Zellen im flüssigen Stickstoff aufbewahrt. Dafür wurden sie in den 175 cm<sup>2</sup> Kulturflaschen bis zur Konfluenz kultiviert, mit Trypsin-EDTA abgelöst und im Vollmedium aufgenommen. Nach dem Pelletiervorgang (5 Minuten bei 560 rpm) wurden Zellen einer Kulturflasche in FCS resuspendiert und auf sterile Kryoröhrchen verteilt. Anschließend wurden die Zellen nach der Zugabe von 10 % DMSO bei -80°C langsam eingefroren. Nach 24 Stunden konnten die Kryoröhrchen in den flüssigen Stickstoff überführt werden.

Zur Revitalisierung der Zellen wurde die Zellsuspension im Wasserbad bei 37°C schnell aufgetaut und aus dem Kryoröhrchen in das vorgewärmte Medium überführt. Nach 24h Regenerationszeit wurde ein Mediumwechsel vorgenommen.

### **2.2.3. Belastung der Zellen**

Die HCT116 und Caco-2 Zellpopulationen wurden für verschiedene Experimente auf die 6-Well-, 48-Well- oder 96-Well-Platten ausplattiert, wobei die Zellzahl vom Plattenformat und der nachfolgenden Methode abhängig war. In der folgenden Tabelle 2 sind die für die verschiedenen Experimente eingesetzten Zellzahlen und Plattenformate aufgelistet.

Experiment	Plattenformat	Zellzahl/Well
DCF-Assay	96-Well	$1 \times 10^4$
BrdU-Assay	96-Well	$5 \times 10^3$
EROD-Assay	48-Well	$1 \times 10^5$
LDH-Assay	12-Well	$3 \times 10^5$
qRT-PCR	6-Well	$2 \times 10^5$
Western Blot	6-Well	$3 \times 10^5$
FACS-Analyse	6-Well	$2 \times 10^5$
Comet-Assay	6-Well	$3 \times 10^5$
Immunzytochemische Färbung	4-Kammer-Objektträger	$6 \times 10^4$

**Tabelle 2 :** Übersicht zum Ausplattieren der Zellen für verschiedene Experimente

Nach einer 24-stündigen Regenerationszeit folgte eine Behandlung mit verschiedenen Noxen für 6 oder 24 Stunden. Alle verwendeten Substanzen sind in der Tabelle 3 aufgelistet. Die Einstellung der Noxenkonzentration erfolgte sowohl im frischen als auch im alten Medium. Da alle verwendeten Substanzen in DMSO gelöst sind, wurde bei jedem Versuchsansatz eine Lösungsmittelkontrolle mitgeführt. Die Konzentration des DMSO im Medium betrug maximal 0,1 % des Gesamtvolumens. Am Ende der Inkubationszeit wurden die Zellen für weitere Experimente verwendet.

Substanz	Firma
Benzo(a)pyren	Sigma-Aldrich
3-Methylcholanthren	Sigma-Aldrich
Luteolin	Sigma-Aldrich
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Sigma-Aldrich
Cisplatin	Absource Diagnostics

**Tabelle 3 :** Liste der verwendeten Substanzen

### 2.3. Zytotoxizitätsassay

Die Zellviabilität wurde nach der Behandlung mit verschiedenen Noxen wie Flavonoiden oder Benzo(a)pyren mit Hilfe des „Cytotox-ONE Homogeneous Membrane Integrity Assays“ von Promega bestimmt. In diesem Assay wird die Freisetzung des zytoplasmatischen Enzyms Laktat-Dehydrogenase (LDH) aus den membrangeschädigten Zellen fluorimetrisch bestimmt. Das freigesetzte Enzym ist dann in der Lage, das zugesetzte künstliche Substrat Resazurin zum fluoreszenten Resorufin umzuwandeln. Die Menge an LDH im Medium korreliert somit mit dem Grad der zellulären Schädigung.



Der Assay wurde nach dem Protokoll vom Hersteller durchgeführt. Die Fluoreszenzmessung erfolgte am Plattenlesegerät Fluoroscan Ascent, LabSystems.

## **2.4. Proliferationsassay**

Die zelluläre Proliferation kann mit Hilfe des BrdU (5-Brom-2'-desoxyuridin) *Labeling and Detection* Kit III (Roche, Mannheim) bestimmt werden, welcher auf dem Einsatz eines Thymidinanalogon BrdU basiert. Während der Inkubation der Zellen mit BrdU wird dieses anstelle von Thymidin in die frisch synthetisierte DNA eingebaut. Die behandelten Zellen werden mit der kalten Ethanol / HCl-Lösung fixiert und die zelluläre DNA durch Zusatz der Nuklease partiell degradiert. Die somit zugänglich gewordenen BrdU-Nukleoside können von einem an Peroxidase gekoppelten Antikörper erkannt und gebunden werden. Durch Zugabe des spezifischen Peroxidase-Substrats, 2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazolin)-6-sulfonsäure (ABTS), wird dessen katalytische Spaltung in Gang gesetzt. Das entstandene Radikalkation kann bei einer Wellenlänge von 405 nm detektiert werden. Die gemessene Absorption des Endprodukts korreliert direkt mit der Menge des in die DNA eingebauten BrdU und somit mit der Stärke der Zellproliferation.

In der vorliegenden Arbeit wurden Zellen mit BrdU und dem Flavonoid Luteolin für 16 Stunden inkubiert. Anschließend wurde der Assay nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Fluoreszenzmessung erfolgte am Plattenlesegerät Infinite M200 PRO Tecan.

## **2.5. Genexpressionsanalysen**

### **2.5.1. RNA-Analytik**

#### **2.5.1.1. Isolierung und Quantifizierung der Gesamt-RNA**

Die Isolierung der Gesamt-RNA aus den Zellen erfolgte mit Hilfe des peqGOLD Total RNA Kits (Peqlab, Erlangen). Die nach Angaben des Herstellers aufgereinigte Gesamt-RNA konnte mittels GeneQuant II Spektralphotometers (Pharmacia Biotech, Freiburg) quantifiziert werden. Um die Konzentration und Reinheit zu bestimmen, wurden die RNA Proben 1:14 mit DEPC-Wasser verdünnt und bei Absorption 260nm (Absorptionsmaximum der Basen) und 280nm (Absorptionsmaximum der Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin) gemessen. Der Quotient aus den beiden Absorptionen lag zwischen 1,6 und 2,0. Dabei wird es angenommen, dass Werte unter 1,8 auf eine Verunreinigung mit Protein zurückzuführen sind.

### 2.5.1.2. Reverse Transkription Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

Bei der RT-PCR dient die zelluläre mRNA als Matrize und wird zuerst mit Hilfe einer reversen Transkriptase, RNA-abhängigen DNA-Polymerase, in die einzelsträngige cDNA (*copy DNA*) umgeschrieben. Als Startpunkt für die cDNA-Synthese dient Bindung eines Oligo (dT)<sub>15</sub>-Primers an das polyadenylierte 3'-Ende der mRNA. Anschließend wird die entstandene cDNA durch Polymerase-Kettenreaktion amplifiziert (s. Kapitel 2.5.1.3.).

In dieser Arbeit wurde für die cDNA-Synthese 1 µg isolierten RNA in 15,5 µl DEPC-Wasser verdünnt. Nach Zugabe von 2,5 µl Oligo (dT)<sub>15</sub>-Primern (Roche) und 2 µl dNTP-Mixes (Peqlab) wurde ein fünfminütiger *Annealing*-Schritt bei 65°C durchgeführt. Nach dem anschließenden Abkühlen der Reaktionsansätze wurden 400 Units der *Moloney-Murine-Leukemia-Virus* (MMLV) reversen Transkriptase und der 5xRT-Puffer (Promega) zugefügt. Die cDNA-Synthese erfolgte 52 Minuten bei 37°C. Abschließend wurde die reverse Transkriptase durch ein zehnminütiges Erhitzen bei 70 °C inaktiviert.

### 2.5.1.3. Polymerase-Kettenreaktion (PCR) / Quantitative *Real-time* PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion wird mit spezifischen Primern nach der cDNA-Synthese angeschlossen (Mullis, 1986). Es ist eine zyklische Reaktion, bei deren Ablauf, ausgehend von einer denaturierten DNA-Matrize (*Template*), spezifische DNA-Bereiche amplifiziert werden. Dabei wird der zu amplifizierende Bereich von zwei komplementären Oligonukleotiden (*Primern*) mit freien 3'-OH-Enden eingegrenzt.

Eine PCR setzt sich aus drei Schritten zusammen. Im ersten Denaturierungsschritt wird die Matrize bei 95°C denaturiert, so dass beide komplementären Stränge als Einzelstränge vorliegen. Im zweiten *Annealing*-Schritt lagern sich die beiden Primer an die *Template*-DNA. Die *Annealing*-Temperatur ist abhängig von den Schmelztemperaturen (T<sub>m</sub>) der Primern. Diese sollten annähernd gleich sein, um eine optimale Bindung beider Primern an die *Template*-Stränge zu gewähren. Nach dem *Annealing* folgt der dritte Elongationsschritt. Bei diesem Schritt werden die Transkripte in 5' – 3' Richtung durch die thermostabile DNA-Polymerase verlängert. Häufig wird dafür die aus *Thermophilus aquaticus* gewonnene *Taq*-Polymerase verwendet. Die Elongation erfolgt meist bei 72°C, da die *Taq*-Polymerase bei dieser Temperatur ihre optimale Aktivität aufweist. Die in einem Zyklus entstandenen doppelsträngigen DNA-Moleküle dienen im nächsten Zyklus wiederum als Matrize für die DNA-Polymerase. Auf diese Weise wird eine exponentielle Zunahme der Konzentration des gewünschten DNA-Fragments ermöglicht. Abschließend erfolgt ein finaler Elongationsschritt, bei dem alle offenen Transkripte durch die DNA-Polymerase beendet werden können.

Verwendete Laufparameter für qRT-PCR mit FAST SYBR Green Kit III:

1. 7 Minuten, 95°C – Aktivierung der Taq-Polymerase
2. 10 Sekunden, 95°C – Denaturierung
3. 35 Sekunden, 60°C – Annealing
4. 35 Sekunden, 60°C – Elongation

Schmelzkurvenanalyse: 0,1°C / Sekunde zwischen 60-95°C

Ablauf der Amplifikation: 45-50 Zyklen

Die quantitative *Real-time* PCR (qRT-PCR) beruht auf dem Prinzip der herkömmlichen PCR-Technik und ermöglicht, die Expression eines Gens in „Echtzeit“ zu verfolgen. Im Vergleich zu einer normalen PCR werden bei der qRT-PCR entstandenen doppelsträngigen Amplifikate mit einem interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green angefärbt. Somit kann die zunehmende Fluoreszenz des eingebauten Farbstoffes nach jedem Zyklus durch das PCR-Gerät erfasst und quantifiziert werden.

Name	Fragmentlänge	Sequenz
<b>AHR</b>	132 bp	FW:5'-TGGTCTCCCCCAGACAGTAG-3' RP:5'-TTCATTGCCAGAAAACCAGA-3'
<b>b-Aktin</b>	263 bp	FP: 5'-CCC CAG GCA CCA GGG CGT GAT-3' RP: 5'-GGT CAT CTT CTC GCG GTT GGC CTT GGG GT-3'
<b>CYP1A1</b>	150 bp	FP: 5'-TAG ACA CTG ATC TGG CTG CAG-3' RP: 5'-GGG AAG GCT CCA TCA GCA TC-3'
<b>COX-2</b>	142bp	FW:5'-CCC TTG GGT GTC AAA GGT AA-3' RP:5'-AAC TGA TGC GTG AAG TGC TG-3'
<b>EPHX-1</b>	102bp	FP: 5'-TCG ATA AGT TCC GTT TCA CCC -3' RP: 5'-AAT TCA TTC CGC CAG TAG GAG A-3'
<b>ER-alpha</b>	152 bp	FW: 5'-GAA TCT GCC AAG GAG ACT CGC-3' RP: 5'-ACT GGT TGG TGG CTG GAC AC-3'
<b>ER-beta</b>	144 bp	FW: 5'-TGT CTG CAG CGA TTA CGC A-3' RP: 5'-GCG CCG GTT TTT ATC GAT T-3'
<b>GREB1</b>	172bp	FW: 5'-CAA AGA ATA ACC TGT TGG CCC TGC-3' RP: 5'-GAC ATG CCT GCG CTC TCA TAC TTA-3'
<b>GSTA-2</b>	170bp	FW:5'-CTC CAA TAT ACG GGG CAG AA-3' RP:5'-CCA GCT TCA TCC CAT CAA TC-3'
<b>p21/Cip1</b>	128 bp	FW:5'-CCATGTGGACCTGTCACTGT-3' RP:5'-TGGTAGAAATCTGTCATGCTGGTC-3'
<b>p27/Kip1</b>	171 bp	FW:5'-AGATGTCAAACGTGCGAGTG-3' RP:5'-TCTCTGCAGTGCTTCTCCAA-3'

**Tabelle 4:** Sequenzen der verwendeten Primer-Paare

Die Quantifizierung erfolgt anhand der Berechnung des Eintritts der Reaktion in die exponentielle Phase (*Crossing Point*). Als Messgröße wird der Ct-Wert festgelegt, der die Zahl des PCR-Zyklus, bei

dem ein Signal oberhalb eines Schwellenwertes sichtbar wird, angibt. Der sogenannte *threshold* wird durch Messung der Standardproben mit bekannter Anzahl der DNA-Amplifikate berechnet.

In der vorliegenden Arbeit wurde die qRT-PCR mit Hilfe des Rotor Gene-Gerätes von Qiagen und SYBR Green Kits III ebenfalls von Qiagen durchgeführt. PCR-Ansätze setzten sich aus 2,5 µl cDNA, 2,5 µl von den *forward* und *reverse* Primern sowie 7,5 µl FAST-SYBR Green Lösung zusammen. Dabei wurde die cDNA 1:2,5 mit DEPC-Wasser vorher verdünnt. Die verwendeten Primer wurden von Firma Eurofins MWG Operon bezogen und sind in der Tabelle 4 aufgelistet.

## **2.5.2. Western Blot Analysen**

### **2.5.2.1. Isolierung von Gesamtprotein**

Die Zellen wurden nach der Inkubation mit verschiedenen Noxen mit PBS gewaschen und anschließend in Lysepuffer aufgenommen. Nach der 15-minütigen Inkubation wurden die Zelllysate in Eppendorfer Gefäße überführt und 10 Minuten bei 14.000 rpm und 4°C abzentrifugiert. Die Proteinproben wurden bei -80°C gelagert.

### **2.5.2.2. Proteinbestimmung**

Die Proteinbestimmung erfolgte mit Hilfe des „BIO-RAD DC Protein Assay“ von BIO RAD Laboratories nach Angaben des Herstellers in 96-Well-Platten. Die Absorptionsmessung erfolgte am Plattenlesegerät Dynatech MR5000 bei 630 nm. Die enthaltene Proteinmenge wurde mit Hilfe einer BSA-Standardreihe berechnet.

### **2.5.2.3. Proteinauftrennung unter denaturierenden Bedingungen**

Proteine können auf Grund ihrer unterschiedlichen Ladung und Bildung von Sekundärstrukturen nur in denaturierter Form nach ihrer Größe in Gelen aufgetrennt werden. Die SDS-Gelelektrophorese erfolgt nach der Methode von Laemmli mit denaturierenden Polyacrylamidgelen und mit dem Tris-Glycin-Puffer-System (Laemmli, 1970). Für die Herstellung der Gele wird eine Lösung aus Acrylamid und Bisacrylamid durch Zugabe von APS und TEMED zur radikalischen Polymerisation angeregt. Dabei reagiert das Acrylamid zu langen Ketten, welche durch das bifunktionelle Bisacrylamid vernetzt werden. Über die Prozentigkeit des Gels kann die Porengröße und somit auch die Auftrennung unterschiedlicher Größenbereiche festgelegt werden.

In dieser Arbeit wurden selbsthergestellte Gele mit 10-12% Trenn- und 5% Sammelgelschichten oder fertige 12% Bis-Tris-Gele von NuPage Novex® (Invitrogen) verwendet. Für die anschließende SDS-Gelelektrophorese wurden Proteinproben mit definierter Proteinkonzentration in SDS-Probenpuffer

und 16% (v/v)  $\beta$ -Mercaptoethanol aufgenommen und 5 Minuten bei 95°C erhitzt. Das SDS verursacht zum einen eine Strukturauflösung, wodurch die Proteine die „*random coil*“-Form annehmen, zum anderen lagert es sich gleichmäßig an die Proteinoberfläche, so dass ihre Ladung proportional zur Laufstrecke wird. Das im Probenpuffer enthaltene  $\beta$ -Mercaptoethanol sorgt für eine Auflösung der Disulfidbrückenbindungen. Die nun denaturierten Proteine wurden anschließend auf Polyacrylamidgelen aufgetragen und nach ihrer Größe aufgetrennt. Die Auftrennung im Sammelgel erfolgte bei 80 V und im Trenngel bei 100-120 V. Als Größenstandard diente der peqGOLD Protein-Marker IV (Peqlab, Erlangen).

#### **2.5.2.4. Elektrotransfer von Proteinen auf PVDF-Membranen**

Nach der Gelelektrophorese werden Proteine mit Hilfe der Blotting-Apparatur von Roth aus den Polyacrylamidgelen auf eine Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membran (Hybond-P; Amersham Pharmacia Biotech, Pittsburgh) übertragen. In dieser Arbeit erfolgte der Transfer mit Hilfe der „*wet blotting*“ Methode. Dafür wurden zwei Lagen des auf die Größe des Gels zugeschnittenen Whatmanpapiers und zwei *Blotting Pads* im Transferpuffer getränkt und zusammen mit der in Methanol aktivierten PVDF-Membran und Gel laut Durchführungsanleitung zu einem Sandwich geschichtet. Der Transfer wurde 50 bis 60 Minuten bei 100 V durchgeführt. Anschließend wurde die Membran mit dem TBST-Waschpuffer gewaschen, um die SDS-Reste zu entfernen. Durch diesen Vorgang können die aufgetrennten und auf eine Membran übertragenen Proteine ihre ursprüngliche Sekundär- und Tertiärstrukturen teilweise wieder erlangen.

#### **2.5.2.5. Immunologischer Nachweis spezifischer Proteine**

Die PVDF-Membran mit transferierten Proteinen wurde vor der Immundetektion für mindestens 1 Stunde in einer 5% Magermilch-Blockierlösung bei 4°C blockiert, um die unspezifischen Antikörperbindungen zu vermeiden. Wenn für die Proteindetektion Primärantikörper verwendet wurden, die in einer 5% BSA / TBST – Lösung verdünnt werden mussten, erfolgte ein zweiter Blockierungsschritt mit der 5% BSA / TBST – Lösung für weitere 15 Minuten. Anschließend folgte die Zugabe des polyklonalen Primärantikörpers, welcher in 5% Magermilch-Blockierlösung oder 5% BSA / TBST – Lösung verdünnt wurde. Die Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte über Nacht bei 4°C. Alle verwendeten Antikörper sind in Tabelle 5 aufgeführt. Zur Entfernung ungebundener Antikörper wurde die Membran anschließend 2 mal 15 Minuten in TBST-Waschpuffer auf einem Schwenker gewaschen. Im nächsten Schritt wurde ein entsprechender sekundärer Antikörper in der Magermilchlösung verdünnt auf die Membran gegeben. Diese wurde nach der 1-stündigen Inkubationszeit bei RT weitere 2 mal 15 Minuten gewaschen. Anschließend konnte die

Antikörperbindung mittels einer Peroxidase-vermittelten Chemilumineszenz-Reaktion nachgewiesen werden.

	Antikörper	Hersteller	Verdünnung
<b>Primärantikörper</b>	Chk-1	Cell Signaling	1:1000 in BSA-Lsg.
	Chk-2	Cell Signaling	1:1000 in BSA-Lsg.
	Phospho-Chk-2	Cell Signaling	1:1000 in Magermilch-Lsg.
	GAPDH	Cell Signaling	1:1000 in BSA-Lsg.
	$\gamma$ H2AX	Cell Signaling	1:1000 in BSA-Lsg.
	Phospho-JNK1	Cell Signaling	1:1000 in BSA-Lsg.
	p53	Santa Cruz	1:3000 in Magermilch-Lsg.
<b>Sekundärantikörper</b>	anti-mouse-HRP	GE Healthcare	1:5000 in Magermilch-Lsg.
	anti-rabbit-HRP	Santa Cruz	1:5000 in Magermilch-Lsg.

**Tabelle 5:** Liste der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Antikörper

Um verschiedene Proteine mit ähnlicher Größe auf einer Membran nachweisen zu können, wurden die zuvor gebundene Antikörpern mit Hilfe des *Restore Western Blot Stripping-Buffer* (Thermo Scientific, Bremen) von der Membran entfernt. Nach dem Waschen mit TBST und dem erneuten Blockieren konnte die Membran wieder mit einem primären Antikörper inkubiert werden.

#### 2.5.2.6. Chemilumineszenz-Detektion

Die Chemilumineszenzdetektion erfolgte mittels eines Amersham ECL-Systems (GE-Healthcare, Freiburg). Dafür wurde die Membran mit der ECL-Lösung benetzt und 5 Minuten inkubiert. Durch die Verwendung der Horseradish Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper konnte das in der ECL-Lösung enthaltene Substrat Luminol in Anwesenheit von  $H_2O_2$  zu einem Licht emittierenden Intermediat oxidiert werden. Die Detektion der Lichtsignale erfolgte durch das Auflegen von Röntgenfilmen (Fuji Medical X-Ray Film, FUJIFILM) für unterschiedliche Zeiträume. Die Entwicklung der Röntgenfilme wurde durch den Einsatz der Entwicklungsmaschine (Optimax, Protec Medical Systems, Oberstenfeld) ermöglicht.

#### Verwendete Lösungen für die Western Blot Analyse:

Lysepuffer	RIPA-Puffer	
	5 $\mu$ l/ml	PMSF (Sigma)
	2 $\mu$ l/ml	Protein Inhibitor Cocktail III (Sigma)

RIPA-Puffer	50mM	Tris HCL pH 7,4
	300mM	NaCl
	0,2mM	EDTA pH 8,0
	2%	Nonidet P40 (= Igepal)
	2%	Desoxycholat
	0,2%	Sodium Dodecyl Sulfat (SDS)
5 % Sammelgel, pH = 6,8 (für 4 ml)	2,9 ml	H <sub>2</sub> O
	0,5 ml	40 % (v/v) AA
	0,5 ml	1 M Tris pH = 6,8
	20 µl	20 % (w/v) SDS
	20 µl	20 % (v/v) APS
	4 µl	TEMED
12 % Trenngel, pH = 8,8 (für 10 ml)	4,2 ml	H <sub>2</sub> O
	3,0 ml	40 % (v/v) AA,
	2,6 ml	1,5 M Tris pH = 8,8;
	50 µl	20 % (w/v) SDS,
	50 µl	20 % (v/v) APS
	4 µl	TEMED
10x SDS Elektrophorese-Puffer	250 mM	Tris
	190 mM	Glycin
	0,5 % (w/v)	SDS
Transferpuffer	50 mM Tris	
	40 mM	Glycin
	3,75 % (w/v)	SDS
	20 % (v/v)	Methanol
TBST-Waschpuffer	10 mM	Tris-HCl, pH = 8
	150 mM	NaCl
	0,1 % (v/v)	Tween 20

4x Laemmli-Probenpuffer	250 mM	Tris-HCl, pH=8,0
	20 % (v/v)	Glycerol
	5 % (w/v)	SDS
	0,001 % (v/v)	Bromphenolblau
	16 % (v/v)	β-Mercaptoethanol, frisch hinzufügen!
Blockierlösung	5 % (w/v)	Magermilchpulver oder BSA in TBST

### 2.5.2.7. Densitometrische Auswertung

Für die densitometrische Auswertung der detektierten Proteinbanden wurde das Programm FluorChem 8900 (Alpha Innotech Corporation) mit der Analyse-Funktion „Spot-Denso“ angewendet.

## 2.6. Nachweis der DNA-Schädigung

### 2.6.1. Immunzytochemische Färbung

Die immunzytochemische Färbung ist eine etablierte Technik, die zum Nachweis bestimmter zellulärer Strukturen mit Hilfe von markierten Antikörpern angewandt wird. Das Sichtbarmachen bestimmter zellulärer Epitope wird dabei durch den Einsatz spezifischer Antikörper, die mit einem chromogenen Komplex gekoppelt sind, ermöglicht.

In der vorliegenden Arbeit wurden Benzo(a)pyren-7, 8-diol-9, 10-epoxid-DNA-Addukte (BPDE-DNA-Addukte) mittels immunzytochemischer Färbung in den Zellen nachgewiesen. Die Zellen wurden nach der Behandlung mit B(a)P oder Flavonoiden mit 12% Paraformaldehyd (Endkonzentration 4%) bei 37°C fixiert. Nach dem zweimaligen fünfminütigen Waschen mit PBS erfolgte eine 30-minütige Blockierung unspezifischer Bindungsstellen mit der frisch zubereiteten Blockierlösung bei 4°C. Danach wurden die fixierten Zellen 30 Minuten mit dem gegen BPDE gerichteten Erstantikörper in einer Feuchtkammer bei 37°C inkubiert. Die Verdünnung des Erstantikörpers wurde in der Blockierlösung angesetzt. Nach dem nachfolgenden dreimaligen fünfminütigen Waschen mit PBS erfolgte eine weitere Inkubation mit dem Zweitantikörper, welcher mit einem grünfluoreszierenden Fluorochrom gekoppelt ist. Auch diese Behandlung wurde 30 Minuten bei 37°C in einer Feuchtkammer durchgeführt. Die Zweitantikörperverdünnung erfolgte in PBS. Zur Anfärbung der Zellkerne wurden außerdem noch 3% (v/v) des Hoechst-Farbstoffes zu der Zweitantikörperlösung hinzugefügt. Anschließend wurden die Zellen noch 3 mal 5 Minuten mit PBS gewaschen und mit dem Eindeckmedium (Vectashield, Vectorlaboratories Inc., Burlingame) und den Deckgläschen lagerfähig gemacht. Die Auswertung der Proben erfolgte am Fluoreszenzmikroskop von Zeiss. Die



Quantifizierung der Fluoreszenzintensität konnte mit Hilfe des Programms „Image J“ (MacBiophotonics ImageJ) ermittelt werden.

### **Verwendete Lösungen:**

Blockierlösung		PBS
	0,1%	Tween 20
	10%	Normal Goat Serum (Bethyl Laboratories, Montgomery)

	<b>Antikörper</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Verdünnung</b>
<b>Primärantikörper</b>	BPDE (8E11)	Santa Cruz	1:50 in PBST/NGS-Lsg.
<b>Sekundärantikörper</b>	anti-mouse-Alexa488	Invitrogen	1:250 in PBS

**Tabelle 6:** Verwendete Antikörper für die immunzytochemische Färbung der BPDE-DNA-Addukte

### **2.6.2. Comet-Assay**

Die Einzelzell-Gelelektrophorese, oder auch *Comet Assay* genannt, wird zur Bestimmung von DNA-Schäden und Reparatur in isolierten eukariotischen Zellen angewendet (Singh et al., 1988). Mit Hilfe dieses Assays wird die Wanderungstrecke der geschädigten DNA aus dem Zellkern im elektrischen Feld bestimmt. Das Bild der migrierten DNA ähnelt einem Kometen mit Kopf- und Schweifteil und ist für die Bezeichnung dieser Methode verantwortlich. Dabei sind die Schweiflänge und der Anteil der gewanderten DNA im Schweif vom Grad der DNA-Fragmentierung abhängig. Die Anwendung des Comet-Assays unter bestimmten Bedingungen ermöglicht die Detektion der Einzel- und Doppelstrangbrüchen der DNA sowie Bildung der Basenschäden und alkalilabilen Stellen. So bewirken die neutralen bis leicht alkalischen Bedingungen nur partielle DNA-Entwindungen und erlauben demzufolge nur den Nachweis von DNA-Doppelstrangbrüchen. Die stark alkalischen Bedingungen ( $\text{pH} \geq 13$ ) hingegen ermöglichen Untersuchung der Einzelstrangbrüche, da das alkalische Milieu eine optimale DNA-Denaturierung und Migration bewirkt. Im Vergleich zur neutralen Variante treten im alkalischen Comet-Assay mehr DNA-Fragmente auf, die keine Verbindung zum Zellkern aufweisen. Die Belastung der Zellen mit stark DNA schädigenden Substanzen kann zur Bildung der sogenannten '*ghost*'-Kometen führen, in denen die stark fragmentierte DNA vollständig im Schweif vorliegt. Außerdem spielen weitere Faktoren wie Zellzyklusphase (Olive & Banath, 1993), Alter oder Ursprungsgewebe der Zellen (Koppen et al., 1999; Singh et al., 1991) bei der Kometenbildung eine bedeutende Rolle.

Die Bestimmung der vorliegenden DNA-Schädigung erfolgt anhand verschiedener Parametern wie ‚*tail moment*‘ (Schweiflänge plus DNA-Gehalt im Schweif) oder ‚*tail intensity*‘ (DNA-Gehalt im Schweif), welche sich als sensible und verlässliche Indikatoren bewährt haben.

In der vorliegenden Arbeit wurden Zellen nach der Behandlung mit verschiedenen Noxen der Einzelzell-Gelelektrophorese unter alkalischen und neutralen Assay-Bedingungen unterzogen. Alle Schritte erfolgten im Dunkeln, um mögliche unspezifische DNA-Schäden durch Einwirkung der UV-Strahlen aus dem Tageslicht zu vermeiden. Die behandelten Zellen wurden durch Zugabe von 100 µl Trypsin pro Well abgelöst und in 400 µl Nährmedium aufgenommen. Um eine optimale Zellzahl zu erreichen wurden die Zellen aus drei Wells vereint. Die entstandene Zellsuspension wurde 1:10 mit der 1% Low Melting Point Agarose (LMP) gemischt und auf ein Objektträger aufgetragen. Wichtig ist, dass die verwendeten Objektträger zuvor mit 0,5 % Agarose vorbeschichtet und anschließend gekühlt wurden. Eine gleichmäßige Verteilung des Zellsuspension / LMP-Agarose-Gemisches konnte durch das Aufbringen eines Deckgläschens erreicht werden. Nach dem Gelieren wurden diese wieder entfernt und die Objektträger in den Lysepuffer gestellt, wobei dessen pH-Wert in Abhängigkeit von der Methode alkalisch oder neutral eingestellt war. Als Nächstes erfolgte eine 20-minütige Alkalidenaturierung der DNA im vorgekühlten Elektrophoresepuffer. Die anschließende Elektrophorese wurde 20 Minuten bei 25 V in einer speziellen Kammer (Electrophoresis Power Supply EPS 1000, Fa. Pharmacia Biotech) durchgeführt. Die nachfolgende 20-minütige Neutralisierung der Präparate diente der Entfernung der alkalischen Lösungsreste, um die spätere Kometenfärbung zu ermöglichen. Nach der abschließenden Fixierung im 80 % (v/v) Ethanol wurden die Präparate getrocknet und mit 35 µl Ethidiumbromidlösung (20 µg/ml) / Objektträger gefärbt. Die mikroskopische Auswertung erfolgte am Fluoreszenzmikroskop (Olympus BV60, Anregung – 515-560 nm, Barrierfilter – 590 nm). Es wurden 50 oder 100 Kerne pro Präparat mit Hilfe des computergestützten Programms „Comet Assay II“ ausgemessen und gemittelt. Als Parameter für die DNA-Schädigung wurde der ‚*tail intensity*‘ Wert festgelegt.

### **Verwendete Lösungen**

Lyse-Stammlösung	2,809 M	NaCl
	112,35 mM	Na <sub>2</sub> EDTA
	11,235 mM	Tris
	pH 10 bei alkalischen Bedingungen	
	pH 7,5 bei neutralen Bedingungen	

Lyse-Gebrauchslösung	Lyse-Stammlösung 10 % (v/v)     DMSO 1 % (v/v)     Triton X-100 Beides frisch hinzufügen! Lichtgeschützt bei 4°C lagern
Elektrophoresepuffer	300 mM     NaOH 1 mM     Na <sub>2</sub> EDTA pH ≥ 13, bei 4°C lagern
Neutralisierungspuffer	0,4 M     Tris pH = 7,5

### 2.6.3. Durchflusszytometrie mit der Nicoletti-Färbung

Die sogenannte Nicoletti-Färbung wurde von Riccardi und Nicoletti (2006) entwickelt. Diese Methode ermöglicht eine eingehende Analyse des zellulären Zellzyklus durch das Anfärben mit dem DNA interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff Propidiumiodid. Mit Hilfe des speziell entwickelten Nicoletti-Puffers wird die Membran der zu untersuchenden Zellen zunächst permeabilisiert, um dann ein Eindringen des Propidiumiodids in den Zellkern zu ermöglichen. Der DNA-Gehalt der Zellen kann somit anhand des fluoreszierenden Propidiumiodids mit Hilfe der Durchflusszytometrie analysiert werden. Der Zellzyklus wird in G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-, S- und G<sub>2</sub>/M-Phasen unterschieden, die in Form eines Histogramms dargestellt werden. Die Zellen der G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-Phase weisen im Vergleich zu den in der G<sub>2</sub>/M-Phase befindlichen Zellen viel geringere Fluoreszenz auf. Der Grund dafür ist der doppelte DNA-Gehalt und somit die doppelt so starke Fluoreszenz in den Zellen der G<sub>2</sub>/M-Phase, da dort die DNA-Synthese schon abgeschlossen wurde und Zellen kurz vor Teilung sind. Im Bereich zwischen diesen zwei Phasen befinden sich Zellen, die eine S-Phase durchlaufen, bei der neue DNA synthetisiert wird. Wenn die DNA durch die Behandlung mit genotoxischen Substanzen geschädigt wird, kommt es in den Zellen zur Initiierung der DNA-Reparatur. Da die geschädigten Zellen während des Reparaturprozesses in der S-Phase verharren, ist der sogenannte S-Phase-Arrest ein sensibler Endpunkt für die Untersuchung bestimmter DNA-Modifikationen wie Bildung von DNA-Addukten.

Die mit verschiedenen Noxen belasteten Zellen wurden nach Protokoll von Riccardi und Nicoletti gefärbt. Dafür wurden die Zellen abtrypsiniert und zusammen mit dem Belastungsmedium, in dem gegebenenfalls abgelösten Zellen sich befinden können, bei 1200 rpm und 4°C zentrifugiert. Nach der Abnahme des Überstandes erfolgte ein Waschschriff mit 1 ml PBS. Anschließend an eine weitere

Zentrifugation und Überstandabnahme wurden die Zellen in 100-200 µl Nicoletti-Puffer unter Vortexen resuspendiert. Die Messung erfolgte am BD FACS Calibur mit Hilfe der *Software CellQuest 3.3* (BD Bioscience, Heidelberg). Ausgewertet wurde mit der *Software FlowJo* (Treestar, San Carlos, USA), wobei der prozentuale Anteil an Zellen in der S-Phase bestimmt wurde.

<b><u>Nicoletti-Puffer:</u></b>	0,1 % (w/v)	Natriumcitrat,
	0,1 %	Triton X-100
	50 µg/ml	Propidiumiodid

### **2.7. Nachweis der ROS-Bildung mit Hilfe des DCF-Assays**

Der Dichlorofluorescein (DCF)-Assay wird zum Nachweis für die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) in den Zellen verwendet (LeBel et al., 1992). Bei dieser Methode wird die Fluoreszenz von DCF gemessen, das als unpolares 2',7'-Dichlorofluorescein-Diacetat (DCFH-DA) der Zellkultur zugegeben und von den Zellen aufgenommen wird. Im Zytoplasma werden die Acetatreste durch intrazelluläre Esterasen gespalten, wodurch das Austreten von DCF aus den Zellen verhindert wird. Die anschließende Oxidation durch intrazellulär vorhandene ROS modifiziert das Molekül so, dass es bei entsprechender Anregung fluoresziert. Die gemessene Fluoreszenz korreliert mit der Menge der interzellulären ROS. Dieser Assay eignet sich zur Bestimmung der oxidativen Eigenschaften als auch des antioxidativen Potentials von Substanzen.

In dieser Arbeit wurde Einfluss von Luteolin auf die intrazelluläre ROS-Bildung untersucht. Dafür wurden die Zellen 24 Stunden mit diesem Flavonoid behandelt. Nach der Behandlung wurde das Belastungsmedium durch 100 µL des farblosen mit 100 µM H<sub>2</sub>DCF-DA versetzten Mediums ersetzt. Nach einer 30-minütigen Inkubation bei 37°C wurde das Assay-Medium verworfen. Die Fluoreszenzmessung erfolgte nach der Zugabe des farblosen Mediums ohne Zusätze bei der Anregungswellenlänge 475 nm und der Emissionswellenlänge 525 nm im Plattenlesegerät Infinite M200 PRO Tecan.

### **2.8. EROD-Assay**

Der sogenannte 7-Ethoxyresorufin-O-Deethylase (EROD)-Assay ist eine sehr sensitive und isoenzymspezifische Methode zur Bestimmung der enzymatischen Aktivität des Cytochrom-P450-1A1, welcher zu Phase-I-Enzymen des Fremdstoffmetabolismus gehört. Der fluoreszenzphotometrische Nachweis der CYP1A1-Aktivität basiert auf der Umwandlung eines künstlichen Substrats Ethoxyresorufin zu einem fluoreszierenden Produkt Resorufin. Die Deethylierung von Ethoxyresorufin durch CYP1A1 erfolgt unter Verbrauch von NADPH und

Sauerstoff. Die Menge des gebildeten Resorufins wird mit Hilfe einer Fluoreszenzmessung bei der Anregungswellenlänge von 522 nm und der Emissionswellenlänge von 580 nm bestimmt.

Die Untersuchung der CYP1A1-Aktivität in den Zellen erfolgte nach der Belastung mit Flavonoiden und B(a)P. Nach der Abnahme des Belastungsmediums wurde lebenden Zellen das serumfreie Assay-Medium mit darin enthaltenen 2,5  $\mu\text{M}$  7-Ethoxyresorufin und 10  $\mu\text{M}$  Dicumarol hinzugefügt. Das Dicumarol ist wichtig für die Stabilisierung des entstandenen Resorufins im Medium. Es hemmt die Aktivität der Chinon-Oxidoreduktasen und verhindert somit die Reduktion von Resorufin zum nicht-fluoreszierenden Produkt. Die anschließende Messung des Substratumsatzes wurde in Form einer Kinetik über 30 Minuten aufgezeichnet. Die Fluoreszenzmessung erfolgte alle 3 Minuten bei 37°C im Plattenlesegerät Infinite M200 PRO Tecan. Um die gebildete Menge an Resorufin anhand der gemessenen Fluoreszenz zu bestimmen, wurde zuvor eine Resorufin-Standardreihe erstellt. Die spezifische Enzymaktivität konnte jedoch erst durch die Normierung auf die Gesamtproteinmenge ermittelt werden. Diese wurde mit Hilfe des CBQCA-Kits (Invitrogen, Karlsruhe) nach der abgeschlossenen Kinetikmessung bestimmt. Die Methode basiert auf der Fähigkeit des 3-(4-Carboxybenzoyl)-Quinoline-2-Carboxaldehydes (CBQCA), an die zellulären Proteine in Anwesenheit von Cyaniden oder Thiolen zu binden und die hoch fluoreszenten CBQCA-Protein-Addukte zu bilden. Die Fluoreszenz dieser Addukte kann bei der Anregungswellenlänge 430-490 nm und bei der Emissionswellenlänge 560 nm detektiert werden. Für die Bestimmung der Gesamtproteinmenge wurde das EROD-Assay-Medium von der Platte entfernt und die Zellen mit 500  $\mu\text{l}$  PBS gewaschen. Die Zellyse erfolgte durch eine Zugabe von 40  $\mu\text{l}$  20% SDS pro Well und dem anschließenden 5-minütigen Schütteln auf dem Plattenschüttler (IKA MTS4, Labexchange, Burladingen). Nach der Zellyse wurden 5  $\mu\text{l}$  KCN, 10  $\mu\text{l}$  2mM CBQCA und 100  $\mu\text{l}$  Boratpuffer nacheinander ins jede Well gegeben. Im Anschluss an die 1-stündige lichtgeschützte Inkubation auf dem Plattenschüttler wurde die Fluoreszenzmessung im Plattenlesegerät Infinite M200 PRO Tecan durchgeführt. Die enthaltene Proteinmenge konnte mit Hilfe einer BSA-Standardreihe berechnet werden.

### Verwendete Lösungen

Natriumborat-Puffer	0,1 M $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ , pH 9,3
2mM CBQCA-Lösung	40 mM Stammlösung 1:20 mit $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ -Puffer <u>frisch</u> verdünnen

## 2.9. Statistik

Jedes Experiment wurde, wenn nicht anders vermerkt, mindestens dreimal durchgeführt. Die Mittelwerte aus den einzelnen Experimenten wurden mit Standardabweichungen berechnet und in den Abbildungen dargestellt. Die Überprüfung der statistischen Signifikanz erfolgte mittels ungepaartem *Student's T-Test* (Excel, Microsoft). Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von unter 5% ( $p \leq 0,05$ ) wurde als signifikant gewertet.

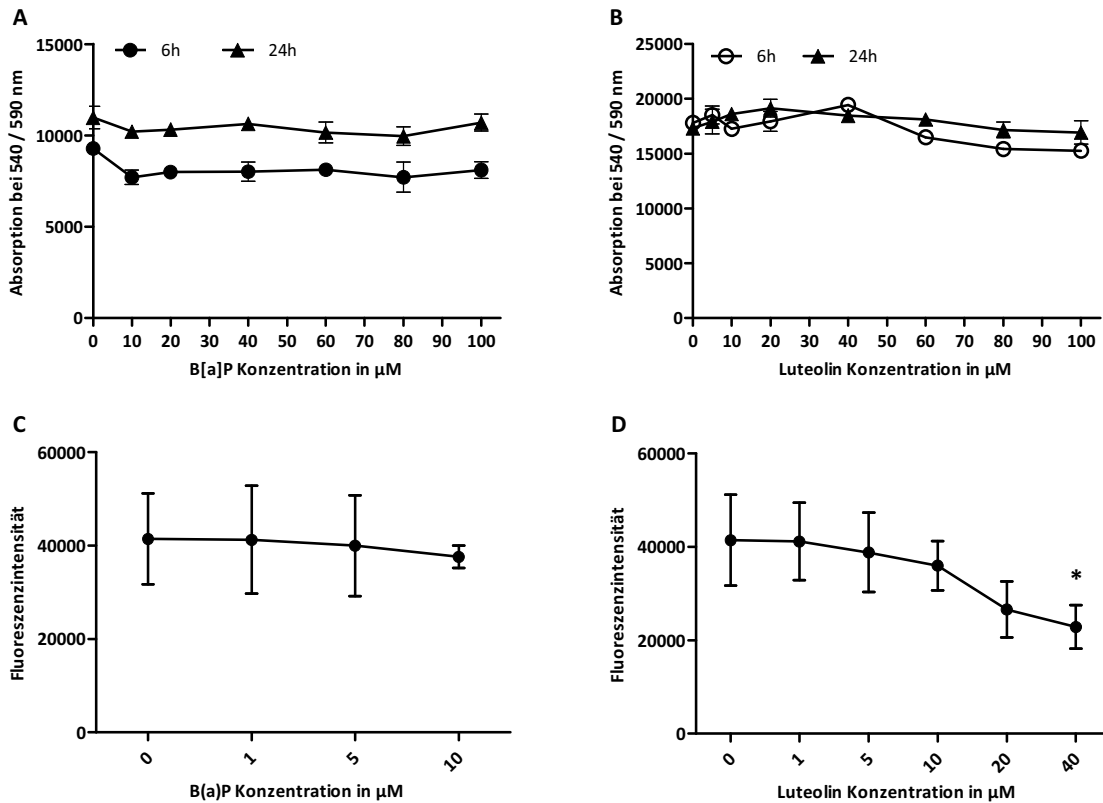
### 3. Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit soll der Einfluss des Flavonoids Luteolin auf die B(a)P-induzierte DNA-Schädigung und die damit verbundene Störung der DNA-Integrität in Darmzellen untersucht werden. Die Enzyme CYP1A1 und GSTA2 spielen eine wesentliche Rolle im B(a)P-Metabolismus und werden durch den AHR reguliert. Neben CYP1A1 kann ein weiteres AHR-abhängiges Enzym COX-2 die Umwandlung von BaP zu einem hochreaktiven Metaboliten begünstigen. Aus diesem Grund ist die Aufklärung der möglichen Interaktion des Luteolins mit dem AHR und damit verbundene Reduktion des genotoxischen Potentials von BaP in den Kolonkarzinomzelllinien Caco-2 und HCT116 von besonderem Interesse. Die Untersuchung der AHR-vermittelten Effekte des Flavonoids auf die zelluläre DNA wird durch den Einsatz von AHR-profizienten und AHR-defizienten HCT116-Zellen ermöglicht.

#### 3.1. Einfluss von Luteolin und Benzo(a)pyren auf die Viabilität der Kolonkarzinom-Zelllinien Caco-2 und HCT116

Die Überprüfung des zytotoxischen Potentials von B(a)P und Luteolin erfolgte mit Hilfe zweier gängigen Zelltoxizitätstests, des Laktat-Dehydrogenase-Assays (LDH) und des Cell Titer Blue-Assays (CTB). Für die Bestimmung der Toxizität beider Substanzen in Caco-2 Zellen wurde der LDH-Assay verwendet. Dafür wurden die Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen von Luteolin und B(a)P belastet. Nach 6- und 24-stündiger Inkubation wurde das Belastungsmedium für die Bestimmung der freigesetzten LDH-Menge entnommen. Die Viabilität der Caco-2-Zellen nach unterschiedlichen Behandlungen ist in der Abbildung 5A dargestellt und zeigt, dass B(a)P bis zu einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  keine toxischen Effekte in dieser Zelllinie auslöste. Auch die in der Abbildung 5B dargestellte Inkubation mit verschiedenen Luteolin-Konzentrationen (10-100  $\mu\text{M}$ ) führte zu keinen signifikanten Verringerungen der Zellviabilität.

Die Viabilität der HCT116 Zellen wurde nach der 24-stündigen Behandlung mit B(a)P und Luteolin mit Hilfe der CTB-Methode ermittelt. Die in der Abbildung 5C gezeigte Viabilitätskurve deutet darauf hin, dass die in den folgenden Experimenten eingesetzte B(a)P-Konzentrationen von 1-10  $\mu\text{M}$  in diesen Zellen keine toxischen Effekte auslösten. Dagegen führte die Behandlung mit verschiedenen Luteolin-Konzentrationen zu einer dosisabhängigen Abnahme der Zellzahl. Wie in der Abbildung 5D dargestellt, erfolgte bis 10  $\mu\text{M}$  des Flavonoids eine geringfügige Abnahme der Zellviabilität. Die Belastung der Zellen mit höheren Luteolin-Dosen (20  $\mu\text{M}$  und 40  $\mu\text{M}$ ) führte jedoch im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle eine Reduktion der lebenden Zellen herbei, die bei der höchsten Konzentration etwa 40 % betrug und statistisch signifikant war. Für die anschließenden Experimente mit HCT116 Zellen wurden die nichttoxischen Luteolin-Konzentrationen bis 20  $\mu\text{M}$  eingesetzt.



**Abbildung 5: Untersuchung der Zellviabilität nach der Belastung mit Luteolin und BaP**

Bestimmung der Toxizität der Substanzen B(a)P und Luteolin erfolgte in der Caco-2 Zelllinie (A und B) nach 6 und 24 Stunden mit Hilfe des LDH-Assays und in den HCT116 Zellen (C und D) nach 24 Stunden mittels CTB-Methode.

\* signifikant im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle.

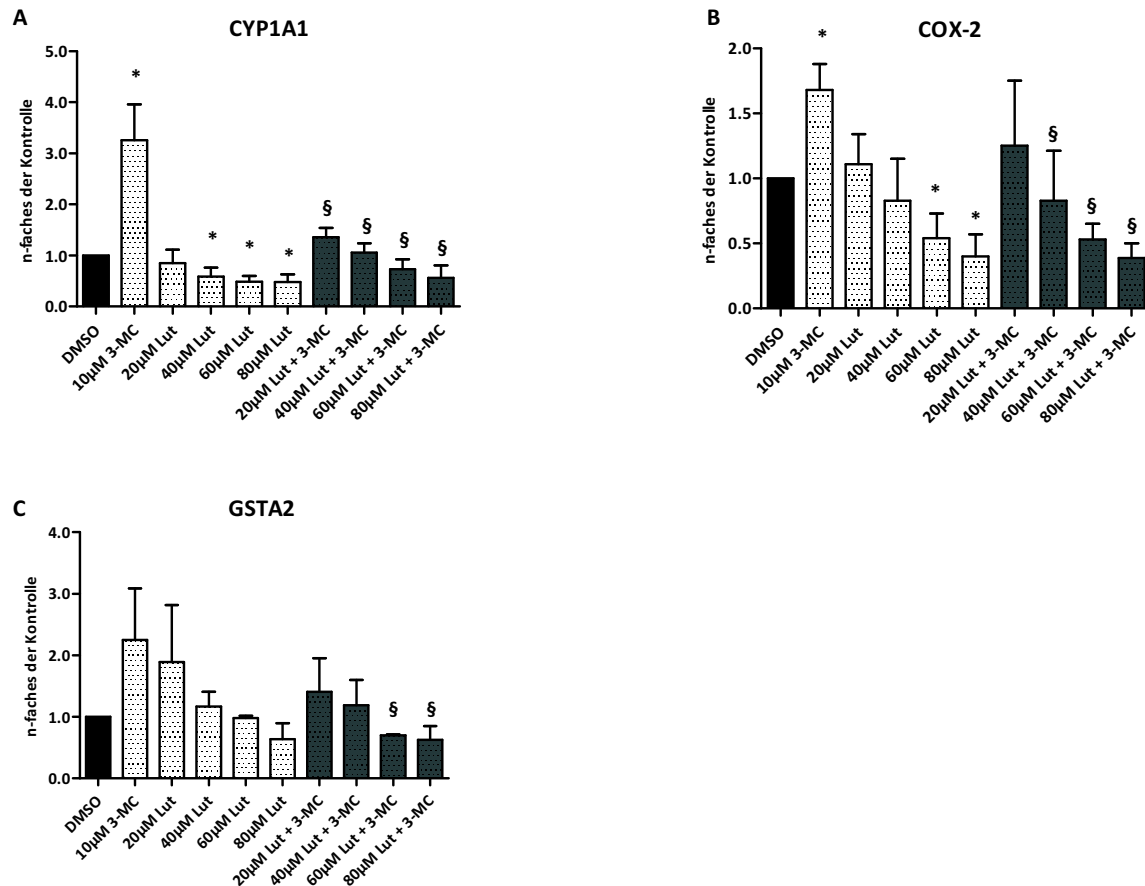
### 3.2. Einfluss von Luteolin auf die Expression der B(a)P-metabolisierenden Enzyme in Caco-2 Zellen

B(a)P ist eine karzinogene Substanz, die ihre Toxizität erst durch eine metabolische Aktivierung entwickelt. Eine zentrale Rolle spielt dabei das Enzym CYP1A1. Außerdem können noch weitere Enzyme in die Toxifizierung des B(a)P involviert sein. Aus der Literatur ist bekannt, dass das Enzym Cyclooxygenase-2 (COX-2) zur Entstehung des hochreaktiven BPDE-Metabolits beitragen kann (Zhang et al., 1998). Die entstandenen Metabolite können jedoch durch die Phase-II-Enzyme, wie Glutathion-S-Transferase 2 (GSTA2), wieder detoxifiziert und eliminiert werden (Marquardt & Schäfer, 2004). Die Expression der CYP1A1- und GSTA2-Enzyme unterliegt der Kontrolle des AHR (Nebert et al., 2000). Auch die Transkription des COX-2-Gens kann über den nicht-genomischen AHR-Signalweg beeinflusst werden (Fritsche et al., 2007; Vogel et al., 2000)

In der Literatur ist beschrieben, dass Flavonoide in der Lage sind, mit dem AHR auf agonistische und antagonistische Weise zu interagieren. Zhang et al. (2003) haben in einer Studie herausgefunden, dass auch Luteolin in HepG2-Zellen als ein AHR-Antagonist auftreten kann. Um diesen Befund zu überprüfen, wurde die Expression der AHR-abhängigen Enzyme, die in den B(a)P-Metabolismus



involviert sind, auf der mRNA-Ebene untersucht. Anstelle von B(a)P wurde in den folgenden Experimenten ein anderer Vertreter der PAK-Gruppe 3-Methylcholanthren (3-MC) eingesetzt, welcher ebenfalls einen potenten AHR-Agonist darstellt.



**Abbildung 6: Einfluss von Luteolin auf die Expression von CYP1A1, COX-2 und GSTA2 in Caco-2 Zellen**

Caco-2 Zellen wurden mit 10 µM 3-MC, 20, 40, 60, 80 µM Luteolin oder mit einer kombinierten Behandlung aus 3-MC und Luteolin für 6 Stunden inkubiert. Die CYP1A1 (A)-, COX-2 (B)- und GSTA2 (C)-Transkription wurde mittels qRT-PCR quantifiziert und auf 50.000 Molekülen  $\beta$ -Aktin normiert. \* signifikant höher oder niedriger im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle, § signifikant niedriger im Vergleich zur 10 µM 3-MC-Probe

Die Untersuchung der Genexpression der B(a)P-metabolisierenden Gene CYP1A1, COX-2 und GSTA2 erfolgte in der Caco-2 Zelllinie, die seit längerer Zeit als ein Modell für die humane Dünndarmzellen etabliert ist (Chantret et al., 1988). Dafür wurden diese Zellen 6 Stunden mit unterschiedlichen Luteolin-Konzentrationen inkubiert. Da die Affinität der PAK-Substanzen zum AHR im Vergleich zu natürlichen Liganden höher ist (Pohjanvirta, 2012), wurden die Zellen bei der Koinkubation mit 10 µM 3-MC und Luteolin zuerst 1 Stunde nur mit dem Flavonoid vorinkubiert. Nach der Inkubation erfolgte die Zellernte und die Bestimmung der Transkriptmenge mit Hilfe der qRT-PCR.

In der Abbildung 6 ist die Genexpression von CYP1A1 (A), COX-2 (B) und GSTA2 (C) dargestellt. Die Belastung der Zellen mit 3-MC führte erwartungsgemäß zu einer signifikanten Erhöhung der CYP1A1 Expression. Im Vergleich zur Kontrolle wurde dieses Gen etwa 3-fach höher exprimiert. Auch bei der Untersuchung der COX-2- und GSTA2-Expression konnte nach 6-stündiger Behandlung mit 3-MC ein 1,7- (COX-2) bis 2,3-facher (GSTA2) Anstieg der Transkriptmenge beobachtet werden. Wurden die Zellen mit Luteolin belastet, zeigte sich ein dosisabhängiger Rückgang der Expression aller drei Gene. Bei der Expression der GSTA2 fällt jedoch im Vergleich zu den beiden anderen Genen auf, dass Luteolin bei der niedrigsten Konzentration von 20  $\mu\text{M}$  eine etwa 1,9-fache Erhöhung der GSTA2-mRNA-Menge bewirkte.

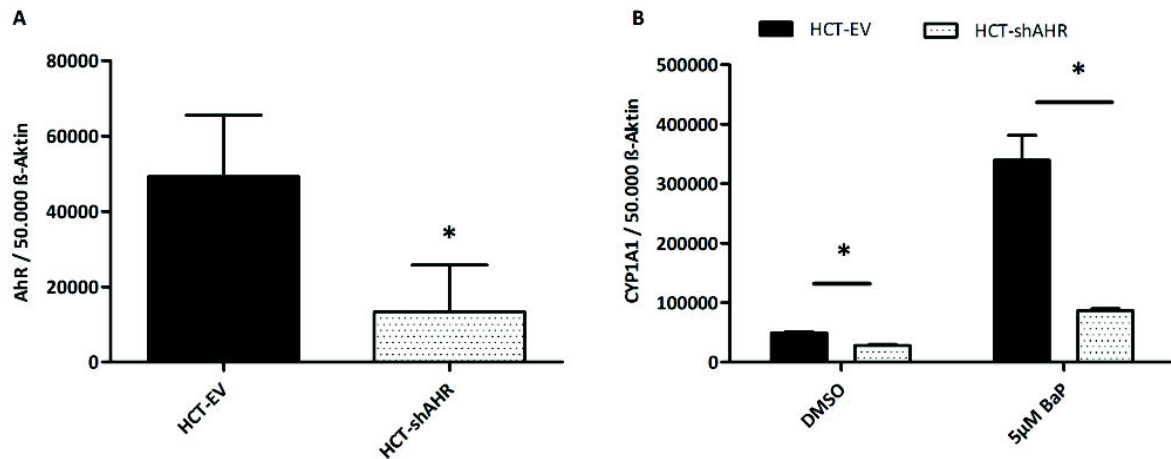
Zusammengefasst, führt eine 1-stündige Vorbehandlung der Zellen mit Luteolin und anschließende Koinkubation mit 10  $\mu\text{M}$  3-MC zu einer signifikanten konzentrationsabhängigen Abnahme der CYP1A1-, COX-2- und GSTA2-Transkription. Da das CYP1A1 als Markergen für die AHR-Aktivität angesehen wird, kann man anhand der vorliegenden qRT-PCR Ergebnisse eine antagonistische Wirkungsweise von Luteolin auf den AHR vermuten.

### 3.3. Etablierung der AHR-profizienten und AHR-defizienten HCT116 Zellen

Die Ergebnisse des vorherigen Kapitels haben gezeigt, dass Luteolin in der Lage ist, die 3-MC-induzierte Genexpression von CYP1A1 und GSTA2 zu inhibieren. Darüber hinaus konnte in den Experimenten mit Caco-2 Zellen eine Induktion der COX-2-Transkription nach der Behandlung mit 3-MC festgestellt werden. Die Studie von Zhang et al. (1998) berichtet, dass die Akkumulierung dieses Enzyms in den Zellen eine verstärkte B(a)P-Epoxidierung und somit erhöhte Bildung des mutagenen BPDE-Metaboliten begünstigen kann. Um den erheblichen Effekt des COX-2-Enzyms auf die metabolische Aktivierung von B(a)P auszuschließen, wurde in folgender experimentellen Arbeit die HCT116 Zelllinie verwendet, die laut Literatur keine funktionelle COX-2 exprimiert (s. nächstes Kapitel). Zusätzlich wurde in diesen Zellen die Aktivität des AHR unterdrückt, um weitere Untersuchungen der AHR-abhängigen Effekte von Luteolin zu ermöglichen.

Die Generierung der sogenannten HCT-AHR *knockdown* oder HCT-shAHR Zellen erfolgte mit Hilfe der stabilen Transfektion mit einem lentiviralen Vektor, der eine gegen AHR gerichtete shRNA kodiert. Die Kontrollzellen wurden mit einem Leervektor stabil transfiziert und werden in dieser Arbeit als HCT-EV Zellen bezeichnet. Diese Arbeiten der gentechnischen Sicherheitsstufe 2 wurden in den Laboratorien der Kinderklinik der Universitätsklinikums Düsseldorf unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Hanenberg durchgeführt.

Die Überprüfung des erfolgreichen *AHR-knockdown* konnte durch die basale Expression des AHR-Gens sowie die Induzierbarkeit des typischen AHR-Zielgens CYP1A1 mittels qRT-PCR-Analysen ermittelt werden. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in der Abbildung 7 zusammengefasst.



**Abbildung 7: Untersuchung der basalen AHR-mRNA-Expression und der induzierten CYP1A1-mRNA-Expression in HCT-EV und HCT-shAHR Zellen**

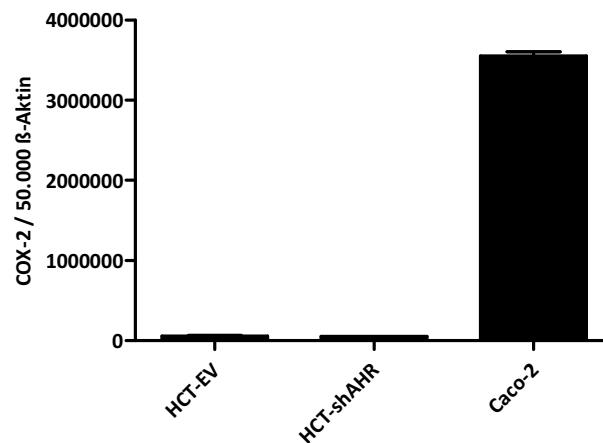
Die Transkriptmengen von AHR (A) und CYP1A1 (B) wurden mittels qRT-PCR bestimmt und auf 50.000 Moleküle  $\beta$ -Aktin normiert. Die Untersuchung der CYP1A1-Expression erfolgte nach einer 6-stündigen Belastung mit B(a)P. \* signifikant niedriger im Vergleich zu HCT-EV Kontrollzellen.

Die stabile Transfektion der Zellen mit der AHR-shRNA führte zu einer signifikanten Abnahme der basalen AHR-Transkriptmenge um circa 73% im Vergleich zu den HCT-EV-Kontrollzellen. Die Induzierbarkeit des AHR-abhängigen CYP1A1-Gens wurde nach der 6-stündigen Belastung beider HCT116-Zellpopulationen mit 5  $\mu$ M B(a)P ermittelt. Die Behandlung mit B(a)P führte zu einem 7-fachen Anstieg der CYP1A1-Transkriptmenge in den HCT-EV Zellen. In HCT-shAHR war die CYP1A1-Expression signifikant schwächer. Im Vergleich zu den Kontrollzellen konnte hier nur eine 2-fache Zunahme der mRNA-Menge gemessen werden. Somit bewirkte der *AHR-knockdown* einen Verlust von 74% der induzierten CYP1A1-Expression. Diese Unterschiede zwischen den beiden Zelllinien waren auch in den unbehandelten Kontrollzellen zu beobachten. Die HCT-shAHR Zellen wiesen eine signifikant schwächere basale CYP1A1-Expression auf. Im Vergleich zu den AHR-profizienten Zellen konnte hier eine 60%-ige Reduktion der basalen Transkriptmenge ermittelt werden.

Zusammenfassend konnte mit diesen Experimenten bestätigt werden, dass der *AHR-knockdown* in HCT116-Zellen eine starke Reduktion der konstitutiven AHR-Expression herbeiführte. Die Induzierbarkeit des AHR-Markergens CYP1A1 wurde ebenfalls durch den *knockdown*-Vorgang signifikant geschwächt und deutet auf die gewünschte Hemmung des AHR-Signalweges hin. Aus

diesem Grund konnten diese Zelllinien als Modell für die Untersuchung der AHR-abhängigen Effekte von Luteolin eingesetzt werden.

Die Zelllinie HCT116 exprimiert laut Angaben in der Literatur kein COX-2 (Liu et al., 2003; Sheng et al., 1996; Sheng et al., 1998). Zur Überprüfung dieser Angaben wurde in den Kolonkarzinomzelllinien HCT-EV, HCT-shAHR und Caco-2 die basale Expression des COX-2-Gens mit Hilfe der qRT-PCR bestimmt.



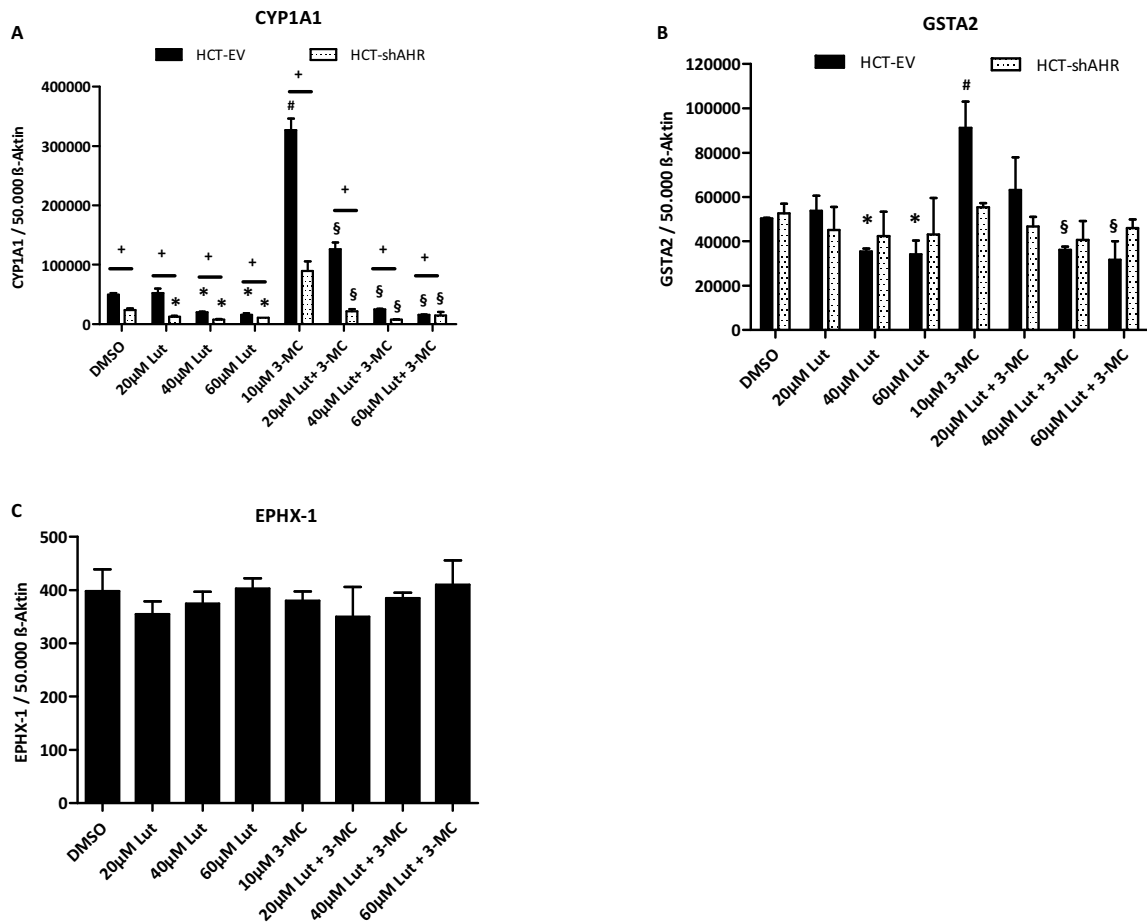
**Abbildung 8: Konstitutive mRNA-Expression der Cyclooxygenase-2 in HCT116- und Caco2-Zelllinien**

Die COX-2-Transkriptmengen wurden in den Zelllinien HCT-EV, HCT-shAHR und Caco-2 mittels qRT-PCR bestimmt und auf 50.000 Moleküle  $\beta$ -Aktin normiert (n=2, Min/Max).

Aus der Abbildung 8 ist ersichtlich, dass in Caco-2 Zellen dieses Enzym stark exprimiert wird. Im Vergleich dazu ist die COX-2-Transkriptmenge in beiden HCT116-Zellpopulationen sehr gering und liegt knapp an der Detektionsgrenze. In diesem Versuch konnte somit gezeigt werden, dass die in dieser Arbeit verwendeten HCT116-Zelllinien keine signifikanten Mengen der COX-2-mRNA exprimieren.

#### **3.4. Effekte von Luteolin auf die Expression der B(a)P-metabolisierenden Enzymen in AHR-profizienten und AHR-defizienten HCT-Zellen**

Nach der Generierung der HCT-EV und HCT-shAHR Zellen wurden diese nun für die Untersuchung der Expression der AHR-abhängigen Gene CYP1A1 und GSTA2 nach 6-stündiger Inkubation mit 10  $\mu$ M 3-MC und Luteolin eingesetzt. Außerdem wurde der Einfluss von Luteolin auf die Expression des Enzyms Epoxidhydrolase, welches eine Schlüsselrolle bei der Entstehung des toxischen BPDE-Metaboliten spielt, untersucht.



**Abbildung 9: CYP1A1-, GSTA2- und EPHX1-mRNA-Expression nach der Belastung mit Luteolin und 3-MC in HCT-EV und HCT-shAHR Zellen**

Die Transkriptmenge von CYP1A1 (A), GSTA2 (B) und EPHX1 (C) wurde nach 6 Stunden Inkubation mit Luteolin, 10  $\mu$ M 3-MC oder nach der Koinkubation mit beiden Substanzen mit Hilfe der qRT-PCR bestimmt und auf 50.000  $\beta$ -Aktin Moleküle normiert. C: Überprüfung der EPHX1-Expression in HCT-EV Zellen, \* signifikant geringer als in der Lösungsmittelkontrolle, # signifikant erhöht im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle, § signifikant niedriger im Vergleich zur 3-MC behandelten Probe, + signifikant höher verglichen mit HCT-shAHR.

Die Ergebnisse der Genexpressionsanalysen zeigten, dass die basale CYP1A1-Expression in den HCT-EV Zellen ähnlich, wie in den Vorversuchen (s. Abb. 7), um ca. 60% höher als in den Zellen mit gehemmten AHR war (vgl. Abbildung 9A). Die Inkubation der AHR-profizienten Zellen mit 10  $\mu$ M 3-MC führte, wie erwartet, zur einer signifikanten 6,5-fachen Induktion der CYP1A1-Transkription. Im Vergleich dazu war die CYP1A1-Transkriptmenge in den HCT-shAHR Zellen um etwa 72% reduziert. Die Behandlung beider HCT116-Zellpopulationen mit Luteolin alleine bewirkte eine statistisch signifikante dosisabhängige Abnahme der CYP1A1-Kopienzahl, wobei die AHR-profizienten Zellen, verglichen mit den AHR-defizienten Zellen, in allen Behandlungsproben eine signifikante um ca. 75% (20  $\mu$ M)-32% (60  $\mu$ M) höhere CYP1A1-mRNA-Menge aufwiesen. Wurden die HCT116-Zelllinien mit Luteolin und 10  $\mu$ M 3-MC kombiniert behandelt, zeichnete sich eine statistisch signifikante

konzentrationsabhängige Reduktion der Genexpression ab. In den HCT-EV Zellen löste die Gabe von 20  $\mu\text{M}$  Luteolin eine signifikante etwa 82%-Abnahme der 3-MC-induzierten CYP1A1-Expression, die sich mit Erhöhung der Luteolin-Konzentrationen statistisch signifikant auf 95% reduzierte. Im Vergleich zu den HCT-EV Zellen führte die gleichzeitige Inkubation der HCT-shAHR mit beiden Substanzen ebenfalls zu einer signifikanten Abnahme der 3-MC-induzierten CYP1A1-Transkription, wobei in den mit 20 und 40  $\mu\text{M}$  Luteolin behandelten Proben eine signifikant geringere mRNA-Menge (82% und 69%) beobachtet werden konnte. Die Belastung der HCT-shAHR Zellen mit 60  $\mu\text{M}$  des Flavonoids bewirkte eine ähnliche Reduktion der induzierten CYP1A1-Menge, wie in den HCT-EV Zellen.

Die Untersuchung der GSTA2-Expression zeigte ein ähnliches Expressionsmuster nach der Belastung mit beiden Substanzen. Aus der Abbildung 9B ist ersichtlich, dass im Vergleich zu der untersuchten CYP1A1-Expression die HCT-EV und HCT-shAHR Kontrollzellen keine Unterschiede in der basalen GSTA2-Transkription aufweisen. Die Inkubation der HCT-EV Zellen mit Luteolin bewirkte, ähnlich wie bei CYP1A1, eine signifikante dosisabhängige Abnahme der GSTA2-Transkriptmenge. Die Behandlung dieser Zellen mit 10  $\mu\text{M}$  3-MC hingegen führte zu einer signifikanten 1,8-fachen Induktion der GSTA2-Expression, die wiederum durch Zugabe von unterschiedlichen Konzentrationen Luteolin signifikant und dosisabhängig gehemmt wurde. Anders als bei der CYP1A1-Expressionsanalyse konnte in den AHR-defizienten HCT116 Zellen keine Effekte von 3-MC und Luteolin auf die GSTA2-Transkription beobachtet werden.

Die in der Abbildung 9C dargestellte Auswertung der Genexpression des EPHX1-Enzyms zeigte nach der Belastung der HCT-EV Zellen mit 3-MC und verschiedenen Konzentrationen Luteolin keine erheblichen Unterschiede in den mRNA-Mengen. Auffällig waren jedoch die geringen Mengen der EPHX1-Transkripte in allen Proben. Das führte zur Annahme, dass dieses Enzym in HCT116 Zellen schwach exprimiert wird.

Zusammenfassend zeigte die Expressionsanalyse der AHR-abhängigen Gene CYP1A1 und GSTA2 in AHR-profizienten HCT116 Zellen, dass Luteolin in der Lage ist, die durch 3-MC ausgelöste Induktion der Genexpression beider Enzyme dosisabhängig zu inhibieren. Diese Beobachtung stimmte mit den Ergebnissen der Expressionsanalyse in Caco-2 Zellen überein. In den AHR-defizienten Zellen dagegen konnte eine signifikante reduzierte CYP1A1-Expression in allen Behandlungsproben beobachtet werden. Im Vergleich dazu zeigte Luteolin in dieser Zelllinie keine Effekte auf GSTA2-Genexpression. Durch diese Befunde wird die Rolle des AHR bei der Luteolin-vermittelten Hemmung der B(a)P-metabolisierenden Enzyme hervorgehoben.

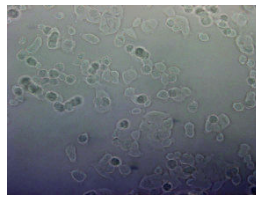
### **3.5. Nachweis der B(a)P-induzierten DNA-Schädigung in Kolonkarzinomzellen**

#### **3.5.1. Detektion von BPDE-DNA-Addukten mittels Immunfluoreszenz-Methode**

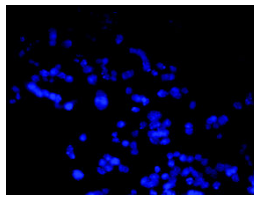
Die gezeigte Luteolin-vermittelte Inhibierung der Expression von B(a)P-metabolisierenden Enzymen führt zur Annahme, dass dies eine Verminderung des B(a)P-Stoffwechsels und gleichzeitig eine reduzierte Bildung der hochreaktiven BPDE-Metaboliten zur Folge hat. Diese Befunde deuten auf die protektive Wirkung dieses Flavonoids gegenüber der Entstehung von BPDE-DNA-Addukten auf. In diesem Teil der Arbeit soll nun eine geeignete Methode für die Untersuchung der BPDE-DNA-Addukt-Bildung nach der Behandlung der Zellen mit B(a)P etabliert und der Einfluss von Luteolin auf diesen Prozess untersucht werden.

Die Etablierung der immunzytochemischen Methode zum Nachweis der BPDE-DNA-Addukt-Bildung erfolgte mit Hilfe spezifischer BPDE-Antikörper. Dafür wurden die HCT-EV Zellen mit unterschiedlichen B(a)P-Konzentrationen für 1 bis 24 Stunden inkubiert. Die mikroskopische Auswertung der Proben wurde nach der Fixierung der Zellen mit Paraformaldehyd und anschließender Färbung mit dem anti-BPDE-Antikörper sowie einem mit Fluorochrom gekoppelten Zweitantikörper durchgeführt. Im Anschluss erfolgte die Färbung der Zellkerne mit Hilfe des Hoechst-Farbstoffes. Repräsentative Bildaufnahmen sind in den Abbildungen 10A und 10B aufgeführt. Die densitometrische Auswertung der Fluoreszenzintensität einzelner Proben ist im Diagramm in der Abbildung 10C zusammengefasst.

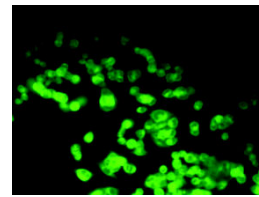
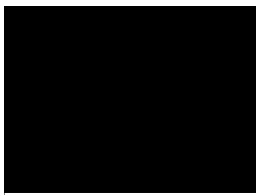
Die Abbildung 10A zeigt, wie eine erfolgreiche Färbung der BPDE-DNA-Addukte aussieht. Bei der Überlappung der Bilder mit der Kernfärbung und den gefärbten DNA-Addukten wird deutlich, dass die grün fluoreszierenden Addukte im Zellkern lokalisiert sind. Diese Beobachtung führt zur Annahme, dass die gegen BPDE-gerichteten Antikörper die BPDE-DNA-Addukte im Zellkern spezifisch erkennen und binden. Um diese Methode für die Untersuchung der Luteolin-Effekte auf die B(a)P-induzierte DNA-Schädigung zu etablieren, wurden in nachfolgenden Versuchen Bildung der BPDE-DNA-Addukte in Abhängigkeit von der B(a)P-Konzentration und der Inkubationszeit überprüft. In der Abbildung 10B sind die mikroskopischen Aufnahmen der Zellen nach der Behandlung mit 10  $\mu\text{M}$  B(a)P nach sechs verschiedenen Inkubationszeiten dargestellt. Bei der DMSO-Kontrolle betrug die Behandlungszeit 24 Stunden. Die mikroskopische Auswertung zeigte im Verlauf der 8-stündigen Inkubationszeit einen zeitabhängigen Anstieg der Fluoreszenzintensität, welcher auf eine Zunahme der BPDE-DNA-Addukt-Bildungsrate hinweist. Die höchste Fluoreszenz wurde nach 8 Stunden erreicht und nahm nach 24 Stunden wieder ab. Die Änderung der detektierten DNA-Addukt-Mengen nach der Belastung mit weiteren B(a)P-Konzentrationen und Inkubationszeiten sind im Diagramm 10C dargestellt.

**A**

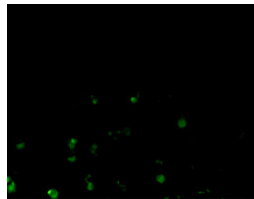
Durchlicht



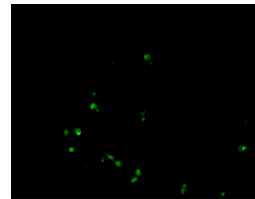
Färbung mit Hoechst

Färbung mit anti-BPDE-  
Alexa488-Antikörper**B**

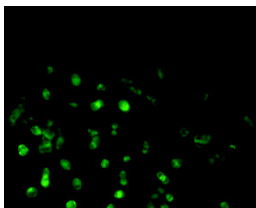
DMSO-Kontrolle



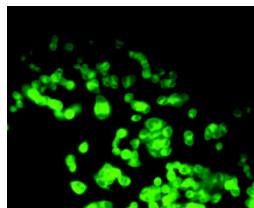
1 Stunde



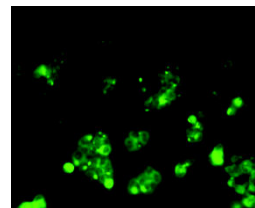
2 Stunden



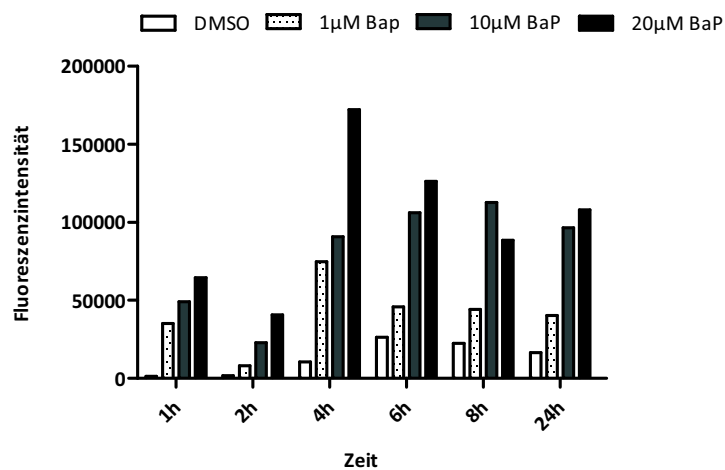
4 Stunden



8 Stunden



24 Stunden

**C****Abbildung 10: Immunfluoreszenzfärbung der BPDE-DNA-Addukte in HCT-EV Zellen**

A. Exemplarische Aufnahme der gefärbten BPDE-DNA-Addukte nach 8 Stunden Inkubation mit 10 μM B(a)P.

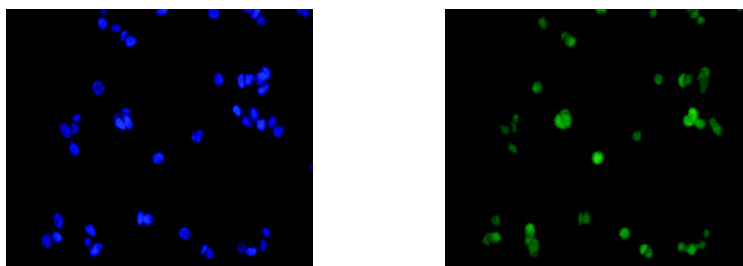
B. Färbung der BPDE-DNA-Addukte nach unterschiedlichen Inkubationszeiten mit 10 μM B(a)P, Kernfärbung mit Hoechst.

C. Densitometrische Auswertung der Fluoreszenzintensität, n=1.



Daraus ist es ersichtlich, dass B(a)P bei jedem Zeitpunkt eine konzentrationsabhängige Zunahme der DNA-Addukt-Menge bewirkte. Die höchste Anzahl der DNA-Addukte wurde bei der Belastung der Zellen mit 10 und 20  $\mu\text{M}$  dieser Substanz beobachtet. Die Inkubation der HCT-EV-Zellen mit 10  $\mu\text{M}$  B(a)P führte nach 4 Stunden zu einem Anstieg der DNA-Addukt-Menge, der auch im Verlauf der weiteren 4 Stunden anhielt und nach 24 Stunden Inkubation geringfügig abflachte. Im Vergleich dazu wurde in den mit 20  $\mu\text{M}$  B(a)P-behandelten Zellen die höchste DNA-Addukt-Bildungsrate bereits nach 4 Stunden Inkubation erreicht und nahm danach kontinuierlich ab.

Zusammenfassend deuten die Ergebnisse dieses Experiments darauf hin, dass die Immunfluoreszenz-Methode für die Untersuchung der B(a)P-induzierten DNA-Modifizierung geeignet ist. Die weiterführenden Experimente mit Luteolin zeigten jedoch, dass die anti-BPDE-Antikörper auch diese Substanz unspezifisch binden können, wodurch eine aussagekräftige Auswertung nicht mehr möglich ist (vgl. Abb.11). Der Grund dafür ist vermutlich die Ähnlichkeit in der chemischen Struktur von Luteolin und BPDE.



**Abbildung 11: Immunfluoreszenzfärbung mit dem anti-BPDE-Antikörper nach der Behandlung mit Luteolin**

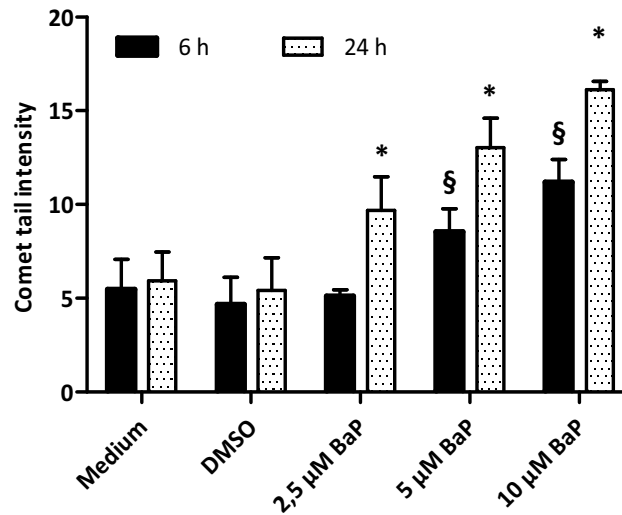
HCT-EV Zellen wurden 6 Stunden mit 10  $\mu\text{M}$  Luteolin belastet und anschließend mit dem anti-BPDE-Alexa 488-Antikörper und Hoechst gefärbt

### 3.5.2. Nachweis der B(a)P-induzierten DNA-Schädigung im Comet-Assay

Da die Immunfärbung der BPDE-DNA-Addukte nach der Behandlung der Zellen mit Luteolin aus o.g. Gründen nicht etabliert werden konnte, wurde eine indirekte Untersuchung der DNA-Addukt-Bildung und der damit einhergehenden DNA-Schädigung mit Hilfe des Comet-Assays durchgeführt. Aufgrund der in der Literatur beschriebenen Fähigkeit von BPDE zur Induktion der DNA-Einzelstrangbrüchen (DNA-ESB) (Harreus et al., 1999; Lubet et al., 1983), wurde für die Detektion der B(a)P- bzw. BPDE-vermittelten DNA-ESB ein Comet-Assay unter alkalischen Bedingungen angewandt.

Die HCT-EV Zellen wurden dafür mit verschiedenen Dosen B(a)P für 6 und 24 Stunden behandelt. Nach dem Fixieren der Zellen in der *Low Melting Point* Agarose und anschließender Zelllyse und Einzelzell-Gelelektrophorese wurden die Zellkerne mit Ethidiumbromid angefärbt und mikroskopisch

ausgewertet. Bei der Auswertung wurden Kometenschweife von 100 Zellen pro Behandlungsprobe gemessen. Abbildung 12 zeigt die Ergebnisse des alkalischen Comet-Assays.



**Abbildung 12: Nachweis der B(a)P-induzierten DNA-Schädigung im alkalischen Comet-Assay**

Die HCT-EV Zellen wurden mit B(a)P für 6 und 24 Stunden inkubiert. Die DNA-Schädigung wurde mit Hilfe des Parameters Schweifintensität (*tail intensity*) bestimmt. \* signifikant höher in Bezug auf die 6 h-DMSO-Kontrolle, § signifikant höher im Vergleich zur 24h-DMSO-Kontrolle.

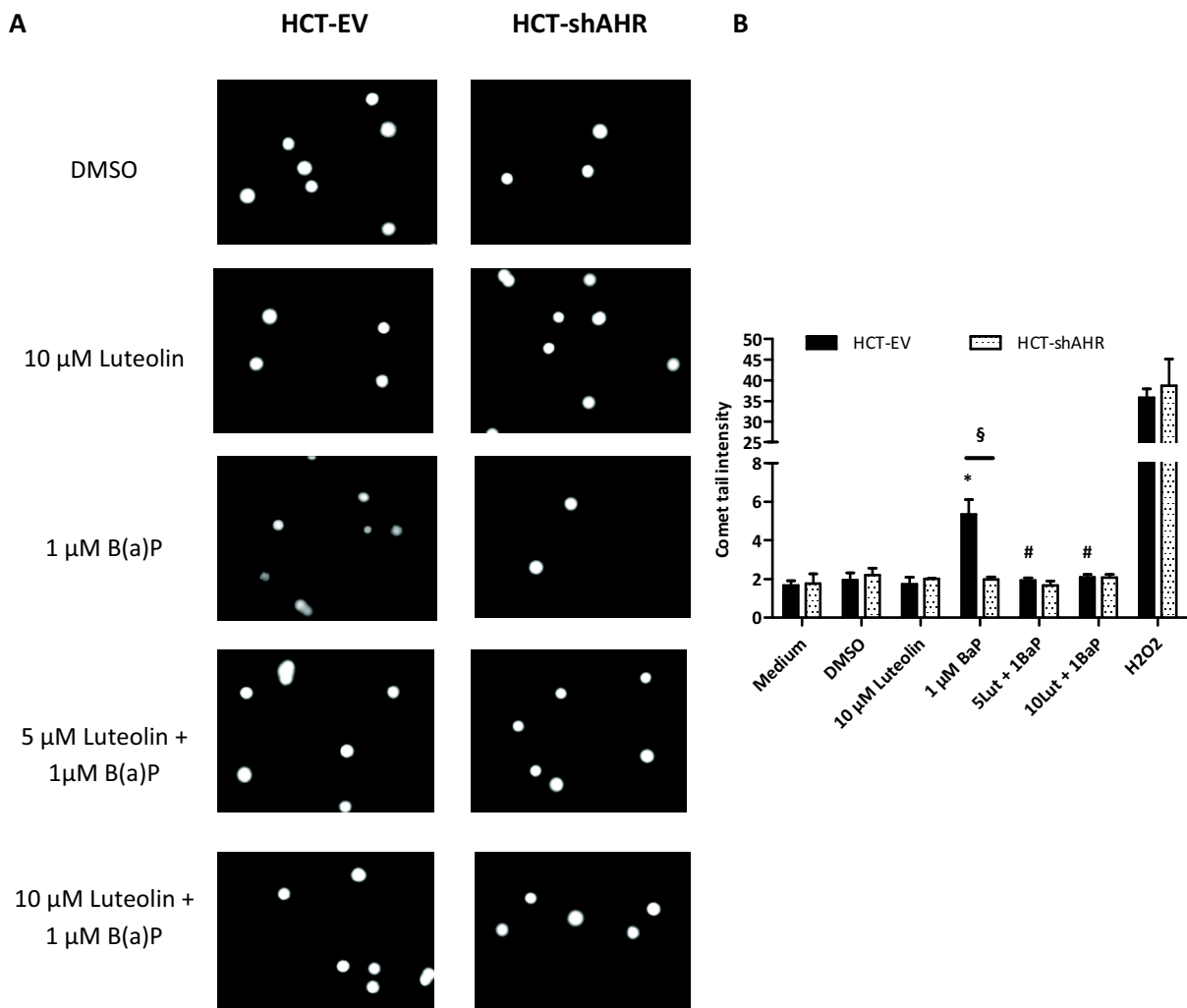
Nach einer 6-stündigen Exposition mit verschiedenen Konzentrationen B(a)P wurde ein signifikanter konzentrationsabhängiger Anstieg der Kometenschweifintensität beobachtet. So bewirkte die Behandlung der HCT-EV Zellen mit 10 µM dieser Substanz eine ca. 2-fache Zunahme der DNA-Menge im Kometenschweif. Im Vergleich dazu führte eine Inkubation für 24 Stunden erwartungsgemäß zu einer verstärkten Zunahme des DNA-Schädigungsgrades, die eine Dosisabhängigkeit aufwies. Bei der höchsten B(a)P-Konzentration wurde eine etwa 2,5-fache Zunahme der DNA-Schädigung im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle erreicht.

Die Befunde aus den Comet-Analysen stimmen mit den Ergebnissen der Immunzytochemie überein. Aus diesem Grund kann der Comet-Assay für die indirekte Untersuchung der B(a)P-induzierten DNA-Schädigung angewendet werden.

### 3.6. Einfluss von Luteolin auf die B(a)P-induzierte Bildung der DNA-Einzelstrangbrüchen

Im vorherigen Kapitel konnte gezeigt werden, dass die Inkubation der HCT-EV-Zellen mit B(a)P zu einer dosisabhängigen DNA-Schädigung führt. Nachfolgend sollte mittels Comet-Assays festgestellt werden, ob Luteolin in der Lage ist, die B(a)P-induzierte Bildung der DNA-Einzelstrangbrüche zu minimieren und ob dieser Effekt AHR-abhängig ist.

Dafür wurden HCT-EV und HCT-shAHR Zellen mit 1  $\mu\text{M}$  B(a)P und zwei verschiedenen Konzentrationen (5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ ) Luteolin 24 Stunden inkubiert. Anschließend wurde der Comet-Assay unter alkalischen Bedingungen durchgeführt.



**Abbildung 13: Effekte von Luteolin auf die B(a)P-induzierte DNA-Schädigung**

Die B(a)P-induzierten DNA-Einzelstrangbrüche wurden nach 24 Stunden Belastung mit 1  $\mu\text{M}$  Benzo(a)pyren, Luteolin oder Koinkubation mit beiden Substanzen im alkalischen Comet-Assay untersucht. Die Inkubation wurde im Hungermedium durchgeführt. Die Positivkontrolle wurde 30 Minuten vor der Zellernte mit 100  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  behandelt. A. Repräsentative mikroskopische Aufnahmen der Zellen jeder Behandlungsprobe. B. Statistische Auswertung von 50 Zellen einer Probe erfolgte anhand des Parameters Komet-Schweifintensität (*tail intensity*). \* signifikant höher als die Lösungsmittelkontrolle, # signifikant niedriger als die 1  $\mu\text{M}$  B(a)P-Probe, § signifikant niedriger im Vergleich zu HCT-EV Zellen.

Zwecks kombinierter Belastung der Zellen mit 10, 20  $\mu\text{M}$  Luteolin und 1  $\mu\text{M}$  B(a)P erfolgte zuvor eine 1-stündige Vorinkubation mit dem Flavonoid. Durch diese Vorgehensweise wurden die Chancen der Interaktion zwischen Luteolin und dem AHR-Protein erhöht, da B(a)P eine deutlich stärkere Affinität zum Rezeptor aufweist. Die Inkubation der Zellen der Positivkontrolle mit 100  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  erfolgte 30 Minuten vor Zellernte. Die exemplarischen Aufnahmen der Zellen nach unterschiedlichen

Belastungen und dazu gehörige statistische Auswertung der Fluoreszenzintensitäten aus drei unabhängigen Versuchen sind in der Abbildung 13 (A, B) dargestellt.

Die Inkubation der HCT-EV Zellen mit 1  $\mu\text{M}$  B(a)P bewirkte im Vergleich zu den Zellen der Lösungsmittelkontrolle einen 2,8-fachen Anstieg der Kometenschweifintensität. Wurden die Zellen jedoch mit Luteolin und B(a)P zusammen belastet, konnte eine signifikante Reduktion der Schweifintensität auf das Niveau der unbehandelten bzw. Luteolin-behandelten Zellen beobachtet werden. Die Abnahme der B(a)P-induzierten DNA-Schädigung erfolgte unabhängig von der eingesetzten Luteolin-Konzentration. Im Vergleich zu AHR-profizienten Zellen bewirkte die Behandlung der HCT-shAHR Zellen mit B(a)P erwartungsgemäß keine Veränderung der Kometenschweifintensität. Dementsprechend blieben die Intensitätswerte in den Zellen der kombinierten Behandlung und mit Luteolin alleine belasteten Zellen unverändert. In den Zellen der Positivkontrolle wurde eine 18-fache Zunahme der Kometenschweifintensität detektiert, die einen Hinweis für eine erfolgreiche Durchführung des Experiments liefert.

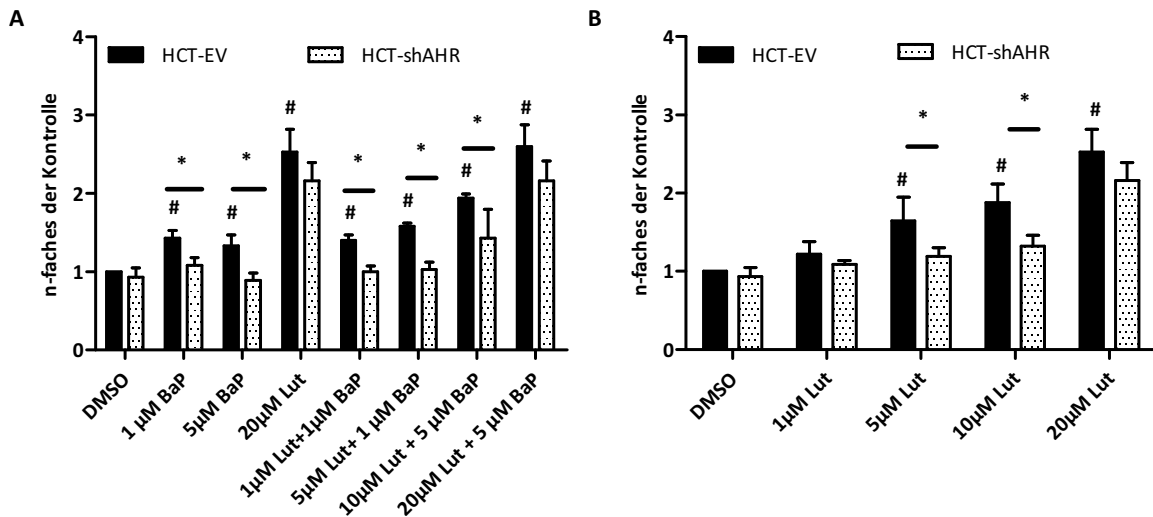
Mit diesem Versuch konnte gezeigt werden, dass Luteolin die B(a)P-induzierte Bildung der DNA-Einzelstrangbrüche in Anwesenheit des AHR in den Kolonkarzinomzellen stark hemmt. Diese Beobachtungen führen zu der Annahme, dass dieser Naturstoff die zelluläre DNA vor der BPDE-DNA-Addukt-Bildung und damit verbundenen Einzelstrangbrüchen schützen kann. Da AHR als das Schlüsselprotein in der B(a)P-Toxifizierung angesehen wird, können die Befunde aus dem alkalischen Comet-Assay auf die Interaktion zwischen dem Flavonoid und dem AHR hindeuten.

### **3.7. Effekte von Luteolin auf den B(a)P-induzierten Zellzyklusarrest in den HCT-EV und HCT-shAHR Zellen**

Zur Verifizierung der Resultate aus dem Comet-Assay soll eine weitere indirekte Methode zur Messung der DNA-Addukt-Bildung nach B(a)P-Inkubation etabliert werden. Die Studie von Hamouchene et al. (2011) beschreibt, dass die B(a)P-initiierte DNA-Schädigung mit Hilfe der Zellzyklusanalyse indirekt bestimmt werden kann. Dabei erweist sich der sogenannte S-Phase Arrest als sensitiver Marker für die gestörte DNA-Integrität. Es wird davon ausgegangen, dass eine Schädigung mit genotoxischen Substanzen die DNA-Reparatur initiiert. Da der Reparaturprozess in der S-Phase des Zellzyklus eingeleitet wird, werden die geschädigten Zellen in dieser Phase arretiert. Der Anteil der in der S-Phase arretierten Zellen lässt sich mit Hilfe der Zellzyklusanalyse im Durchflusszytometer bestimmen.

Für die Durchführung der Zellzyklusanalyse wurden HCT-EV und HCT-shAHR Zellen 24 Stunden im Hungermedium synchronisiert und anschließend 16 Stunden mit 1  $\mu\text{M}$  und 5  $\mu\text{M}$  B(a)P sowie vier Konzentrationen Luteolin (1, 5, 10 und 20  $\mu\text{M}$ ) behandelt. Bei der Koinkubation mit beiden Substanzen erfolgte zuvor eine 1-stündige Vorinkubation mit dem Flavonoid alleine.

Die in Abbildung 14A dargestellten Ergebnisse zeigen, dass die Behandlung der HCT-EV Zellen mit B(a)P einen dosisunabhängigen signifikanten Anstieg der S-Phase-arretierten Zellen auslöste. Im Vergleich dazu blieb die Zellzahl der HCT-shAHR Zellen in der S-Phase auf dem Level der Kontrollzellen. Erstaunlicherweise führte die Inkubation mit 20  $\mu$ M Luteolin zu einem noch höheren relativen Anteil der Zellen in der S-Phase als nach der Behandlung mit B(a)P.



**Abbildung 14: Zellzyklusanalyse; S-Phase-Arrest nach der Behandlung mit B(a)P und Luteolin**

Die synchronisierten HCT-EV und HCT-shAHR Zellen wurden 16 Stunden mit 1 und 5  $\mu$ M B(a)P (A) oder mit 1, 5, 10 und 20  $\mu$ M Luteolin (B) belastet. Bei der kombinierten Behandlung mit B(a)P und dem Flavonoid wurde eine 1-stündige Vorinkubation mit Luteolin alleine durchgeführt. Die Detektion der S-Phase-arretierten Zellen erfolgte nach der Färbung mit Propidiumiodid mit Hilfe des Durchflusszytometers. \* signifikant niedriger im Vergleich zu HCT-EV Zellen, # signifikant höher als die Lösungsmittelkontrolle.

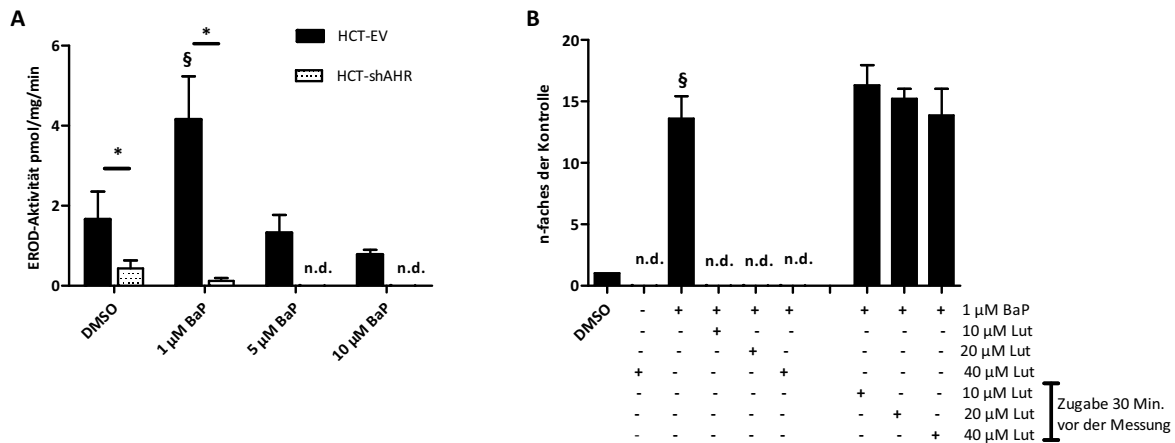
Im Vergleich zur Kontrolle bewirkte Luteolin eine 2,5-fache Zunahme der arretierten HCT-EV Zellen und eine etwa 2-fache Zunahme der arretierten HCT-shAHR Zellen. Auch nach der Koinkubation der HCT-EV Zellen mit B(a)P und verschiedenen Konzentrationen Luteolin wurde ein signifikanter Anstieg der S-Phase-arretierten Zellen in Abhängigkeit zu steigenden Luteolin-Konzentrationen beobachtet. Die kombinierte Belastung der AHR-defizienten HCT116-Zellen löste bis 10  $\mu$ M Luteolin nur eine minimale Zunahme der Zellpopulation in der S-Phase aus, die erst bei der höchsten Konzentration verdoppelt wurde. Diese Beobachtungen führen zur Annahme, dass der S-Phase-Arrest in den mit beiden Substanzen exponierten Zellen unabhängig von der Inkubation mit B(a)P induziert wurde und eher auf die DNA-schädigende Effekte von Luteolin zurückzuführen war. Um diese Vermutung zu bestätigen, wurden HCT-EV und HCT-shAHR Zellen 16 Stunden mit den gleichen Konzentrationen des Flavonoids behandelt und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die Ergebnisse der Zellzyklusanalyse stimmten mit den Beobachtungen aus den Versuchen mit B(a)P und Luteolin

überein. Die Exposition der HCT-EV Zellen gegenüber verschiedener Konzentrationen Luteolin führte zu einem konzentrationsabhängigen signifikanten Anstieg des relativen Anteils der Zellen in der S-Phase (vgl. Abb.14B). Im Vergleich dazu wurde in HCT-shAHR Zellen nur eine geringfügige Zunahme der arretierten Zellen, die erst bei 20  $\mu\text{M}$  gut detektierbar war, beobachtet. Der Vergleich zwischen beiden Zelllinien zeigte einen statistisch signifikanten Unterschied in der Anzahl der S-Phase-arretierten Zellen nach der Belastung mit 5 und 10  $\mu\text{M}$  Luteolin. So wurden etwa 15% weniger HCT-shAHR Zellen nach der Inkubation mit 5  $\mu\text{M}$  und ca. 46% nach der Behandlung mit 10  $\mu\text{M}$  des Flavonoids im Vergleich zu AHR-profizienten Zellen in der S-Phase akkumuliert. Nach der Behandlung beider Zellpopulationen mit 20  $\mu\text{M}$  Luteolin unterschied sich jedoch der zelluläre S-Phase-Anteil nicht signifikant. Diese Befunde deuteten darauf hin, dass Luteolin über ein DNA-schädigendes Potenzial verfügt, wobei dieses bei geringeren Konzentrationen durch die Anwesenheit des AHR unterstützt werden kann.

### **3.8. Einfluss von Luteolin auf die CYP1A1-Aktivität**

Die Ergebnisse aus den Zellzyklusanalysen und dem alkalischen Comet-Assay deuteten darauf hin, dass sowohl die protektiven Eigenschaften des Luteolins gegenüber der B(a)P-induzierten DNA-Schädigung als auch seine festgestellte genotoxische Wirkung durch den AHR vermittelt werden. Die Art der Interaktion dieses Naturstoffes mit dem AHR kann mit Hilfe der Aktivitätsmessung des Enzyms CYP1A1 untersucht werden, welches ein Marker für die Funktionstüchtigkeit dieses Rezeptors darstellt (Mimura et al., 1997). Außerdem spielt das aktivierte CYP1A1-Enzym bei den Entgiftungs- und Giftungsprozessen des B(a)P eine bedeutende Rolle.

Die Überprüfung der Enzymaktivität erfolgte mittels Ethoxyresorufin-O-Deethylase-Assays (EROD-Assay). Zur Untersuchung der basalen und induzierten CYP1A1-Aktivität wurden HCT-EV und HCT-shAHR Zellen mit verschiedenen Konzentrationen B(a)P behandelt. Die Messung der Enzymaktivität wurde nach 24 Stunden Inkubation in Form einer 30-minütigen Kinetik durchgeführt. Die Abbildung 15A zeigt, dass die basale Enzymaktivität in den beiden HCT116-Zelllinien, wie erwartet, unterschiedlich war. Die Hemmung der AHR-Aktivität in den HCT-shAHR Kontrollzellen führte zu einer Reduktion der CYP1A1-Aktivität um 70% im Vergleich zur HCT-EV Kontrolle. Bei der Belastung der Zellen mit 1  $\mu\text{M}$  B(a)P war der Unterschied in der Enzymaktivität noch stärker ausgeprägt. Nach der Zugabe von B(a)P konnte in AHR-defizienten Zellen nur noch eine 3%-ige Restaktivität gemessen werden. Die AHR-profizienten Zellen zeigten hingegen einen signifikanten Anstieg der Enzymaktivität nach der Exposition mit B(a)P im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle, der allerdings nach der Erhöhung der B(a)P-Konzentration abflachte. In den HCT-shAHR konnte bei den höheren B(a)P-Konzentrationen keine enzymatische Aktivität detektiert werden.



**Abbildung 15: Bestimmung der EROD-Aktivität nach der Behandlung mit B(a)P und Luteolin**

Die HCT-EV und HCT-shAHR Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen B(a)P (A) und Luteolin + 1 µM B(a)P (B) behandelt. Nach der 24-stündigen Inkubation wurde die CYP1A1-Aktivität mittels EROD-Assays bestimmt. Der Ethoxyresorufinumsatz (pmol/min) wurde auf die Gesamtproteinmenge (pmol/min/mg) normiert. B: Koinkubation: Zellen wurden 1 Stunde mit Luteolin vorbehandelt und anschließend für 24 Stunden mit B(a)P und Luteolin inkubiert. Bestimmung der spezifischen Enzymaktivität: Zellen wurden 24 Stunden mit 1 µM B(a)P inkubiert und anschließend 30 Minuten vor der EROD-Messung mit verschiedenen Konzentrationen Luteolin belastet. § signifikant höher als die Lösungsmittelkontrolle, \* signifikant niedriger im Vergleich zu HCT-EV Zellen, n.d. – nicht detektierbar.

Diese Ergebnisse lieferten wichtige Informationen für das experimentelle Design der nachfolgenden Untersuchung der CYP1A1-Aktivität. Aufgrund der fehlenden Enzymaktivität in den AHR-defizienten Zellen wurden in folgenden Experimenten mit Luteolin nur HCT-EV Zellen verwendet.

Um festzustellen, auf welche Weise Luteolin die Milderung der B(a)P-induzierten DNA-Schädigung bewirkt, wurden zwei verschiedene experimentelle Ansätze für den EROD-Assay verwendet. Im ersten Ansatz sollte die Interaktion von Luteolin mit dem AHR überprüft werden. Hier erfolgte die EROD-Messung nach einer kombinierten Behandlung mit 1 µM B(a)P und 10, 20, 40 µM Luteolin für 24 Stunden, wobei zuvor eine 1-stündige Vorinkubation mit dem Flavonoid stattfand. Im zweiten Ansatz wurde die direkte Interaktion des Naturstoffes mit dem CYP1A1-Enzym untersucht. Dafür wurden die HCT-EV Zellen 24 Stunden mit 1 µM B(a)P inkubiert. Anschließend wurde auf die Zellen frisches mit Luteolin versetztes Medium gegeben. Nach einer 30-minütigen Inkubation startete die Kinetikmessung.

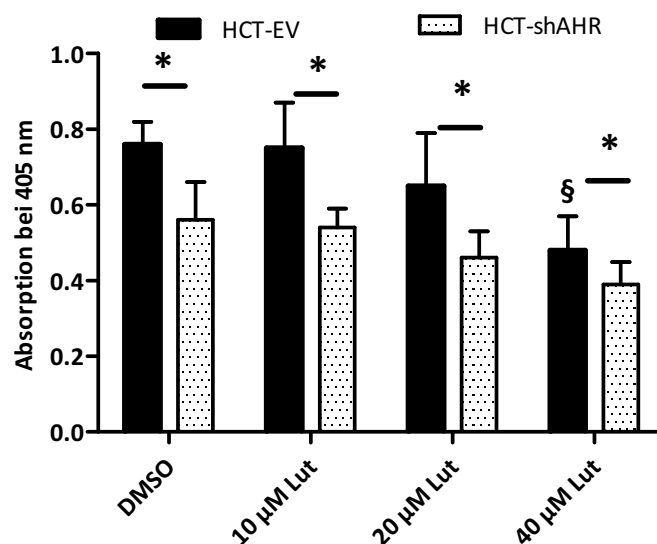
Die Belastung der Zellen mit 1 µM B(a)P verursachte eine signifikante Zunahme der CYP1A1-Aktivität (vgl. Abb. 15B). Die Koinkubation der Zellen mit beiden Substanzen führte hingegen zu einem Einbruch der B(a)P-induzierten Enzymaktivität bei allen verwendeten Luteolin-Konzentrationen. Wenn die Zellen erst mit B(a)P inkubiert und anschließend 30 Minuten mit verschiedenen Konzentrationen Luteolin nachbehandelt wurden, konnte keine Beeinflussung der spezifischen enzymatische Aktivität des CYP1A1 durch Luteolin detektiert werden.

Die Befunde dieses Experimentes wiesen darauf hin, dass die Effekte von Luteolin auf die B(a)P-induzierte DNA-Schädigung auf die direkte antagonistische Wechselwirkung zwischen Luteolin und AHR und nicht auf eine Hemmung der katalytischen Aktivität des CYP1A1-Enzyms zurückzuführen sind.

### 3.9. Einfluss von Luteolin auf die Proliferation der HCT-EV und HCT-shAHR Zellen

Die Zellzyklusanalysen in den AHR-profizienten und -defizienten HCT116-Zellen zeigten, dass die Belastung der Zellen mit verschiedenen Luteolin-Konzentrationen (1, 5, 10 und 20  $\mu\text{M}$ , vgl. Kap. 3.8.) einen konzentrationsabhängigen signifikanten Anstieg der Zellen in der S-Phase herbeiführt. Da der S-Phase-Arrest als Maß für die DNA-Schädigung gilt, lässt diese Beobachtung die Vermutung zu, dass Luteolin über ein genotoxisches Potenzial verfügt. Es ist jedoch auch möglich, dass diese Effekte durch eine verstärkte Zellproliferation ausgelöst werden. Um diese Möglichkeit auszuschließen, soll der Einfluss von Luteolin auf die Proliferation beider Zelllinien mittels BrdU-Assays untersucht werden.

Die Behandlung der HCT-EV und HCT-shAHR Zellen mit 10, 20 und 40  $\mu\text{M}$  Luteolin erfolgte für 16 Stunden. Anschließend wurde die Fluoreszenz des in die DNA eingebauten Thymidinanalogen Brom-desoxy-Uridin gemessen. Die Zellproliferation wurde anhand der Fluoreszenzdaten ermittelt.



**Abbildung 16: Untersuchung der Zellproliferation nach der Inkubation mit Luteolin**

HCT-EV und HCT-shAHR Zellen wurden mit Luteolin (10, 20, 40  $\mu\text{M}$ ) belastet. Nach 16 Stunden wurde die Zellproliferation mittels BrdU-Assay bestimmt. Die Fluoreszenz des in die DNA eingebauten Thymidinanalogen BrdU wurde bei 405 nm gemessen. § signifikant niedriger als Lösungsmittelkontrolle, \* signifikant niedriger im Vergleich zu HCT-EV Zellen.



Die Ergebnisse sind in der Abbildung 16 zusammengefasst und zeigen, dass Luteolin in beiden Zellpopulationen eine konzentrationsabhängige Verringerung der Proliferation herbeiführte. In den HCT-EV Zellen war diese Abnahme nach der Inkubation mit 40  $\mu$ M Flavonoid signifikant. Interessanterweise konnten signifikante Unterschiede hinsichtlich der basalen Proliferation zwischen AHR-profizienten und AHR-defizienten Zellen beobachtet werden. So wiesen die HCT-shAHR Zellen der DMSO-behandelten Kontrolle ein um etwa 30% geringeres Zellwachstum als HCT-EV Zellen auf. Dieser Unterschied blieb auch in den Luteolin-belasteten Proben präsent.

Zusammenfassend konnte in diesem Experiment gezeigt werden, dass Luteolin die Proliferation der HCT-EV und HCT-shAHR Zellen konzentrationsabhängig hemmt. Diese Beobachtung weist darauf hin, dass die in den Zellzyklusanalysen festgestellte Zunahme der S-Phase-arretierten Zellen nach der Luteolingabe nicht auf die erhöhte Proliferation zurückzuführen ist. Die beobachtete geringere Zellteilung der HCT-shAHR Zellen im Vergleich zu den HCT-EV Zellen deutet außerdem auf eine wichtige Rolle des AHR bei der Zellproliferation hin.

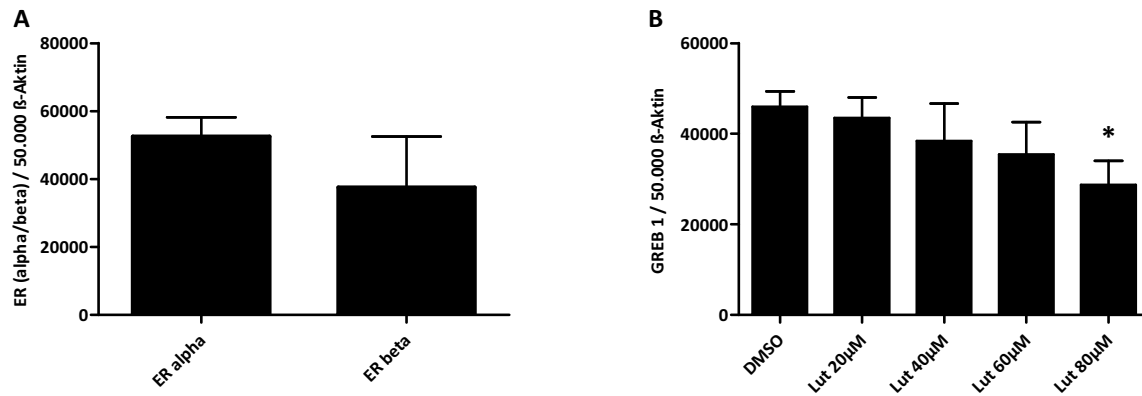
### **3.10. Einfluss von Luteolin auf die Expression der Östrogenrezeptoren**

Die Östrogenrezeptoren alpha und beta (ER alpha, ER beta) gehören zu der Steroidrezeptorfamilie und werden in vielen Organen, unter anderem auch im Darm, exprimiert (Mary et al., 1993). Diese Rezeptoren sind in die Prozesse des zellulären Wachstums und der Teilung involviert. Im aktivierten Zustand stimulieren sie die DNA-Synthese und die Zellproliferation (Colditz, 2005). In der Literatur wird einigen Flavonoiden die Fähigkeit zur Beeinflussung der ER-Aktivität zugeschrieben (Collins-Burow et al., 2000; Han et al., 2002; Ise et al., 2005). So konnte in der Studie von Zand et al. (2000) gezeigt werden, dass auch Luteolin im niedrigen Konzentrationsbereich östrogene Effekte ausüben kann.

In diesem Kapitel soll untersucht werden, ob die in der Zellzyklusanalyse beobachtete Zunahme der in der S-Phase arretierten Zellen auf der erhöhten Aktivierung der ER alpha und beta und somit erhöhten Zellteilung basiert. Dafür wurde zuerst die basale Expression beider Östrogenrezeptoren in HCT116-Zellen überprüft und anschließend die Expression ihres gemeinsamen Zielgens GREB1 (*Growth Regulation by Estrogen in Breast Cancer 1*) nach der Behandlung mit Luteolin untersucht. Die Bestimmung der Transkriptmenge erfolgte in HCT-EV Zellen mit Hilfe der qRT-PCR.

Die in der Abbildung 17A dargestellten Ergebnisse der Untersuchung zur basalen ER alpha und ER beta-Expression zeigen, dass beide Rezeptor-Subtypen in HCT116 Zellen exprimiert werden, wobei ER alpha eine etwas höhere Transkriptmenge aufwies. Die mRNA-Analyse des GREB1-Gens nach der 24-stündigen Behandlung der HCT-EV Zellen mit 20, 40, 60 und 80  $\mu$ M Luteolin deutete auf die

konzentrationsabhängige Reduktion der Transkriptmenge hin, die erst bei der höchsten Konzentration von 80  $\mu\text{M}$  statistisch signifikant war (vgl. Abb. 17B).



**Abbildung 17: mRNA-Expression der Östrogenrezeptoren alpha und beta und des GREB1-Gens**

A: Überprüfung der konstitutiven Expression der ER alpha und ER beta in verwendeter HCT-EV Zelllinie B: mRNA-Analyse der GREB1-Expression nach einer 6-stündigen Inkubation der HCT-EV Zellen mit Luteolin. Die ermittelte Transkriptmenge wurde auf 50.000 Moleküle  $\beta$ -Aktin normiert. \* signifikant niedriger im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle.

Da die hemmenden Effekte von Luteolin auf die GREB1-Expression erst bei Konzentrationen von über 20  $\mu\text{M}$  auftraten und die in den Zellzyklusanalysen beobachtete verstärkte Zunahme der HCT-EV Zellen in der S-Phase bis zur Konzentration von 20  $\mu\text{M}$  erfolgte, kann die ER-vermittelte Erhöhung der Zellproliferation in dieser Zelllinie ausgeschlossen werden. Diese Ergebnisse unterstützen die Beobachtungen aus dem BrdU-Assay, in dem keine Erhöhung der Zellproliferation nach der Exposition gegenüber Luteolin festgestellt werden konnte. Somit liegt die Vermutung nahe, dass der Luteolin-vermittelte Anstieg der Zellzahl in der S-Phase auf die DNA-Schädigung und nicht auf die erhöhte Proliferation zurückzuführen ist. Die Aufklärung der genotoxischen Wirkweise von Luteolin wird in folgenden Kapiteln angestrebt.

### 3.11. Effekte von Luteolin und B(a)P auf die intrazelluläre ROS-Bildung in HCT-EV und HCT-shAHR Zellen

Eine der häufigsten Ursachen für eine DNA-Schädigung ist oxidativer Stress. Diese Situation entsteht in Zellen, wenn die Balance zwischen Bildung und Abbau der reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) gestört ist. ROS können durch endogene Oxidationsprozesse oder durch die Aufnahme von oxidierenden Substanzen in den Zellen generiert und bei überschüssiger Bildung akkumuliert werden. Auf Grund ihrer stark ausgeprägten Reaktionsfähigkeit gehen diese reaktive Radikale mit den zellulären Makromolekülen Verbindungen ein, wobei deren Funktion dadurch erheblich

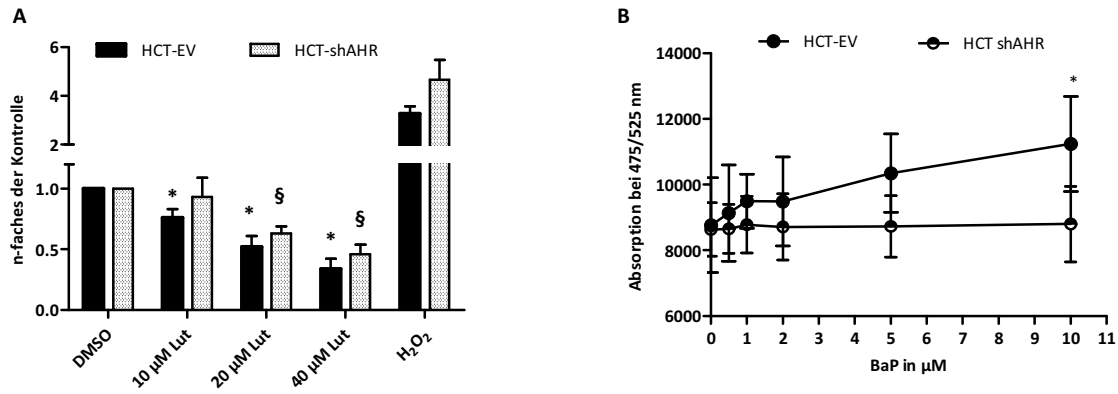
beeinträchtigt werden kann. Eine oxidative Schädigung der DNA erfolgt in Form oxidierter Basen, wie 8-Oxo-2-Deoxyguanosin. Diese adversen Modifikationen begünstigen die Entstehung von Einzel- und/oder Doppelstrangbrüchen in der DNA. In einer Studie von Wätjen et al. (2005) konnte gezeigt werden, dass einige Flavonoide, wie Quercetin und Fisetin, in hohen Konzentrationen DNA-Schäden initiieren können. Als eine der möglichen Ursachen dafür wird ihre pro-oxidative Aktivität angesehen.

In diesem Abschnitt wird die oxidative Kapazität von Luteolin und B(a)P mit Hilfe einer Fluoreszenzsonde im Dichlorofluorescein-Assay bestimmt. Die intrazelluläre Oxidation der Fluoreszenzsonde 2',7'-Dichloro-dihydrofluorescein-diacetat durch ROS führt zur Entstehung des fluoreszierenden Produktes Dichlorofluorescein (DCF), dessen Fluoreszenz mit Hilfe eines Fluoreszenzphotometers erfasst werden kann. Die gemessenen Fluoreszenzwerte korrelieren somit mit der tatsächlichen Menge der reaktiven Sauerstoffspezies in den Zellen.

Für die Untersuchung des oxidativen Potentials von Luteolin und B(a)P wurden die HCT-EV und HCT-shAHR Zellen mit verschiedenen Konzentrationen der jeweiligen Substanz für 24 Stunden (B(a)P) oder 48 Stunden (Luteolin) inkubiert und anschließend mit der Fluoreszenzsonde versetzt. Die Zellen der Positivkontrolle wurden kurz vor der Messung mit 300  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  geschädigt.

Die Belastung der HCT-EV Zellen mit Luteolin führte zu einer signifikanten konzentrationsabhängigen Reduktion der DCF-Fluoreszenz (vgl. Abb. 18A). Die Zellen, die mit der höchsten Luteolin-Konzentration (40  $\mu\text{M}$ ) behandelt wurden, wiesen ca. 66% weniger der intrazellulären ROS-Menge verglichen mit den Zellen der Lösungsmittelkontrolle auf. Im Vergleich zu den AHR-profizienten Zellen verlief die Luteolin-induzierte Abnahme der ROS-Menge in den HCT-shAHR etwas geringer und war nach der Inkubation mit 20 und 40  $\mu\text{M}$  Luteolin statistisch signifikant. Die Behandlung dieser Zelllinie mit 40  $\mu\text{M}$  Luteolin führte, bezogen auf die DMSO-Kontrolle, zu einer ca. 55%-igen Reduktion der DCF-Fluoreszenz. Die Behandlung beider Zelllinien mit der Modellsubstanz  $\text{H}_2\text{O}_2$  bewirkte eine etwa 3-fache Zunahme der DCF-Fluoreszenz.

Diese Ergebnisse deuten auf die anti-oxidativen Eigenschaften von Luteolin hin, wobei die Hemmung der ROS-Bildung in HCT-EV Zellen etwas stärker ausgeprägt war als in HCT-shAHR Zellen. Aus diesem Grund konnte die Vermutung, dass Luteolin-induzierte DNA-Schädigung durch die erhöhte ROS-Bildung verursacht wird, nicht belegt werden.



**Abbildung 18: Intrazellulärer ROS-Status nach der Inkubation mit Luteolin**

Für die Messung der intrazellulären ROS-Menge wurden HCT-EV und HCT-shAHR Zellen mit (A) Luteolin (10, 20, 40 µM) für 48 Stunden oder (B) B(a)P (0,5; 1; 2; 5; 10 µM) behandelt. Anschließend erfolgte eine 30-minütige Inkubation mit 100 µM 2',7'-Dichloro-dihydrofluorescein-diacetat im farblosen Medium in der lichtgeschützten Umgebung. Die Fluoreszenzmessung wurde nach dem Mediumwechsel bei 475 / 525 nm durchgeführt. Die Positivkontrolle wurde direkt vor der Messung mit 100 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> geschädigt. \* signifikant niedriger im Vergleich zur HCT-EV-Kontrolle, § signifikant niedriger als die HCT-shAHR-Kontrolle.

Die Exposition der HCT-EV und HCT-shAHR Zellen mit 0,5, 1, 2, 5 und 10 µM B(a)P für 24 Stunden und die anschließende Messung der intrazellulären ROS-Menge sollte einen Aufschluss über eine weitere Möglichkeit der DNA-schädigenden Wirkung dieses Stoffes in Form von oxidativen Modifikationen geben. Die DCF-Fluoreszenz-Messwerte in beiden Zelllinien sind in der Abbildung 18B zusammengefasst. In HCT-EV Zellen zeigten diese eine schwache Zunahme der reaktiven Sauerstoffspezies, die bei der höchsten Konzentration von 10 µM statistisch signifikant war. Die Behandlung der HCT-shAHR Zellen mit B(a)P bewirkte hingegen keinen Einfluss auf die intrazelluläre ROS-Menge. Beim Vergleich der beiden Zelllinien nach der Belastung mit der höchsten B(a)P-Konzentration zeichnete sich ein Unterschied in der gebildeten DCF-Fluoreszenz um etwa 20% ab. Die im Diagramm nicht-dargestellten Fluoreszenzmesswerte der Positivkontrolle zeigten nach der Schädigung mit 100 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> einen 5-fachen Anstieg des oxidierten DCF und somit der gebildeten ROS-Menge.

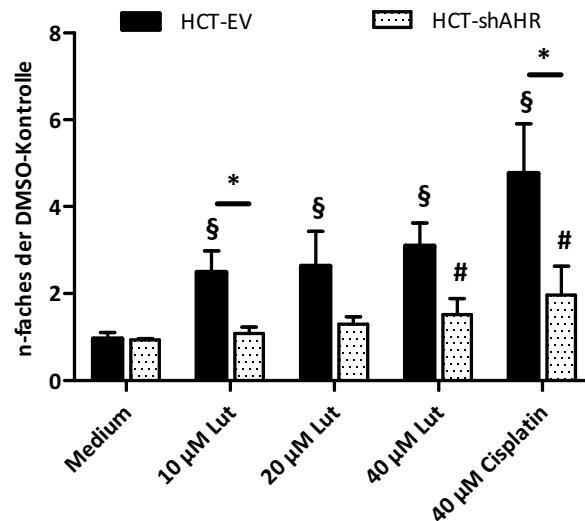
Mit diesem Versuch konnte gezeigt werden, dass B(a)P sein genotoxisches Potential nicht nur durch die zelluläre Transformation zum reaktiven BPDE-Metabolit entfalten kann. Auch seine schwach ausgeprägten pro-oxidativen Eigenschaften, die erst bei höheren Konzentrationen auftreten, könnten vermutlich zur Schädigung der zellulären DNA beitragen.

### 3.12. Untersuchung der Luteolin-induzierten DNA-Doppelstrangbruchbildung

Die Untersuchung des Zellzyklus in AHR-profizienten und AHR-defizienten HCT116-Zellen zeigte, dass die Inkubation beider Zelllinien mit Luteolin einen S-Phase-Arrest herbeiführt. Dabei konnte ein signifikant höherer Anteil der arretierten Zellen in den HCT-EV festgestellt werden. Die anschließende Analyse der Zellproliferation und des ROS-Status nach der Exposition der HCT-EV und HCT-shAHR Zellen mit Luteolin unterstützen die Vermutung, dass die Induktion des S-Phase-Arrests in erster Linie durch die Schädigung der zellulären DNA hervorgerufen wird. Auch in der Literatur gibt es Hinweise auf das DNA-schädigende Potential dieses Flavonoids. In den Arbeiten von Yamashita et al. (2000) und Chowdhury et al. (2002) konnte nachgewiesen werden, dass Luteolin in der Lage ist, die Aktivität der zellulären Topoisomerasen I und II zu inhibieren und direkt mit der DNA zu interkalieren. Da diese Enzyme essentiell für die Reparatur der geschädigten DNA sind, führt ihre Hemmung zur Bildung der DNA-Doppelstrangbrüchen (DNA-DSB).

In diesem Abschnitt soll die Induktion der DNA-DSB nach der Behandlung mit Luteolin mittels neutralem Comet-Assay untersucht werden. Dafür wurden HCT-EV und HCT-shAHR Zellen mit 10, 20 und 40  $\mu\text{M}$  Luteolin für 24 Stunden belastet. Die Zellen der Positivkontrolle wurden 24 Stunden mit 40  $\mu\text{M}$  Cisplatin inkubiert. Nach der anschließenden Einzelzellgelelektrophorese unter neutralen Bedingungen (pH 7,5) wurden 100 Zellen jeder Behandlungsprobe ausgewertet.

Die Behandlung der HCT-EV und HCT-shAHR Zellen mit 10, 20 und 40  $\mu\text{M}$  Luteolin führte zu einem dosisabhängigen Anstieg der Kometenschweifintensität in beiden Zelllinien (vgl. Abb.19). Verglichen mit den Zellen der Lösungsmittelkontrolle konnte in den HCT-EV Zellen schon bei der niedrigsten Luteolin-Konzentration eine 2,5-fache, statistisch signifikante Zunahme der DNA-DSB beobachtet werden. Die Belastung dieser Zellen mit 20 und 40  $\mu\text{M}$  Luteolin führte weiterhin zu einem 2,6- bis 3-fachen Anstieg der Kometenschweifintensität. In den HCT-shAHR Zellen hingegen war die Luteolin-induzierte DSB-Bildung erst ab 20  $\mu\text{M}$  detektierbar. Nach der Behandlung mit 40  $\mu\text{M}$  des Flavonoids wurde in diesen Zellen ein signifikanter 1,5-facher Anstieg der DNA-Fragmentierung beobachtet. Der Vergleich der Kometenschweifintensität in beiden Zelllinien zeigte, dass die AHR-profizienten Zellen bei jeder Luteolin-Dosis eine stärkere DNA-Schädigung aufweisen. Ein signifikanter Unterschied konnte allerdings nur bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  ermittelt werden. Hier zeigten die HCT-EV Zellen etwa 60% mehr DNA-DSB als die HCT-shAHR. Die Belastung beider Zelllinien mit 20 und 40  $\mu\text{M}$  Luteolin führte in den AHR-profizienten Zellen zu einem um 50 % höheren Anteil der geschädigten DNA als in HCT-shAHR Zellen. Auch in den Zellen der Positivkontrolle wurde eine unterschiedlich starke DSB-Bildung festgestellt. So führte die Inkubation der HCT-EV Zellen mit Cisplatin zu einem signifikanten 5-fachen Anstieg der Kometenschweifintensität, der um ca. 60% höher war als in den HCT-shAHR Zellen.



**Abbildung 19: Untersuchung der Luteolin-induzierten DNA-Doppelstrangbildung**

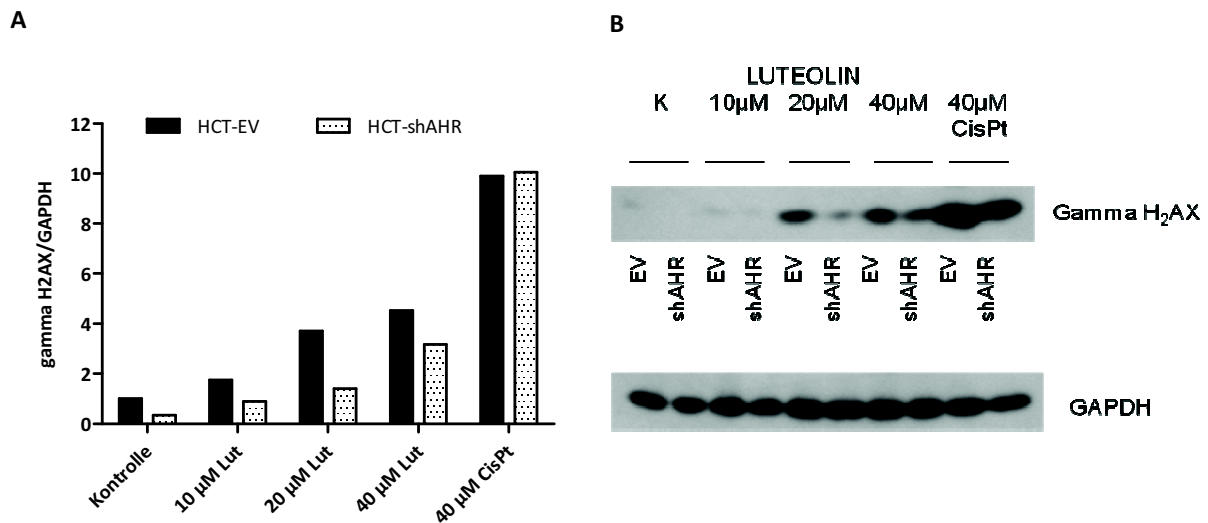
Die Luteolin-induzierte Bildung der DNA-Doppelstrangbrüche wurde mittels neutralem Comet-Assay untersucht. Die 24-stündige Inkubation mit 10, 20, 40 µM Luteolin erfolgte im Hungermedium. Die Positivkontrolle wurde 24 Stunden mit 40 µM Cisplatin behandelt. Die Auswertung von 100 Zellen jeder Behandlungsprobe erfolgte anhand des Parameters Komet-Schweifintensität (*tail intensity*). Dargestellt sind die n-fachen Werte der DMSO-Kontrolle. § signifikant höher als die HCT-EV-Lösungsmittelkontrolle, # signifikant höher als die HCT-shAHR-Lösungsmittelkontrolle. \* signifikant niedriger im Vergleich zu HCT EV-Zellen.

Mit diesem Experiment konnte nachgewiesen werden, dass Luteolin Bildung von DNA-DSB in Kolonkarzinomzellen auslösen kann. Der beobachtete Unterschied zwischen den HCT-EV und HCT-shAHR Zelllinien, welcher in den 10 µM Luteolin-Proben statistisch signifikant war, deutet darauf hin, dass der aktive AHR die Luteolin-vermittelte DNA-Schädigung verstärken kann.

Um die vorgestellten Ergebnisse des neutralen Comet-Assays zu verifizieren, wurde der Einfluss von Luteolin auf die DNA-Integrität der Kolonkarzinomzellen HCT116 mittels *Western Blot*-Analyse untersucht. Dabei wurde die Aktivierung des Histonproteins H2AX nach der Belastung mit verschiedenen Konzentrationen des Flavonoids überprüft. Das Protein H2AX bildet zusammen mit den DNA-Molekülen Nukleosome und mit weiteren Proteinen Chromatin-Komplexe und trägt somit zur Stabilisierung der DNA bei. Im Falle eines DNA-DSB wird es durch die vorgeschalteten Kinasen am Serinrest 139 phosphoryliert (Rogakou et al., 1998). Die phosphorylierte Form des H2AX trägt die Bezeichnung Gamma-H2AX ( $\gamma$ H2AX) und spielt eine wichtige Rolle bei der Initiierung der DNA-Reparatur. Die Entstehung von  $\gamma$ H2AX hat sich als sensibler Nachweis der DNA-Doppelstrangbrüche in der Molekularbiologie etabliert (Kuo & Yang, 2008).

In der Abbildung 20 ist eine repräsentative *Western Blot* Aufnahme (vgl. 20A) und eine densitometrische Auswertung (vgl. 20B) des phosphorylierten  $\gamma$ H2AX dargestellt. Die 24-stündige Behandlung der HCT-EV und HCT-shAHR Zellen mit 10, 20 und 40 µM Luteolin führte zu einem

dosisabhängigen Anstieg der phosphorylierten Form des H2AX-Proteins in beiden Zelllinien. Allerdings zeigten die AHR-profizienten Zellen eine deutlich höhere Menge des  $\gamma$ H2AX nach der Inkubation mit verschiedenen Luteolin-Konzentrationen als die HCT-shAHR Zellen.



**Abbildung 20: Bildung von  $\gamma$ H2AX nach der Belastung mit Luteolin**

HCT-EV und HCT-shAHR Zellen wurden 24 Stunden mit 10, 20, 40  $\mu$ M Luteolin inkubiert. Die Bildung des Proteins  $\gamma$ H2AX (Ser 139, 15 kDa) wurde mit Hilfe der *Western Blot*-Analyse untersucht. A. Densitometrische Auswertung der  $\gamma$ H2AX-Proteinmenge nach der 24-stündigen Belastung mit Luteolin oder 40  $\mu$ M Cisplatin (CisPt) (n=2). Dargestellt ist die Bandenintensität des  $\gamma$ H2AX-Proteins normiert auf die Intensität des *housekeeping*-Proteins GAPDH. B. Repräsentative *Western Blot* Aufnahme.

Die densitometrische Auswertung der  $\gamma$ H2AX-Bandenintensität zeigte eine 1,5- bis 4,5-fache Zunahme des phosphorylierten Proteins in HCT-EV Zellen. Im Vergleich dazu konnte in den HCT-shAHR Zellen eine bis zu 60% (bei 20  $\mu$ M Luteolin) geringere Bildung des  $\gamma$ H2AX detektiert werden. Die Inkubation der Zellen mit 40  $\mu$ M Cisplatin bewirkte, wie erwartet, eine etwa 10-fache Zunahme der  $\gamma$ H2AX-Bandenintensität in beiden Zelllinien.

Zusammenfassend zeigte die Untersuchung der H2AX-Phosphorylierung in HCT-EV und HCT-shAHR Zellen, dass Luteolin in der Lage ist, die Entstehung der DNA-Doppelstrangbrüchen hervorzurufen. Dabei schien die Anwesenheit des AHR in den Zellen von Bedeutung zu sein. Diese Beobachtungen unterstützten die Ergebnisse aus dem neutralen Comet-Assay. Somit konnte in diesem Kapitel gezeigt werden, dass der zuvor beobachtete S-Phase-Arrest der HCT-EV und HCT-shAHR Zellen nach der Inkubation mit Luteolin auf die Bildung der DNA-Doppelstrangbrüchen zurückzuführen ist. Anhand der vorgestellten Daten wurde deutlich, dass die Präsenz des AHR in den Zellen die Luteolin-induzierte DNA-Schädigung begünstigt und somit deren Arretierung in der S-Phase verstärkt.

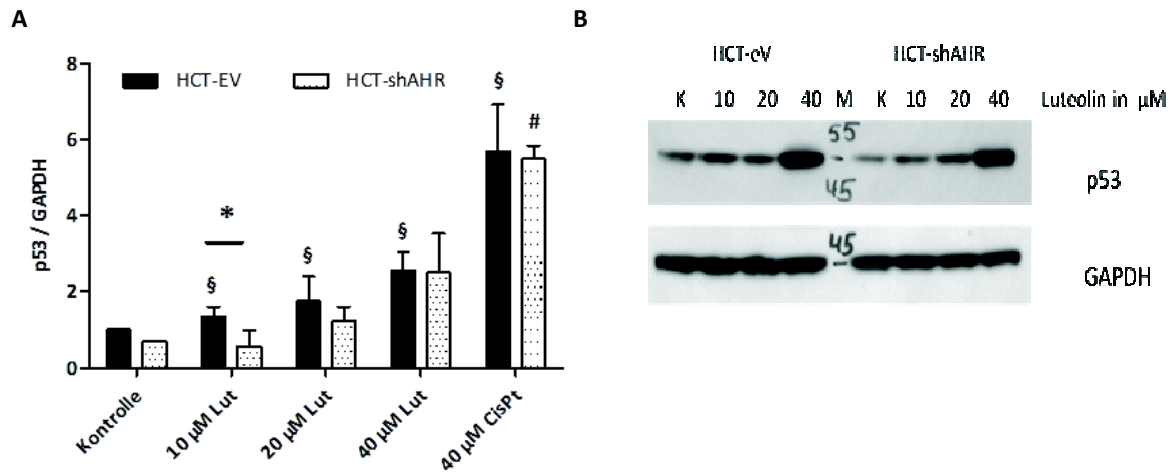
### 3.13. Untersuchung der Luteolin-induzierten AHR-abhängigen p53-Aktivierung

Eine Schädigung der DNA löst in den betroffenen Zellen eine Stressantwort aus. Dabei werden verschiedene Mechanismen in Gang gesetzt, die die replikative DNA-Synthese unterbinden und somit die Zellen vor entarteter Proliferation schützen. Eine wichtige Komponente der zellulären Antwort auf die Störung der DNA-Integrität stellt das Tumorsuppressorprotein p53 dar. In geschädigten Zellen wird dieser Transkriptionsfaktor durch vorgeschalteten Kinasen phosphoryliert und führt in seinem aktiven Zustand zum Zellzyklusarrest, welcher die Reparatur der gestörten DNA-Bereiche ermöglicht. Im Falle einer irreparablen DNA-Schädigung können die betroffenen Zellen durch den programmierten Zelltod, Apoptose, eliminiert werden. Die Einleitung beider Vorgänge, DNA-Reparatur und Apoptose, wird durch das p53-Protein reguliert (Ko & Prives, 1996).

Die Ergebnisse vorangegangener Versuche zeigten, dass Luteolin in AHR-profizienten HCT116-Zellen einen verstärkten Arrest in der S-Phase des Zellzyklus auslöst. Als Ursache dafür konnte eine Luteolin-induzierte Bildung von DNA-Doppelstrangbrüchen aufgezeigt werden. Im folgenden Experiment sollte nun die Menge des gebildeten Transkriptionsfaktors p53 in AHR-profizienten und AHR-defizienten HCT116-Zellen nach der Belastung mit Luteolin untersucht werden.

Beide Zelllinien wurden dafür mit 10, 20 und 40  $\mu\text{M}$  Luteolin für 24 Stunden belastet. Die Zellen der Positivkontrolle wurden mit 40  $\mu\text{M}$  Cisplatin behandelt. Die anschließende Untersuchung erfolgte mit Hilfe der *Western Blot*-Analyse. Die Abbildung 21A zeigt eine repräsentative *Western Blot* Aufnahme. Die densitometrische Auswertung von drei unabhängigen Versuchen ist in der Abbildung 21B zusammengefasst. Die Inkubation der HCT-EV Zellen mit Luteolin bewirkte eine dosisabhängige 1,4- bis 2,5-fache Zunahme der p53-Proteinmenge, die schon bei der niedrigsten Konzentration einen signifikanten Unterschied zur Lösungsmittelkontrolle aufwies. Der Vergleich beider Zelllinien zeigte, dass HCT-EV Zellen nach der Inkubation mit 10 und 20  $\mu\text{M}$  Luteolin einen deutlich höheren p53-Level als HCT-shAHR Zellen aufweisen. Im Vergleich zu den HCT-shAHR Zellen konnte in HCT-EV Zellen vor allem bei der niedrigsten Luteolin-Konzentration eine signifikante um ca. 58% höhere Zunahme des p53-Proteins detektiert werden. In den Zellen der Positivkontrolle zeigte sich, wie erwartet, eine etwa 5-fache signifikante Zunahme der p53-Proteinmenge in beiden Zelllinien.





**Abbildung 21: Bestimmung der p53-Proteinmenge nach der Belastung mit Luteolin**

Western Blot Analyse der p53-Expression (53 kDa) nach der 24-stündigen Inkubation mit verschiedenen Luteolin-Konzentrationen (10, 20, 40 µM) oder 40 µM Cisplatin (CisPt). A: Densitometrische Auswertung von drei unabhängigen Experimenten. Dargestellt sind die auf GAPDH normierten (36 kDa) Bandenintensitäten des p53-Proteins. B: Repräsentative Western Blot Aufnahme. M: Proteinstandardmarker, K: DMSO-Kontrolle, § signifikant höher im Vergleich zur HCT-EV-Lösungsmittelkontrolle, # signifikant höher im Vergleich zur HCT-shAHR-Lösungsmittelkontrolle \* signifikant höher als in HCT-shAHR Zellen.

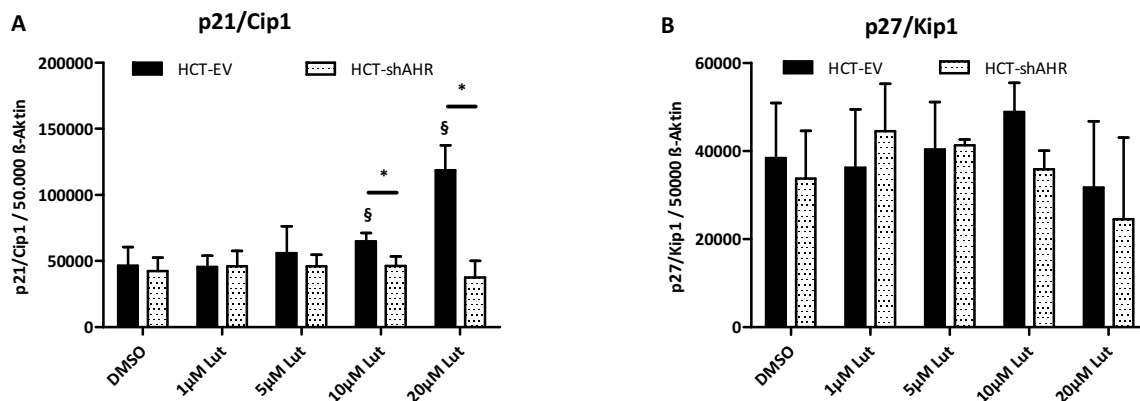
Mit diesem Versuch konnte gezeigt werden, dass die Belastung der Zellen mit Luteolin eine Akkumulierung des Transkriptionsfaktors p53 herbeiführt. Zumindest nach der gewählten Inkubationsdauer von 24 Stunden konnte jedoch nur im Niedrigdosisbereich eine AHR-abhängige Zunahme dieses Proteins beobachtet werden.

### 3.14. Einfluss von Luteolin auf die Expression der p21/Cip1 und p27/Kip1-Gene in HCT-EV und HCT-shAHR Zellen

Die zelluläre Akkumulierung des p53-Proteins in Folge einer DNA-Schädigung kann einen Zellzyklusarrest einleiten. Aus der Literatur ist es bekannt, dass die Progression des Zellzyklus durch eine Reihe von Cyclin-abhängigen-Kinasen (*Cyclin-Dependent-Kinase*, CDK) und spezifischen CDK-Inhibitoren reguliert wird (Sheer, 1996; Sheer & Roberts, 1995; Steeg & Abrams, 1997). So unterliegt der Übergang zwischen den G1- und S-Phasen des Zellzyklus, sowie die Progression der S-Phase der Kontrolle der Proteinkomplexe Cyclin E/CDK2 und Cyclin A/CDK2. Die Aktivität dieser Proteinkomplexe wird beim Vorliegen eines DNA-Schadens durch die spezifischen CDK-Inhibitoren p21/Cip1 und p27/Kip1 gehemmt, wodurch der Zellzyklusarrest in betroffenen Zellen eingeleitet wird. Während die Expression des CDK-Inhibitorproteins p21/Cip1 direkt durch den p53-Transkriptionsfaktor initiiert wird (Harper et al., 1993; Xiong et al., 1993), kann die Transkription und Aktivierung des p27/Kip1 durch verschiedene mitogene und anti-proliferative Signale reguliert werden (Slingerland & Pagano, 2000). In der Literatur wird die Aktivierung des p53-p21/Cip1-

Signalweges vor allem mit dem zellulären G1-S-Phasen-Arrest in Zusammenhang gebracht (Brown et al., 1997; Deng et al., 1995; Waldman et al., 1995; Steeg & Abrams, 1997).

Im folgenden Experiment wurde die Expression beider CDK-Inhibitoren nach der Behandlung der HCT-EV und HCT-shAHR Zellen mit Luteolin überprüft. Die Untersuchung erfolgte nach einer 24-stündigen Inkubation der Zellen mit 1, 5, 10 und 20  $\mu\text{M}$  des Flavonoids mittels der qRT-PCR.



**Abbildung 22: mRNA-Expression der p21/Cip1- und p27/Kip1-Gene nach der Inkubation mit Luteolin**

Die mRNA-Analyse der p21/Cip1- (A) und p27/Kip1 (B)-Expression erfolgte nach 24 Stunden Inkubation mit Luteolin (1, 5, 10  $\mu\text{M}$ ) in HCT-EV und HCT-shAHR Zellen. Die ermittelte Transkriptmenge wurde auf 50.000 Moleküle  $\beta$ -Aktin normiert. § signifikant höher im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle, \* signifikant höher als in HCT-shAHR Zellen.

Die in der Abbildung 22 dargestellte Expression des p21/Cip1-Gens zeigt, dass Luteolin in HCT-EV Zellen eine konzentrationsabhängige Zunahme der Transkriptmenge auslöste. Nach der Behandlung der Zellen mit 10 und 20  $\mu\text{M}$  dieser Substanz wurde im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle ein signifikanter etwa 1,4- bis 2,6-facher Anstieg der mRNA-Menge beobachtet. In den HCT-shAHR blieb die p21/Cip1-Transkription nach der Belastung mit 1-20  $\mu\text{M}$  Luteolin auf dem Level der Kontrollzellen. Verglichen mit den HCT-EV Zellen konnte in AHR-defizienten Zellen keine Luteolin-induzierte Transkription des p21/Cip1-Gens beobachtet werden. Somit war der Unterschied in der Expression des p21/Cip1-Gens zwischen beiden Zellpopulationen nach der Belastung mit 10 und 20  $\mu\text{M}$  Luteolin statistisch signifikant. Nach der Inkubation der Zellen mit 10  $\mu\text{M}$  des Flavonoids zeichnete sich in den HCT-EV Zellen eine etwa um 30% höhere Zunahme der p21/Cip1-Transkriptmenge als in HCT-shAHR Zellen ab, die mit der Erhöhung der Konzentration (20  $\mu\text{M}$ ) auf 70% anstieg.

Die Analyse der p27/Kip1-Expression in HCT-EV und HCT-shAHR Zellen zeigte, dass die Belastung der Zellen mit 1-10  $\mu\text{M}$  Luteolin keinen Einfluss auf die Transkription dieses Gens hat (vgl. Abb. 23 B). In den Zellen, die mit 20  $\mu\text{M}$  Luteolin behandelt wurden, wurde hingegen eine geringfügige, nicht

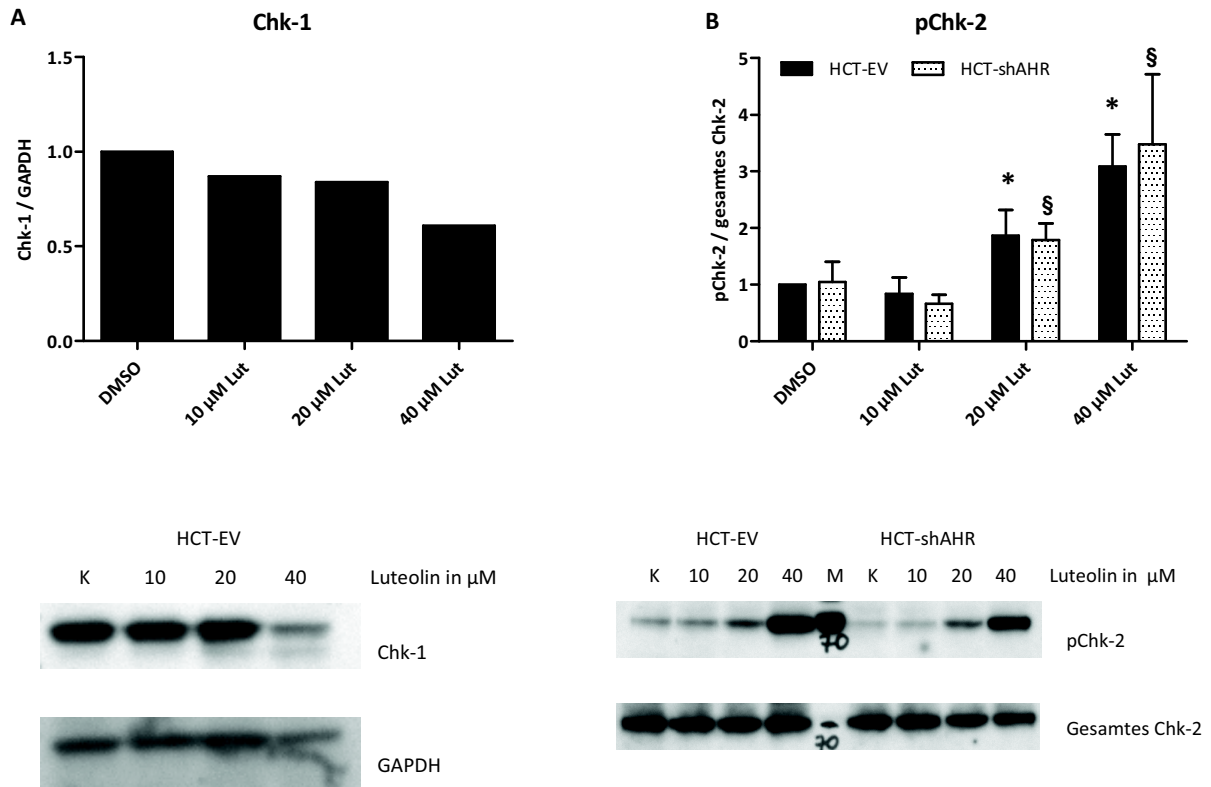
signifikante Abnahme der mRNA-Menge beobachtet, die in den HCT-shAHR etwas stärker ausgeprägt schien.

Zusammenfassend konnte mit diesem Experiment gezeigt werden, dass die Inkubation der AHR-profizienten Zellen mit Luteolin eine erhöhte p21/Cip1-Expression zur Folge hat. Die Expression des p27/Kip1-Gens wurde dagegen durch Luteolin wenig beeinflusst. Damit konnte die Vermutung bestätigt werden, dass der Luteolin-induzierte S-Phase-Arrest durch DNA-DSB-vermittelte Aktivierung des Transkriptionsfaktors p53 und der Expression des inhibitorischen Proteins p21/Cip1 verursacht werden kann. Die beobachtete verstärkte Akkumulierung der p53- und p21/Cip1-Proteine in HCT-EV Zellen führt zur Annahme, dass die Anwesenheit des AHR in diesen Zellen eine erhöhte DNA-DSB-Bildung bewirkt und dadurch eine verstärkte zelluläre Arretierung in der S-Phase begünstigt.

### **3.15. Untersuchung der Luteolin-induzierten Aktivierung der Chk-1-, Chk-2- und JNK1-Kinasen in HCT-EV und HCT-shAHR Zellen**

Beim Vorliegen eines DNA-Schadens und der daraus resultierenden Blockade der DNA-Replikation werden in den Zellen verschiedene Signalwege in Gang gesetzt. Die durch DNA-Schädigung induzierte Stressantwort erfasst zwei parallele, sich zum Teil überlappende Protein-Kinase-Kaskaden: ATM-Chk-2- und ATR-Chk-1-Kinasen Signalwege. Beide sind für die Transduktion des DNA-Schaden-Signals zu den nachgeschalteten Effektorproteinen zuständig. Eines dieser Effektorproteine ist das p53-Protein. Laut Literaturangaben wird p53 in erster Linie durch die Chk-2- und ATM-Kinasen in der Zelle stabilisiert, indem diese es vor dem enzymatischen Abbau schützen (Ahn et al., 2004). Darüber hinaus ist bekannt, dass eine weitere Kinase zur Stabilisierung des p53-Proteins beitragen kann. Dabei handelt es sich um die Proteinkinase JNK1, die ebenfalls durch genotoxischen Stress aktiviert werden kann (Dent et al., 2003; Karin et al., 1998) und die proteosomale Degradation des p53 unterdrückt (Shi et al., 2007).

Im folgenden Experiment sollte die Expression der Chk-1- und die Aktivierung der Chk-2- und JNK1-Kinasen nach der Behandlung der Zellen mit Luteolin mit Hilfe der *Western Blot*-Analyse untersucht werden. Die Dauer der Inkubation der HCT-EV und HCT-shAHR Zellen mit Luteolin (10, 20, 40  $\mu$ M) betrug 24 Stunden. Die Ergebnisse der Untersuchungen der Chk-1-Expression und der Chk-2-Phosphorylierung sind in der Abbildung 23 zusammengefasst. Die densitometrische Auswertung der gesamten zellulären Chk-1-Menge weist darauf hin, dass die Belastung der HCT-EV Zellen mit dem Flavonoid keinen stark ausgeprägten Einfluss auf die Expression dieses Proteins ausübte (vgl. Abb. 23A). Aus diesem Grund wurden keine weiteren Versuche zur Expression und Aktivierung dieses Proteins durchgeführt. Dagegen zeigte die Untersuchung der Chk-2-Aktivität einen starken Luteolin-abhängigen Effekt.

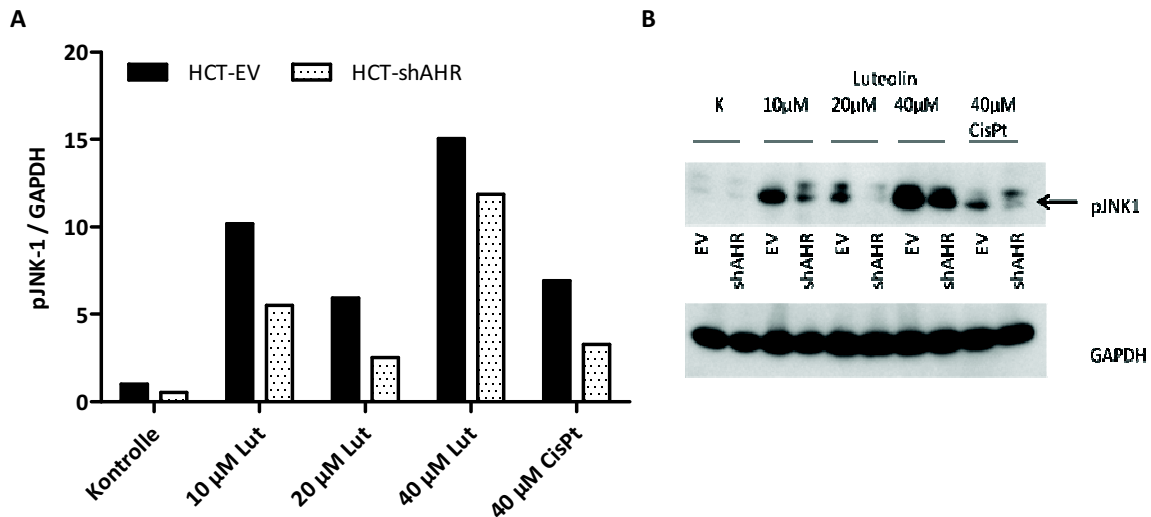


**Abbildung 23: Effekte von Luteolin auf die Expression der Chk-1- und die Aktivierung der Chk-2-Kinasen**

Western Blot Analyse der Chk-1-Expression (56 kDa) (A) und der Chk-2-Phosphorylierung (Thr 68, 62 kDa) (B) nach der 24-stündigen Inkubation mit 10, 20 und 40 µM Luteolin. Densitometrische Auswertung zeigt die Normierung des Zielproteins auf die GAPDH-Menge (36 kDa) (A) oder die Gesamtmenge des Chk-2 Proteins (B) (Chk-1: n=1, pChk-2 n=3). M: Proteinstandardmarker, \* signifikant höher als in HCT-EV Kontrollzellen, § signifikant höher als in HCT-shAHR Kontrollzellen.

Die Belastung beider Zelllinien mit 10, 20 und 40 µM dieser Substanz führte zu einem konzentrationsabhängigen signifikanten Anstieg des am Threonin 68 phosphorylierten Chk-2-Proteins (vgl. Abb. 23B). In den Zellen mit der höchsten Luteolin-Konzentration wurde eine 3-fache Zunahme des aktiven Chk-2 beobachtet. Anhand der dargestellten Ergebnisse konnten jedoch keine Unterschiede in der Luteolin-induzierten Chk-2-Phosphorylierung zwischen AHR-profizienten und AHR-defizienten Zellen festgestellt werden.

Die Ergebnisse der Untersuchung der JNK1-Phosphorylierung nach der Behandlung der HCT-EV und HCT-shAHR Zellen mit Luteolin sind in der Abbildung 24 dargestellt. Sie deuten darauf hin, dass dieses Flavonoid in der Lage war, die Aktivierung von JNK1 in beiden Zelllinien positiv zu beeinflussen. Eine Inkubation der HCT-EV Zellen mit 10, 20 und 40 µM Luteolin führte in allen Konzentrationsproben zu einem starken 10- bis 15-fachen Anstieg des pJNK1-Proteins. Allerdings schien dieser Effekt nicht konzentrationsabhängig zu sein. In HCT-shAHR wurde ebenfalls eine Zunahme der phosphorylierten JNK1-Form beobachtet, die jedoch im Vergleich zu AHR-defizienten



**Abbildung 24: Einfluss von Luteolin auf die Aktivierung der JNK1-Kinase**

Western Blot-Analyse der JNK1-Aktivierung (Thr 183/Tyr 185, 46 kDa, 54 kDa) erfolgte nach der 24-stündigen Inkubation mit 10, 20 und 40 μM Luteolin. A: Western Blot-Aufnahme. B: Densitometrische Auswertung nach der Normierung der pJNK1-Bandenintensität auf die GAPDH-Menge (n=2).

Zellen weniger stark ausgeprägt war. So zeigten die HCT-EV Zellen nach der Behandlung mit 10 μM oder 20 μM Luteolin eine etwa 50% höhere pJNK1-Proteinmenge als die HCT-shAHR Zellen. Erst bei der höchsten Luteolin-Konzentration minimierte sich die Differenz der pJNK1-Menge zwischen beiden Zelllinien auf 30%. Die Zellen der Positivkontrolle wurden mit der DNA-DSB-Modellschubstanz Cisplatin inkubiert und zeigten, wie erwartet, eine 7-fache Zunahme des phosphorylierten JNK1-Proteins in den HCT-EV Zellen und einen im Vergleich dazu um etwa 50% geringeren Anstieg des aktivierte Proteins in den HCT-shAHR Zellen. Interessanterweise war die Konzentration des pJNK1 in diesen Zellen deutlich niedriger als in den Luteolin-belasteten Zellen.

Das Fazit dieser Experimente ist, dass die Luteolin-induzierten DNA-DSB anscheinend den ATM-Chk-2-Signalweg aktivierten. Es zeigten sich allerdings keine Unterschiede in der Chk-2-Phosphorylierung in Abhängigkeit vom aktiven AHR-Signalweg. Die unveränderte zelluläre Chk-1-Proteinmenge in den HCT-EV Zellen deutete auf den fehlenden Einfluss des Flavonoids auf dessen Expression. Außerdem konnte in dargestellten Versuchen festgestellt werden, dass die Behandlung mit Luteolin zu einer stark erhöhten Zunahme der JNK1-Phosphorylierung führt, die in den Zellen mit funktionellem AHR deutlich stärker ausgeprägt ist.

## **4. Diskussion**

Luteolin, oder 3,4,5,7-Tetrahydroxyflavon, gehört zur Gruppe der Flavonoiden, die eine weite Verbreitung in der Pflanzenwelt finden. Aufgrund seiner Fähigkeit in verschiedene zelluläre Signalwege einzugreifen, werden Luteolin anti-inflammatorische, anti-allergische und anti-karzinogene Wirkungen zugeschrieben. In einigen Studien konnte gezeigt werden, dass Luteolin in der Lage ist, antagonistische Wechselwirkungen mit dem AHR einzugehen (Ashida et al., 2000; Zhang et al., 2003), welcher infolge seiner zentralen Rolle im Fremdstoffmetabolismus oft mit der chemisch-induzierten Karzinogenese in Zusammenhang gebracht wird. Einer der prominentesten Beispiele dafür ist die metabolische Aktivierung des PAK-Vertreters B(a)P durch AHR-abhängige Enzyme. Der eingeleitete B(a)P-Metabolismus kann die Entstehung von DNA-Addukten zur Folge haben und einen wichtigen Schritt für die Initiierung der Karzinogenese darstellen. Darüber hinaus wird in der Literatur berichtet, dass Luteolin auch genotoxische Eigenschaften entfalten kann (Leung et al., 2005; Michels et al., 2005; Rao et al., 2012).

In der vorliegenden Arbeit soll untersucht werden, ob das als eines der potentesten AHR-Antagonisten beschriebene Flavonoid Luteolin in der Lage ist, die metabolische Aktivierung von B(a)P durch Wechselwirkungen mit dem AHR in Kolonkarzinomzellen zu hemmen und somit den B(a)P-induzierten Mutageneseprozess zu unterbinden. Außerdem sollen im zweiten Projekt die möglichen genotoxischen Effekte von Luteolin überprüft werden. Dabei ist die Aufklärung des molekularen Wirkmechanismus dieses Flavonoids mit dem Fokus auf die AHR-Aktivität von besonderem Interesse. Erkenntnisse aus beiden Teilprojekten könnten zum besseren Verständnis der Rolle des AHR-Signalweges bei den einerseits chemopräventiven und andererseits DNA-schädigenden Eigenschaften von Luteolin beitragen.

### **4.1. Einfluss von Luteolin auf die B(a)P-induzierte DNA-Schädigung**

#### **4.1.1. Effekte von Luteolin auf die Expression der B(a)P-metabolisierenden Enzyme in Caco-2 Zellen**

Die Aufnahme von B(a)P in den Darmzellen führt zu einer Aktivierung der fremdstoffmetabolisierenden Enzyme, die bei der Entgiftung dieser Substanz eine wichtige Rolle spielen. Zu diesen Enzymen zählen unter anderem die CYP1A1 und CYP1B1, EPHX1 sowie die GSTA2. Die eingeleitete Metabolisierung endet jedoch nicht immer mit der Detoxifizierung von B(a)P. In einigen Fällen initiiert sie die Bildung des hochreaktiven Metaboliten BPDE, welches nur über die GST-vermittelte Konjugation mit dem Glutathion (GSH) inaktiviert werden kann. Im Falle der Erschöpfung des zellulären GSH-Vorrats ist das BPDE-Molekül in der Lage, mit der zellulären DNA

Bindungen einzugehen und diese zu schädigen (Marquard & Schäfer, 2004). Die entstandenen BPDE-DNA-Addukte können in den Zellen Mutationen auslösen und dadurch zur Initiierung der Tumorigenese beitragen (Harrigan et al., 2004; Jägerstad & Skog, 2005; Rubin, 2001).

Bothe et al. (2010) konnten in ihrer Arbeit zeigen, dass die kombinierte Inkubation der Kolonkarzinomzellen Caco-2 mit B(a)P und Luteolin eine signifikante Abnahme der B(a)P-stimulierten Expression von fremdstoffmetabolisierenden Enzymen CYP1A1- und UDP-Glycuronosyltransferase 1A1 (UGT1A1) zur Folge hat. Diese für den B(a)P-Metabolismus wichtigen Enzyme werden bekannterweise durch den AHR reguliert. Darüber hinaus konnte in dieser Arbeit eine signifikante Hemmung der Expression des AHR-abhängigen BCRP-Transporterproteins (*Breast Cancer Resistance Protein*) festgestellt werden, welches für die Exkretion der B(a)P-Metaboliten aus den Darmzellen zuständig ist (Ebert et al., 2005). Die beobachtete hemmende Wirkung von Luteolin auf die Transkription AHR-abhängiger Gene verursacht in Caco-2 Zellen eine stark erhöhte B(a)P-Akkumulierung und weist auf den bedeutenden Einfluss dieses Naturstoffes auf den B(a)P-Metabolismus hin.

Zur Verifizierung der Ergebnisse aus der vorgestellten Studie von Bothe et al. (2010) wurde in der vorliegenden Arbeit die Expression der in den B(a)P-Metabolismus involvierten AHR-abhängigen Enzyme CYP1A1 und GSTA2 in Caco-2 Zellen überprüft. Die Bestimmung deren Transkriptmengen erfolgte nach der Inkubation der Zellen mit 3-Methylcholanthren (3-MC) mittels der quantitativen real-time PCR. Diese Substanz gehört wie B(a)P zur PAK-Gruppe und ist als ein weiterer AHR-Ligand beschrieben. Die 6-stündige Behandlung der Zellen mit 10  $\mu\text{M}$  3-MC bewirkte eine signifikante etwa 3-fache Zunahme der CYP1A1-Transkriptmenge und ca. 1,7-fache Zunahme der GSTA2-mRNA. Wurden jedoch die Caco-2 Zellen mit verschiedenen Konzentrationen Luteolin und 3-MC gleichzeitig belastet, konnte bei beiden Genen eine signifikante dosisabhängige Reduktion der mRNA-Menge gemessen werden.

Diese Beobachtung unterstützt die Befunde der Studie von Bothe et al. (2010) und führt zur Annahme, dass Luteolin seinen hemmenden Effekt auf die Expression der B(a)P-metabolisierenden Gene durch die antagonistische Interaktion mit dem AHR ausübt.

Die Behandlung der Caco-2 Zellen mit Luteolin alleine bewirkte ebenfalls eine signifikante dosisabhängige Reduktion der CYP1A1-mRNA und wies auf die aktiven Wechselwirkungen des Flavonoids mit dem AHR hin. Im Vergleich dazu konnte nach der Inkubation der Zellen mit 20  $\mu\text{M}$  Luteolin eine ca. 1,9-fache Zunahme der GSTA2-Transkriptmenge detektiert werden, die jedoch keine statistische Signifikanz aufwies. Die Behandlung mit höheren Luteolin-Konzentrationen hatte allerdings eine Hemmung der GSTA2-Expression zur Folge.

Diese Befunde führen zur Annahme, dass dieses Polyphenol in geringen Dosen die Inaktivierung der BPDE-Metaboliten begünstigen kann, indem es die GSTA2-Expression unabhängig vom AHR positiv

beeinflusst. In der Tat zeigen die Ergebnisse der Studie von Fiander & Schneider (2000), dass einige Flavonoide, wie Quercetin, Myricetin und Fisetin, die Transkription verschiedener GST-Enzyme induzieren können. Die Aktivierung der anti-oxidativen Enzyme, zu denen auch GST gezählt wird, kann somit zur Steigerung des anti-oxidativen Potentials dieser Naturstoffe beitragen.

Die Mitglieder der CYP1A- und CYP1B-Enzymgruppen haben einen wesentlichen Beitrag bei der Entstehung des BPDE-Moleküls. In den Fütterungsstudien von Uno et al. (2001) und Dragin et al. (2008) konnte allerdings gezeigt werden, dass das Ausschalten von CYP1A1 oder gleichzeitiges Ausschalten der CYP1A1-, CYP1A2- und CYP1B1-Enzyme eine stark erhöhte Bildung der BPDE-DNA-Addukte in der Leber der Mäusen auslöst. Diese Befunde deuten darauf hin, dass außer der Vertreter der CYP1A-Familie noch weitere Enzyme in die metabolischen Aktivierung des B(a)P involviert sein können. Tatsächlich wird in der Literatur der Einfluss des Enzyms COX-2 auf die Generierung der BPDE-Metaboliten beschrieben. So führt die orale Verabreichung von B(a)P bei den Ratten eine erhöhte COX-2 Expression auf mRNA- und Proteinebenen sowie eine Verstärkung der Prostaglandinsynthese herbei (Yan et al., 2000). Die Akkumulierung der COX-2 hingegen begünstigt den Arachidonsäure-Metabolismus und somit die Entstehung des Peroxylradikals, welches in der Lage ist, den Vorgang der B(a)P-Epoxidierung und somit die Bildung der mutagenen BPDE-Verbindung zu katalysieren (Zhang et al., 1998). Außerdem kann die erhöhte B(a)P-stimulierte COX-2 Expression eine Initiierung der Entzündungsprozesse fördern, die ihrerseits die Tumorentstehung in verschiedenen Gewebearten begünstigen (Greenhough et al., 2009; Brown & DuBois, 2005).

In der Studie von Fritsche et al. (2007) konnte erstmals gezeigt werden, dass die Expression dieses Enzyms über den nicht-genomischen AHR-Signalweg aktiviert werden kann. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit die AHR-abhängige COX-2-Transkription nach der Belastung der Darmkrebszellen mit 10  $\mu$ M 3-MC mittels qRT-PCR überprüft. Die Ergebnisse der Expressionsanalyse zeigten, dass 3-MC in den Caco-2 Zellen einen etwa 2,3-fachen Anstieg der COX-2-Transkription im Vergleich zu Kontrollzellen bewirkt. Die gleichzeitige Inkubation der Zellen mit Luteolin und 3-MC führte dagegen zu einer signifikanten dosisabhängigen Abnahme der Transkriptmenge.

Diese Beobachtungen weisen darauf hin, dass Luteolin anscheinend die COX-2-Expression AHR-abhängig beeinflussen kann. Diese Vermutung wird durch die Ergebnisse der Studien von Fritsche et al. (2007) und Vogel et al. (2000) bekräftigt, in denen eine AHR-anhängige Regulation der COX-2-Transkription demonstriert werden konnte. Die beobachtete signifikante dosisabhängige Reduktion der COX-2 mRNA-Menge in den mit Luteolin alleine belasteten Zellen kann allerdings auch durch andere Signalkaskaden als den AHR-Signalweg initiiert werden. So wird in den *in vitro* und *in vivo* Studien von Chen et al. (2007) und Li et al. (2012) berichtet, dass dieses Flavonoid die COX-2-Genexpression durch die Inhibierung der NF $\kappa$ B- und AP-1 Signalwege in Lungenepithelzellen und alveolären Makrophagen reduzieren kann.



#### 4.1.2. AHR-abhängige Effekte von Luteolin auf B(a)P-induzierte DNA-Schädigung in HCT-EV und HCT-shAHR Zellen

Die Unterdrückung der B(a)P-induzierten Expression der CYP1A1- und COX-2-Enzyme durch Luteolin kann eine schwächere Umsetzung dieser Substanz und die daraus resultierende verminderte Bildung der reaktiven BPDE-Metaboliten in den Zellen zur Folge haben. Da das Enzym COX-2 laut Literaturangaben eine bedeutende Rolle bei der Generierung der toxischen B(a)P-Metaboliten hat (Zhang et al., 1998), wurde in dieser Arbeit eine weitere Kolonkarzinomzelllinie HCT116 verwendet. Das Besondere an diesen Zellen ist die fehlende COX-2-Expression (Liu et al., 2003; Sheng et al., 1996; Sheng et al., 1998). Um COX-2-abhängige Effekte auszuschließen sind die HCT116 Zellen für die weiteren Untersuchungen der Luteolin-vermittelten Effekte auf die B(a)P-induzierte DNA-Schädigung interessant.

Um zu überprüfen, ob auch die in dieser Arbeit verwendeten HCT116 Zellen kein COX-2 besitzen, wurde die basale Expression dieses Enzyms mit Hilfe der qRT-PCR bestimmt. Dabei konnte festgestellt werden, dass diese Zelllinie, wie in der Literatur beschrieben, kein COX-2 exprimiert. Dagegen wiesen die als Positivkontrolle eingesetzten Caco-2-Zellen eine um etwa 3 000 000-fach höhere basale Transkriptmenge des Enzyms im Vergleich zu den HCT116 auf.

Die Befunde aus dem Caco-2 Zellmodell lassen darauf schließen, dass die inhibitorischen Effekte von Luteolin auf die Expression B(a)P-metabolisierender Enzyme und auf die daraus resultierende mögliche Reduktion der BPDE-DNA-Addukt-Bildung durch die direkte Wechselwirkung des Flavonoids mit dem AHR-Signalweg entstehen. Um diese Hypothese zu belegen, wurden AHR-defiziente HCT116-Zellen mit Hilfe der stabilen shRNA-Transfektion (HCT-shAHR) und die entsprechenden AHR-profizienten Kontrollzellen (HCT-EV) generiert. Nach dem durchgeführten AHR-*knockdown* wiesen die HCT-shAHR Zellen eine signifikante Reduktion der AHR-Transkriptmenge um etwa 73% auf. Die anschließende Untersuchung der Induzierbarkeit des typischen AHR-Zielgens CYP1A1 in beiden Zelllinien ergab ebenfalls eine 74% Abnahme der B(a)P-induzierten Genexpression in den HCT-shAHR Zellen. Diese Befunde deuteten somit auf die erfolgreiche signifikante Hemmung der AHR-Aktivität hin. Parallel zu den HCT116-Zellen wurde die stabile Transfektion mit der AHR-shRNA auch in der Caco-2-Zelllinie durchgeführt, für die dieser Vorgang jedoch letal war.

Die mRNA-Expressionsanalysen in der Caco-2 Zelllinie zeigten, dass Luteolin in der Lage ist, die 3-MC-induzierte Transkription der AHR-abhängigen CYP1A1- und GSTA2-Gene zu hemmen. Um zu überprüfen, ob die beobachteten Effekte auch in den HCT116 Zellen auftreten, wurde die mRNA-Expression dieser Gene in HCT-EV und HCT-shAHR Zellen bestimmt. Dabei konnte festgestellt werden, dass Luteolin die CYP1A1- und GSTA2-Expression in HCT-EV Zellen dosisabhängig hemmt. Wurden diese Zellen mit 3-MC behandelt, konnte eine etwa 2-fache Zunahme der CYP1A1- und GSTA2-Expression beobachtet werden, die jedoch durch die Gabe von Luteolin

konzentrationsabhängig inhibiert wurde. Im Gegensatz dazu wurde in den HCT-shAHR Zellen sowohl nach der Behandlung mit Luteolin als auch nach der kombinierten Belastung mit 3-MC und dem Flavonoid keine detektierbare Änderung der Transkriptmenge beider Gene beobachtet.

Diese Ergebnisse weisen somit darauf hin, dass Luteolin die basale und die induzierte Expression der B(a)P-metabolisierenden Enzyme CYP1A1 und GSTA2 in HCT-EV Zellen, ähnlich wie in den Caco-2 Zellen, hemmen kann. Da Caco-2 als ein Zellmodell für die humanen Dünndarmzellen angesehen wird (Chantret et al., 1988), kann angenommen werden, dass die beobachteten Effekte des Flavonoids in dieser und der HCT-EV-Zelllinien physiologisch relevant sind. Die fehlende Aktivierung der Genexpression in HCT-shAHR Zellen unterstreicht die bedeutende Rolle des AHR für die inhibierenden Effekte dieses Naturstoffes.

Die Untersuchung der Expression des Enzyms EPHX1, welches eine bedeutende Rolle bei der metabolischen Aktivierung des B(a)P spielt (Conney, 1982; Gelboin, 1980), zeigte, dass die Belastung der HCT-EV Zellen mit 3-MC und Luteolin im Vergleich zu Kontrollzellen keine erheblichen Unterschiede in den mRNA-Mengen bewirkt. Da die EPHX-Transkriptmenge in allen Proben sehr gering war, könnte eine schwache Expression dieses Gens in HCT116 Zellen nicht ausgeschlossen werden. Aus diesem Grund wurde auf weitere Experimente mit den HCT-shAHR Zellen verzichtet.

In den Genexpressionsanalysen konnte gezeigt werden, dass Luteolin die CYP1A1-Transkription AHR-abhängig hemmen kann. Um zu überprüfen, ob die Luteolin-vermittelte CYP1A1-Inhibierung über die Hemmung des AHR-Signalweges erfolgt, wurde die Aktivität dieses Enzyms mittels EROD-Assays bestimmt. Wie erwartet, führte die Behandlung der HCT-EV Zellen mit B(a)P zu einer signifikanten 12-fachen Erhöhung der CYP1A1-Aktivität, die durch Zugabe von Luteolin vollständig unterdrückt wurde. Dieser Befund deutete stark darauf hin, dass zwischen Luteolin und dem AHR eine direkte Wechselwirkung stattfindet. Außerdem konnte in dieser Untersuchung eine starke dosisabhängige Abnahme der Enzymaktivität nach der Inkubation der HCT-EV Zellen mit den höheren B(a)P-Konzentrationen festgestellt werden, die anscheinend auf die enzymatische Substrathemmung zurückzuführen ist (Petrulis & Bunce, 1999). Im Vergleich zu HCT-EV Zellen wurde das CYP1A1-Enzym nach der B(a)P-Inkubation in den HCT-shAHR Zellen kaum aktiviert, was nochmals auf eine erfolgreiche Hemmung des AHR in diesen Zellen hindeutet.

In der Literatur gibt es allerdings Hinweise auf mögliche direkte Interaktionen zwischen Flavonoiden und dem CYP1A1-Enzym, wodurch dessen Aktivität ebenfalls gehemmt werden kann. In den Arbeiten von Ciolino et al. (1998) und Takemura et al. (2010) wurde beispielsweise demonstriert, dass die Belastung der MCF-7 Zellen mit Chrysoeriol oder Curcumin eine signifikante Inhibierung der CYP1A1-Aktivität bewirkt. Um zu überprüfen, ob auch Luteolin die CYP1A1-Aktivität durch die direkte Bindung beeinflussen kann, wurde die spezifische katalytische Aktivität dieses Enzyms im EROD-Assay

untersucht. Es konnte beobachtet werden, dass Luteolin, wenn es kurz vor der Messung der CYP1A1-Aktivität zu den Zellen gegeben wurde, zu keiner Veränderung der B(a)P-induzierten Enzymaktivität führt. Dieses Experiment zeigte, dass die beobachtete Hemmung der CYP1A1-Expression durch Luteolin auf der direkten antagonistischen Interaktion mit dem AHR und nicht auf der Inhibierung der katalytischen CYP1A1-Enzymaktivität beruht.

Die im EROD-Assay beobachtete Hemmung der AHR-Aktivität durch Luteolin kann eine Reduktion des B(a)P-Stoffwechsels und somit die verminderte Generierung von BPDE-Metaboliten zur Folge haben. Dies führt zur Annahme, dass Luteolin protektiv gegenüber der BPDE-DNA-Addukt-Bildung wirken kann. Um diese Annahme zu bestätigen wurde in folgenden Experimenten überprüft, ob Luteolin die B(a)P-vermittelte BPDE-DNA-Bildung AHR-abhängig unterdrücken kann.

Die Untersuchung der B(a)P-induzierten BPDE-DNA-Addukt-Bildung in HCT-EV Zellen erfolgte zunächst mit Hilfe der immunzytochemischen Färbung. Die Ergebnisse dieses Experiments zeigten eine dosisabhängige Zunahme der DNA-Addukte nach der Gabe von B(a)P. Die weiterführende Untersuchung der BPDE-DNA-Addukt-Bildung mit B(a)P und Luteolin zeigte allerdings eine unspezifische Färbung der zellulären Strukturen nach der Belastung der Zellen mit dem Flavonoid, die eine Auswertung unmöglich machte. Als eine der möglichen Ursachen dafür wurde die Ähnlichkeit der chemischen Struktur von Luteolin mit dem BPDE-Molekül angenommen.

Um weitere Untersuchungen der Luteolin-Effekte auf die Entstehung der BPDE-DNA-Addukte zu ermöglichen, wurden zwei indirekte Methoden - der alkalische Comet-Assay und Zellzyklusanalysen (FACS) - angewandt. Dabei diente die Bestimmung der DNA-Schädigung als indirekter Nachweis der BPDE-DNA-Addukt-Bildung.

Die Ergebnisse des alkalischen Comet-Assays mit der Bildung der DNA-ESB als Endpunkt zeigten, dass die Belastung der HCT-EV Zellen mit B(a)P einen signifikanten konzentrations- (2,5, 5, 10  $\mu$ M) und zeitabhängigen (6, 24h) Anstieg der Zellen mit geschädigter DNA auslöst, und spiegelten somit die Beobachtungen der immunzytochemischen Färbung der BPDE-DNA-Addukte wieder. Die anschließende Untersuchung des präventiven Potentials von Luteolin gegenüber der B(a)P-induzierten DNA-Schädigung ergab eine signifikante Reduktion der B(a)P-induzierten DNA-ESB-Bildung durch Luteolin in den AHR-profizienten Zellen, die unabhängig von der Konzentration des Flavonoids zu sein schien. Im Gegensatz dazu konnte in den HCT-shAHR Zellen sowohl nach der Exposition mit B(a)P als auch nach der Koinkubation mit beiden Substanzen keine Fragmentierung der DNA in Folge der entstandenen DNA-ESB detektiert werden. Diese Ergebnisse weisen stark darauf hin, dass die chemoprotektiven Effekte von Luteolin gegenüber der B(a)P-initiierten Generierung der DNA-ESB nur in Anwesenheit des AHR in den Zellen ausgeübt werden können.

Zur Unterstützung dieser Hypothese sollte eine weitere indirekte Messung der BPDE-DNA-Addukt-Bildung etabliert werden. Die Literaturrecherche brachte einige Studien hervor, in denen gezeigt

werden konnte, dass die durch B(a)P oder BPDE initiierte Entstehung von sogenannten *bulky adducts* in der DNA (ATSDR, 1995; IPCS/EHC, 1998) Störungen im Zellzyklusablauf hervorruft. Ergebnisse der Arbeit von Jeffy et al. (2000) zeigen, dass die Exposition der MCF7-Zellen gegenüber 5  $\mu\text{M}$  B(a)P eine zelluläre Arretierung in den S- und G2/M-Phasen des Zellzyklus auslöst. In etlichen weiteren Studien wird jedoch berichtet, dass die metabolische Aktivierung von B(a)P vor allem eine verstärkte S-Phase-Akkumulierung der Zellen verschiedener Gewebe bewirkt (Guo et al., 2002; Qi et al., 2009; Weiss et al., 2003; Yao et al., 2007). Ein Grund für die Arretierung der Zellen in der S-Phase ist die Entstehung der DNA-Einzelstrangbrüche in Folge der BPDE-DNA-Addukt-Bildung und die daraus resultierende Blockierung der DNA-Replikation. Durch den eingeleiteten Zellzyklusarrest wird in den Zellen die Reparatur der geschädigten DNA-Bereiche ermöglicht. Somit kann der S-Phase-Arrest als Endpunkt für die B(a)P-induzierte DNA-Schädigung angesehen werden.

In dieser Arbeit erfolgten die Zellzyklusanalysen in synchronisierten HCT-EV und HCT-shAHR Zellen. Die 16-stündige Belastung der HCT-EV Zellen mit 1 und 5  $\mu\text{M}$  B(a)P zeigte eine geringfügige aber statistisch signifikante Zunahme der arretierten Zellen in der S-Phase des Zellzyklus. Im Vergleich dazu konnte in den HCT-shAHR Zellen keine Änderung des zellulären S-Phase Anteils nach der B(a)P-Exposition beobachtet werden. Interessanterweise führte aber die Belastung der HCT-EV und HCT-shAHR Zellen mit 20  $\mu\text{M}$  Luteolin zu einem signifikanten etwa 2,5-fachen Anstieg der zellulären Akkumulation in der S-Phase. Die Belastung dieser Zellen mit beiden Substanzen zeigte ebenfalls eine verstärkte Arretierung der Zellen im Vergleich zu den B(a)P-behandelten Proben. Die Zunahme des zellulären Anteils in der S-Phase erfolgte dabei in Abhängigkeit von den steigenden Luteolin-Konzentrationen und war in den AHR-profizienten HCT-Zellen eindeutig höher als in Zellen mit gehemmter AHR-Aktivität.

Die vorgestellten Befunde der Zellzyklusanalyse konnten die Beobachtungen aus dem Comet-Assay und der Immunzytochemie nicht bestätigen. Im Vergleich zu den anderen Assays zeigten die B(a)P-belasteten Zellen bei der Zellzyklusanalyse ein viel geringeres Ausmaß der DNA-Schädigung. Auch die Behandlung mit Luteolin führte nicht zur erwarteten Reduktion der B(a)P-vermittelten DNA-Schädigung sondern verstärkte den gentoxischen Effekt in den Zellen unabhängig vom B(a)P. Die erhöhte Schädigung der DNA und die daraus resultierende erhöhte Arretierung der Zellen in der S-Phase nach der Belastung mit Luteolin könnte durch die in der Literatur beschriebenen Fähigkeit dieses Naturstoffes, die DNA-Doppelstrangbrüche zu initiieren, erklärt werden (Chowdhury et al., 2002; Yamashita & Kawanishi, 2000). Die Tatsache, dass die DNA-schädigende Wirkung von Luteolin im alkalischen Comet-Assay nicht detektiert werden konnte, ist auf die primäre Entwicklung dieser Methode für den Nachweis der DNA-Einzelstrangbrüche zurückzuführen. Die Untersuchung der gentoxischen Effekte beider Substanzen mittels Zellzyklusanalysen zeigte im Gegensatz dazu eine Arretierung der Zellen in der S-Phase unabhängig von der Form des vorliegenden DNA-Schadens.

Die toxische Wirkung von B(a)P beruht laut Literatur nicht nur auf der Ausbildung von BPDE-DNA-Addukten sondern kann durch den Einfluss auf den intrazellulären ROS-Status verstärkt werden (Xue & Warshawsky, 2005). Beim Stoffwechselprozess dieser Substanz kann durch eine enzymatische Oxidierung das B(a)P-7, 8-Catechol entstehen. Dieses Metabolit wird in den Zellen über eine weitere Oxidierung durch intrazelluläre ROS wie Sauerstoffradikale und Wasserstoffperoxid zum reaktiven o-Semichinon umgewandelt. Die Fähigkeit dieser Verbindung zur Autooxidation führt zur Initiierung der Redox-Zyklus-Reaktionen und zur verstärkten Generierung der reaktiven Sauerstoffspezies, in Folge dessen die oxidativen DNA-Modifikationen entstehen können. Darüber hinaus können auch die B(a)P-metabolisierenden CYP1A-Enzyme durch ihre enzymatische Aktivität die intrazelluläre ROS-Bildung fördern. Die pro-oxidativen Eigenschaften von B(a)P können somit dessen karzinogene Aktivität zusätzlich unterstützen (Xue & Warshawsky, 2005).

Die Untersuchung des pro-oxidativen Potentials von B(a)P erfolgte in der vorliegenden Studie anhand der Bestimmung der intrazellulären ROS-Menge mit Hilfe der Fluoreszenzsonde 2',7'-Dichlorofluorescein. In diesem Experiment konnte gezeigt werden, dass die Belastung der HCT-EV Zellen mit 10 µM dieser Substanz zu einem etwa 1,3-fachen Anstieg der ROS-Menge führt. Obwohl der Unterschied zwischen den Zellen der Lösungsmittelkontrolle und den B(a)P-belasteten Zellen statistisch signifikant war, waren die pro-oxidativen Effekte von B(a)P im Vergleich zu den Beobachtungen aus anderen Studien wesentlich schwächer ausgeprägt (Kangting et al., 2013; Leadon et al., 1988; Stedeford et al., 2001; Tsuji et al., 2011). Die fehlende Zunahme der intrazellulären ROS in HCT-shAHR Zellen deutete auf die wichtige Rolle des AHR bei der ROS-Bildung hin. Diese Beobachtung wird durch die Ergebnisse der Studie von Tsuji et al. (2011) bestätigt, in der gezeigt werden konnte, dass die Ausschaltung des AHR in Keratinozyten die B(a)P-vermittelte ROS-Entstehung vollständig unterdrückt. Als Grund dafür wird die Hemmung der Expression des AHR-abhängigen CYP1A1-Enzyms angegeben, welches für die Generierung der Redox-potenten B(a)P-7,8-Catecholverbindung notwendig ist (Xue & Warshawsky, 2005). Mit dieser Untersuchung konnte somit demonstriert werden, dass die beobachtete B(a)P-induzierte DNA-Schädigung durch die pro-oxidativen Eigenschaften dieser Verbindung zusätzlich beeinflusst werden könnte. Die Belastung der Zellen mit Luteolin würde möglicherweise in diesem Fall die AHR-abhängige Unterdrückung der CYP1A1-Aktivität auslösen und die B(a)P-vermittelte ROS-Bildung inhibieren.

Zusammenfassend konnte in diesem Teil der experimentellen Arbeit gezeigt werden, dass das Flavonoid Luteolin die Expression der B(a)P-metabolisierenden Enzyme CYP1A1, COX-2 und GSTA2 durch die Hemmung des AHR-Signalweges in Kolonkarzinomzellen unterdrücken kann. Die Inhibierung der Transkription dieser Gene könnte zu der im Comet-Assay beobachteten signifikanten Reduktion der B(a)P-vermittelten DNA-Einzelstrangbruchbildung in den AHR-profizienten Zellen führen. Da die Detektion der fragmentierten DNA bei dieser Methode als indirekter Nachweis der

BPDE-DNA-Addukt-Bildung gilt, kann angenommen werden, dass Luteolin die Generierung von BPDE-DNA-Addukten unterbinden kann. Die gezeigten pro-oxidativen Eigenschaften von B(a)P in der Anwesenheit des funktionellen AHR schließen außerdem die mögliche Unterdrückung der oxidativen DNA-Schädigung durch die Wechselwirkung dieses Flavonoids mit dem Rezeptor nicht aus. Diese Beobachtungen führen zur Annahme, dass Luteolin in der Lage ist, die intrazelluläre B(a)P-Metabolisierung aufgrund seiner antagonistischen Effekte auf die AHR-Aktivität zu inhibieren und somit protektiv gegen die B(a)P-induzierte DNA-Schädigung und gegen den damit verbundenen Mutageneseprozess zu wirken. Die Fähigkeit zur Unterdrückung des genotoxischen Potentials von PAK-Substanzen kann zur Erweiterung des in der Literatur beschriebenen anti-kanzerogenen Potentials von Luteolin beitragen. Für die endgültige Bestätigung dieser Hypothese sind jedoch weitere Experimente mit dem direkten Nachweis der Luteolin-vermittelten Hemmung der BPDE-DNA-Addukt-Bildung, beispielsweise mit Hilfe der  $P^{32}$ -*postlabeling* Methode, notwendig.

#### **4.2. AHR-abhängige Effekte von Luteolin auf die DNA-Integrität der Kolonkarzinomzellen**

Luteolin wird in der Literatur aufgrund seiner anti-inflammatorischen, pro-apoptotischen und anti-kanzerogenen Eigenschaften als ein mögliches Krebstherapeutikum diskutiert. Befunde einiger *in vivo*-Studien mit den subkutanen *Xenograft*-Mausmodellen zeigen, dass Luteolin das Wachstum der aus den humanen Hautkrebs-, Ovarialkrebs- und Hepatomzellen entstandenen Tumoren dosisabhängig inhibieren kann (Bagli et al., 2004; Chiang et al., 2007; Selvendiran et al., 2006). Interessanterweise führte auch die Fütterung der Wistar-Ratten mit Luteolin, in denen zuvor mit Hilfe der PAK-Substanz 7,12-Dimethylbenz(a)anthracene (DMBA) Brustkrebs induziert wurde, zu einer signifikanten Abnahme der Tumorinzidenz und Tumorgroße (Samy et al., 2006). Laut Literatur beruhen die anti-kanzerogenen Eigenschaften dieses Naturstoffes auf seiner Fähigkeit, in die zahlreichen Signalwege, die in die Prozesse der Apoptose, Angiogenese und der Metastasierung involviert sind, einzugreifen (Lin et al., 2009). Außerdem kann Luteolin, wie auch im vorherigen Kapitel gezeigt, die metabolische Aktivierung pro-kanzerogener Substanzen unterbinden und die Zellen so vor Mutationen und der möglichen Initiierung der Tumorigenese schützen (Kim et al., 2005; Miller & Ramos, 2001).

In früheren sowie aktuellen Studien mit verschiedenen polyphenolischen Naturstoffen wird berichtet, dass viele Flavonoide den Zellzyklus von Krebszellen beeinflussen können, wodurch das anti-proliferative bzw. pro-apoptotische Potential dieser Verbindungen unterstützt wird. Die Inhibierung der Zellproliferation durch Flavonoide erfolgt in erster Linie durch die Arretierung der Zellzyklusprogression in den G1/S oder G2/M-Phasen. So führt die Inkubation der Brustkrebszellen

MDA-MB 468 mit dem Flavonoid Silymarin zu einer starken zellulären Akkumulierung in der G1-Zellzyklusphase (Zi et al., 1998). Die Behandlung dieser Zellen sowie der Kolonkarzinomzelllinien SW 480, HT-29 und Caco-2 mit dem Luteolin-verwandten Polyphenol Apigenin bewirkt dagegen einen G2/M-Arrest (Lindenmeyer et al., 2001; Wang et al., 2000). Ein ähnlicher Effekt wird nach der Exposition der Magenkrebszellen HGC-27 mit dem Flavonoid Genistein beobachtet (Matsukawa et al., 2001). Manche Flavonoide, wie beispielsweise Baicalein, können in den Krebszellen einen S-Phase Arrest mediiieren (Yu et al., 2013). Als wichtige Ursachen für die Arretierung der Zellen in verschiedenen Phasen des Zellzyklus werden die Unterdrückung der Aktivität phasenspezifischer Cyclin/CDK-Komplexe durch Flavonoide und das genotoxische Potential dieser Verbindungen betrachtet.

In den Arbeiten von Casagrande & Darbon (2001) und Lim et al. (2007) wird gezeigt, dass auch Luteolin die Akkumulierung verschiedener Krebszellen in den Zellzyklusphasen induzieren kann. So löst die Exposition der Kolonkarzinom- und Melanomzellen gegenüber Luteolin einen erhöhten G1-Phase-Arrest. Aus diesen Arbeiten geht hervor, dass die Luteolin-induzierte Zellakkumulierung in dieser Phase mit der Inhibierung der CDK2-Enzymaktivität assoziiert ist. Die Aktivitätshemmung dieses Enzyms erfolgt dabei entweder durch die direkte Interaktion mit dem Flavonoid oder über die Luteolin-vermittelte Induktion der CDK-Inhibitoren p27/Kip1 und p21/Cip1. Ergebnisse einer weiteren Studie zeigen, dass Luteolin die Arretierung der tsFT210-Mauskrebszellen in der G1/M-Phase bewirken kann (Li et al., 2005). Als Grund für den Zellzyklusarrest geben die Autoren dieser Arbeit die Luteolin-induzierte Aktivitätszunahme des Tumorsuppressorproteins p53 und des CDK-Inhibitors p21/Cip1 an, die auf eine zuvor entstandene DNA-Schädigung hinweist. In der Tat wird diesem Flavonoid die Fähigkeit zur Bindung an die DNA-Topoisomerasen und damit zur Inhibierung der Enzymaktivität zugeschrieben (Yamashita & Kawanishi, 2000; Chowdhury et al., 2002). Diese Enzyme sind vor allem bei der Zellteilung und der DNA-Reparatur unentbehrlich. Die Luteolin-induzierte Hemmung der Topoisomerasen I und II kann auf zwei verschiedene Wege eingeleitet werden: 1) durch die Interkalierung in die DNA, 2) durch die direkte Interaktion mit den beiden Enzymen (Boege et al., 1996; Fortune & Osheroff, 1998). Beide Möglichkeiten der Unterdrückung der Topoisomerasen-Aktivität haben in den Zellen die DNA-Einzelstrang- (Topoisomerase I) oder DNA-Doppelstrangbruchbildung (Topoisomerase II) zur Folge (Liu, 1994).

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Zellzyklusanalysen in den AHR-profizienten und AHR-defizienten HCT116-Zellen nach der Belastung mit B(a)P und Luteolin zeigten eine verstärkte Akkumulierung der Zellen in der S-Phase. Dabei schien diese mehr durch Luteolin als durch das B(a)P induziert zu sein. Die anschließende Untersuchung des Zellzyklusarrests nach der Inkubation beider Zelllinien mit verschiedenen Luteolin-Konzentrationen ergab einen dosisabhängigen signifikanten Anstieg der arretierten HCT-EV Zellen. Im Gegensatz dazu bewirkte Luteolin in den HCT-shAHR Zellen

eine eindeutig geringere Akkumulierung in der S-Phase. Der Unterschied in der Anzahl der arretierten Zellen zwischen beiden Zelllinien war vor allem nach der Exposition mit niedrigen Flavonoid-Konzentrationen (5, 10  $\mu\text{M}$ ) statistisch signifikant.

In Zusammenhang mit den Hinweisen auf das DNA-schädigende Potential von Luteolin deuten die Ergebnisse dieses Experiments darauf hin, dass der Luteolin-vermittelte S-Phase-Arrest mit großer Wahrscheinlichkeit auf seine genotoxischen Effekte zurückzuführen ist und durch die Präsenz des AHR in den Kolonkarzinomzellen beeinflusst werden kann. Andererseits könnte die beobachtete Akkumulierung der HCT-EV Zellen in der S-Phase auf einen erhöhten DNA-Replikationsvorgang und somit auf eine verstärkte Proliferation hinweisen. Um diese Möglichkeit zu überprüfen, wurden die Effekte von Luteolin auf die Zellproliferation getestet. Dabei konnte festgestellt werden, dass die Zellteilung der HCT-EV und HCT-shAHR Zellen mit der Erhöhung der Luteolin-Konzentrationen signifikant abnimmt. Der Vergleich beider Zelllinien zeigte, dass die AHR-defizienten Zellen in allen Behandlungsproben eine signifikante etwa um 30% geringere Proliferationsrate als die AHR-profizienten Zellen aufweisen. Der beobachtete Unterschied in der Zellteilung der HCT-EV und HCT-shAHR Zellen deutet auf eine wichtige Funktion des AHR in diesem Prozess hin. Tatsächlich konnte schon im Jahre 1982 in der Arbeit von Poland & Knutson festgestellt werden, dass die Behandlung von Mäusen mit TCDD oder anderen AHR-Liganden eine veränderte Zellproliferation und Zelldifferenzierung bewirkt. In späteren *in vitro* Studien zur Untersuchung des Zusammenhangs zwischen dem AHR und dem Zellzyklus konnte gezeigt werden, dass der AHR auch liganden-unabhängig für die Zellteilung wichtig ist (Poland & Knutson, 1981). Die Ausschaltung des AHR bewirkte beispielsweise in murinen und humanen Hepatomzellen eine viel langsamere Progression durch den Zellzyklus (Ma & Whitlock, 1996; Abdelrahim et al., 2003). Im Gegensatz dazu führte die Liganden-vermittelte Steigerung der AHR-Aktivität zur Stimulierung verschiedener MAPK-Signalwege, wodurch die Zellproliferation begünstigt wird (Marlowe & Puga, 2005).

Auch im Bezug auf die inhibitorischen Effekte von Luteolin auf die Zellproliferation liefert die Literatur zahlreiche Hinweise. So konnte nach der Behandlung mit diesem Flavonoid in verschiedenen humanen Zelllinien, wie beispielsweise Brust- (MCF-7), Hirn- (GMB) und Bauchspeicheldrüsentumorzellen (MiaPaCa-2) eine Reduktion der Zellteilungsrate festgestellt werden (Lee et al., 2002; Tsai et al., 2013; Wang et al., 2012). Für die Luteolin-vermittelte Hemmung der Zellteilung wird hauptsächlich die negative Regulation der Aktivität der Wachstumsfaktoren und den im Zellzyklus involvierten Enzyme diskutiert. Beide Möglichkeiten können eine Zellzyklusblockade initiieren (Lin et al., 2008).

Es ist bekannt, dass die hohe Teilungsrate der Krebszellen durch die Hormone, wie Östrogene, begünstigt werden kann. Die Östrogenrezeptoren (ER) werden aufgrund ihrer strukturellen und funktionellen Unterschiede in zwei Gruppen - ER alpha und ER beta - unterteilt. ER alpha wird



hauptsächlich in den Zellen des Reproduktionstraktes und des Brustgewebes exprimiert. Seine erhöhte Expression in Brusttumoren führt zu einer starken Responsivität der entarteten Zellen gegenüber dem typischen Östrogenhormon 17- $\beta$ -Estradiol (Chalbos et al., 1982) und zur damit einhergehenden verstärkten Zellproliferation. Dadurch wird die Rolle des ER alpha in der Progression der Brustkrebserkrankung hervorgehoben (Henderson et al., 1982; Kyprianou et al., 1991; Lippman et al., 1976). Im Vergleich zu ER alpha wird ER beta weniger im Fortpflanzungsgewebe und dafür mehr in vielen anderen Organgeweben wie Prostata, Darm, kardiovaskuläres und Nervensystemen exprimiert. Die Untersuchungen zur Rolle dieses ER-Subtypes in der Kolonkarzinogenese weisen darauf hin, dass die in gesunden Zellen der Darm-Mukosa dominante ER beta-Expression in Darmtumorzellen stark reduziert ist (Di Leo et al., 2008; Konstatinopoulos et al., 2003). Epidemiologischen Studien zeigen, dass zwischen der verminderten Expression dieses Rezeptors und der schnelleren Progression der Darmkrebserkrankung eine Korrelation besteht (Castiglione et al., 2008). Demnach werden dem ER beta tumorsuppressive Eigenschaften zugeschrieben. In der Tat konnte in einigen Arbeiten nachgewiesen werden, dass dieses Rezeptorprotein durch die positive Regulation der Expression von CDK-Inhibitoren p21/Cip1 und p27/Kip1 den G2-Phase-Arrest in den Krebszellen einleiten und dadurch deren Proliferation hemmen kann (Paruthiyil et al., 2004; Strom et al., 2004).

Aus den neueren Forschungsarbeiten ist bekannt, dass die ER- und AHR-Signalwege sich untereinander beeinflussen können. Die *in vitro* und *in vivo* durchgeführten Experimente mit dem typischen AHR-Agonisten TCDD weisen auf die anti-östrogene Effekte dieser Substanz hin (Safe & Wormke, 2003). Auch in weiteren Publikationen von Brunnberg et al. (2003), Ruegg et al. (2008) und Kietz et al. (2004) wird die AHR-ARNT-abhängige negative Regulation der ER-Expression und der ER-Aktivität beschrieben. Interessanterweise beobachten die Autoren, dass TCDD einen stärkeren anti-östrogenen Effekt auf die ER beta-abhängigen Aktivitäten ausübt. Diese Feststellung gibt einen Hinweis für den möglichen Subtyp-spezifischen Mechanismus.

Zur Überprüfung der verstärkten Luteolin-vermittelten Effekte auf den Zellzyklus der HCT-EV Zellen in Abhängigkeit vom aktiven ER-Signalweg, wurde die basale Expression beider Östrogenrezeptoren in untersuchten Zellen sowie die Induktion ihres gemeinsamen Zielgens GREB1 nach der Belastung mit diesem Flavonoid durchgeführt. Ergebnisse dieser Versuche zeigten, dass beide ER-Subtypen in HCT-EV Zellen exprimiert werden. Interessanterweise konnte in diesen Zellen festgestellt werden, dass ER alpha wider Literaturangaben etwa in gleichem Masse wie ER beta exprimiert wird (Arai et al., 2000; Waliszewski et al., 1997). Die anschließende Untersuchung der GREB1-Expression nach der Inkubation mit verschiedenen Luteolin-Konzentrationen deutete darauf hin, dass das untersuchte Flavonoid bis 80  $\mu$ M keinen signifikanten Einfluss auf die Transkription dieses Gens hat.

Abschließend konnte mit diesem Versuch gezeigt werden, dass Luteolin in HCT-EV Zellen keine pro-östrogenen Effekte ausübt.

Zusammenfassend deuten die Ergebnisse der Proliferations- und ER-Expressionsanalysen darauf hin, dass die Luteolin-induzierte Arretierung der HCT-EV und HCT-shAHR Zellen nicht durch die verstärkte Zellteilung und unabhängig vom ER-Signalweg initiiert wird. Die Vermutung für die Luteolin-vermittelte DNA-Schädigung als Ursache für die Zellzyklusblockade kann dadurch bestätigt werden. Es sind zwei verschiedene Möglichkeiten für das genotoxische Effekte dieses Naturstoffes in der Zelle vorstellbar: 1) oxidative DNA-Schäden, 2) Induktion der DNA-Doppelstrangbrüchen durch die Hemmung der DNA-Topoisomerasen.

In der Literatur wird beschrieben, dass viele Flavonoide nicht nur über die anti-oxidativen Eigenschaften verfügen sondern auch die Generierung der reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) auslösen können. Untersuchungen des oxidierenden Potentials dieser Verbindungen im zellfreien System ergaben, dass einige Flavonoide, wie Myricetin, Baicalein und Quercetin, in höheren Konzentrationen zu den stärksten ROS-Bildner gehören (Miura et al., 1998). Am Beispiel von Quercetin konnte in der Arbeit von Metodiewa et al. (1999) das pro-oxidative Potential pflanzlicher Polyphenole auch im Zellsystem bestätigt werden. So wurde Quercetin nach der zellulären Aufnahme durch die metabolische Degradierung zu einer Quinon-Verbindung umgewandelt. Diese oxidoreduktive Aktivierung resultierte sich in der verstärkten Generierung der ROS-Moleküle, meist Superoxide und  $H_2O_2$ , und in der Beeinflussung verschiedener zellulären Signalwege sowie der Oxidierung zellulärer Makromolekülen (Metodiewa et al., 1999).

Obwohl die Mehrzahl der Studien, die sich mit den pharmakologischen Eigenschaften von Flavonoiden befassten, auf den stark ausgeprägten anti-oxidativen Potential von Luteolin hinweisen, konnten in einigen Arbeiten auch seine pro-oxidative Wirkung festgestellt werden. Matsuo et al. (2005) beobachteten nach der Behandlung der humanen embryonalen Lungenfibroblasten mit hohen Luteolin-Konzentrationen (75 und 150  $\mu M$ ) eine starke intrazelluläre ROS-Akkumulierung. Dieser Effekt wurde ebenfalls in der Arbeit von Ju et al. (2007) in humanen Lungenkarzinomzellen nachgewiesen. Die Autoren fanden heraus, dass die pro-oxidativen Effekte von Luteolin nicht auf der oxidoreduktiven Aktivierung basieren sondern durch die Hemmung des zellulären anti-oxidativen Enzyms Superoxiddismutase entstehen. Die ausgelöste Aktivierung der redoxsensitiven Signalwege durch die gebildeten ROS-Moleküle hat laut Autoren eine Inhibierung der Proliferation und eine erhöhte Apoptoserate in Krebszellen zur Folge.

Aufgrund der beschriebenen Möglichkeit der pro-oxidativen Effekte von Luteolin kann die damit verbundene oxidative DNA-Schädigung nicht ausgeschlossen werden. In der vorliegenden Arbeit wurde aus diesem Grund die oxidierende Wirkung von Luteolin mit Hilfe des DCF-Assays untersucht.

Dabei konnte festgestellt werden, dass die Behandlung der HCT-EV und HCT-shAHR Zellen mit diesem Flavonoid eine signifikante dosisabhängige Reduktion der intrazellulären ROS-Menge bewirkt. Dieser Befund deutet auf die protektive Eigenschaften von Luteolin gegen eine ROS-Bildung in Kolonkarzinomzellen hin. Die Beobachtungen aus den Studien von Matsuo et al. (2005) und Ju et al. (2007) konnten somit in diesem Zellmodell nicht bestätigt werden und scheinen zellspezifisch zu sein. Anhand der vorliegenden Ergebnisse des DCF-Assays konnte somit die Möglichkeit des Luteolin-induzierten S-Phase-Arrests in Folge der oxidativen DNA-Schädigung ausgeschlossen werden. Die Vermutung liegt nahe, dass die Akkumulierung der HCT116-Zellpopulationen in der S-Phase durch die in den Arbeiten von Yamashita & Kawanishi (2000) und Chowdhury et al. (2002) beschriebenen Fähigkeit des Flavonoids, die Aktivität der DNA-Topoisomerasen I und II zu hemmen und so die Ausbildung der DNA-Strangbrüchen zu begünstigen, hervorgerufen wird.

Die im vorangegangenen Kapitel dargestellten Ergebnisse des alkalischen Comet-Assays, welcher primär für die Detektion der DNA-ESB eingesetzt wird, zeigten in den Luteolin-belasteten Zellen keine Zunahme der DNA-Schädigung. Das führte zur Annahme, dass Luteolin in den untersuchten Kolonkarzinomzellen HCT116 ausschließlich die DNA-DSB induziert. Die Luteolin-vermittelte Bildung der DNA-DSB wurde in HCT-EV und HCT-shAHR Zellen mit Hilfe des neutralen Comet-Assays untersucht. In diesem Versuch führte die Behandlung mit Luteolin in beiden Zelllinien zu einem signifikanten dosisabhängigen Anstieg der DNA-Schädigung. Im Vergleich zu den HCT-shAHR Zellen, wurde in AHR-profizienten Zellen eine verstärkte DNA-DSB-Bildung detektiert. Interessanterweise konnte dieser Unterschied zwischen den beiden Zelllinien auch nach der Belastung mit Cisplatin, welches als Modellsubstanz für die DNA-DSB-Bildung eingesetzt wurde, beobachtet werden.

Aus der Literatur ist bekannt, dass Cisplatin auf zwei verschiedene Wege die DNA-Schädigung einleiten kann. So ist diese Substanz in der Lage, eine direkte Bindung mit der DNA einzugehen und die Entstehung der DNA-Monoaddukte, Inter- und Intrastrang-Quervernetzungen sowie Protein-DNA-Quervernetzungen auszulösen (Friedberg et al., 1995). Darüber hinaus kann es die Hemmung der Zellteilung durch die Inhibierung der DNA-Topoisomerase II herbeiführen (Cantero et al., 2006; Hasinoff et al., 2005). Beide Möglichkeiten führen zur Generierung der DNA-DSB in den Zellen und letztendlich zur Apoptose. Aufgrund dieser Eigenschaften wird Cisplatin in der Medizin als Krebstherapeutikum verwendet (Lippert & Beck, 1983; Lippert, 1999). Die Ergebnisse aus dem neutralen Comet-Assay deuten darauf hin, dass Luteolin ähnlich wie Cisplatin die DNA-DSB-Bildung bewirkt, welche anscheinend durch die Präsenz des AHR in den Zellen verstärkt wird.

Um die im neutralen Comet-Assay festgestellte Luteolin-vermittelte Induktion der DNA-DSB zu verifizieren, wurde die Phosphorylierung des Proteins H2AX mittels *Western Blot*-Analyse untersucht. H2AX ist ein Histonprotein, welches in Folge eines entstandenen DNA-DSB durch vorgeschaltete Kinasen, wie beispielsweise ATM (*Ataxia Telangiectasia Mutated*) oder ATR (*ATM and Rad3-related*),

phosphoryliert wird (Durocher & Jackson, 2001; Rogakou et al., 1998). Die aktive Form dieses Proteins,  $\gamma$ H2AX, spielt eine wichtige Rolle bei der Initiierung der DNA-Reparatur. In der Molekularbiologie hat sich die Entstehung von  $\gamma$ H2AX als sensitiver Nachweis der DNA-DSB etabliert (Kuo & Yang, 2008). Die Untersuchung der H2AX-Phosphorylierung nach der Inkubation der HCT-EV Zellen mit verschiedenen Luteolin-Konzentrationen zeigte eine dosisabhängige Zunahme des  $\gamma$ H2AX-Proteins. In HCT-shAHR wurde ebenfalls ein konzentrationsabhängiger Anstieg beobachtet, der allerdings deutlich schwächer ausgeprägt war. Im Vergleich zu AHR-profizienten Zellen konnte in diesen Zellen eine bis zu 60%-ige Reduktion der  $\gamma$ H2AX-Proteinmenge detektiert werden. In den Zellen der Positivkontrolle löste die Behandlung mit Cisplatin erwartungsgemäß eine starke etwa 10-fache Zunahme der H2AX-Phosphorylierung aus. Es konnten jedoch in diesem Experiment keine Unterschiede zwischen beiden Zelllinien festgestellt werden.

Die Ergebnisse dieser Untersuchung unterstützen die Befunde aus dem neutralen Comet-Assay und zeigen somit, dass Luteolin in Kolonkarzinomzellen die DNA-DSB-Bildung initiiert. Dies hat eine Arretierung der Zellen in der S-Phase zur Folge. Die verminderte DNA-Schädigung und S-Phase-Akkumulierung der AHR-defizienten Zellen deuten darauf hin, dass der AHR bei der Luteolin-induzierten Generierung der DNA-DSB eine wichtige Rolle spielt.

Als Antwort auf die induzierte DNA-Schädigung und damit verbundenen Blockierung der Replikation wird in den Zellen der sogenannte Stressantwort-Signalweg aktiviert, welcher zwei parallele jedoch in sich überlappende Kinase-Kaskaden – ATM-Chk2 und ATR-Chk-1 – erfasst. Zahlreiche Studien weisen darauf hin, dass die ATM-Kinase-Aktivierung hauptsächlich durch die Induktion der DNA-DSB erfolgt. Im Gegensatz dazu wird der ATR-Chk-1-Signalweg nicht nur in Folge der DNA-Schädigung sondern auch durch die Hemmung der DNA-Replikation eingeleitet (Shiloh, 2001; Zou & Elledge, 2003). Zwischen beiden Signalkaskaden gibt es laut einigen Studien eine Wechselwirkungsbeziehung. Die durch beispielsweise  $\gamma$ -Strahlung induzierten DNA-DSB können zur Aktivierung beider Signalkaskaden führen. Dabei kann die Phosphorylierung der ATR-Kinase durch das aktivierte ATM-Protein erfolgen (Harper & Elledge, 2007). Die Aktivierung der ATM-Kinase führt jedoch in den meisten Fällen zur Threonin 68-Phosphorylierung des untergeordneten Chk2-Proteins. Die *Checkpoint*-Kinase 2 ist in ihrer aktiven Form in der Lage, eine Reihe von Proteinen des Zellzyklus, wie beispielsweise das Tumorsuppressorprotein p53 oder die Cdc25-Phosphatasen, zu phosphorylieren (Banin et al., 1998; Falck et al., 2001) und einen Zellzyklusarrest zu initiieren. Erfolgt eine DNA-Schädigung während die Zelle die S-Phase durchläuft, führt die Phosphorylierung der vorgestellten Proteine zur Inaktivierung der S-Phase-spezifischen CDK2-Kinase. Dies hat einen über mehrere Stunden anhaltenden S-Phase-Arrest in den Zellen zur Folge. Durch die Initiierung der DNA-Reparatur im S-Phase-Arrest haben

Zellen die Möglichkeit, die geschädigten DNA-Bereiche zu beseitigen oder die Apoptose einzuleiten (Bartek & Lukas, 2001; Falck et al., 2001).

Die Aktivierung des p53-Proteins als Antwort auf die entstandene DNA-Schädigung mit nachfolgendem Zellzyklusarrest in der S-Phase demonstrieren die Arbeiten von Banin et al. (1998) und Canman et al. (1998). Ergebnisse dieser Studien zeigen, dass das in den geschädigten Zellen aktivierte ATM-Protein das p53 durch die direkte Phosphorylierung stabilisieren kann. Die Akkumulierung des aktiven p53-Proteins führt zur Phosphorylierung eines weiteren Effektorproteins p21/Cip1, welches wiederum die Inhibierung der CDK2-Aktivität auslöst. Somit kann die Initiierung des zellulären S-Phase-Arrests in Folge der DNA-DSB-Bildung auch über diesen Signalweg eingeleitet werden.

Um festzustellen, welche Signalkaskaden durch Luteolin aktiviert werden und den S-Phase-Zellzyklusarrest in HCT-EV und HCT-shAHR induzieren, wurde die Phosphorylierung oder die Expression der Chk-1-, Chk2-Kinasen, des p53-Proteins sowie der endogenen CDK-Inhibitorproteine p21/Cip1 und p27/Kip1 überprüft. Die Untersuchung der Chk-1-Expression in HCT-EV Zellen zeigte, dass die Belastung mit Luteolin keinen detektierbaren Einfluss auf die zelluläre Chk-1-Proteinmenge hat. Bei der anschließenden Überprüfung der Chk2-Phosphorylierung konnte im Gegensatz dazu ein Luteolin-abhängiger Effekt beobachtet werden. Die Behandlung der HCT-EV und HCT-shAHR Zellen mit diesem Flavonoid führte zu einem dosisabhängigen signifikanten Anstieg des am Threonin 68 phosphorylierten Chk2-Proteins. Es konnte allerdings kein Unterschied in der Phosphorylierung dieser Kinase in den AHR-profizienten und -defizienten Zellen detektiert werden. Da in früheren Studien gezeigt werden konnte, dass der durch eine vorliegende DNA-Schädigung aktivierte ATM-Chk2-Signaweg die intrazelluläre Akkumulierung des p53-Proteins begünstigt (Chehab et al., 2000; Hirao et al., 2000; Shieh et al., 2000), wurde die p53-Proteinmenge analysiert. Die Ergebnisse dieser Untersuchung deuteten darauf hin, dass die Behandlung mit Luteolin in den HCT-EV Zellen einen stärkeren konzentrationsabhängigen signifikanten Anstieg der intrazellulären p53-Proteinmenge als in HCT-shAHR Zellen bewirkt. Die deutlichsten Unterschiede zwischen beiden Zellpopulationen zeichneten sich vor allem bei der niedrigen und mittleren Flavonoidkonzentrationen (10 und 20  $\mu\text{M}$ ) ab, wobei nach der Belastung der Zellen mit 10  $\mu\text{M}$  Luteolin in HCT-shAHR eine signifikant geringere Menge des p53-Proteins als in HCT-EV Zellen detektiert werden konnte.

Die Phosphorylierung des p53-Tumorsuppressorproteins in Folge einer DNA-Schädigung führt laut Literaturangaben zu einer verstärkten Expression des CDK-Inhibitorproteins p21/Cip1, welches zu den Zielgenen des p53 gezählt wird (Harper et al., 1993; Xiong et al., 1993). Aus diesem Grund müsste die beobachtete erhöhte p53-Akkumulierung in den HCT-EV Zellen eine erhöhte Expression des p21/Cip1 auslösen.

Um diese Vermutung zu überprüfen, erfolgte eine Untersuchung der p21/Cip1-Transkription nach der Behandlung der beiden HCT116-Zellpopulationen mit Luteolin. Es konnte in der Tat eine signifikante konzentrationsabhängige Zunahme der p21/Cip1-Transkriptmenge in den HCT-EV Zellen beobachtet werden. In den HCT-shAHR Zellen hingegen änderte sich die Transkriptanzahl kaum. Da schon in früheren Studien die wichtige Rolle des p21/Cip1-Proteins bei der Initiierung des G1-S-Phase-Zellzyklusarrests in Folge der zellulären Exposition gegenüber DNA-schädigenden Agentien demonstriert werden konnte (Macleod et al., 1995; Waldman et al., 1995), kann anhand der vorgestellten Daten davon ausgegangen werden, dass die verstärkte p21/Cip1-Expression in HCT-EV Zellen die beobachtete verstärkte Arretierung dieser Zellen im Zellzyklus bewirkt.

In der Literatur gibt es allerdings auch Hinweise auf die Beeinflussung der Zellzyklusprogression durch ein weiteres CDK-Inhibitorprotein p27/Kip1. Befunde einiger Arbeiten zeigen eine Induktion der p27/Kip1-Akkumulierung nach der Schädigung der zellulären DNA mit UVB-Strahlen oder mit Cisplatin in humanen Melanom- und Nierenzellen der Ratten (Petrocelli & Slingerland, 2000; Zhou et al., 2004). Da dieses Protein als ein potenter CDK2/Cyclin E-Inhibitor beschrieben ist, kann seine erhöhte Expression, ähnlich wie bei p21/Cip1, eine Blockade des Zellzyklus in den G1-S-Phasen initiieren (Balasubramanian et al., 1999; Qin & Ng, 2002). Die Fähigkeit des p27/Kip1-Proteins, die Zellproliferation zu hemmen wird vor allem mit der TCDD-vermittelten Toxizität in Zusammenhang gebracht. Die Ergebnisse der Arbeit von Kolluri et al. (1999) weisen daraufhin, dass TCDD die p27/Kip1-Expression in murinen embryonalen Thymuszellen und in Rattenhepatomzellen AHR-abhängig induziert. Die daraus resultierende Zunahme des aktiven p27/Kip1 in diesen Zellen hat die Inhibierung der Zellteilung zur Folge.

Zur Überprüfung der möglichen Effekte dieses CDK-Inhibitorproteins auf die Luteolin-induzierte Zellzyklusblockade in HCT-EV und HCT-shAHR Zellen wurde dessen mRNA-Expression untersucht. Dabei konnte festgestellt werden, dass Luteolin keinen Einfluss auf die p27/Kip1-Transkription in beiden Zellpopulationen hat. Aus diesem Grund spielt dieses Protein bei dem beobachteten S-Phase Zellzyklusarrest anscheinend keine Rolle.

Die Ergebnisse der vorgestellten Expressions- und Phosphorylierungsanalysen ergeben zusammenfassend, dass die Luteolin-induzierte Bildung der DNA-DSB eine ATM-Chk-2-Signalkaskade in Gang setzt. Die aktivierte Chk-2-Kinase bewirkt die Phosphorylierung und Stabilisierung des Tumorsuppressorproteins p53, welches in der Lage ist, die Transkription seines Zielgens p21/Cip1 zu initiieren. Diese Befunde führen zur Annahme, dass die Akkumulierung des p21/Cip1-Inhibitorproteins eine verstärkte Hemmung des CDK2/Cyclin A-Komplexes auslöst und somit die Progression der Zellen durch die S-Zellzyklusphase verhindert. Diese Beobachtungen sind vergleichbar mit den Befunden der Studie von Casagrande & Darbon (2000). In dieser Arbeit zeigen die Autoren, dass die Flavonoide Luteolin, Quercetin und Daidzein in der Lage sind, eine Stimulation

der p21/Cip1-Expression und die darauffolgende Hemmung der CDK2-Kinase sowie die Initiierung des G1-Phase-Arrests in humanen Melanomzellen herbeizuführen. Die Luteolin-vermittelte Aktivierung dieses Signalweges in HCT116 Zellen scheint im Niedrigkonzentrationsbereich (10, 20  $\mu\text{M}$ ) teilweise vom funktionellen AHR abhängig zu sein. Im Vergleich zu HCT-shAHR Zellen löst Luteolin in HCT116-Zellen eine signifikant höhere Akkumulierung des p53-Proteins und eine verstärkte Expression seines Zielgens p21/Cip1 aus, die jedoch nicht mit einer AHR-abhängigen erhöhten Aktivierung der vorgeschalteten Chk-2-Kinase assoziiert ist. Aus diesem Grund liegt die Vermutung nahe, dass die Luteolin-initiierte, AHR-abhängige Phosphorylierung des p53-Tumorsuppressorproteins durch weitere Enzymproteine, die eine Responsivität gegenüber der entstandenen DNA-DSB zeigen, ausgelöst werden kann. In der Tat wird in der Studie von Shi et al. (2007) berichtet, dass Luteolin in der Lage ist, die intrazelluläre p53-Akkumulierung durch posttranslationale Stabilisierung signifikant zu erhöhen. Die Autoren fanden heraus, dass die Stabilisierung des p53-Proteins vor allem auf dessen Phosphorylierung durch die c-Jun-NH<sub>2</sub>-terminale-Kinase (JNK) zurückzuführen ist. Die Belastung der in dieser Arbeit untersuchten Kolonkarzinomzellen HCT116 mit Luteolin bewirkte eine verstärkte Aktivierung des JNK-Proteins, welches die Phosphorylierung des p53 einleitet und dadurch dieses Protein vor der proteosomalen Degradierung schützt.

Die c-Jun NH<sub>2</sub>-terminale-Kinasen gehören zu der Familie der Mitogen-aktivierten-Proteinkinasen (MAPK) und werden auch als *Stress-Activated-Phospho-Kinasen* (SAPK) bezeichnet. Aufgrund ihrer Responsivität gegenüber verschiedenen Umweltfaktoren und einer Vielzahl von Zytokinen sowie Wachstumsfaktoren fungieren JNK-Proteine als wichtige Mediatoren der extrazellulären Stimuli (Ihijo, 1999; Kyriakis et al., 1994). Laut Literaturangaben kann der JNK-Signalweg durch verschiedene Arten des genotoxischen Stresses aktiviert werden (Dent et al., 2003; Karin et al., 1998). So wird die durch die DNA-DSB-generierenden Substanzen oder UV-Strahlung induzierte Apoptose auf die Aktivierung der JNK-Signalkaskade zurückgeführt (Picco & Pages, 2013). Die Aktivierung der JNK-Kinasen kann durch verschiedene MAPK-Kinase wie MKK4 und MKK7 (Lopez-Bergami & Ronai, 2008) oder die TAK1-Kinase (*Transforming Growth Factor  $\beta$  Activated Kinase-1*) initiiert werden, wobei die Letzte eine wichtige Rolle bei der Aktivierung der NF $\kappa$ B-Signalantwort in Folge der DNA-Schädigung spielt (Picco & Pages, 2013).

In der Arbeit von Kiziltepe et al. (2007) wird demonstriert, dass die Inkubation der humanen multiplen Myelomzellen mit einem Chemotherapeutikum O<sup>2</sup>-(2,4-dinitrophenyl)-1-[(4-ethoxycarbonyl) piperazin-1-yl]-diazan-1-ium-1,2-diolat, auch JS-K bezeichnet, die Apoptose via DNA-DSB-Bildung induziert. Dabei werden zwei wichtige Signalwege aktiviert: die ATM-Chk-2-p53- sowie die JNK-Signalkaskaden. Die Phosphorylierung der JNK löst eine Aktivierung oder Stabilisierung seiner Zielproteine wie das Histonprotein H2AX und das Tumorsuppressorprotein p53 aus

(Picco & Pages, 2013). Da die JNK1-Isoform hauptsächlich für die p53-vermittelte Apoptose und Regulierung der Zellzyklusprogression in den Zellen verantwortlich ist, wurde in der vorliegenden Arbeit die Phosphorylierung dieser Kinase in Folge der Exposition der AHR-profizienten und -defizienten HCT116 Zellen mit Luteolin getestet.

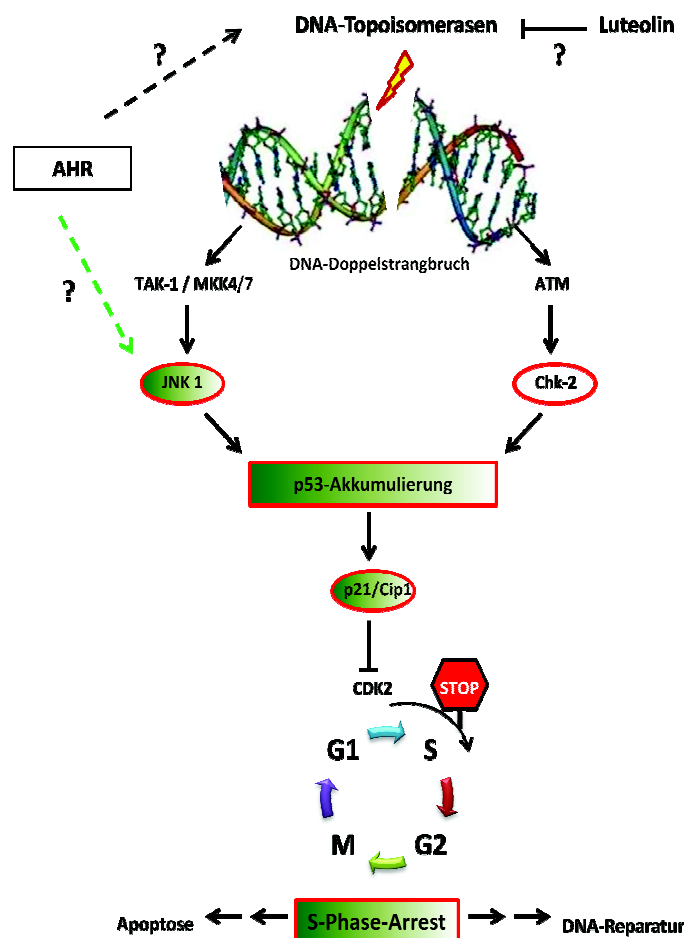
Die Bestimmung der JNK1-Phosphorylierung am Threonin 184 (pJNK1) zeigte, dass Luteolin in HCT-EV Zellen einen 10- bis 15-fachen Anstieg der pJNK1 bewirkt. Im Vergleich dazu konnte in den HCT-shAHR Zellen eine bis 50% geringere Menge des phosphorylierten Proteins detektiert werden. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass die Luteolin-vermittelte DNA-DSB-Bildung mit der Aktivierung des JNK1-Signalweges assoziiert sein könnte und AHR-abhängig ist. Außerdem konnte mit diesem Experiment gezeigt werden, dass die Luteolin-initiierte Arretierung der Zellen in der S-Phase nicht nur über die ATM-Chk-2-p53-Signalkaskade sondern auch über die Aktivierung der JNK1 und die daraus resultierende Stabilisierung des p53-Proteins erfolgen kann.

Die in der Abbildung 26 zusammengefassten Ergebnisse dieses Teils der experimentellen Arbeit weisen darauf hin, dass die Behandlung der Kolonkarzinomzelllinie HCT116 mit Luteolin eine DNA-Schädigung in Form von Doppelstrangbrüchen auslöst und die Zellzyklusprogression inhibiert. Der initiierte S-Phase-Arrest kann durch die Aktivierung von zwei Signalwegen – ATM-Chk-2 und JNK1 - eingeleitet werden, die eine erhöhte intrazelluläre Akkumulierung des p53-Proteins zur Folge haben. Die fehlenden Unterschiede in der Chk-2-Phosphorylierung zwischen AHR-profizienten und AHR-defizienten Zellen führen zur Vermutung, dass die beobachtete AHR-abhängige Zunahme der p53-Proteinmenge auf die Luteolin-vermittelte Induktion der JNK1-Signalkaskade zurückzuführen ist. Der vor allem bei den niedrigen Luteolin-Konzentrationen ermittelte AHR-abhängige Anstieg des p53-Proteins kann eine positive Regulation der p21/Cip1-mRNA-Expression bewirken. Die erhöhte Bildung dieses CDK-Inhibitorproteins kann in HCT-EV Zellen eine stärkere Hemmung der S-Phase-spezifischen CDK2-Kinase-Aktivität auslösen und somit die Zellzyklusblockade in der S-Phase initiieren. Da die anti-proliferativen, zellzyklushemmenden Effekte von Luteolin in den AHR-profizienten Kolonkarzinomzellen stärker ausgeprägt waren, kann angenommen werden, dass der vorgestellte mögliche Wirkmechanismus dieser Substanz durch den aktiven AHR-Signalweg positiv beeinflusst wird.

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit demonstrierte Fähigkeit von Luteolin zur Initiierung der DNA-DSB und der daraus resultierenden intrazellulären DNA-Schadensantwort mit einer Zellzyklusblockade als Folge kann auf den in der Literatur beschriebenen direkten Wechselwirkungen dieses Flavonoids mit den DNA-Topoisomerasen I / II und deren Hemmung beruhen (Yamashita & Kawanishi, 2000; Chowdhury et al., 2002). Diese Enzyme katalysieren in den Zellen die Entwindung der superspiralisierten DNA-Doppelhelix und spielen somit bei den DNA-Replikations- und Transkriptionsvorgängen eine wichtige Rolle (Austin & Marsh, 1998). Der gebildete



DNA-Topoisomerase-Komplex stellt beispielsweise einen wichtigen Angriffspunkt für die Topoisomerase II-Gifte dar, die eine breite Verwendung in der Krebstherapie finden. Die Inhibierung der Topoisomerase-II-Aktivität durch solche Substanzen führt zur Schädigung der DNA in Form von DSB und resultiert sich in der Aktivierung verschiedener Stresskinasen-Signalwege (Jeggo & Lobrich, 2006; Harper & Elledge, 2007; Roos & Kaina, 2006; Zhou & Elledge, 2000). Um zu überprüfen, ob die beobachteten genotoxischen AHR-abhängigen Effekte von Luteolin durch die Modulation der DNA-Topoisomerasen-Aktivität entstehen, sind weitere experimentelle Untersuchungen notwendig.



**Abbildung 26: Luteolin-induzierter S-Phase-Arrest**

Rote Markierung: Proteine, dessen Expression oder Aktivität in der vorliegenden Arbeit untersucht wurde.  
 Grüne Schattierung: AHR-abhängige Aktivierung der untersuchten Proteine und AHR-abhängige Induktion des S-Phase-Arrests. ATM - *Ataxia Telangiectasia Mutated*, CDK2 - *Cyclin-Dependent-Kinase 2*, Chk-2 - *Checkpointkinase-2*, JNK-1 - *c-Jun-NH<sub>2</sub>-terminale-Kinase-1*, MKK4/7 - *Mitogen Activated Kinase Kinase 4 oder 7*, p53 - 53kDa Tumorsuppressorprotein, p21/Cip1 - 21kDa CDK-Inhibitorprotein, TAK-1 - *Transforming Growth Factor  $\beta$  Activated Kinase-1*

### 4.3. Einordnung der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit konnten neue Erkenntnisse über die sowohl chemopräventiven als auch genotoxischen Eigenschaften des pflanzlichen Polyphenols Luteolin gewonnen werden. Die Ergebnisse der durchgeführten Untersuchungen deuten darauf hin, dass dieser Naturstoff in der Lage ist, Wechselwirkungen mit dem AHR-Signalweg einzugehen und den B(a)P-Metabolismus in den Kolonkarzinomzellen zu beeinflussen. Die demonstrierte Luteolin-vermittelte Inhibierung der AHR-abhängigen CYP1A1- und COX-2-Expression sowie der CYP1A1-Enzymaktivität hatte eine verminderte B(a)P-induzierte DNA-Schädigung zur Folge.

Auch in früheren Studien wurde über die hemmenden Eigenschaften des Luteolins auf den Metabolismus indirekter Kanzerogene wie B(a)P berichtet. So wurde dieses Flavonoid in der Arbeit von Kim et al. (2005) als ein potenter Inhibitor der humanen CYP1A1-, CYP1A2- und CYP1B1-Enzyme beschrieben. Da diese Enzyme oft an der metabolischen Aktivierung des B(a)P beteiligt sind, bewirkt deren Hemmung eine verminderte Generierung des reaktiven BPDE-Metabolits (Miller et al., 2001). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit weisen darauf hin, dass der aktive AHR-Signalweg ausschlaggebend für diese Luteolin-vermittelte Effekte ist. Die beobachtete Reduktion der B(a)P-induzierten DNA-Schädigung wurde im Vergleich zu der vorgestellten Studie nicht über die Luteolin-induzierte Inhibierung der CYP1A1-Enzymaktivität sondern über die Hemmung des AHR durch das Flavonoid verursacht.

Die vorangegangenen Untersuchungen von Bothe et al. (2010) zeigten zudem, dass Luteolin den B(a)P-Stoffwechsel nicht nur über die Inhibierung der Expression der AHR-abhängiger Phase-I-Enzyme (CYP1A-Familie) beeinflusst sondern auch die Expression der B(a)P-detoxifizierenden Phase-II-Enzyme (UGT) hemmen kann. In Folge dieser Hemmung wurde eine intrazelluläre Akkumulierung von freiem B(a)P beobachtet. Ob die erhöhte B(a)P-Anreicherung mit einer verstärkten oder verminderten Generierung der BPDE-DNA-Addukte einhergeht, wurde jedoch nicht untersucht. Diese Fragestellung konnte in der vorliegenden Arbeit zum Teil beantwortet werden. Die indirekte Bestimmung der BPDE-DNA-Addukt-Bildung deutete darauf hin, dass Luteolin eine signifikante AHR-abhängige Reduktion der B(a)P-vermittelten DNA-Schädigung bewirkt und somit eine bedeutende Rolle bei der Prävention der B(a)P-induzierten Kanzerogenese im Darm spielen kann.

In der Literatur gibt es Hinweise, dass Luteolin nicht nur protektive Effekte sondern auch genotoxische Eigenschaften entfalten kann. Auch in der vorliegenden Arbeit konnte demonstriert werden, dass dieses Flavonoid in der Lage ist, die DNA-DSB-Bildung mit der nachfolgenden Induktion der Zellzyklusblockade in Kolonkarzinomzellen HCT116 zu initiieren. Interessanterweise schienen die DNA-schädigende Effekte von Luteolin vom aktiven AHR-Signalweg abhängig zu sein.

Schon in früheren Studien konnte gezeigt werden, dass dieses Flavonoid eine Blockierung des Zellzyklus in der G1/S- und G2/M-Phase in verschiedenen Krebszellen auslösen kann (Casagrande et al., 2001; Kobayashi et al., 2002; Lim et al., 2007). Als Ursache dafür wird die intrazelluläre Aktivierung des p53-p21/Cip1-Signalweges in Folge der Luteolin-vermittelten DNA-Schädigung angenommen (Lim et al., 2007; Plaumann et al., 1996). Die verstärkte Akkumulierung dieser Proteine in Luteolin-behandelten Zellen können laut Studien von Shi et al. (2007) und Rao et al. (2011) über die Aktivierung der ATM-Chk-2- oder der SAPK/JNK-Signalwege initiiert werden. Auch die Befunde der vorliegenden Arbeit deuten auf die Fähigkeit dieses Flavonoids hin, durch die Initiierung der DNA-DSB beide Signalkaskaden in HCT116 Zellen zu stimulieren. Dabei konnte erstmals festgestellt werden, dass die Initiierung der JNK-Signalantwort in diesen Zellen stark vom AHR-Signalweg abhängig ist. Die AHR-abhängige Aktivierung dieser Signalkaskade korrelierte mit einer verstärkten Akkumulierung der p53- und p21/Cip1-Proteine sowie einer verstärkten Arretierung der AHR-profizienten Zellen in der S-Phase. Es konnte somit gezeigt werden, dass der funktionelle AHR-Signalweg wichtig für die Luteolin-induzierte Generierung der DNA-DSB und für die anschließende Hemmung der Proliferation der Kolonkarzinomzellen ist.

Für die genaue Aufklärung der AHR-abhängigen anti-proliferativen Effekte von Luteolin sind weitere Untersuchungen zu Wechselwirkungen zwischen dem AHR-Signalweg und der DNA-Topoisomerasen-Aktivität, die ausschlaggebend für die genotoxische Eigenschaften dieses Naturstoffes zu sein scheinen, notwendig. Durch das Verständnis der genauen Wirkweise von Luteolin könnte diese Substanz als ein möglicher Kandidat für die Darmkrebstherapie interessant werden.

---

## Literaturverzeichnis

- Abel, J. and T. Haarmann-Stemmann. "An introduction to the molecular basics of aryl hydrocarbon receptor biology." Biol.Chem. 391.11 (2010): 1235-48.
- Ahn, J., M. Urist, and C. Prives. "The Chk2 protein kinase." DNA Repair (Amst) 3.8-9 (2004): 1039-47.
- Aisling, A. S. and O'Brien, M. N. "Dietary flavonols: chemistry, food content and metabolism." Nutr. 18, 75-81.
- Ames, B. N. "Endogenous DNA damage as related to cancer and aging." Mutat.Res. 214.1 (1989): 41-46.
- Andersson, P., et al. "A constitutively active dioxin/aryl hydrocarbon receptor induces stomach tumors." Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 99.15 (2002): 9990-95.
- Arai, N., et al. "Estrogen receptor beta mRNA in colon cancer cells: growth effects of estrogen and genistein." Biochem.Biophys.Res.Commun. 270.2 (2000): 425-31.
- Ashida, H., et al. "Flavones and flavonols at dietary levels inhibit a transformation of aryl hydrocarbon receptor induced by dioxin." FEBS Lett. 476.3 (2000): 213-17.
- ATSDR, "Toxicological Profile for Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs)." <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp69.html> (1995). Ref Type: Online Source.
- Austin, C. A. and K. L. Marsh. "Eukaryotic DNA topoisomerase II beta." Bioessays 20.3 (1998): 215-26.
- Bagli, E., et al. "Luteolin inhibits vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis; inhibition of endothelial cell survival and proliferation by targeting phosphatidylinositol 3'-kinase activity." Cancer Res. 64.21 (2004): 7936-46.
- Balasubramanian, S., R. A. Chandraratna, and R. L. Eckert. "A novel retinoid-related molecule inhibits pancreatic cancer cell proliferation by a retinoid receptor independent mechanism via suppression of cell cycle regulatory protein function and induction of caspase-associated apoptosis." Oncogene 24.26 (2005): 4257-70.
- Banin, S., et al. "Enhanced phosphorylation of p53 by ATM in response to DNA damage." Science 281.5383 (1998): 1674-77.
- Bartek, J. and J. Lukas. "Mammalian G1- and S-phase checkpoints in response to DNA damage." Curr.Opin.Cell Biol. 13.6 (2001): 738-47.
- Berg, P. and I. Pongratz. "Differential usage of nuclear export sequences regulates intracellular localization of the dioxin (aryl hydrocarbon) receptor." J.Biol.Chem. 276.46 (2001): 43231-38.
- Bjeldanes, L. F., et al. "Aromatic hydrocarbon responsiveness-receptor agonists generated from indole-3-carbinol in vitro and in vivo: comparisons with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin." Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 88.21 (1991): 9543-47.
- Bock, K. W. and C. Kohle. "Ah receptor: dioxin-mediated toxic responses as hints to deregulated physiologic functions." Biochem.Pharmacol. 72.4 (2006): 393-404.
- Boege, F., et al. "Selected novel flavones inhibit the DNA binding or the DNA religation step of eukaryotic topoisomerase I." J.Biol.Chem. 271.4 (1996): 2262-70.

- Bothe, H., et al. "Luteolin enhances the bioavailability of benzo(a)pyrene in human colon carcinoma cells." Arch.Biochem.Biophys. 498.2 (2010): 111-18.
- Bowden, N. A., et al. "Nucleotide excision repair gene expression after Cisplatin treatment in melanoma." Cancer Res. 70.20 (2010): 7918-26.
- Boyer, J. and R. H. Liu. "Apple phytochemicals and their health benefits." Nutr.J. 3 (2004): 5.
- Bradfield, C. A., E. Glover, and A. Poland. "Purification and N-terminal amino acid sequence of the Ah receptor from the C57BL/6J mouse." Mol.Pharmacol. 39.1 (1991): 13-19.
- Bradshaw, T. D., et al. "The aryl hydrocarbon receptor in anticancer drug discovery: friend or foe?" Curr.Pharm.Des 8.27 (2002): 2475-90.
- Brouillard, R. and A. Cheminat. "Flavonoids and plant color." Prog.Clin.Biol.Res. 280 (1988): 93-106.
- Brown, J. E. and C. A. Rice-Evans. "Luteolin-rich artichoke extract protects low density lipoprotein from oxidation in vitro." Free Radic.Res. 29.3 (1998): 247-55.
- Brown, J. P., W. Wei, and J. M. Sedivy. "Bypass of senescence after disruption of p21CIP1/WAF1 gene in normal diploid human fibroblasts." Science 277.5327 (1997): 831-34.
- Brunnberg, S., et al. "The basic helix-loop-helix-PAS protein ARNT functions as a potent coactivator of estrogen receptor-dependent transcription." Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 100.11 (2003): 6517-22.
- Bustelo, X. R. "Regulatory and signaling properties of the Vav family." Mol.Cell Biol. 20.5 (2000): 1461-77.
- Canman, C. E. and M. B. Kastan. "Signal transduction. Three paths to stress relief." Nature 384.6606 (1996): 213-14.
- Canman, C. E., et al. "Activation of the ATM kinase by ionizing radiation and phosphorylation of p53." Science 281.5383 (1998): 1677-79.
- Cantero, G., et al. "Topoisomerase II inhibition and high yield of endoreduplication induced by the flavonoids luteolin and quercetin." Mutagenesis 21.5 (2006): 321-25.
- Cantero, G., et al. "Cisplatin-induced endoreduplication in CHO cells: DNA damage and inhibition of topoisomerase II." Mutat.Res. 599.1-2 (2006): 160-66.
- Carver, L. A. and C. A. Bradfield. "Ligand-dependent interaction of the aryl hydrocarbon receptor with a novel immunophilin homolog in vivo." J.Biol.Chem. 272.17 (1997): 11452-56.
- Carver, L. A., J. B. Hogenesch, and C. A. Bradfield. "Tissue specific expression of the rat Ah-receptor and ARNT mRNAs." Nucleic Acids Res. 22.15 (1994): 3038-44.
- Casagrande, F. and J. M. Darbon. "Effects of structurally related flavonoids on cell cycle progression of human melanoma cells: regulation of cyclin-dependent kinases CDK2 and CDK1." Biochem.Pharmacol. 61.10 (2001): 1205-15.
- Castiglione, F., et al. "Expression of estrogen receptor beta in colon cancer progression." Diagn.Mol.Pathol. 17.4 (2008): 231-36.

- Chantret, I., et al. "Epithelial polarity, villin expression, and enterocytic differentiation of cultured human colon carcinoma cells: a survey of twenty cell lines." Cancer Res. 48.7 (1988): 1936-42.
- Chao, A., et al. "Meat consumption and risk of colorectal cancer." JAMA 293.2 (2005): 172-82.
- Chehab, N. H., et al. "Chk2/hCds1 functions as a DNA damage checkpoint in G(1) by stabilizing p53." Genes Dev. 14.3 (2000): 278-88.
- Chen, C. C., et al. "Flavonoids inhibit tumor necrosis factor-alpha-induced up-regulation of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in respiratory epithelial cells through activator protein-1 and nuclear factor-kappaB: structure-activity relationships." Mol.Pharmacol. 66.3 (2004): 683-93.
- Chen, C. Y., et al. "Luteolin suppresses inflammation-associated gene expression by blocking NF-kappaB and AP-1 activation pathway in mouse alveolar macrophages." Life Sci. 81.23-24 (2007): 1602-14.
- Chen, H. S. and G. H. Perdew. "Subunit composition of the heteromeric cytosolic aryl hydrocarbon receptor complex." J.Biol.Chem. 269.44 (1994): 27554-58.
- Chiang, C. T., T. D. Way, and J. K. Lin. "Sensitizing HER2-overexpressing cancer cells to luteolin-induced apoptosis through suppressing p21(WAF1/CIP1) expression with rapamycin." Mol.Cancer Ther. 6.7 (2007): 2127-38.
- Chowdhury, A. R., et al. "Luteolin, an emerging anti-cancer flavonoid, poisons eukaryotic DNA topoisomerase I." Biochem.J. 366.Pt 2 (2002): 653-61.
- Christmann, M., et al. "Mechanisms of human DNA repair: an update." Toxicology 193.1-2 (2003): 3-34.
- Ciolino, H. P., et al. "Effect of curcumin on the aryl hydrocarbon receptor and cytochrome P450 1A1 in MCF-7 human breast carcinoma cells." Biochem.Pharmacol. 56.2 (1998): 197-206.
- Ciolino, H. P., P. J. Daschner, and G. C. Yeh. "Resveratrol inhibits transcription of CYP1A1 in vitro by preventing activation of the aryl hydrocarbon receptor." Cancer Res. 58.24 (1998): 5707-12.
- Ciolino, H. P., P. J. Daschner, and G. C. Yeh. "Dietary flavonols quercetin and kaempferol are ligands of the aryl hydrocarbon receptor that affect CYP1A1 transcription differentially." Biochem.J. 340 ( Pt 3) (1999): 715-22.
- Colditz, G. A. "Estrogen, estrogen plus progestin therapy, and risk of breast cancer." Clin.Cancer Res. 11.2 Pt 2 (2005): 909s-17s.
- Collins-Burow, B. M., et al. "Estrogenic and antiestrogenic activities of flavonoid phytochemicals through estrogen receptor binding-dependent and -independent mechanisms." Nutr.Cancer 38.2 (2000): 229-44.
- Conney, A. H. "Induction of microsomal enzymes by foreign chemicals and carcinogenesis by polycyclic aromatic hydrocarbons: G. H. A. Clowes Memorial Lecture." Cancer Res. 42.12 (1982): 4875-917.
- Constantinou, A., et al. "Flavonoids as DNA topoisomerase antagonists and poisons: structure-activity relationships." J.Nat.Prod. 58.2 (1995): 217-25.

- Constantinou, A. I., N. Kamath, and J. S. Murley. "Genistein inactivates bcl-2, delays the G2/M phase of the cell cycle, and induces apoptosis of human breast adenocarcinoma MCF-7 cells." Eur.J.Cancer 34.12 (1998): 1927-34.
- Cox, M. B. and Miller, C. A. "Cooperation of Hsp90 and p23 in aryl hydrocarbon receptor signaling" Cell Stress and Chap. 9 (2004): 4-20.
- Crespo, P., et al. "Rac-1 dependent stimulation of the JNK/SAPK signaling pathway by Vav." Oncogene 13.3 (1996): 455-60.
- Crews, S. T. "Control of cell lineage-specific development and transcription by bHLH-PAS proteins." Genes Dev. 12.5 (1998): 607-20.
- Critchlow, S. E. and S. P. Jackson. "DNA end-joining: from yeast to man." Trends Biochem.Sci. 23.10 (1998): 394-98.
- Crozier, A., I. B. Jaganath, and M. N. Clifford. "Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health." Nat.Prod.Rep. 26.8 (2009): 1001-43.
- Delescluse, C., et al. "Induction of cytochrome P450 1A1 gene expression, oxidative stress, and genotoxicity by carbaryl and thiabendazole in transfected human HepG2 and lymphoblastoid cells." Biochem.Pharmacol. 61.4 (2001): 399-407.
- Deng, C., et al. "Mice lacking p21CIP1/WAF1 undergo normal development, but are defective in G1 checkpoint control." Cell 82.4 (1995): 675-84.
- Denis, M., et al. "Association of the dioxin receptor with the Mr 90,000 heat shock protein: a structural kinship with the glucocorticoid receptor." Biochem.Biophys.Res.Commun. 155.2 (1988): 801-07.
- Denison, M. S., J. M. Fisher, and J. P. Whitlock, Jr. "The DNA recognition site for the dioxin-Ah receptor complex. Nucleotide sequence and functional analysis." J.Biol.Chem. 263.33 (1988): 17221-24.
- Denison, M. S. and S. R. Nagy. "Activation of the aryl hydrocarbon receptor by structurally diverse exogenous and endogenous chemicals." Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol. 43 (2003): 309-34.
- Denison, M. S., et al. "Ligand binding and activation of the Ah receptor." Chem.Biol.Interact. 141.1-2 (2002): 3-24.
- Dennis, M. J., et al. "Factors affecting the polycyclic aromatic hydrocarbon content of cereals, fats and other food products." Food Addit.Contam 8.4 (1991): 517-30.
- Dent, P., et al. "Stress and radiation-induced activation of multiple intracellular signaling pathways." Radiat.Res. 159.3 (2003): 283-300.
- Di, Leo A., et al. "ER-beta expression in large bowel adenomas: implications in colon carcinogenesis." Dig.Liver Dis. 40.4 (2008): 260-66.
- Dipple, A. "DNA adducts of chemical carcinogens." Carcinogenesis 16.3 (1995): 437-41.
- Dolwick, K. M., et al. "Cloning and expression of a human Ah receptor cDNA." Mol.Pharmacol. 44.5 (1993): 911-17.

- Dragin, N., et al. "Phenotype of the Cyp1a1/1a2/1b1-/- triple-knockout mouse." Mol.Pharmacol. 73.6 (2008): 1844-56.
- Durocher, D. and S. P. Jackson. "DNA-PK, ATM and ATR as sensors of DNA damage: variations on a theme?" Curr.Opin.Cell Biol. 13.2 (2001): 225-31.
- Ebert, B., A. Seidel, and A. Lampen. "Identification of BCRP as transporter of benzo[a]pyrene conjugates metabolically formed in Caco-2 cells and its induction by Ah-receptor agonists." Carcinogenesis 26.10 (2005): 1754-63.
- Elferink, C. J. "Aryl hydrocarbon receptor-mediated cell cycle control." Prog.Cell Cycle Res. 5 (2003): 261-67.
- Emmert, S., et al. "The xeroderma pigmentosum group C gene leads to selective repair of cyclobutane pyrimidine dimers rather than 6-4 photoproducts." Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 97.5 (2000): 2151-56.
- Enan, E. and F. Matsumura. "Identification of c-Src as the integral component of the cytosolic Ah receptor complex, transducing the signal of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) through the protein phosphorylation pathway." Biochem.Pharmacol. 52.10 (1996): 1599-612.
- Ende, C. and R. Gebhardt. "Inhibition of matrix metalloproteinase-2 and -9 activities by selected flavonoids." Planta Med. 70.10 (2004): 1006-08.
- Falck, J., et al. "The ATM-Chk2-Cdc25A checkpoint pathway guards against radioresistant DNA synthesis." Nature 410.6830 (2001): 842-47.
- Fernandez-Salguero, P. M., et al. "Aryl-hydrocarbon receptor-deficient mice are resistant to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced toxicity." Toxicol.Appl.Pharmacol. 140.1 (1996): 173-79.
- Fiander, H. and H. Schneider. "Dietary ortho phenols that induce glutathione S-transferase and increase the resistance of cells to hydrogen peroxide are potential cancer chemopreventives that act by two mechanisms: the alleviation of oxidative stress and the detoxification of mutagenic xenobiotics." Cancer Lett. 156.2 (2000): 117-24.
- Forkmann, G. "Biosynthesis of Flavonoids." In: "Polyphenolic Phenomena", Scalbert, A. (Ed), INRA Editions Paris (1993): 65-71.
- Fortune, J. M. and N. Osheroff. "Merbarone inhibits the catalytic activity of human topoisomerase IIalpha by blocking DNA cleavage." J.Biol.Chem. 273.28 (1998): 17643-50.
- Frauenstein, K., et al. "Evidence for a novel anti-apoptotic pathway in human keratinocytes involving the aryl hydrocarbon receptor, E2F1, and checkpoint kinase 1." Cell Death.Differ. 20.10 (2013): 1425-34.
- Friedberg, E. C. "DNA repair and Mutagenesis." 2. Edition, ASM Press, Washington DC (2006).
- Friedberg, E. C., L. D. McDaniel, and R. A. Schultz. "The role of endogenous and exogenous DNA damage and mutagenesis." Curr.Opin.Genet.Dev. 14.1 (2004): 5-10.
- Friedberg, E. C., Walker, G. C., Siede, W. "Cross-linking Agents", In: "DNA-Repair and Mutagenesis", ASM Press, Washington DC (1995): 33-42



- Fritsche, E., et al. "Lightening up the UV response by identification of the arylhydrocarbon receptor as a cytoplasmatic target for ultraviolet B radiation." Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 104.21 (2007): 8851-56.
- Fukunaga, B. N., et al. "Identification of functional domains of the aryl hydrocarbon receptor." J.Biol.Chem. 270.49 (1995): 29270-78.
- Gelboin, H. V. "Benzo[alpha]pyrene metabolism, activation and carcinogenesis: role and regulation of mixed-function oxidases and related enzymes." Physiol Rev. 60.4 (1980): 1107-66.
- Giovannucci, E. "An updated review of the epidemiological evidence that cigarette smoking increases risk of colorectal cancer." Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev. 10.7 (2001): 725-31.
- Gramatzki, D., et al. "Aryl hydrocarbon receptor inhibition downregulates the TGF-beta/Smad pathway in human glioblastoma cells." Oncogene 28.28 (2009): 2593-605.
- Greim, H. und Deml, E. "Toxikologie. Einführung für Naturwissenschaftler und Mediziner." VHC Verlagsgesellschaft, Weinheim (1996).
- Gu, Y. Z., J. B. Hogenesch, and C. A. Bradfield. "The PAS superfamily: sensors of environmental and developmental signals." Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol. 40 (2000): 519-61.
- Guo, N., Faller, D. V., Vaziri, C. "Carcinogen-induced S-phase arrest is Chk1 mediated and caffeine sensitive." Cell Growth and Diff. 13 (2002): 77-86.
- Haarmann-Stemmann, T., H. Bothe, and J. Abel. "Growth factors, cytokines and their receptors as downstream targets of arylhydrocarbon receptor (AhR) signaling pathways." Biochem.Pharmacol. 77.4 (2009): 508-20.
- Haarmann-Stemmann, T., et al. "Analysis of the transcriptional regulation and molecular function of the aryl hydrocarbon receptor repressor in human cell lines." Drug Metab Dispos. 35.12 (2007): 2262-69.
- Hall, M., S. Bates, and G. Peters. "Evidence for different modes of action of cyclin-dependent kinase inhibitors: p15 and p16 bind to kinases, p21 and p27 bind to cyclins." Oncogene 11.8 (1995): 1581-88.
- Han, D. H., et al. "Relationship between estrogen receptor-binding and estrogenic activities of environmental estrogens and suppression by flavonoids." Biosci.Biotechnol.Biochem. 66.7 (2002): 1479-87.
- Harborne, J. B. and C. A. Williams. "Advances in flavonoid research since 1992." Phytochemistry 55.6 (2000): 481-504.
- Harper, J. W., et al. "The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases." Cell 75.4 (1993): 805-16.
- Harper, J. W. and S. J. Elledge. "The DNA damage response: ten years after." Mol.Cell 28.5 (2007): 739-45.
- Harreus, U., et al. "[Genotoxic effect on human mucous membrane biopsies of the upper aerodigestive tract]." Laryngorhinootologie 78.4 (1999): 176-81.

- Harrigan, J. A., Vezina, C. M., McGarrigle, B. P., Ersing, N., Box, H. C., Maccubin, A. E., Olson, J. R. "DNA adduct formation in precision-cut rat liver and lung slices exposed to benzo[a]pyrene." Toxicol. Sci. 77 (2004): 307–314.
- Harvey, R. G. and Geacintov, N. E. "Intercalation and binding of Carcinogenic Hydrocarbon Metabolites to Nucleid Acids." Acc. Chem. Res. 21 (1988): 66-7.
- Hasebe, Y., et al. "Specific inhibition of hypoxia-inducible factor (HIF)-1 alpha activation and of vascular endothelial growth factor (VEGF) production by flavonoids." Biol.Pharm.Bull. 26.10 (2003): 1379-83.
- Hasinoff, B. B., et al. "Biochemical and proteomics approaches to characterize topoisomerase IIalpha cysteines and DNA as targets responsible for cisplatin-induced inhibition of topoisomerase IIalpha." Mol.Pharmacol. 67.3 (2005): 937-47.
- Hayashibara, T., et al. "Possible involvement of aryl hydrocarbon receptor (AhR) in adult T-cell leukemia (ATL) leukemogenesis: constitutive activation of AhR in ATL." Biochem.Biophys.Res.Comm. 300.1 (2003): 128-34.
- Helton, E. S. and X. Chen. "p53 modulation of the DNA damage response." J.Cell Biochem. 100.4 (2007): 883-96.
- Hempel, J., et al. "Flavonols and flavones of parsley cell suspension culture change the antioxidative capacity of plasma in rats." Nahrung 43.3 (1999): 201-04.
- Henderson, B. E., et al. "Endogenous hormones as a major factor in human cancer." Cancer Res. 42.8 (1982): 3232-39.
- Hengstler, J. G., Heimerdinger, C. K., Schiffer, I. B., Gebhard, S., Sagemüller, J., Tanner, B., Bolt, H. M., Oesch, F. "Dietary topoisomerase II-poisons: contribution of soy products to infant leukemia?" EXCLI J. 1 (2002): 8–14.
- Hiddemann, W. und Bartram, C. R. "Die Onkologie", Teil 1, 2. Ausgabe, Verlag Springer (2009): 118-127.
- Hirao, A., et al. "DNA damage-induced activation of p53 by the checkpoint kinase Chk2." Science 287.5459 (2000): 1824-27.
- Horinaka, M., et al. "Luteolin induces apoptosis via death receptor 5 upregulation in human malignant tumor cells." Oncogene 24.48 (2005): 7180-89.
- Howard, J. W. and T. Fazio. "Analytical methodology and reported findings of polycyclic aromatic hydrocarbons in foods." J.Assoc.Off Anal.Chem. 63.5 (1980): 1077-104.
- Hsu, S. L., et al. "Baicalein induces a dual growth arrest by modulating multiple cell cycle regulatory molecules." Eur.J.Pharmacol. 425.3 (2001): 165-71.
- Huang, M. T., H. L. Newmark, and K. Frenkel. "Inhibitory effects of curcumin on tumorigenesis in mice." J.Cell Biochem.Suppl 27 (1997): 26-34.
- Ichijo, H. "From receptors to stress-activated MAP kinases." Oncogene 18.45 (1999): 6087-93.
- Ikuta, T., et al. "Nuclear localization and export signals of the human aryl hydrocarbon receptor." J.Biol.Chem. 273.5 (1998): 2895-904.

- Imlay, J. A. and S. Linn. "DNA damage and oxygen radical toxicity." Science 240.4857 (1988): 1302-09.
- IPCS/EHC, "Selected non-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons." Environ. Health Criteria No. 202 (1998): 8-15.
- Ise, R., et al. "Expression profiling of the estrogen responsive genes in response to phytoestrogens using a customized DNA microarray." FEBS Lett. 579.7 (2005): 1732-40.
- Jagerstad, M. and K. Skog. "Genotoxicity of heat-processed foods." Mutat.Res. 574.1-2 (2005): 156-72.
- Jeggo, P. and M. Lobrich. "Radiation-induced DNA damage responses." Radiat.Prot.Dosimetry. 122.1-4 (2006): 124-27.
- Ji, K., et al. "Benzo[a]pyrene induces oxidative stress and endothelial progenitor cell dysfunction via the activation of the NF-kappaB pathway." Int.J.Mol.Med. 31.4 (2013): 922-30.
- Jinno, A., et al. "Induction of cytochrome P450-1A by the equine estrogen equilenin, a new endogenous aryl hydrocarbon receptor ligand." J.Steroid Biochem.Mol.Biol. 98.1 (2006): 48-55.
- Ju, W., et al. "A critical role of luteolin-induced reactive oxygen species in blockage of tumor necrosis factor-activated nuclear factor-kappaB pathway and sensitization of apoptosis in lung cancer cells." Mol.Pharmacol. 71.5 (2007): 1381-88.
- Karin, M. "Mitogen-activated protein kinase cascades as regulators of stress responses." Ann.N.Y.Acad.Sci. 851 (1998): 139-46.
- Kashani, M., et al. "Expression of the aryl hydrocarbon receptor (AhR) and the aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT) in fetal, benign hyperplastic, and malignant prostate." Prostate 37.2 (1998): 98-108.
- Kastan, M. B., et al. "Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage." Cancer Res. 51.23 Pt 1 (1991): 6304-11.
- Kawajiri, K., et al. "Aryl hydrocarbon receptor suppresses intestinal carcinogenesis in ApcMin/+ mice with natural ligands." Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 106.32 (2009): 13481-86.
- Kawamori, T., et al. "Chemopreventive effect of curcumin, a naturally occurring anti-inflammatory agent, during the promotion/progression stages of colon cancer." Cancer Res. 59.3 (1999): 597-601.
- Kazerouni, N., et al. "Analysis of 200 food items for benzo[a]pyrene and estimation of its intake in an epidemiologic study." Food Chem.Toxicol. 39.5 (2001): 423-36.
- Kazlauskas, A., L. Poellinger, and I. Pongratz. "Evidence that the co-chaperone p23 regulates ligand responsiveness of the dioxin (Aryl hydrocarbon) receptor." J.Biol.Chem. 274.19 (1999): 13519-24.
- Kazlauskas, A., L. Poellinger, and I. Pongratz. "The immunophilin-like protein XAP2 regulates ubiquitination and subcellular localization of the dioxin receptor." J.Biol.Chem. 275.52 (2000): 41317-24.

- Kazlauskas, A., et al. "The hsp90 chaperone complex regulates intracellular localization of the dioxin receptor." Mol.Cell Biol. 21.7 (2001): 2594-607.
- Khanna, K. K., et al. "ATM associates with and phosphorylates p53: mapping the region of interaction." Nat.Genet. 20.4 (1998): 398-400.
- Kim, H. J., et al. "Effects of hydroxyl group numbers on the B-ring of 5,7-dihydroxyflavones on the differential inhibition of human CYP 1A and CYP1B1 enzymes." Arch.Pharm.Res. 28.10 (2005): 1114-21.
- Kietz, S., Thomsen, J. S., Matthews, J., Pettersson, K., Strom, A., Gustafsson, J. A. "The Ah receptor inhibits estrogen-induced estrogen receptor beta in breast cancer cells." Biochem Biophys Res Commun 320 (2004):76–82
- Ko, L. J. and C. Prives. "p53: puzzle and paradigm." Genes Dev. 10.9 (1996): 1054-72.
- Kobayashi, T., T. Nakata, and T. Kuzumaki. "Effect of flavonoids on cell cycle progression in prostate cancer cells." Cancer Lett. 176.1 (2002): 17-23.
- Kohle, C., et al. "2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)-mediated membrane translocation of c-Src protein kinase in liver WB-F344 cells." Arch.Toxicol. 73.3 (1999): 152-58.
- Koliopanos, A., et al. "Increased arylhydrocarbon receptor expression offers a potential therapeutic target for pancreatic cancer." Oncogene 21.39 (2002): 6059-70.
- Konstantinopoulos, P. A., et al. "Oestrogen receptor beta (ERbeta) is abundantly expressed in normal colonic mucosa, but declines in colon adenocarcinoma paralleling the tumour's dedifferentiation." Eur.J.Cancer 39.9 (2003): 1251-58.
- Koppen, G., et al. "The comet assay: a tool to study alteration of DNA integrity in developing plant leaves." Mech.Ageing Dev. 110.1-2 (1999): 13-24.
- Kuo, L. J. and L. X. Yang. "Gamma-H." In Vivo 22.3 (2008): 305-09.
- Kyprianou, N., H. F. English, and J. T. Isaacs. "Programmed cell death during regression of PC-82 human prostate cancer following androgen ablation." Cancer Res. 50.12 (1990): 3748-53.
- Kyriakis, J. M., et al. "The stress-activated protein kinase subfamily of c-Jun kinases." Nature 369.6476 (1994): 156-60.
- Laemmli, U. K. "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature 227.5259 (1970): 680-85.
- Lane, D. P. "Cancer. p53, guardian of the genome." Nature 358.6381 (1992): 15-16.
- Le, Marchand L. "Cancer preventive effects of flavonoids--a review." Biomed.Pharmacother. 56.6 (2002): 296-301.
- Leadon, S. A., M. R. Stampfer, and J. Bartley. "Production of oxidative DNA damage during the metabolic activation of benzo[a]pyrene in human mammary epithelial cells correlates with cell killing." Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 85.12 (1988): 4365-68.
- LeBel, C. P., H. Ischiropoulos, and S. C. Bondy. "Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress." Chem.Res.Toxicol. 5.2 (1992): 227-31.

- Lee, L. T., et al. "Blockade of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase activity by quercetin and luteolin leads to growth inhibition and apoptosis of pancreatic tumor cells." Anticancer Res. 22.3 (2002): 1615-27.
- Leibeling, D., P. Laspe, and S. Emmert. "Nucleotide excision repair and cancer." J.Mol.Histol. 37.5-7 (2006): 225-38.
- Leung, H. W., et al. "Luteolin induced DNA damage leading to human lung squamous carcinoma CH27 cell apoptosis." Eur.J.Pharmacol. 508.1-3 (2005): 77-83.
- Li, L. and L. Zou. "Sensing, signaling, and responding to DNA damage: organization of the checkpoint pathways in mammalian cells." J.Cell Biochem. 94.2 (2005): 298-306.
- Li, W. X., et al. "Flavonoids from *Vitex trifolia* L. inhibit cell cycle progression at G2/M phase and induce apoptosis in mammalian cancer cells." J.Asian Nat.Prod.Res. 7.4 (2005): 615-26.
- Lim, do Y., et al. "Induction of cell cycle arrest and apoptosis in HT-29 human colon cancer cells by the dietary compound luteolin." Am.J.Physiol Gastrointest.Liver Physiol 292.1 (2007): G66-G75.
- Lin, K. T., et al. "Vav3-rac1 signaling regulates prostate cancer metastasis with elevated Vav3 expression correlating with prostate cancer progression and posttreatment recurrence." Cancer Res. 72.12 (2012): 3000-09.
- Lindenmeyer, F., et al. "Apigenin acts on the tumor cell invasion process and regulates protease production." Nutr.Cancer 39.1 (2001): 139-47.
- Lippert, B. und W. Beck. "Chemie in unserer Zeit: Platinkomplexe in der Krebstherapie.", Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 17.6 (1983): 190-199.
- Lippert, B. "Cisplatin Chemistry and Biochemistry of a Leading Anticancer Drug.", Verlag Helvetica Chimica Acta (1999).
- Lippman, M., G. Bolan, and K. Huff. "The effects of androgens and antiandrogens on hormone-responsive human breast cancer in long-term tissue culture." Cancer Res. 36.12 (1976): 4610-18.
- Liu, L. F. "DNA Topoisomerases : Biochemistry and Molecular Biology." Advances in Pharmacology, Vol. 29A, Academic Press New York (1994)
- Liu, Z., et al. "AhR expression is increased in hepatocellular carcinoma." J.Mol.Histol. 44.4 (2013): 455-61.
- Liu, Z. G., et al. "Three distinct signalling responses by murine fibroblasts to genotoxic stress." Nature 384.6606 (1996): 273-76.
- Lopez-Bergami, P. and Z. Ronai. "Requirements for PKC-augmented JNK activation by MKK4/7." Int.J.Biochem.Cell Biol. 40.5 (2008): 1055-64.
- Lubet, R. A., et al. "Induction of neoplastic transformation and DNA single-strand breaks in C3H/10T1/2 clone 8 cells by polycyclic hydrocarbons and alkylating agents." J.Natl.Cancer Inst. 71.5 (1983): 991-97.
- Lukas, J., C. Lukas, and J. Bartek. "Mammalian cell cycle checkpoints: signalling pathways and their organization in space and time." DNA Repair (Amst) 3.8-9 (2004): 997-1007.

- Ma, Q. and J. P. Whitlock, Jr. "The aromatic hydrocarbon receptor modulates the Hepa 1c1c7 cell cycle and differentiated state independently of dioxin." Mol.Cell Biol. 16.5 (1996): 2144-50.
- Ma, Q. and J. P. Whitlock, Jr. "A novel cytoplasmic protein that interacts with the Ah receptor, contains tetratricopeptide repeat motifs, and augments the transcriptional response to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin." J.Biol.Chem. 272.14 (1997): 8878-84.
- Macleod, K. F., et al. "p53-dependent and independent expression of p21 during cell growth, differentiation, and DNA damage." Genes Dev. 9.8 (1995): 935-44.
- Mahmoud, N. N., et al. "Plant phenolics decrease intestinal tumors in an animal model of familial adenomatous polyposis." Carcinogenesis 21.5 (2000): 921-27.
- Manach, C., Regerat, F., Texier, O., Agullo, G., Demigne, C. and Remesy, C. "Bioavailability, metabolism and physiological impact of 4-oxo-flavonoids." Nutr. Res. 16 (1996): 517-544.
- Marlowe, J. L. and A. Puga. "Aryl hydrocarbon receptor, cell cycle regulation, toxicity, and tumorigenesis." J.Cell Biochem. 96.6 (2005): 1174-84.
- Marquardt, H. und S. G. Schäfer. "Lehrbuch der Toxikologie", 2. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart (2004).
- Matsukawa, Y., et al. "Genistein arrests cell cycle progression at G2-M." Cancer Res. 53.6 (1993): 1328-31.
- Matsumoto, Y., et al. "Aryl hydrocarbon receptor plays a significant role in mediating airborne particulate-induced carcinogenesis in mice." Environ.Sci.Technol. 41.10 (2007): 3775-80.
- Matsuo, M., et al. "Cytotoxicity of flavonoids toward cultured normal human cells." Biol.Pharm.Bull. 28.2 (2005): 253-59.
- Matsushita, N., et al. "A factor binding to the xenobiotic responsive element (XRE) of P-4501A1 gene consists of at least two helix-loop-helix proteins, Ah receptor and Arnt." J.Biol.Chem. 268.28 (1993): 21002-06.
- Matsuzaki, Y., et al. "Cell death induced by baicalein in human hepatocellular carcinoma cell lines." Jpn.J.Cancer Res. 87.2 (1996): 170-77.
- Meggouh, F., P. Lointier, and S. Saez. "Sex steroid and 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptors in human colorectal adenocarcinoma and normal mucosa." Cancer Res. 51.4 (1991): 1227-33.
- Mello Filho, A. C. and R. Meneghini. "In vivo formation of single-strand breaks in DNA by hydrogen peroxide is mediated by the Haber-Weiss reaction." Biochim.Biophys.Acta 781.1-2 (1984): 56-63.
- Messina, M. J., et al. "Soy intake and cancer risk: a review of the in vitro and in vivo data." Nutr.Cancer 21.2 (1994): 113-31.
- Metodiewa, D., et al. "Quercetin may act as a cytotoxic prooxidant after its metabolic activation to semiquinone and quinoidal product." Free Radic.Biol.Med. 26.1-2 (1999): 107-16.
- Michels, G., et al. "Pro-apoptotic effects of the flavonoid luteolin in rat H4IIE cells." Toxicology 206.3 (2005): 337-48.

- Middleton E Jr, C. Kandaswami, and T. C. Theoharides. "The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer." Pharmacol.Rev. 52.4 (2000): 673-751.
- Miller, K. P. and K. S. Ramos. "Impact of cellular metabolism on the biological effects of benzo[a]pyrene and related hydrocarbons." Drug Metab Rev. 33.1 (2001): 1-35.
- Mimura, J., et al. "Loss of teratogenic response to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in mice lacking the Ah (dioxin) receptor." Genes Cells 2.10 (1997): 645-54.
- Mitchell, D. L. and R. S. Nairn. "The biology of the (6-4) photoproduct." Photochem.Photobiol. 49.6 (1989): 805-19.
- Miura, Y. H., et al. "Active oxygens generation by flavonoids." Biol.Pharm.Bull. 21.2 (1998): 93-96.
- Moennikes, O., et al. "A constitutively active dioxin/aryl hydrocarbon receptor promotes hepatocarcinogenesis in mice." Cancer Res. 64.14 (2004): 4707-10.
- Moon, Y. J., X. Wang, and M. E. Morris. "Dietary flavonoids: effects on xenobiotic and carcinogen metabolism." Toxicol.In Vitro 20.2 (2006): 187-210.
- Moroianu, J. "Nuclear import and export pathways." J.Cell Biochem. Suppl 32-33 (1999): 76-83.
- Mullis, K. B. and F. A. Faloona. "Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction." Methods Enzymol. 155 (1987): 335-50.
- Nagle, D. G., D. Ferreira, and Y. D. Zhou. "Epigallocatechin-3-gallate (EGCG): chemical and biomedical perspectives." Phytochemistry 67.17 (2006): 1849-55.
- Nakatsuru, Y., et al. "Dibenzo[A,L]pyrene-induced genotoxic and carcinogenic responses are dramatically suppressed in aryl hydrocarbon receptor-deficient mice." Int.J.Cancer 112.2 (2004): 179-83.
- Nebert, D. W., et al. "Role of the aromatic hydrocarbon receptor and [Ah] gene battery in the oxidative stress response, cell cycle control, and apoptosis." Biochem.Pharmacol. 59.1 (2000): 65-85.
- Nitiss, J. L. "DNA topoisomerases in cancer chemotherapy: using enzymes to generate selective DNA damage." Curr.Opin.Investig.Drugs 3.10 (2002): 1512-16.
- Olive, P. L. and J. P. Banath. "Induction and rejoining of radiation-induced DNA single-strand breaks: "tail moment" as a function of position in the cell cycle." Mutat.Res. 294.3 (1993): 275-83.
- Palermo, C. M., et al. "Identification of potential aryl hydrocarbon receptor antagonists in green tea." Chem.Res.Toxicol. 16.7 (2003): 865-72.
- Paruthiyil, S., et al. "Estrogen receptor beta inhibits human breast cancer cell proliferation and tumor formation by causing a G2 cell cycle arrest." Cancer Res. 64.1 (2004): 423-28.
- Perdew, G. H. and C. A. Bradfield. "Mapping the 90 kDa heat shock protein binding region of the Ah receptor." Biochem.Mol.Biol.Int. 39.3 (1996): 589-93.
- Petrocelli, T. and J. Slingerland. "UVB induced cell cycle checkpoints in an early stage human melanoma line, WM35." Oncogene 19.39 (2000): 4480-90.

- Petrulis, J.R. and N.J. Bunce. "Competitive inhibition by inducer as a confounding factor in the use of the ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) assay to estimate exposure to dioxin-like compounds." Toxicol. Lett. 105(3) (1999):251-60.
- Phelan, D., et al. "Activation of the Ah receptor signal transduction pathway by bilirubin and biliverdin." Arch.Biochem.Biophys. 357.1 (1998): 155-63.
- Phillips, D. H. "Polycyclic aromatic hydrocarbons in the diet." Mutat.Res. 443.1-2 (1999): 139-47.
- Pinpin, L., Han, C., Tsai, W. T., Wu, M. H., Liao, Y. S., Chen, J. T., and Su, J. M. "Overexpression of Aryl Hydrocarbon Receptor in Human Lung Carcinomas." Toxicol Pathol 31 (2003): 22-30.
- Plaumann, B., et al. "Flavonoids activate wild-type p53." Oncogene 13.8 (1996): 1605-14.
- Pohjanvirta, R. "The AH Receptor in Biology and Toxicology." Wiley&Sons, Inc., Hoboken, New Jersey (2012).
- Poland, A., E. Glover, and A. S. Kende. "Stereospecific, high affinity binding of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin by hepatic cytosol. Evidence that the binding species is receptor for induction of aryl hydrocarbon hydroxylase." J.Biol.Chem. 251.16 (1976): 4936-46.
- Poland, A. and J. C. Knutson. "2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and related halogenated aromatic hydrocarbons: examination of the mechanism of toxicity." Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol. 22 (1982): 517-54.
- Pollenz, R. S., C. A. Sattler, and A. Poland. "The aryl hydrocarbon receptor and aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator protein show distinct subcellular localizations in Hepa 1c1c7 cells by immunofluorescence microscopy." Mol.Pharmacol. 45.3 (1994): 428-38.
- Puga, A., Y. Xia, and C. Elferink. "Role of the aryl hydrocarbon receptor in cell cycle regulation." Chem.Biol.Interact. 141.1-2 (2002): 117-30.
- Qin, L. F. and I. O. Ng. "Induction of apoptosis by cisplatin and its effect on cell cycle-related proteins and cell cycle changes in hepatoma cells." Cancer Lett. 175.1 (2002): 27-38.
- Quattrochi, L. C. and R. H. Tukey. "Nuclear uptake of the Ah (dioxin) receptor in response to omeprazole: transcriptional activation of the human CYP1A1 gene." Mol.Pharmacol. 43.4 (1993): 504-08.
- Rao, S. P., Satelli, A., Moridani, M., Jenkins, M., Subrahmanyeswara Rao, U. "Luteolin induces apoptosis in multidrug resistant cancer cells without affecting the drug transporter function: involvement of cell line-specific apoptotic mechanisms." Int. J. of Cancer 130 (2011): 2703-14.
- Ramos, A. A., C. Pereira-Wilson, and A. R. Collins. "Protective effects of ursolic acid and luteolin against oxidative DNA damage include enhancement of DNA repair in Caco-2 cells." Mutat.Res. 692.1-2 (2010): 6-11.
- Rannug, A. and E. Fritsche. "The aryl hydrocarbon receptor and light." Biol.Chem. 387.9 (2006): 1149-57.
- Rannug, A., et al. "Certain photooxidized derivatives of tryptophan bind with very high affinity to the Ah receptor and are likely to be endogenous signal substances." J.Biol.Chem. 262.32 (1987): 15422-27.



- Reisz-Porszasz, S., et al. "Identification of functional domains of the aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator protein (ARNT)." Mol.Cell Biol. 14.9 (1994): 6075-86.
- Renaud, S. and Lorgeril M. de. "Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease." Lancet 339.8808 (1992): 1523-26.
- Reyes, H., S. Reisz-Porszasz, and O. Hankinson. "Identification of the Ah receptor nuclear translocator protein (Arnt) as a component of the DNA binding form of the Ah receptor." Science 256.5060 (1992): 1193-95.
- Riccardi, C. and I. Nicoletti. "Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry." Nat.Protoc. 1.3 (2006): 1458-61.
- Rifkind, A. B., et al. "Aryl hydrocarbon hydroxylase activity and microsomal cytochrome content of human fetal tissues." Cancer Res. 38.6 (1978): 1572-77.
- Rigdon, R. H. and J. Neal. "Gastric carcinomas and pulmonary adenomas in mice fed benzo (a) pyrene." Tex.Rep.Biol.Med. 24.2 (1966): 195-207.
- Rigdon, R. H. and J. Neal. "Relationship of leukemia to lung and stomach tumors in mice fed benzo (a) pyrene." Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 130.1 (1969): 146-48.
- Rigdon, R. H., J. Neal, and J. Mack. "Leukemia in mice fed benzo(a)pyrene." Tex.Rep.Biol.Med. 25.3 (1967): 422-31.
- Robak, J. and R. J. Gryglewski. "Flavonoids are scavengers of superoxide anions." Biochem.Pharmacol. 37.5 (1988): 837-41.
- Rogakou, E. P., et al. "DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139." J.Biol.Chem. 273.10 (1998): 5858-68.
- Robert-Koch-Institut, Zentrum für Krebsregisterdaten "[www.rki.de](http://www.rki.de)", Stand: 13.12.2013,  
Ref Type: Online Source,  
[http://www.rki.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Darmkrebs/darmkrebs\\_node.html](http://www.rki.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Darmkrebs/darmkrebs_node.html)
- Roos, W. P. and B. Kaina. "DNA damage-induced cell death by apoptosis." Trends Mol.Med. 12.9 (2006): 440-50.
- Rossi, M., et al. "Flavonoids and colorectal cancer in Italy." Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev. 15.8 (2006): 1555-58.
- Rowlands, J. C. and J. A. Gustafsson. "Aryl hydrocarbon receptor-mediated signal transduction." Crit Rev.Toxicol. 27.2 (1997): 109-34.
- Rubin, H. "Synergistic mechanisms in carcinogenesis by polycyclic aromatic hydrocarbons and by tobacco smoke: a bio-historical perspective with updates." Carcinogenesis 22.12 (2001): 1903-30.
- Ruegg, J., et al. "The transcription factor aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator functions as an estrogen receptor beta-selective coactivator, and its recruitment to alternative pathways mediates antiestrogenic effects of dioxin." Mol.Endocrinol. 22.2 (2008): 304-16.
- Safe, S. "Polychlorinated biphenyls (PCBs), dibenzo-p-dioxins (PCDDs), dibenzofurans (PCDFs), and related compounds: environmental and mechanistic considerations which support the development of toxic equivalency factors (TEFs)." Crit Rev.Toxicol. 21.1 (1990): 51-88.

- Safe, S. and M. Wormke. "Inhibitory aryl hydrocarbon receptor-estrogen receptor alpha cross-talk and mechanisms of action." Chem.Res.Toxicol. 16.7 (2003): 807-16.
- Salti, G. I., et al. "Genistein induces apoptosis and topoisomerase II-mediated DNA breakage in colon cancer cells." Eur.J.Cancer 36.6 (2000): 796-802.
- Samy, R. P., P. Gopalakrishnakone, and S. Ignacimuthu. "Anti-tumor promoting potential of luteolin against 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced mammary tumors in rats." Chem.Biol.Interact. 164.1-2 (2006): 1-14.
- Sandrock, K., et al. "The nuclear import of the small GTPase Rac1 is mediated by the direct interaction with karyopherin alpha2." Traffic. 11.2 (2010): 198-209.
- Schmidt, F., et al. "The topoisomerase II inhibitor, genistein, induces G2/M arrest and apoptosis in human malignant glioma cell lines." Oncol.Rep. 19.4 (2008): 1061-66.
- Seidel, S. D., et al. "Activation of the Ah receptor signaling pathway by prostaglandins." J.Biochem.Mol.Toxicol. 15.4 (2001): 187-96.
- Selvendiran, K., et al. "Luteolin promotes degradation in signal transducer and activator of transcription 3 in human hepatoma cells: an implication for the antitumor potential of flavonoids." Cancer Res. 66.9 (2006): 4826-34.
- Sherr, C. J. "Cancer cell cycles." Science 274.5293 (1996): 1672-77.
- Sherr, C. J. and J. M. Roberts. "Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases." Genes Dev. 9.10 (1995): 1149-63.
- Shi, R., et al. "Luteolin sensitizes the anticancer effect of cisplatin via c-Jun NH2-terminal kinase-mediated p53 phosphorylation and stabilization." Mol.Cancer Ther. 6.4 (2007): 1338-47.
- Shi, R. X., C. N. Ong, and H. M. Shen. "Luteolin sensitizes tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis in human tumor cells." Oncogene 23.46 (2004): 7712-21.
- Shi, R. X., C. N. Ong, and H. M. Shen. "Protein kinase C inhibition and x-linked inhibitor of apoptosis protein degradation contribute to the sensitization effect of luteolin on tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis in cancer cells." Cancer Res. 65.17 (2005): 7815-23.
- Shieh, S. Y., et al. "The human homologs of checkpoint kinases Chk1 and Cds1 (Chk2) phosphorylate p53 at multiple DNA damage-inducible sites." Genes Dev. 14.3 (2000): 289-300.
- Shiloh, Y. "ATM and ATR: networking cellular responses to DNA damage." Curr.Opin.Genet.Dev. 11.1 (2001): 71-77.
- Shiloh, Y. "ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity." Nat.Rev.Cancer 3.3 (2003): 155-68.
- Shimizu, Y., et al. "Benzo[a]pyrene carcinogenicity is lost in mice lacking the aryl hydrocarbon receptor." Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 97.2 (2000): 779-82.
- Shimoi, K., et al. "Intestinal absorption of luteolin and luteolin 7-O-beta-glucoside in rats and humans." FEBS Lett. 438.3 (1998): 220-24.

- Singh, N. P., et al. "A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells." Exp.Cell Res. 175.1 (1988): 184-91.
- Singh, N. P., et al. "A microgel electrophoresis technique for the direct quantitation of DNA damage and repair in individual fibroblasts cultured on microscope slides." Mutat.Res. 252.3 (1991): 289-96.
- Sinha, R., et al. "Dietary benzo[a]pyrene intake and risk of colorectal adenoma." Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev. 14.8 (2005): 2030-34.
- Skibola, C. F. and M. T. Smith. "Potential health impacts of excessive flavonoid intake." Free Radic.Biol.Med. 29.3-4 (2000): 375-83.
- Slingerland, J. and M. Pagano. "Regulation of the cdk inhibitor p27 and its deregulation in cancer." J.Cell Physiol 183.1 (2000): 10-17.
- Song, J., et al. "A ligand for the aryl hydrocarbon receptor isolated from lung." Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 99.23 (2002): 14694-99.
- Sordet, O., et al. "Apoptosis induced by topoisomerase inhibitors." Curr.Med.Chem.Anticancer Agents 3.4 (2003): 271-90.
- Stedeford, T., et al. "Organ-specific differences in 8-oxoguanosine glycosylase (OGG1) repair following acute treatment with benzo[a]pyrene." Res.Commun.Mol.Pathol.Pharmacol. 109.1-2 (2001): 73-85.
- Steeg, P. S. and J. S. Abrams. "Cancer prognostics: past, present and p27." Nat.Med. 3.2 (1997): 152-54.
- Strom, A., et al. "Estrogen receptor beta inhibits 17beta-estradiol-stimulated proliferation of the breast cancer cell line T47D." Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 101.6 (2004): 1566-71.
- Swanson, H. I., W. K. Chan, and C. A. Bradfield. "DNA binding specificities and pairing rules of the Ah receptor, ARNT, and SIM proteins." J.Biol.Chem. 270.44 (1995): 26292-302.
- Takemura, H., et al. "Inhibitory effects of chrysoeriol on DNA adduct formation with benzo[a]pyrene in MCF-7 breast cancer cells." Toxicology 274.1-3 (2010): 42-48.
- Teramoto, H., et al. "Tyrosine phosphorylation of the vav proto-oncogene product links FcepsilonRI to the Rac1-JNK pathway." J.Biol.Chem. 272.16 (1997): 10751-55.
- Terry, P., et al. "Fruit, vegetables, dietary fiber, and risk of colorectal cancer." J.Natl.Cancer Inst. 93.7 (2001): 525-33.
- Thompson, L. U. "Lignans and Isoflavones.", In: "Carcinogenic/Anticarcinogenic Factors in Food", Eisenbrand, G., Dayan, A. D., Elias, P. S., Grunow, W., Schlatter, J. (Ed), Wiley-VHC (2000): 334-47.
- Theodoratou, E., et al. "Dietary flavonoids and the risk of colorectal cancer." Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev. 16.4 (2007): 684-93.
- Tibbetts, R. S., et al. "A role for ATR in the DNA damage-induced phosphorylation of p53." Genes Dev. 13.2 (1999): 152-57.

- Tsai, Y. D., et al. "Luteolin inhibits proliferation of human glioblastoma cells *via* induction of cell cycle arrest and apoptosis." Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers 44 (2013):837–845
- Tsuchiya, Y., M. Nakajima, and T. Yokoi. "Cytochrome P450-mediated metabolism of estrogens and its regulation in human." Cancer Lett. 227.2 (2005): 115-24.
- Tsuji, G., et al. "An environmental contaminant, benzo(a)pyrene, induces oxidative stress-mediated interleukin-8 production in human keratinocytes via the aryl hydrocarbon receptor signaling pathway." J.Dermatol.Sci. 62.1 (2011): 42-49.
- Uno, S., et al. "Benzo[a]pyrene-induced toxicity: paradoxical protection in Cyp1a1(-/-) knockout mice having increased hepatic BaP-DNA adduct levels." Biochem.Biophys.Res.Comm. 289.5 (2001): 1049-56.
- Verheij, M., et al. "The role of the stress-activated protein kinase (SAPK/JNK) signaling pathway in radiation-induced apoptosis." Radiother.Oncol. 47.3 (1998): 225-32.
- Vogel, C., et al. "Regulation of prostaglandin endoperoxide H synthase-2 induction by dioxin in rat hepatocytes: possible c-Src-mediated pathway." Carcinogenesis 21.12 (2000): 2267-74.
- Vogel, C. F., et al. "Interaction of aryl hydrocarbon receptor and NF-kappaB subunit RelB in breast cancer is associated with interleukin-8 overexpression." Arch.Biochem.Biophys. 512.1 (2011): 78-86.
- Waldman, T., K. W. Kinzler, and B. Vogelstein. "p21 is necessary for the p53-mediated G1 arrest in human cancer cells." Cancer Res. 55.22 (1995): 5187-90.
- Waliszewski, P., et al. "Molecular study of sex steroid receptor gene expression in human colon and in colorectal carcinomas." J.Surg.Oncol. 64.1 (1997): 3-11.
- Wang, L. M., et al. "Luteolin inhibits proliferation induced by IGF-1 pathway dependent ERalpha in human breast cancer MCF-7 cells." Asian Pac.J.Cancer Prev. 13.4 (2012): 1431-37.
- Wang, W., et al. "Cell-cycle arrest at G2/M and growth inhibition by apigenin in human colon carcinoma cell lines." Mol.Carcinog. 28.2 (2000): 102-10.
- Watzl, B. und Rechkemmer, G. "Basiswissen aktualisiert: Flavonoide. Ernährungs-Umschau 48 (2001): 498-502.
- Weiss, R. S., P. Leder, and C. Vaziri. "Critical role for mouse Hus1 in an S-phase DNA damage cell cycle checkpoint." Mol.Cell Biol. 23.3 (2003): 791-803.
- Whitlock, J. P., Jr. "Induction of cytochrome P4501A1." Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol. 39 (1999): 103-25.
- Williams, R. J., J. P. Spencer, and C. Rice-Evans. "Flavonoids: antioxidants or signalling molecules?" Free Radic.Biol.Med. 36.7 (2004): 838-49.
- Woodcock, S. A., et al. "Tiam1-Rac signaling counteracts Eg5 during bipolar spindle assembly to facilitate chromosome congression." Curr.Biol. 20.7 (2010): 669-75.

- Xagorari, A., et al. "Luteolin inhibits an endotoxin-stimulated phosphorylation cascade and proinflammatory cytokine production in macrophages." J.Pharmacol.Exp.Ther. 296.1 (2001): 181-87.
- Xagorari, A., C. Roussos, and A. Papapetropoulos. "Inhibition of LPS-stimulated pathways in macrophages by the flavonoid luteolin." Br.J.Pharmacol. 136.7 (2002): 1058-64.
- Xiong, Y., et al. "p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases." Nature 366.6456 (1993): 701-04.
- Xue, W. and D. Warshawsky. "Metabolic activation of polycyclic and heterocyclic aromatic hydrocarbons and DNA damage: a review." Toxicol.Appl.Pharmacol. 206.1 (2005): 73-93.
- Yamashita, N. and S. Kawanishi. "Distinct mechanisms of DNA damage in apoptosis induced by quercetin and luteolin." Free Radic.Res. 33.5 (2000): 623-33.
- Yan, Z., et al. "Benzo[a]pyrene induces the transcription of cyclooxygenase-2 in vascular smooth muscle cells. Evidence for the involvement of extracellular signal-regulated kinase and NF-kappaB." J.Biol.Chem. 275.7 (2000): 4949-55.
- Yang, C. S., et al. "Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds." Annu.Rev.Nutr. 21 (2001): 381-406.
- Yao, B., et al. "The Cdc25A is involved in S-phase checkpoint induced by benzo(a)pyrene." Toxicology 237.1-3 (2007): 210-17.
- Yu, C., et al. "Pretreatment of baicalin and wogonoside with glycoside hydrolase: a promising approach to enhance anticancer potential." Oncol.Rep. 30.5 (2013): 2411-18.
- Zand, R. S., D. J. Jenkins, and E. P. Diamandis. "Steroid hormone activity of flavonoids and related compounds." Breast Cancer Res.Treat. 62.1 (2000): 35-49.
- Zeng, L., et al. "Vav3 mediates receptor protein tyrosine kinase signaling, regulates GTPase activity, modulates cell morphology, and induces cell transformation." Mol.Cell Biol. 20.24 (2000): 9212-24.
- Zhang, S., C. Qin, and S. H. Safe. "Flavonoids as aryl hydrocarbon receptor agonists/antagonists: effects of structure and cell context." Environ.Health Perspect. 111.16 (2003): 1877-82.
- Zhang, Y. J., et al. "Immunohistochemical detection of polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA damage in human blood vessels of smokers and non-smokers." Atherosclerosis 140.2 (1998): 325-31.
- Zhou, B. B. and S. J. Elledge. "The DNA damage response: putting checkpoints in perspective." Nature 408.6811 (2000): 433-39.
- Zhou, H., et al. "The induction of cell cycle regulatory and DNA repair proteins in cisplatin-induced acute renal failure." Toxicol.Appl.Pharmacol. 200.2 (2004): 111-20.
- Zi, X., D. K. Feyes, and R. Agarwal. "Anticarcinogenic effect of a flavonoid antioxidant, silymarin, in human breast cancer cells MDA-MB 468: induction of G1 arrest through an increase in Cip1/p21 concomitant with a decrease in kinase activity of cyclin-dependent kinases and associated cyclins." Clin.Cancer Res. 4.4 (1998): 1055-64.
- Zou, L. and S. J. Elledge. "Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA-ssDNA complexes." Science 300.5625 (2003): 1542-48.



## Danksagung

Ich möchte mich zunächst beim Herrn Prof. Dr. Josef Abel für die Überlassung des interessanten Themas bedanken.

Bei Frau Prof. Dr. Ellen Fritsche möchte ich mich für die freundliche Übernahme der Betreuung meines Projektes sowie für die konstruktive und hilfreiche Unterstützung bedanken.

Herrn Prof. Dr. Peter Proksch danke ich für die freundliche Übernahme des Zweitgutachters und die fakultätsübergreifende Betreuung.

Mein besonderer Dank gilt dem „besten Chef der Welt“ Dr. Thomas Haarmann-Stemmann. Danke Dir für die hilfreichen Ratschläge und Ideen, für dein Verständnis für gewisse Lebenssituationen und die Geduld. Dank Deiner offenen und freundlichen Art entstand in unserer AG eine wohltuende Arbeitsatmosphäre, die einfach Lust zur Arbeit zu kommen erweckte. Danke Dir, dass Du immer ein offenes Ohr für mich hattest!

Ganz herzlichen Dank an Dr. Katrin Frauenstein für die freundschaftliche Unterstützung in jeglichen Arbeits- und Lebenssituationen. Durch die gemeinsame Arbeit habe ich aus einer guten Kollegin eine liebe Freundin gewonnen, mit der wir zusammen lachen und weinen konnten. Danke Dir für die tollen Gespräche bei unseren geliebten Kaffeepausen!

Außerdem möchte ich mich ganz herzlich bei Kerstin Fischer für die zahlreiche Unterstützung im Labor bedanken. Ohne Dich wäre die Abschlussphase meiner Arbeit viel schwieriger gewesen. Und einen ganz herzlichen Dank für die leckeren selbstgemachten Marmeladen, die mir meine Arbeitstage versüßt haben. Vielen Dank an Birgit Neumann für die süsse Nervennahrung, die sehr oft zur Entspannung der kritischen Situationen beitrug.

Bei meiner Familie möchte ich mich vom ganzen Herzen bedanken. Liebe Mama und Papa, ich danke Euch, dass Ihr ohne Rücksicht auf eigene Lebensperspektiven mir die Chance gegeben habt, diesen Weg einzuschlagen. Danke für Eure Liebe, Euer Vertrauen und Euer Glaube an mich!

Ein großes Dankeschön an mein Schwesterherz Tanja für die moralische Unterstützung aus dem fernen Moskau. Schade, dass du viel zu weit entfernt von mir bist!

Danke an meine Schwiegereltern für die tatkräftige Unterstützung bei der Betreuung meiner kleinen Tochter Julia und die netten und aufbauenden Worte in den kritischsten Phasen des Schreibens!

In besonderem Masse bedanke ich mich bei meinen lieben Wladimir und Julia. Eure grenzenlose Liebe, Geduld und die seelische Unterstützung gab mir die Kraft diese Arbeit abzuschließen. Ich liebe Euch!

**Eidesstattliche Erklärung**

Ich versichere an Eides Statt, dass die Dissertation von mir selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität“ erstellt worden ist. Die Dissertation wurde noch keiner anderen Fakultät vorgelegt. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, den 07.08.2014

Natalie Stobbe-Maicherski