
Mechanismen der genotoxischen Wirkung von *Alternaria*-Toxinen

Zur Erlangung des akademischen Grades eines

DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. nat.)

der Fakultät für Chemie und Biowissenschaften der

Universität Karlsruhe (TH)

vorgelegte

DISSERTATION

von

Markus Fehr

aus Schwäbisch Gmünd

Dekan: Prof. Dr. Stefan Bräse

Referent: Prof. Dr. Doris Marko

Korreferent: Prof. Dr. Dr. Manfred Metzler

Tag der mündlichen Prüfung: 17. Dezember 2009



Für meine Familie

Man kann einen Menschen nichts lehren, man kann ihm nur helfen, es in
sich selbst zu entdecken

[Galileo Galilei]



Danksagung

Mein Dank gilt allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Im Besonderen möchte ich mich bedanken bei:

Frau Prof. Marko für die Bereitstellung des interessanten Themas sowie für die Betreuung und Begutachtung der Arbeit.

Herrn Prof. Metzler für die Übernahme des Korreferats.

Gudrun und Melanie, deren wissenschaftliche Unterstützung zu wichtigen Ideen und Erkenntnissen beigetragen haben.

Melanie, Joanna und Simone für die Durchsicht des Manuskripts.

Allen Kolleginnen und Kollegen der Abteilung Lebensmittelchemie / -toxikologie.

Meinen Diplomanden Christoph, Simone und Julia.

Meiner Familie, die mich während dieser Zeit immer unterstützt hat.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
2. Theoretische Grundlagen.....	3
2.1. Humane Topoisomerasen.....	3
2.1.1. Topoisomerase I.....	5
2.1.1.1. Vorkommen und Aufbau.....	5
2.1.1.2. Mechanismus der Topoisomerase I.....	6
2.1.1.3. Expression und Funktion der Topoisomerase I.....	7
2.1.2. Topoisomerase II.....	8
2.1.2.1. Vorkommen und Aufbau der Topoisomerase II-Enzyme.....	8
2.1.2.2. Mechanismus der Topoisomerase II.....	9
2.1.2.3. Expression und Funktion der Topoisomerase II-Isoformen.....	11
2.1.3. Hemmstoffe humaner Topoisomerasen.....	12
2.1.3.1. Katalytische Topoisomerasehemmstoffe.....	13
2.1.3.2. Topoisomerasegifte.....	14
2.1.4. Topoisomerasehemmstoffe in der Chemotherapie.....	17
2.1.4.1. Induktion sekundärer Leukämien durch Topoisomerase II-Gifte.....	18
2.2. Tyrosyl-DNA-Phosphodiesterase 1.....	19
2.3. DNA-Reparatur.....	22
2.3.1. Reparatur von DNA-Einzelstrangbrüchen.....	22
2.3.1.1. PCNA.....	23
2.3.2. Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen.....	25
2.3.2.1. Ku70/Ku80.....	27
2.4. Oxidativer Stress.....	28
2.4.1. Reaktive Sauerstoffspezies.....	29
2.4.2. Der Nrf2/ARE-Signalweg.....	32
2.4.3. Das zelluläre Antioxidans Glutathion.....	34
2.4.4. Glutathion-S-Transferasen.....	35
2.5. Fremdstoffmetabolismus.....	36
2.5.1. Der „Arylhydrocarbon“ Rezeptor-Signalweg.....	36
2.5.2. Cytochrom-P450 abhängige Monooxygenasen.....	39
2.6. Mykotoxine der Schimmelpilzgattung <i>Alternaria</i>	40

2.6.1. Die Schimmelpilzgattung <i>Alternaria</i>	40
2.6.1.1. Morphologie von <i>Alternaria</i>	41
2.6.1.2. Vorkommen von <i>Alternaria</i>	41
2.6.2. <i>Alternaria</i> -Toxine	44
2.6.2.1. Einfluss der Umweltbedingungen auf die Toxinbildung	44
2.6.2.2. Toxizität von <i>Alternaria</i> -Extrakten.....	45
2.6.2.3. Toxizität und biologische Wirkungen von AOH, AME und ALT.....	46
2.6.2.4. Verteilung und Metabolismus von AOH und AME	49
3. Ziel der Arbeit	50
4. Ergebnisse und Diskussion	53
4.1. Das <i>Alternaria</i> -Toxin Altenuen	53
4.2. Einfluss von AOH und AME auf die katalytische Aktivität humaner DNA-Topoisomerase II α	56
4.3. Wirkmechanismus der Topoisomerasehemmung	58
4.3.1. Mechanismus der Hemmwirkung von AOH auf humane DNA- Topoisomerase II im zellfreien Testsystem	59
4.3.2. Mechanismus der Topoisomerasehemmung durch AOH und AME in A431-Zellen.....	64
4.3.2.1. Zytotoxisches Potential von AOH und AME in A431-Zellen.....	64
4.3.2.2. Genotoxisches Potential von AOH und AME in A431-Zellen.....	67
4.3.2.3. Nachweis der Topoisomerasegiftung durch AOH in A431-Zellen.....	70
4.3.2.4. Detektion kovalenter DNA-Topoisomerase-Intermediate in A431-Zellen.....	74
4.3.3. Nachweis von DNA-Doppelstrangbrüchen durch AOH und AME in A431-Zellen.....	86
4.4. Einfluss der DNA-Reparatur auf das genotoxische Potential von AOH.....	92
4.4.1. Einfluss der TDP1 auf die Genotoxizität von AOH	92
4.4.1.1. Modulation der DNA-strangbrechenden Wirkung durch AOH an TDP1- überexprimierenden HEK293-Zellen	92
4.4.1.2. Modulation der DNA-strangbrechenden Wirkung durch AOH in TDP1- supprimierten HCT116-Zellen.....	95
4.4.2. Modulation der genotoxischen Wirkung durch AOH an Ku70- und PCNA-supprimierten HCT116-Zellen.....	99
4.4.3. Genotoxisches Potential von AOH und AME in humanen Kolonkarzinomzellen	104
4.5. AOH und AME als Induktoren des oxidativen Stresses in humanen Kolonkarzinomzellen	108

4.5.1. Generierung von ROS durch die Mykotoxine AOH und AME	109
4.5.2. Der Transkriptionsfaktor Nrf2 als zelluläres Zielenzym von AOH und AME	113
4.6. Beeinflussung des zellulären Redoxstatus durch die <i>Alternaria</i> -Toxine AOH und AME	118
4.6.1. Modulation des Glutathionspiegels durch AOH und AME.....	118
4.6.2. Einfluss von AOH und AME auf die Aktivität humaner Glutathion-S-Transferasen	120
4.7. Einfluss von AOH und AME auf Karzinomzellen unterschiedlicher Organe	124
4.7.1. Einfluss von AOH und AME auf das Zellwachstum von HepG2- und KYSE510-Zellen.....	124
4.7.2. Untersuchung zur Bildung von ROS durch AOH und AME.....	128
4.7.3. Einfluss von AOH und AME auf die Cytochrom-P450 abhängige Monooxygenase 1A1.....	131
4.7.3.1. Einfluss von AOH und AME auf die Gentranskription von CYP1A1.....	132
4.7.3.2. Einfluss von AOH und AME auf die Enzymaktivität von CYP1A1.....	135
4.7.4. Vergleich des genotoxischen Potentials von AOH und AME in HepG2- und KYSE510-Zellen	142
4.7.4.1. Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen durch AOH und AME in HepG2- und KYSE510- Zellen.....	142
4.7.4.2. DNA-strangbrechende Wirkung von AOH und AME in HepG2- und KYSE510-Zellen	145
5. Zusammenfassung.....	151
6. Material und Methoden.....	154
6.1. Zellkultur.....	154
6.1.1. Verwendete Zelllinien	154
6.1.2. Kultivierung und Lagerung.....	156
6.1.2.1. Zellen in Kultur nehmen.....	156
6.1.2.2. Anlegen und Lagerung von Zellstocks.....	157
6.1.2.3. Mediumwechsel.....	157
6.1.2.4. Subkultivierung der Zellen	157
6.1.2.5. Zellzahlbestimmung.....	158
6.1.2.6. Mykoplasmentest.....	160
6.2. Bestimmung der DNA-Konzentration	161
6.3. Bestimmung der Protein-Konzentration	162

6.3.1. Proteinbestimmung nach der Methode von Bradford	162
6.3.2. Proteinbestimmung mit BCA	163
6.4. Untersuchungen zur Zytotoxizität.....	165
6.4.1. Trypanblau-Ausschluss-Test.....	165
6.4.2. Laktatdehydrogenase (LDH) Assay.....	165
6.4.3. Sulforhodamin B (SRB) Test	167
6.5. Untersuchungen zur Genotoxizität – Comet Assay.....	169
6.5.1. Neutraler Comet Assay	170
6.5.2. Alkalischer Comet Assay.....	173
6.5.3. Formamidopyrimidin-DNA-Glykosylase (Fpg)-Behandlung	175
6.6. Untersuchungen zum Einfluss auf humane Topoisomerasen.....	176
6.6.1. Dekatenierungsassay.....	176
6.6.2. „Cleavage“-II Assay	178
6.6.3. Immunoband-Depletion Assay	181
6.6.4. „ <i>In vivo</i> Complex of Enzyme“ (ICE) Assay	188
6.7. Untersuchungen zum Einfluss auf den zellulären Redoxstatus	192
6.7.1. Dichlorofluorescein (DCF) Assay	192
6.7.2. Bestimmung des nukleären Gehaltes von Nrf2 mittels Western Blot Analyse	194
6.7.3. Bestimmung von Glutathion nach Tietze.....	196
6.7.4. Bestimmung der Glutathion-S-Transferase Aktivität	201
6.8. Bestimmung der Cytochrom-P450 abhängigen Monooxygenase (CYP) 1A1-Aktivität	203
6.9. Untersuchungen zur Gentranskription mittels Real Time PCR	205
6.10. Materialverzeichnis.....	211
7. Literaturverzeichnis	215
8. Anhang	268
8.1. Formeln	268
8.2. Publikationsliste.....	270

8.3. Lebenslauf.....276

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AhR	„Arylhydrocarbon“ Rezeptor
ALL	akute lymphoblastische Leukämie
ALT	Altenuen
AME	Alternariolmonomethylether
AML	akute myeloide Leukämie
AOH	Alternariol
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ARE	antioxidativ responsive Element
Arg	Arginin
Arnt	Arylhydrocarbon Rezeptor Translokator
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
A431	humane Vulvakarzinomzelllinie
BCA	Bicinchoninsäure
BER	Basen-Exzisionsreparatur
BfR	Bundesamt für Risikobewertung
bHLH-PAS	„basic-Helix-Loop-Helix-Per-Arnt-Sim“
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
bZIP	“basic leucine zipper”
cDNA	„complementary DNA“
CDNB	1-Chlor-2,4-Dinitrobenzol
CPT	Camptothecin
CYP	Cytochrom-P450 abhängige Monooxygenasen
DAPI	4-6-Diamidino-2-Phenylindol-Dihydrochlorid
DCFH-DA	2', 7'-Dichlorfluorescein-Diacetat
DCF	2', 7'-Dichlorfluorescein
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMEM	“Dulbecco's Modified Eagle's Medium”
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNA-PKcs	DNA-abhängige katalytische Proteinkinase-Untereinheit
dNTP	Desoxyribonucleosidtriphosphat
DOX	Doxorubicin
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
DTNB	5, 5'-Dithiobis(2-Nitrobenzoesäure)
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGCG	(-)Epigallocatechingallat
EROD	7-Ethoxyresorufin O-Deethylation
EtBr	Ethidiumbromid
ETO	Etoposid
FAO	„Food and Agriculture Organization“
FAPY	Formamidopyrimidin
Fen-1	Flap Endonuklease 1
FKS	Fetales Kälberserum

Abkürzungsverzeichnis

Fpg	Formamidopyrimidin-DNA-Glykosylase
h	Stunde
HO1	Hämoxygenase 1
g	Erdbeschleunigung
gDNA	genomische DNA
GFP	„green fluorescent protein“
GGR	„Global Genomic Repair“
GlcA-UDP	Glukuronsäure-Uridindiphosphat
GPX	Glutathionperoxidase
GR	Glutathionreduktase
GSH	Glutathion (reduzierte Form)
GSSG	Glutathion (oxidierte Form)
GST	Glutathion-S-Transferase
HAc	Essigsäure
HCT116	humane Kolonkarzinomzelllinie
HEK293	humane, embryonale Nierenzelllinie
HeLa	Gebärmutterkarzinomzelllinie
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinyl)-Ethansulfonsäure
HepG2	humane Leberzellkarzinomzelllinie
His	Histidin
HPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase
HR	homologe Rekombination
HRP	„Horseradish“ Peroxidase
Hsp90	„Heatshock“ Protein 90
HT29	Humane Kolonadenokarzinomzelllinie
IC ₅₀	„inhibitory concentration“
ICE	„ <i>in vivo</i> complex of enzyme“
kDa	Kilo Dalton, Molekülmasse
kDNA	Kinetoplasten DNA
Keap1	„Kelch-like ECH-associated protein 1“
KG	Körpergewicht
KYSE510	humane Speiseröhrenepithelkarzinomzelllinie
LDH	Laktatdehydrogenase
Lig	Ligase
LMA	„low melting Agarose“
Lys	Lysin
mA	Milliampère
Maf	Makrophagen aktivierender Faktor
MCF-7	Humane Mammakarzinomzelllinie
MEM	„Minimum Essential Medium“
min	Minute
ml	Milliliter
MLC	Mauslymphomzellen
mM	Millimolar
MMR	„Mismatch“ Reparatur
NADPH	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotidphosphat
NER	Nukleotid-Exzisionsreparatur
NHEJ	„Non Homologous End Joining“
NIH/3T3	Maus-Fibroblastenzelllinie
NMA	„normal melting Agarose“
NQO1	NAD(P)H-Chinonoxidoreduktase 1

Abkürzungsverzeichnis

Nrf2	„nuclear factor erythroid 2p45 (NF-E2)-related factor 2“
OT	Objektträger
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PARP-1	Poly(ADP-Ribose) Polymerase-1
PBS	„phosphate buffered saline“
PCB	polychlorierte Biphenyle
PCNA	„Proliferating Cellular Nuclear Antigen“
PCR	„Polymerase chain reaction“
PLD	Phospholipase D
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
POL	Polymerase
P/S	Penicillin / Streptomycin
RAD50	Homolog zum <i>E. coli</i> RecA Protein 50
RNA	Ribonukleinsäure
RBrS	reaktive Bromspezies
RCIS	reaktive Chlorspezies
RNS	reaktive Stickstoffspezies
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RPMI	„Rosswell Park Memorial Institute“
RS	reaktive Spezies
rT	relative Transkription
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkription PCR
s	Sekunden
SCAN1	spinozerebellare Ataxie mit axonaler Neuropathie
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
SOD	Superoxiddismutase
<i>spp.</i>	Subspezies
SRB	Sulforhodamin B
SSA	„single-strand annealing“
SSS	Sulfosalicylsäure
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
tBHQ	<i>tert</i> -Butylhydrochinon
T/C	„test / control“
TCA	Trichloressigsäure
TCDD	2,3,7,8-Tetrachlordibenzo- <i>p</i> -Dioxin
TCR	„Transcription Coupled Repair“
TDP1	Tyrosyl-DNA-Phosphodiesterase 1
TEA	Triethanolamin
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethyldiamin
tGSH	„total“ Glutathion
TLS	Translasionssynthese
TNB	5-Thio-2-Nitrobenzoat
Topo	Topoisomerase
Tyr	Tyrosin
Ub	Ubiquitin
UDP	Uridindiphosphat
UGT	UDP-Glukuronyltransferase
UV	Ultraviolett

Abkürzungsverzeichnis

V-79	Hamsterlungenfibroblastenzelllinie
XAP2	Hepatitis B Virus X-assoziiertes Protein
XRCC	„X-ray cross complementing group“
XRE	„Xenobiotic Responsive Element“
μM	Mikromolar
μl	Mikroliter
$\gamma\text{-GCL}$	γ -Glutamylcysteinligase
2-VP	2-Vinylpyrimidin

1. Einleitung

In einer Stellungnahme des Bundesamtes für Risikobewertung (BfR) aus dem Jahre 2003 heißt es bezüglich *Alternaria*-Toxinen in Lebensmitteln, dass die Datenlage nicht ausreichend sei, um eine Risikoabschätzung für den Verbraucher vorzunehmen und weitere Untersuchungen zur Exposition sowie der Toxikologie dieser Mykotoxine erforderlich seien.

Mykotoxine werden als sekundäre Stoffwechselprodukte von Schimmelpilzen gebildet. Diese Toxine können, aufgrund ihrer unterschiedlichen chemischen Strukturen, diverse biologische Wirkungen ausüben und an verschiedenen toxikologisch relevanten Endpunkten angreifen.

Mykotoxinkontaminationen in der Umwelt, vor allem in Verbindung mit Nahrungsmitteln, stellen ein ernstes Problem für die Landwirtschaft dar [Scott et al., 1972]. Laut der „Food and Agriculture Organization“ (FAO) sind mindestens 25% des Getreides weltweit mit Mykotoxinen kontaminiert, wobei die Schimmelpilzgattung *Alternaria* aufgrund ihres ubiquitären Vorkommens sehr häufig darunter zu finden ist. Neben von Mykotoxinen verursachten Krankheitsbildern, den so genannten Mykotoxikosen, setzt die Mykotoxinforschung den Fokus seit mehreren Jahren auf Toxine, die genotoxisches und mutagenes Potential besitzen und daher möglicherweise in die menschliche Kanzerogenese involviert sind. So wurde in den 90-er Jahren ein Schimmelpilzbefall von Weizen mit *Alternaria*-Arten in der Linxian-Region Chinas in Zusammenhang mit einer erhöhten Inzidenz an Speiseröhrenkrebs gebracht [Liu et al., 1991]. Des Weiteren gibt es Publikationen, die ein toxisches Potential sowohl von *Alternaria*-Extrakten, als auch von einzelnen *Alternaria*-Toxinen, wie den Hauptmetaboliten Alternariol (AOH) und Alternariolmonomethylether (AME) beschreiben [Pero et al., 1973; Liu et al., 1992].

Um ein Gefährdungspotential ausgehend von *Alternaria*-Mykotoxinen einschätzen zu können, bedarf es der Aufklärung der toxikologischen Wirkmechanismen dieser Substanzen.

Der Schwerpunkt der vorliegenden Dissertation lag auf zellulären Wirkmechanismen der Mykotoxine AOH und AME und entstand im Rahmen des Landesschwerpunktes von Baden-Württemberg „Lebensmittel und Gesundheit“; Forschungsschwerpunkt „Mykotoxine“ (2006-2008), dem Folgeprojekt: Forschungsschwerpunkt „Mykotoxine“

im Karlsruher Zentrum für Lebensmittel und Gesundheit (2008-2009) und dem Start Up Projekt 2008 im Rahmen des „Karlsruhe Institute of Technology“ (KIT) „Impact of oxidative stress on alternariol- and alternariol monomethyl ether-induced genotoxicity“, unterstützt von der Exzellenzinitiative der Universität Karlsruhe (TH).

2. Theoretische Grundlagen

2.1. Humane Topoisomerasen

DNA liegt im Zellkern in hochkondensiertem Zustand vor, wodurch die genetische Information, die sie trägt, unzugänglich für die Transkriptionsmaschinerie der Zelle ist. Um Vorgänge wie Replikation, Transkription, Rekombination und Reparatur der DNA zu ermöglichen, müssen die Windungen und Schleifen der einzelnen Ordnungsstufen entwunden, dekondensiert oder aufgelöst werden [Hardy et al., 2003]. Letztendlich muss die DNA entspiralisiert werden. Die Enzyme, die diese Vorgänge katalysieren und regulieren, werden als DNA-Topoisomerasen bezeichnet [Wang, 1987]. Gemeinsames Charakteristikum aller Topoisomerasen ist die Ausbildung eines kovalenten Enzym-DNA-Intermediates [Osheroff, 1998].

Topoisomerasen verändern den topologischen Zustand von DNA-Strukturen durch das Einfügen von transienten Schnitten in die DNA, Hindurchführen von anderen DNA-Strängen und Verschließen der Brüche im DNA-Rückgrat. Damit sind sie in der Lage superspiralisierte DNA zu relaxieren, zu ver- und entknoten bzw. zu katenieren und dekatenieren (Abbildung 2-1).

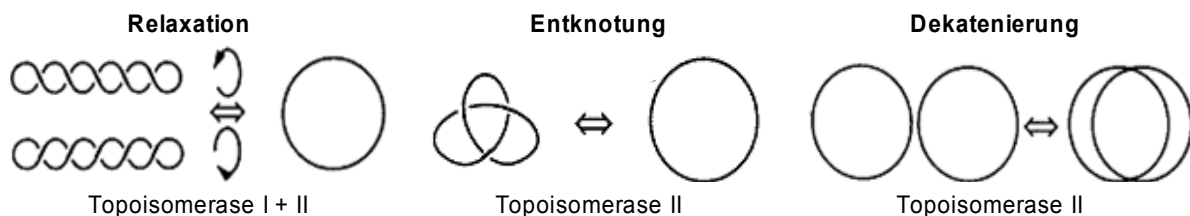


Abbildung 2-1: Strukturelle Modifikationen der DNA-Topologie, katalysiert durch Topoisomerasen [Boege, 1996].

Prinzipiell lassen sich zwei Klassen von Topoisomerasen unterscheiden: Typ I- und Typ II-Topoisomerasen, die sich in dem ihnen zugrunde liegenden Reaktionsmechanismus unterscheiden [Champoux, 2001]. Die Enzyme werden weiterhin in Familien (A und B) unterteilt, wobei diese Differenzierung auf ihrer evolutionären Verwandtschaft und dem durch sie katalysierten Mechanismus beruht. Schließlich können sie Unterfamilien zugeordnet werden, deren Bezeichnung entweder von spezifischen Eigenschaften (z.B. DNA Gyrase oder Reverse Gyrase) oder der Reihenfolge ihrer Entdeckung (von I bis VI) abgeleitet wurde [Forte, 1998].

2007]. Tabelle 2-1 gibt einen Überblick über die beschriebenen Klassen von Topoisomerasen.

Tabelle 2-1: Klassen von Topoisomerasen und deren Eigenschaften.

Typ	Tyrosin-Bindung	Enzyme	DNA-Schnitte	ATP	Mg ²⁺ -Cofaktor
IA	5'-Ende	Bakterielle Topo I + III Säugetier-Topo IIIα/β; Reverse Gyrase	Einzelstrang	-	+
IB	3'-Ende	Eukaryotische Topo I; Topo V	Einzelstrang	-	-
IIA	5'-Ende	Säugetier-Topo IIα/β; DNA-Gyrase; Bakterielle Topo IV	Doppelstrang	+	+
IIB	5'-Ende	Topo VI	Doppelstrang	+	+

DNA-Topoisomerasen sind essentielle, zelluläre Proteine, die an nahezu allen Vorgängen, die im Zusammenhang mit der DNA stehen, beteiligt sind. Eukaryotische Topoisomerasen erkennen die DNA-Topologie und reagieren bevorzugt mit positiv bzw. negativ superspiralierter DNA [Zechiedrich und Osheroff, 1990]. Eine Hemmung dieser Enzymklasse führt zu einer Blockade der DNA-Synthese, was ihre Bedeutung in der DNA-Replikation aufzeigt [Chow und Ross, 1987; Berger et al., 1996; Falaschi et al., 2007]. Daneben üben sie Funktionen bei der Transkription, Rekombination, Chromatidenkondensation und Trennung der Schwesterchromatiden aus [Uemura et al., 1987; Wang, 1996]. Topoisomerasen sind zudem in der DNA-Reparatur involviert und es wird vermutet, dass sich die Enzyme von Typ I und Typ II gegenseitig im Reparaturprozess ersetzen können [Stevensner und Bohr, 1993]. Der essentielle Charakter dieser Proteine wird noch deutlicher, da Topoisomerasen selbst an der Induktion von Apoptose beteiligt sind [Samejima et al., 1999]. Im Menschen sind derzeit neben den DNA-Topoisomerasen I, IIα, IIβ, IIIα und IIIβ, ebenfalls mitochondriale Topoisomerasen bekannt. Da in der vorliegenden Arbeit die humanen Topoisomerasen I, IIα und IIβ verwendet wurden, werden diese im Folgenden näher betrachtet.

2.1.1. Topoisomerase I

Eukaryotische Topoisomerasen vom Typ I führen einen transienten Einzelstrangbruch in die DNA ein und bilden ein kovalentes Enzym-DNA-Intermediat aus, wobei das Enzym die Enden des gebrochenen Stranges verbindet. So wird die kontrollierte Rotation um oder das Durchführen durch diesen Bruch ermöglicht [Pommier et al., 1998]. Die Energie aus der Spaltung der Phosphodiesterbindung im DNA-Rückgrat wird in dem kovalenten Zwischenprodukt gespeichert, daher ist weder für den Bruch des DNA-Stranges noch für das Wiederausammenfügen der Enden Energie aus einer ATP-Hydrolyse notwendig [Champoux, 2001].

Topoisomerase I ist somit in der Lage, superspiralisierte DNA zu relaxieren (intramolekulare Reaktion) und Rekombinationen zu vermitteln (intermolekulare Reaktion) [Pommier et al., 2000].

2.1.1.1. Vorkommen und Aufbau

Humane Topoisomerase I wird von einem Gen auf Chromosom 29q12-13.2 codiert [Juan et al., 1988] und agiert katalytisch als Monomer. Das Enzym setzt sich aus 765 Aminosäuren zusammen und besitzt ein Molekulargewicht von 91 kDa [Champoux, 2001]. Das Polypeptid lässt sich in vier Untereinheiten unterteilen (Abbildung 2-2).

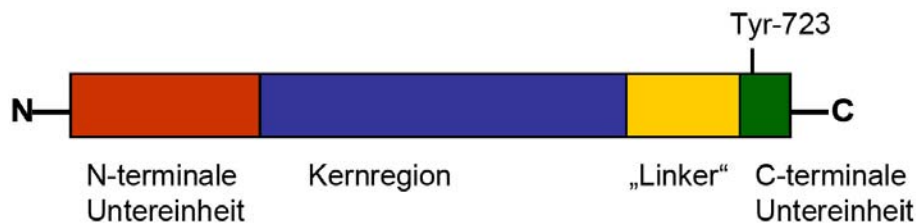


Abbildung 2-2: Aufbau der humanen DNA-Topoisomerase I [Leppard und Champoux, 2005].

Das N-terminale Ende wird für die katalytische Aktivität *in vitro* nicht benötigt [Leppard und Champoux, 2005] und enthält fünf nukleäre Lokalisationssignale, die wahrscheinlich für die subzelluläre Verteilung des Enzyms *in vivo* verantwortlich sind [Alsner et al., 1992]. Die Verbindungsregion ("Linker") verknüpft die Kernregion mit dem C-terminalen Ende, welches das aktive Zentrum mit der aktiven Bindungsstelle Tyrosin 723 (Tyr⁷²³) enthält [Stewart et al., 1998] und essentiell für die katalytische

Aktivität des Enzyms ist [Gao et al., 2006]. Die Kerndomäne ist aus den drei Subdomänen I, II und III aufgebaut [Leppard und Champoux, 2005]. Während der Reaktion lagert sich das Enzym über die Kernregion und die C-terminale Untereinheit an die DNA an, welche dabei vollständig von dem Enzym umklammert wird. In Abbildung 2-3 ist die Anlagerung des Enzyms an die DNA dargestellt, wobei das N-terminale Ende nicht abgebildet ist.

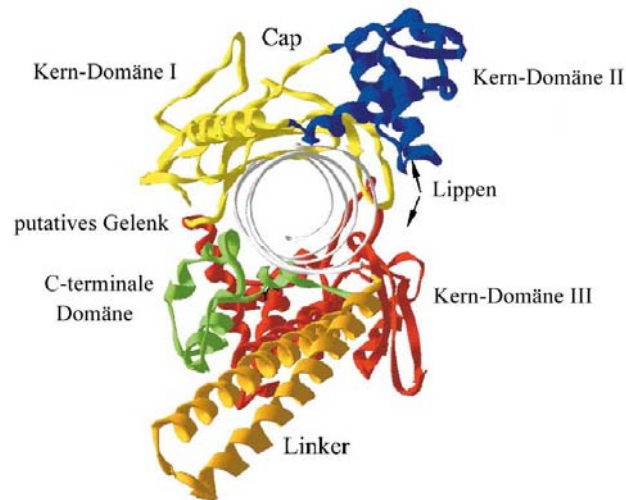


Abbildung 2-3: Humane Topoisomerase I mit einem eingeklagerten DNA-Segment [Champoux, 2001].

2.1.1.2. Mechanismus der Topoisomerase I

Der katalytische Zyklus der Topoisomerase I lässt sich in vier Schritte unterteilen:

1. Das Enzym bindet an doppelsträngige DNA, indem es sich wie eine Zange um die DNA legt und so eine positiv geladene Tasche bildet [Champoux, 2001]. Die Positionierung wird durch vier Seitenkettenreste (Arg-488, Lys-532, Arg-590, His-632) im aktiven Zentrum des Enzyms katalysiert. Dabei vermittelt Lys-532 die einzige basenspezifische Interaktion zwischen dem Enzym und der DNA [Interthal et al., 2004].
2. Im Folgenden wird die DNA geschnitten, indem der nukleophile Angriff des O-4-Sauerstoffatoms von Tyr⁷²³ auf das Phosphatrückgrat der DNA erfolgt [Leppard und Champoux, 2001]. Hierdurch wird eine Phosphodiesterbindung zwischen Tyr⁷²³ und dem 3'-Phosphat-Ende der DNA gebildet und die Hydroxy-Gruppe am 5'-Ende des DNA-Stranges freigesetzt (Abbildung 2-4).

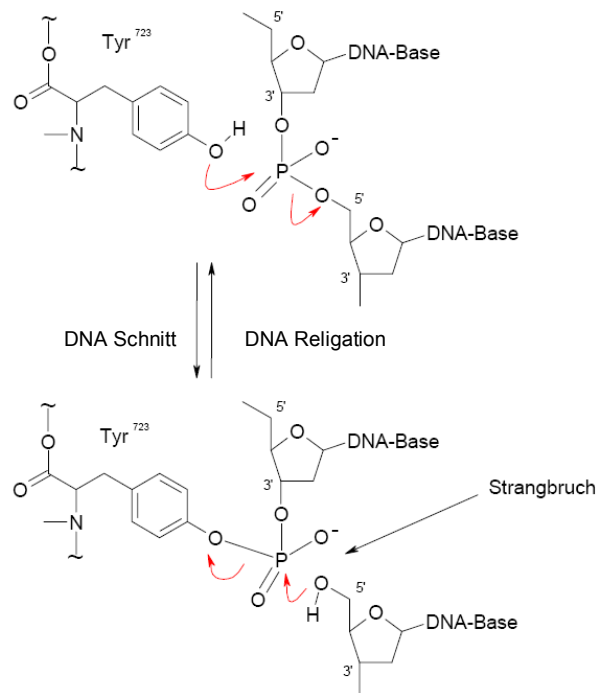


Abbildung 2-4: Schneiden und Verknüpfen der DNA durch Topoisomerase I [Berger, 1998].

3. Nach Bildung des kovalenten Intermediates wird die Torsionsspannung der DNA durch kontrollierte Rotationen entspannt [Woo et al., 2003]. Der geschnittene Strang wird dabei durch die Bindung an das Enzym festgehalten, während das freie Ende gedreht wird [Berger, 1998].
4. Im letzten Schritt werden die Enden des gebrochenen Stranges wieder miteinander verknüpft und gleichzeitig Tyr⁷²³ des Enzyms abgespalten. In dieser Reaktion wirkt die freie 5'-Hydroxy-Gruppe des geschnittenen Stranges als Nukleophil [Champoux, 2001].

2.1.1.3. Expression und Funktion der Topoisomerase I

Beim Durchlaufen des Zellzyklus wird Topoisomerase I konstitutiv exprimiert [Heck et al., 1988]. Im Zellkern liegen je nach Zelltyp etwa 10^5 bis 10^6 Moleküle mit einer Halbwertszeit von 10 - 16 h vor [Baker et al., 1995].

Topoisomerase I ist unter anderem an der Gentranskription [Stewart und Schütz, 1987; Zhang et al., 1988], der DNA-Reparatur [Mielke et al., 2007; Khopde et al., 2008] und der Apoptoseinduktion [Morris und Geller, 1996; Sordet et al., 2008] beteiligt.

2.1.2. Topoisomerase II

Zwei Isoformen der Typ IIA-Topoisomerasen konnten in humanen Zellen nachgewiesen werden, Topoisomerase II α und Topoisomerase II β [Drake et al., 1989]. Im Gegensatz zu den Typ I-Topoisomerasen treten Typ II-Enzyme als Homodimer auf, benötigen für ihre Katalyse als Cofaktor bivalente Metallionen wie Mg²⁺ [Deweese et al., 2009] und sind ATP-abhängig [Baird et al., 1999].

Typ II-Topoisomerasen führen transiente Doppelstrangbrüche in die DNA ein und ermöglichen damit das Durchführen eines weiteren doppelsträngigen DNA-Segments durch diesen Bruch [Osheroff, 1998]. Aufgrund ihres Mechanismus können die Typ II-Proteine nicht nur Ver- und Entwinden, sondern auch ineinander verkettete DNA-Doppelstränge von Tochterchromosomen, welche während der Replikation gebildet werden, voneinander trennen [Cuvier et al., 2008].

Abgesehen von den Histonen stellt Topoisomerase II das häufigste Protein des chromosomalen Gerüsts dar [Earnshaw und Mackay, 1994].

2.1.2.1. Vorkommen und Aufbau der Topoisomerase II-Enzyme

Die Topoisomerase II-Isoformen II α und II β werden durch unterschiedliche Gene auf den Chromosomen 17q21-22 bzw. 3p24 codiert und zeigen etwa 70% Aminosäurehomologie [Tsai-Pflugfelder et al., 1988; Jenkins et al., 1992].

Im katalytisch aktiven Zustand besteht Topoisomerase II α aus zwei Polypeptiden der Molekülmasse 170 kDa, während die Molekülmasse der Protomere von Topoisomerase II β 180 kDa beträgt [Woessner et al., 1991].

Danks et al. [1994] beschreiben, dass DNA-Topoisomerase II α -Enzyme hauptsächlich im Nukleoplasma lokalisiert sind, während die II β -Isoform zum größten Teil im Nukleolus nachgewiesen wird. Im Gegensatz dazu wiesen Meyer et al. [1997] Topoisomerase II β während des gesamten Zellzyklus sowohl innerhalb als auch außerhalb der Nukleoli nach. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass die beiden DNA-Topoisomerase II-Isoformen einer Klasse von mobilen Proteinen zuzuordnen sind, die in der Lage sind, sich schnell zwischen den Kompartimenten des Zellkernes während der Interphase und zwischen den Chromosomen und dem Zytoplasma während der Mitose zu bewegen [Christensen et al., 2002].

Topoisomerase II α bleibt in der Mitose eng mit den Chromosomen verbunden [Nitiss, 1998], während die II β -Isoform in der Mitose von den Chromosomen abdissoziiert [Isaacs et al., 1998].

Topoisomerase II-Enzyme lassen sich in drei Domänen einteilen (Abbildung 2-5).



Abbildung 2-5: Domäneneinteilung der Topoisomerase II [modifiziert nach Champoux, 2001].

Diese Unterteilung basiert auf der Sequenzhomologie mit dem bakteriellen Typ II-Enzym DNA-Gyrase. Die N-terminale Domäne enthält die Konsensus-Sequenz für die ATP-Bindung und -Hydrolyse, während die zentrale Domäne den Tyrosinrest (Tyr⁸⁰⁵ für Topoisomerase II α und Tyr⁸²¹ für Topoisomerase II β) enthält, der die kovalente Bindung zur DNA ausbildet [Wang, 1996]. Die C-terminale Region ist ebenfalls für den katalytischen Mechanismus notwendig [Dickey und Osheroff, 2005] und enthält mehrere Phosphorylierungsstellen, die für die physiologische Regulation des Enzyms notwendig sind [Corbett et al., 1993].

Durch Phosphorylierung erhöht sich die enzymatische Aktivität *in vitro* [Takano et al., 1992], wofür die Casein Kinase II sowie die Proteinkinase C verantwortlich gemacht werden [De Lucio et al., 2002]. Meczes et al. [2008] vermuten, dass die C-terminale Region beider humanen Topoisomerase II-Isoformen für die *in vivo* Funktion des Enzyms nötig ist, jedoch an dem Einführen eines DNA-Doppelstrangbruchs nicht beteiligt ist. Daneben postulieren Linka et al. [2007], dass die C-terminale Region die Isoform-spezifische Funktion des Enzyms *in vivo* bestimmt. Im Gegensatz zur C-terminalen Domäne zeigen die beiden Isoformen eine hohe Sequenzhomologie in der N-terminalen und der zentralen Domäne [Austin et al., 1993].

2.1.2.2. Mechanismus der Topoisomerase II

Der Reaktionsmechanismus während der Katalyse scheint für beide Topoisomerase II-Isoformen keine Unterschiede aufzuweisen [Austin und Marsh, 1998]. Auch sind die spezifischen DNA-Schnittstellen der beiden Typ II-Isoformen ähnlich, jedoch nicht identisch [Marsh et al., 1996; Capranico und Binaschi, 1998]. Der katalytische Zyklus

der Typ II-Enzyme kann in sechs Schritte unterteilt werden und ist in Abbildung 2-6 dargestellt.

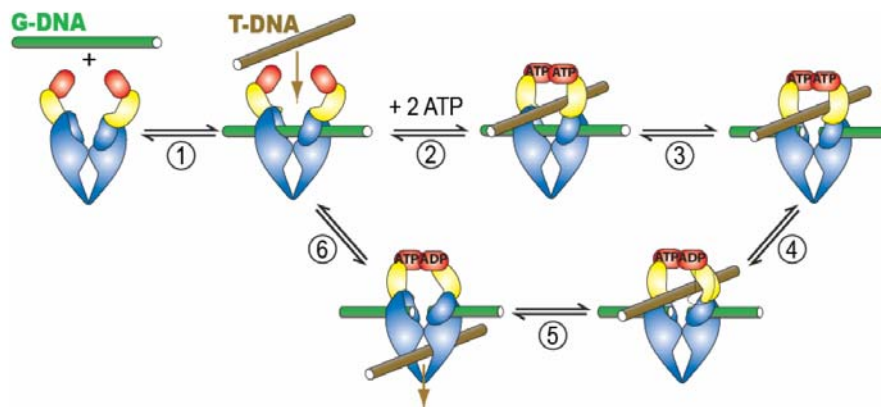


Abbildung 2-6: Reaktionsmechanismus der Topoisomerase II. G-DNA, „gate“-DNA; T-DNA, „transport“-DNA [Müller-Planitz und Herschlag, 2008].

1. Topoisomerase II bindet einen DNA-Strang (G-Segment, G: „gate“) an die zentralen Domänen, die in einer offenen Konformation vorliegen [Champoux, 2001].
2. Durch die Bindung des G-Segmentes verändert die Topoisomerase II ihre Konformation, wodurch sich die DNA-Bindungsdomänen einander annähern. Hierdurch werden die Tyrosin-Reste für einen nukleophilen Angriff in Position gebracht.
3. Beide DNA-Einzelstränge werden um vier Basenpaare versetzt geschnitten und das Enzym bindet kovalent über eine Phosphodiesterbindung an die 5'-Enden beider durchtrennter DNA-Einzelstränge, wodurch freie Hydroxyl-Gruppen am 3'-Ende entstehen. Durch Wechselwirkungen mit den Aminosäureresten des Proteins werden diese koordiniert. Für das Schneiden der DNA ist ein zweiwertiges Kation, bevorzugt Mg^{2+} , essentiell [McClendon und Osheroff, 2007]. Durch Bindung von zwei ATP-Molekülen ändert das Enzym seine Konformation und ermöglicht das Hindurchführen einer zweiten intakten DNA-Helix (T-Segment; T: „transport“) durch die geschnittene DNA, welche durch die Konformationsänderung auseinander gezogen wird.
4. Das T-Segment wird dabei schneller durchgeführt, wenn bereits eines der zwei gebundenen ATP-Moleküle hydrolysiert wurde. Indem das Enzym seine

Konformation ändert, wird die Topoisomerase II an die DNA gebunden und wirkt wie eine Klammer [Wilstermann und Osheroff, 2003].

5. Nach dem Transport des T-Segmentes durch die geschnittenen DNA-Enden wird es in dem Hohlraum, den die zentralen Domänen ausbilden, solange festgehalten, bis die Schnittstellen des G-Segmentes wieder miteinander verbunden sind [Berger, 1998].
6. Es erfolgt die Hydrolyse des zweiten ATP-Moleküls, wodurch die Klammer geöffnet wird und sowohl das T- als auch das G-Segment freigesetzt werden. Diese Reaktion ist ebenfalls Mg^{2+} -abhängig. Topoisomerase II nimmt schließlich wieder ihre Ausgangskonformation ein und steht für einen weiteren Zyklus zur Verfügung [McClendon und Osheroff, 2007].

Wenn G- und T-Segment dem gleichen DNA-Molekül angehören, kann die Topoisomerase II entweder DNA-Superspiralisierungen relaxieren oder verknotete und unverknotete Formen in diesem DNA-Molekül umwandeln. Wenn hingegen G- und T-Segment zu unterschiedlichen DNA-Molekülen gehören, ist die Topoisomerase II in der Lage zu katenieren oder dekatanieren [Roca, 1995].

2.1.2.3. Expression und Funktion der Topoisomerase II-Isoformen

Die Expression der Topoisomerase II α ist abhängig vom Zellzyklus und erreicht ein Maximum während der späten G₂/M-Phase [Woessner et al., 1991]. Dabei ist der Umsatz der Topoisomerase II α -Konzentration größtenteils auf die Transkriptionsebene zurückzuführen, wobei der Gehalt an mRNA zum einen durch die Änderung der Stabilität und zum anderen durch die Regulation der Promotoraktivität bestimmt wird [Isaacs et al., 1996]. DNA-Topoisomerase II α ist essentiell in wachsendem Gewebe und reguliert bei der Zellteilung die Topologie der DNA. Somit ist sie an Prozessen wie der Transkription [Mondal und Parvin, 2001], der DNA-Replikation [Brill et al., 1987], der mitotischen Chromosomenkondensation [Chaly et al., 1996], der Chromosomensegregation [Wang, 2002] und der Trennung von Tochterchromatiden beteiligt [Goswami et al., 1996].

Im Gegensatz zur DNA-Topoisomerase II α ist die Expression der II β -Isoform konstitutiv während des Zellzyklus und unabhängig vom Proliferationszustand der

Zelle [Kimura et al., 1994]. Sie übernimmt die so genannten „housekeeping“ Funktionen, unabhängig von der Zellzyklusphase, in der sich die Zelle befindet [McClendon und Osheroﬀ, 2007]. Die Funktion der Topoisomerase II β wird in der Literatur recht kontrovers diskutiert. So wird das Enzym zum einen in zellulären Konzentrationen als entbehrlich angesehen [Yang et al., 2000]. Zum anderen konnte gezeigt werden, dass die II β -Isoform stark in zerebralen Neuronen exprimiert wird und daher eine Rolle in der neuronalen Entwicklung spielt [Tsutsui et al., 2001]. Topoisomerase II β kann zwar die II α -Isoform nicht ersetzen [Austin und Marsh, 1998], jedoch zeigten Biersack et al. [1996], dass ein kleiner Anteil der DNA-Topoisomerase II-Isoformen in Säugerzellen als α/β -Heterodimere vorliegen, wobei sie ihre katalytische Aktivität beibehalten. Daher ist eine vollständige Unterscheidung der Aufgabengebiete der beiden Isoformen schwierig, wofür auch die Tatsache spricht, dass sich die beiden Topoisomerase II-Isoformen in ihrer Funktion partiell substituieren können [Sakaguchi und Kikuchi, 2004].

2.1.3. Hemmstoffe humaner Topoisomerasen

Topoisomerasehemmstoffe können an verschiedenen Stellen im fein abgestimmten Reaktionsmechanismus der Topoisomerase eingreifen [Sehested und Jensen, 1996; Li und Liu, 2001]. Abbildung 2-7 zeigt bekannte Angriffspunkte für Hemmstoffe im katalytischen Zyklus der Topoisomerase II.

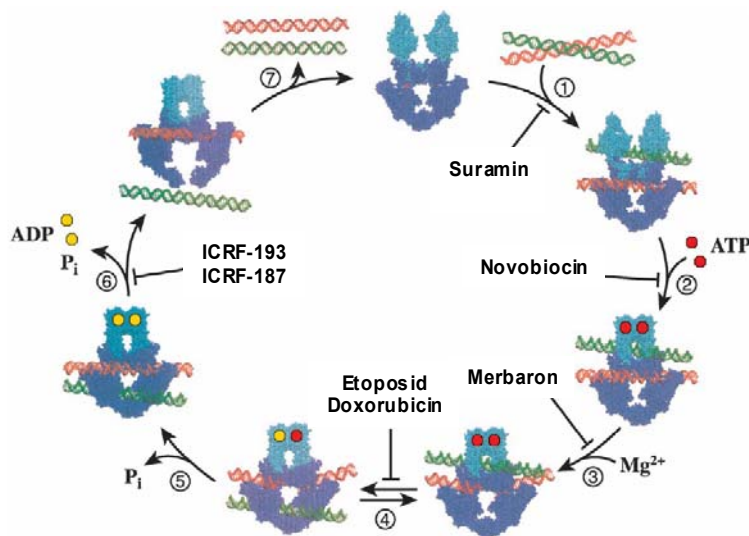


Abbildung 2-7: Angriffspunkte von Topoisomerasehemmstoffen während des Reaktionszyklus der Topoisomerase II [Larsen et al., 2003].

Topoisomerasehemmstoffe werden aufgrund ihres Wirkmechanismus in rein katalytische Hemmstoffe und in Topoisomerasegifte unterteilt [Walker und Nitiss, 2002], wobei die Mehrzahl der bekannten Hemmstoffe Topoisomerasegifte darstellen [Goodell et al., 2008].

2.1.3.1. Katalytische Topoisomerasehemmstoffe

Katalytische Topoisomerasehemmstoffe sind eine heterogene Gruppe von Verbindungen, die sowohl mit Topoisomerase I [Montaudon et al., 2007] als auch mit Topoisomerase II [Andoh und Ishida, 1998] interagieren können. Sie können zum einen die Bindung zwischen DNA und Topoisomerase hemmen, zum anderen den nicht kovalenten DNA-Topoisomerase-Komplex stabilisieren oder bei Typ II-Enzymen die ATP-Bindung beeinflussen [Larsen et al., 2003].

Da durch eine Hemmung der Topoisomerase durch katalytische Hemmstoffe keine direkten DNA-Schäden resultieren, wird angenommen, dass diese Verbindungen Apoptose induzieren, indem sie der Zelle die essentielle Enzymaktivität der Topoisomerasen entziehen [Jensen et al., 2000; Hou et al., 2003].

So kann es bei zellulären Prozessen durch Verminderung der katalytischen Enzymaktivität zu starken Torsionsspannungen kommen, wobei DNA-Strangbrüche entstehen, die schließlich bis zur Apoptose führen können [Lansiaux et al., 2001]. Daneben existieren Publikationen, dass aufgrund der reduzierten Topoisomeraseaktivität der Zelltod durch mitotischen Kollaps herrührt, da die Zellen nicht mehr in der Lage sind, die Chromosomen zu trennen [Cortés und Pastor, 2003; Skladanowski et al., 2005].

Abbildung 2-8 zeigt die Strukturformeln bekannter katalytischer Topoisomerasehemmstoffe.

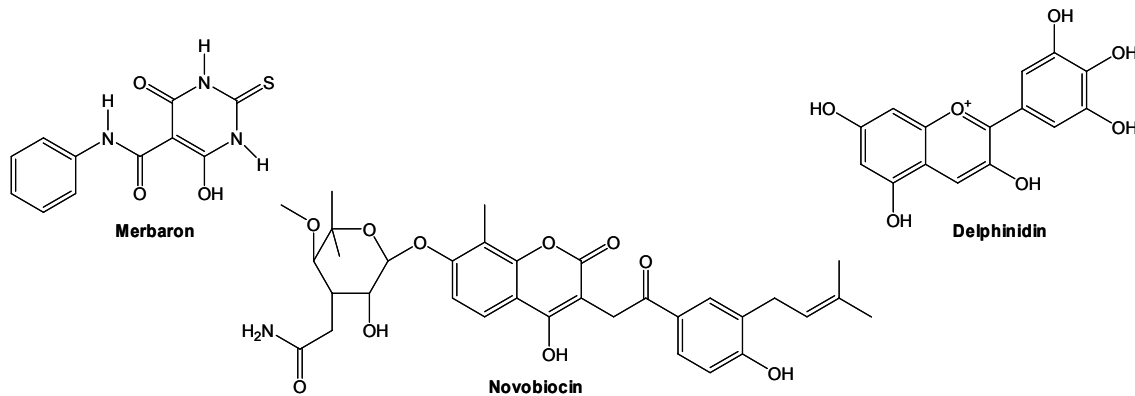


Abbildung 2-8: Strukturformeln bekannter katalytischer Topoisomerasehemmstoffe.

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

2.1.3.2. Topoisomerasegifte

Derzeit werden Topoisomerasegifte in zwei Klassen unterteilt. Mitglieder der ersten Gruppe agieren mittels eines redoxunabhängigen Mechanismus, indem sie mit dem Enzym an der Protein-DNA Oberfläche (nahe des aktiven Zentrums) in einer nichtkovalenten Weise wechselwirken [Pommier und Marchand, 2005; McClendon und Osheroff, 2007]. Ein redoxunabhängiges Topoisomerase II-Gift stellt beispielsweise Etoposid (ETO) dar. Da die Enzym-Interaktion dieser Verbindungen nicht von der Redoxchemie abhängt, sind sie nicht von reduzierenden Agenzien beeinflussbar [Lindsey et al., 2004].

Topoisomerasegifte der zweiten Klasse agieren in einer redoxabhängigen Art [Wang et al., 2001], wobei sie kovalente Addukte mit dem Enzym, fern vom aktiven Zentrum, bilden [Bender et al., 2006]. Dabei erfolgt die Erhöhung an Enzym-DNA-Intermediaten durch zumindest zwei unabhängige Mechanismen. Zum einen hemmen redoxabhängige Topoisomerasegifte die DNA-Religation und zum anderen blockieren sie das N-terminale Tor des katalytisch aktiven Enzyms durch die Verknüpfung der beiden Protomer-Untereinheiten [Bender et al., 2007]. Die bekanntesten Verbindungen dieser Klasse sind Chinone, wie 1,4-Benzochinon

[Lindsey et al., 2004], (-)Epigallocatechingallat (EGCG) [Bandeles und Osheroff, 2008a] und Metabolite von polychlorierten Biphenylen (PCB) [Bender et al., 2006]. Da die Wirkung dieser Stoffe von der Redoxchemie abhängt, wird ihre Fähigkeit, erhöhte Mengen an Topoisomerase-DNA-Komplexen zu bilden, durch reduzierende Agenzien verhindert [Frantz et al., 1996; Baker et al., 2001].

Durch eine Kollision des stabilisierten Topoisomerase-DNA-Intermediates mit Transkriptionsmaschinerien können DNA-Doppelstrangbrüche resultieren, die letal für die Zelle sein können [Cortés und Piñero, 1994; Hong und Kreuzer, 2003]. Dies gilt sowohl für stabilisierte Topoisomerase I-DNA-Intermediate [Hsiang et al., 1989], als auch für Topoisomerase II-DNA-Komplexe [D'Arpa und Liu, 1989]. Dabei zeigt sich, dass die durch ein Topoisomerasegift induzierte Akkumulation von Topoisomerase-DNA-Intermediaten, direkt proportional zur Zytotoxizität und antitumoralen Wirkung des Hemmstoffes ist [Hsiang et al., 1989; Markovits et al., 1995]. Abbildung 2-9 zeigt, dass sowohl Topoisomerase I- als auch Topoisomerase II-Gifte durch die Stabilisierung des kovalenten Enzym-DNA-Intermediates ein zytotoxisches Potential besitzen.

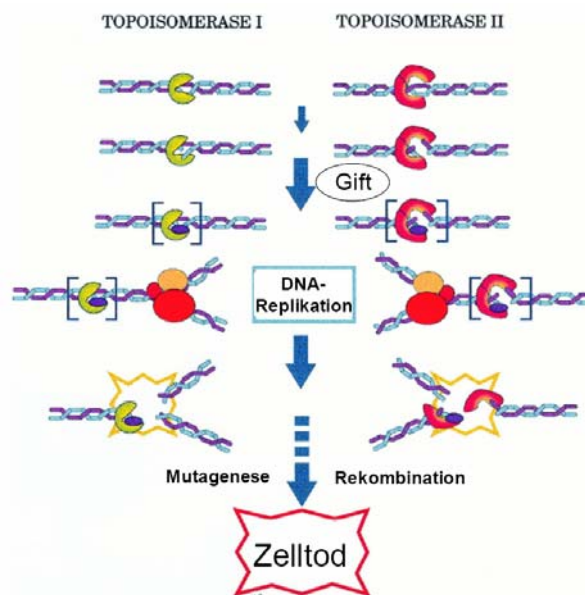
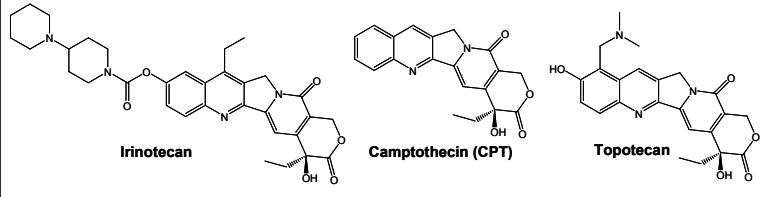
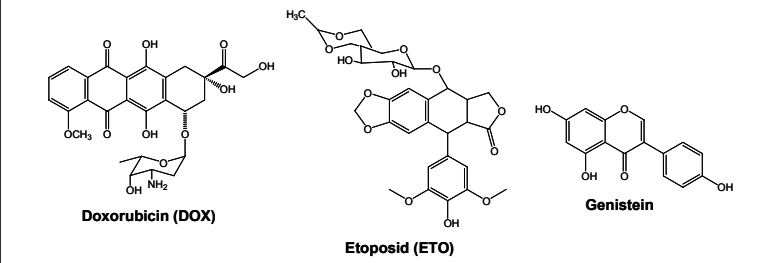
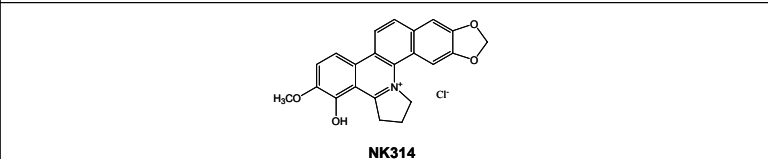
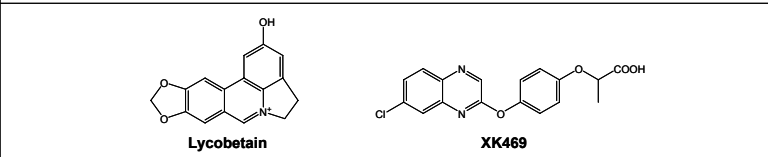
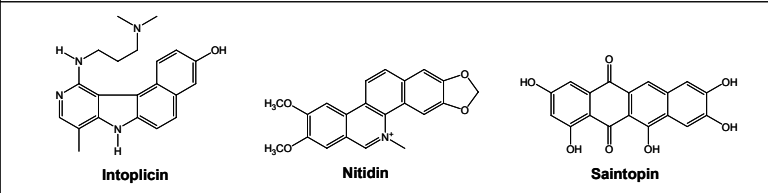


Abbildung 2-9: Mechanismus zur Zytotoxizität von Topoisomerasegiften [Froelich-Ammon und Osheroff, 1995].

Während die meisten Topoisomerasegifte entweder Typ-I-Enzyme oder Typ-II-Enzyme hemmen, existieren Substanzen, die mit Topoisomerase I und II interagieren. Weiterhin wirkt der Großteil an Topoisomerase II-Giften gegenüber

beiden Isoformen in vergleichbarem Ausmaß. Daneben gibt es aber auch Verbindungen, die spezifisch eine Isoform giften. Tabelle 2-2 fasst bekannte Topoisomerasegifte zusammen.

Tabelle 2-2: Strukturen bekannter Topoisomerasegifte. Topo, Topoisomerase.

Topogift	Strukturformel	Literatur
Topo I	 <p>Irinotecan Camptothecin (CPT) Topotecan</p>	Hsiang et al., 1985 Tsuchida und Shitara, 2005
Topo II	 <p>Doxorubicin (DOX) Etoposid (ETO) Genistein</p>	Chen et al., 1984 Monneret, 2001 Markovits et al., 1995
Topo IIα	 <p>NK314</p>	Onda et al., 2008
Topo IIβ	 <p>Lycobetain XK469</p>	Barthelmes et al., 2001 Huang et al., 2001 Gao et al., 1999
Topo I und II	 <p>Intoplicin Nitidin Saintopin</p>	Gatto et al., 1996 Yamashita et al., 1991 Riou et al., 1993

Topoisomerasegifte weisen Unterschiede in ihrer Bindungsstärke auf. Die Bildung eines ternären Enzym-DNA-Gift-Komplexes kann auf unterschiedliche Arten erfolgen. Zum einen kann das Gift spezifisch an den Topoisomerase-DNA-Komplex binden [Li und Liu, 2001], zum anderen ist der Hemmstoff in der Lage zuerst mit der DNA zu interagieren, bevor diese von der Topoisomerase gebunden wird. Schließlich besteht noch die Möglichkeit, dass die Bindung des Giftes an die Topoisomerase vor der Bildung des Topoisomerase-DNA-Intermediates erfolgt [Burden und Osheroff, 1998].

2.1.4. Topoisomerasehemmstoffe in der Chemotherapie

Tumorzellen exprimieren verstärkt Topoisomerasen, um die zelluläre Proliferation zu erhöhen [Heck und Earnshaw, 1986]. Da das Ausmaß der Giftung eine Funktion der Menge des Enzyms repräsentiert, stellt dies einen potentiellen Mechanismus dar, selektiv Tumorzellen zu eliminieren [Eder et al., 1993; Mensah-Osman et al., 2002].

Topoisomerasehemmstoffe, die in der Chemotherapie eingesetzt werden, sind zumeist Topoisomerase I- und/oder II-Gifte [Denny und Baguley, 2003].

Klinische Anwendung finden derzeit überwiegend Camptothecin-Derivate, wie Irinotecan und Topotecan, deren Zielenzym Topoisomerase I darstellt [Meng et al., 2003].

Topoisomerase II-Gifte, wie Amsacrin, Doxorubicin, Etoposid und Teniposid, die ebenfalls in klinischem Gebrauch sind, zeigen keine spezifische Wirkung gegenüber einer Isoform der Topoisomerase II [Deweese und Osheroff, 2009]. Während Meczes et al. [1997] zeigten, dass beide Topoisomerase II-Isoformen potentielle Ziele für einen zytotoxischen Effekt darstellen, wird in neueren Studien postuliert, dass Topoisomerase II α die entscheidende Rolle in der Apoptoseinduktion spielt, während die II β -Isoform in Verbindung mit der Bildung leukämischer chromosomaler Translokationen gebracht wird [Azarova et al., 2007; Lyu et al., 2007].

Ein Problem in der Krebsbehandlung stellt häufig eine Resistenz gegenüber diverser Chemotherapeutika dar. Die Resistenz gegenüber Topoisomerase II-Giften wurde unter verschiedenen Stressbedingungen, wie Sauerstoffmangel [Yamauchi et al., 1987] und Glukosereduktion [Colofiore et al., 1982; Hughes et al., 1989] untersucht, die häufig mit manifestierten Tumoren assoziiert werden [Shen et al., 1987].

Dabei zeigte sich, dass reduzierte Mengen an Topoisomerase I [Sugimoto et al., 1990] und Topoisomerase II [Potmesil et al., 1988] zumindest teilweise an den beobachteten Resistenzen mitverantwortlich sind [Shen et al., 1989; Chatterjee et al., 1994]. Daneben entstehen Resistenzen durch mutierte Enzyme, die Topoisomerase II-induzierte Läsionen erkennen und prozessieren [Nitiss und Wang, 1988; Jeggo et al., 1989], wie beispielsweise Proteine der DNA-Reparatur [Pommier et al., 1994].

2.1.4.1 Induktion sekundärer Leukämien durch Topoisomerase II-Gifte

Trotz der Erfolge von Topoisomerase II-Giften in der Chemotherapie, gibt es Hinweise, dass es bei dieser Behandlung zu chromosomalen Translokationen kommen kann, die zu spezifischen Arten von Leukämie führen können [Felix, 1998; Duca et al., 2006; Nakada et al., 2006]. Derzeit entwickeln etwa 2-3% der Patienten nach einer Therapie mit Topoisomerase II-Giften akute myeloide Leukämien (AMLs) [Deweese und Osheroff, 2009a]. Die meisten dieser Leukämien werden durch Translokationen im MLL-Gen ausgelöst [Felix et al., 2000; Felix, 2001; Sung et al., 2006].

Neben dieser Leukämie, die in Verbindung mit einer Chemotherapie steht, zeigen etwa 80% der Säuglinge mit einer AML oder einer akuten lymphoblastischen Leukämie (ALL), ebenfalls Translokationen im MLL-Gen [Ross et al., 1996; Felix und Lange, 1999; Strick et al., 2000]. Die chromosomalen Translokationen assoziiert mit diesen Krebsarten wurden *in utero* beobachtet, was darauf hindeutet, dass die Säuglings-Leukämie während der Schwangerschaft beginnt. Dabei haben epidemiologische Studien gezeigt, dass das Risiko zu erkranken bei maternaler Ernährung, die viele natürliche Topoisomerase II-Gifte, wie Genistein [Abe, 1999] oder andere Bioflavonoide [Ross, 2000] enthält, deutlich erhöht ist [Bunin, 2004; Spector et al., 2005].

2.2. Tyrosyl-DNA-Phosphodiesterase 1

Stabilisierte Topoisomerase-DNA-Intermediate bedeuten eine Gefahr für die Integrität des Genoms und die Lebensfähigkeit der Zelle. Die Effektivität von Topoisomerasegiften wird dementsprechend auch durch Mechanismen und Enzyme beeinflusst, die diese Schäden beheben können [Connelly und Leach, 2004].

Ein Protein-DNA-Komplex stellt ein Hindernis für die der Zelle zur Verfügung stehenden Reparaturmechanismen dar, da durch den Komplex das DNA-Ende unzugänglich für Reparatur-Ligasen und -Polymerasen wird.

Von Yang et al. [1996] wurde erstmals ein Enzym beschrieben, welches die kovalente Bindung zwischen Topoisomerase I und der DNA lösen kann. Dieses Enzym wird als Tyrosyl-DNA-Phosphodiesterase 1 (TDP1) bezeichnet und hydrolysiert spezifisch 3'-Tyrosin-DNA-Phosphodiester-Bindungen und keine 5'-Phosphodiester-Bindungen. Daher wurde angenommen, dass TDP1 als spezifisches Reparaturenzym für Topoisomerase I-induzierte Läsionen agiert [Pouliot et al., 2001]. Das Gen, welches das TDP1-Protein mit einer Größe von 68,5 kDa kodiert, ist auf Chromosom 14 lokalisiert [Interthal et al., 2001]. Das Enzym TDP1 ist im Zellkern angesiedelt und scheint im Vergleich zu Topoisomerase I mobiler und diffusionsfähiger zu sein. Während der Interphase ist TDP1 gleichmäßig über den gesamten Zellkern verteilt [Barthelmes et al., 2004].

Humane TDP1 ist als Monomer katalytisch aktiv und wird der Superfamilie der Phospholipase D (PLD) zugeordnet [Davies et al., 2004]. Die Mitglieder dieser Superfamilie enthalten eine stark konservierte Sequenz von Aminosäuren, die als HKD-Motiv bezeichnet wird. Humane TDP1 enthält zwei dieser Sequenzen mit den Aminosäuren His²⁶³/Lys²⁶⁵ und His⁴⁹³/Lys⁴⁹⁵ [Interthal et al., 2001].

Der Trennung des Topoisomerase-DNA-Komplexes scheint ein zweistufiger Reaktionsmechanismus zugrunde zu liegen (Abbildung 2-10). Im ersten Schritt erfolgt ein nukleophiler Angriff des His²⁶³ an der Tyrosin-DNA-Phosphodiesterbindung, wodurch ein 3'-Phosphohistidin-TDP1-Intermediat ausgebildet und die Topoisomerase freigesetzt wird. His⁴⁹³ protoniert dabei das Phenoxy-Anion der Tyrosylgruppe. TDP1 und das 3'-Phosphat-Ende der DNA werden im zweiten katalytischen Schritt durch Hydrolyse des 3'-Phosphohistidin-Zwischenproduktes freigesetzt, wobei vermutet wird, dass His⁴⁹³ nun als Base agiert

und das Wassermolekül für die Hydrolyse aktiviert [Raymond et al., 2004; Davies et al., 2004].

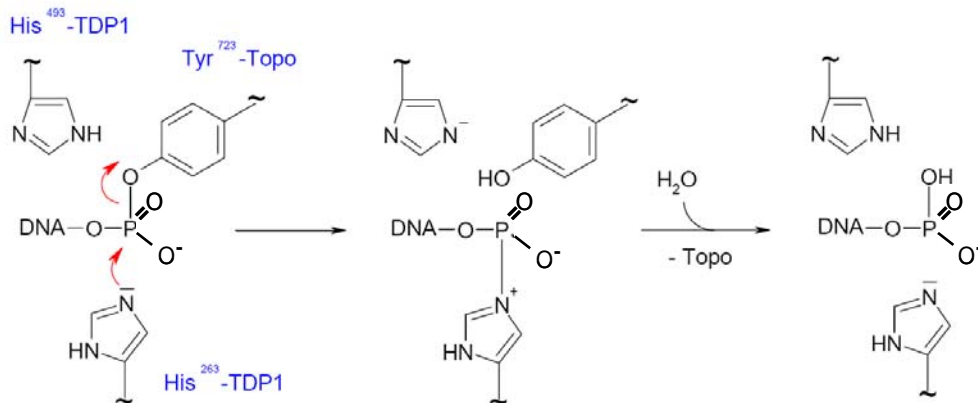


Abbildung 2-10: Mechanismus der Tyrosyl-DNA-Phosphodiesterase 1 [Raymond et al., 2004].

TDP1 besitzt eine geringe DNA- und RNA- 3'-Exonukleaseaktivität und könnte damit eine Rolle während der DNA-Reparatur zur Beseitigung einer Vielzahl an 3'-DNA-Addukten spielen [Interthal et al., 2005b]. Das Enzym ist in der Lage 3'Phosphoglykosylate, die durch oxidative DNA-Schäden entstehen [Inamdar et al., 2002], zu entfernen. Darüber hinaus wird TDP1 für die Reparatur von DNA-Einzelstrangbrüchen benötigt [El-Khamisy et al., 2007]. Dabei konnte eine Wechselwirkung von TDP1 mit der Poly(ADP-Ribose) Polymerase-1 (PARP-1), PNKP, Polymerase β , DNA-Ligase III und XRCC1, welche an der Basen-Exzisionsreparatur (BER) beteiligt sind, nachgewiesen werden [Plo et al., 2003; Park und Cheng, 2005]. Abbildung 2-11 zeigt den von Plo et al. [2003] vorgeschlagenen Mechanismus für die Reparatur eines kovalenten Topoisomerase I-Komplexes mittels des XRCC1-abhängigen Signalweges.

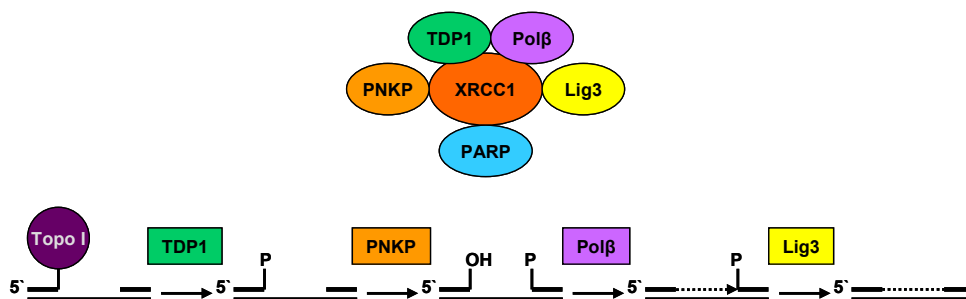


Abbildung 2-11: Schematische Darstellung zur vorgeschlagenen Reparatur von stabilisierten Topoisomerase I-DNA-Intermediaten durch den XRCC1-abhängigen Signalweg. Lig3, Ligase 3; PARP, Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase; PNKP, Polynukleotid Kinase Phosphatase; Pol β , Polymerase β ; Topo, Topoisomerase; TDP1, Tyrosyl-DNA-Phosphodiesterase 1; XRCC, „X-ray cross complementing group“ [modifiziert nach Plo et al., 2003].

Während lange davon ausgegangen wurde, dass TDP1 spezifisch an der Reparatur Topoisomerase I-vermittelter DNA-Schäden beteiligt ist, gibt es nunmehr Hinweise auf eine Beteiligung des Enzyms an der Reparatur Topoisomerase II-vermittelter DNA-Schäden [He et al., 2007]. Dies ist insofern erstaunlich, da TDP1 spezifisch nur 3'-Phosphodiester-Bindungen und nicht 5'-Phosphodiesterbindungen spalten kann. Jedoch scheint TDP1 in der Reparatur von Topoisomerase II-vermittelten Schäden eine Rolle zu spielen, deren Mechanismus noch geklärt werden muss [Nitiss et al., 2006]. Es wird vermutet, dass TDP1 nicht auf den intakten Topoisomerase-DNA-Komplex wirkt, da die 3'-Phosphodiesterbindung tief im Inneren des Komplexes verborgen liegt. Damit einher geht die Erkenntnis, dass die Aktivität der TDP1 durch den proteasomalen Abbau der Topoisomerase erhöht wird [Debétune et al., 2002]. Daher liegt es nahe, dass TDP1 erst wirkt, wenn die Komplexe durch Kollision mit dem Replikationsapparat in DNA-Doppelstrangbrüche umgewandelt [Pouliot et al., 2001] oder anderweitig prozessiert wurden [Davies et al., 2004].

Zwar führt ein Defizit im TDP1-Reparaturmechanismus im Menschen nicht zu Neoplasien oder Dysfunktionen in schnell replizierendem Gewebe, dafür kann es aber zu spinocerebellarer Ataxie mit axonaler Neuropathie (SCAN1) kommen [El-Khamisy und Caldecott, 2007]. SCAN1 ist eine autosomal rezessiv vererbte Krankheit, welche durch eine Mutation hervorgerufen wird, bei der His⁴⁹³ durch Arginin im zweiten HKD-Motiv der humanen TDP1 ersetzt ist [El-Khamisy und Caldecott, 2006]. Es wird vermutet, dass der daraus resultierende Funktionsverlust entweder mit einer Interaktion der Gentranskription oder durch die Induktion von Apoptose in postmitotischen Neuronen einhergeht [Takashima et al., 2002]. Diese Mutation reduziert die Enzymaktivität etwa um das 25-fache und verursacht somit eine Akkumulation von kovalenten TDP1-DNA-Intermediaten [Interthal et al., 2005a]. TDP1-Hemmstoffe, wie Vanadat, Tungstat oder Aminoglykosid-Antibiotika wirken lediglich in hohen (millimolaren) Konzentrationen [Liao et al., 2006], wobei Antony et al. [2007] Furamidin als bislang potentesten Inhibitor von TDP1 beschreiben.

2.3. DNA-Reparatur

DNA-Reparaturmechanismen spielen für den Erhalt der genomischen Integrität eine entscheidende Rolle [Guillem und Tormo, 2008]. Die Zelle ist ständig einer Vielzahl von Gefahren ausgesetzt, die ihre DNA schädigen können. Neben physikalischen Einflüssen und chemischen Substanzen treten auch häufig spontane Schäden der DNA auf.

Es wird berichtet, dass einige DNA-schädigende Agenzien sowie Topoisomerase II-Gifte die Aktivität von DNA-Reparatur-Enzymen erhöhen können [Wang, 2002]. Zudem ist bekannt, dass die DNA-Reparatur einen Resistenzmechanismus gegenüber diversen Fremdstoffen darstellt [Wang et al., 2009]

Um die DNA-Integrität zu wahren, stehen der Zelle je nach Art der Schädigung verschiedene Möglichkeiten der DNA-Reparatur zur Verfügung. Eine fehlerhafte DNA-Reparatur kann je nach betroffenem Reparaturmechanismus zu unterschiedlichen Krankheiten führen und auch eine Rolle bei der Kanzerogenese spielen [Schneider und Kulesz-Martin, 2004].

2.3.1. Reparatur von DNA-Einzelstrangbrüchen

Täglich entstehen durch den Angriff reaktiver Spezies und anderer elektrophiler Moleküle zehntausende DNA-Einzelstrangbrüche in jeder Zelle [McKinnon und Caldecott, 2007]. Bekannte Mechanismen zur Behebung dieser DNA-Schäden sind die Basen-Exzisionsreparatur (BER) [Maynard et al., 2009], die Basenfehlpaarungs-Reparatur („Mismatch“ Reparatur, MMR) [Christmann et al., 2003] und die Nukleotid-Exzisionsreparatur (NER) [Wood et al., 1997].

Die BER stellt den wichtigsten Mechanismus zur Reparatur oxidativer DNA-Schäden, wie 8-Oxo-Guanin, Formamidopyrimidine und 5-Hydroxyuracil, dar [Maynard et al., 2009].

Die MMR ist verantwortlich für das Entfernen von Basenfehlpaarungen, die aus spontanen und induzierten Basendesaminierungen, oxidativen Methylierungen oder Replikationsfehlern entstehen können [Christmann et al., 2003].

Die NER dominiert als DNA-Reparaturmechanismus beim Erkennen und Beheben einer Vielfalt an DNA-Läsionen, welche die DNA-Doppelhelix in ihrer Sterik behindern [Costa et al., 2003]. Dabei kann die NER in unterschiedliche Wirkungsweisen unterteilt werden [Nospikel, 2009]. Die globale genomische Reparatur („Global Genomic Repair“, GGR) repariert DNA-Schäden in transkriptionsinaktiven DNA-Bereichen, während die Transkription gekoppelte Reparatur („Transcription Coupled Repair“, TCR), Schäden an aktuell zu transkribierenden Bereichen behebt [van Hoffen, 2003].

2.3.1.1. PCNA

Das wohl bekannteste Beispiel für eine duale Rolle in der DNA-Replikation sowie in der DNA-Reparatur stellt das „Proliferating Cellular Nuclear Antigen“ (PCNA) dar [Toueille und Hübscher, 2004]. PCNA wurde ursprünglich als nukleäres Antigen während der S-Phase des Zellzyklus identifiziert [Leonardi et al., 1992]. Später wurde die Bedeutung von PCNA als Cofaktor für die DNA-Polymerase δ während der DNA-Replikation und der DNA-Reparatur erkannt [Essers et al., 2005].

PCNA ist an der BER [Dianova et al., 2001], der NER [Nichols und Sancar, 1992] und der MMR [Johnson et al., 1996] beteiligt, wobei es die Stabilisierung zwischen DNA und Polymerase δ oder ϵ unterstützt [Kelman, 1997]. Des Weiteren scheint PCNA eine Rolle in der Transläsionssynthese (TLS) zu spielen, die einen Nebenweg für die DNA-Replikation darstellt, falls zuvor nicht entfernte Fehler in der DNA-Struktur (z.B. T-T-Cyclobutan-Dimere) zu einem Anhalten der Replikationsgabel führen. Die für diesen Prozess benötigten TLS-Polymerasen sind ebenfalls auf PCNA angewiesen [Hoegel et al., 2002]. PCNA geht einen Komplex mit p21^{CIP1} ein [Xiong et al., 1992] und hemmt so dessen Funktion in der DNA-Replikation. Abbildung 2-12 zeigt eine Übersichtsskizze für Prozesse, an denen PCNA beteiligt ist.

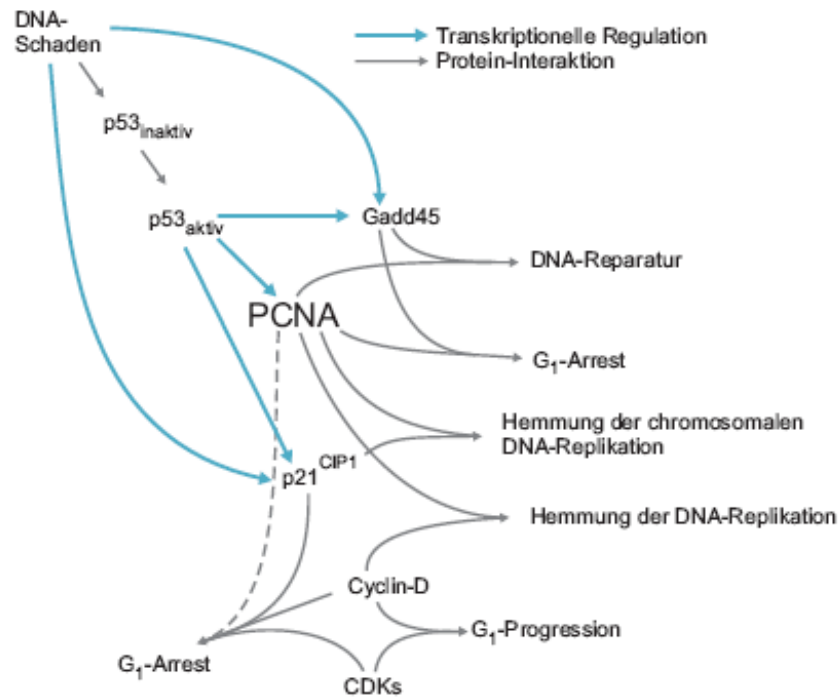


Abbildung 2-12: Intrazelluläre Prozesse, an denen PCNA beteiligt ist [Kelman, 1997].

PCNA wirkt als Homotrimer, mit drei als Ring angeordneten PCNA-Monomeren, welche die DNA umfassen [Krishna et al., 1994]. Dies erlaubt DNA-Polymerase δ die Zielsequenz zu umklammern, um die Prozessivität zu erhöhen [Suzuka et al., 1989]. PCNA wird in Zellen in der Ruhephase schwach exprimiert, sobald diese Zellen (z. B. durch Serum) jedoch zum Wachstum angeregt werden, steigt dessen Transkription um ein Vielfaches an. In exponentiell wachsenden Zellen findet die Transkription von PCNA über den Zellzyklus hinweg konstitutiv statt. In der S-Phase kommt es zu einer Translokation von PCNA in den Zellkern [Takasaki et al., 1981]. Des Weiteren zeigte sich eine Akkumulation des PCNA-Proteins im Nukleus nach DNA-Schädigung durch UV-Bestrahlung [Celis und Nielsen, 1986].

Aufgrund der zentralen Bedeutung von PCNA für die genomische Stabilität [Paunesku et al., 2001; Moldovan et al., 2007] führt eine Schädigung dieses Proteins zu einer gestörten Signalweiterleitung und einer schadhafte DNA-Reparatur, was die Zellviabilität beeinflussen kann und bis zur Mutagenese führen kann [Bae et al., 2008].

2.3.2. Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen

DNA-Doppelstrangbrüche stellen unter den vielen Arten von DNA-Schäden, die in der Zelle existieren, die größte Gefahr dar [Scott und Pandita, 2006]. Sie werden durch verschiedene endogene und exogene Agenzien, wie ionisierende Strahlung, ROS oder Topoisomerasegifte verursacht [Lieber et al., 2003].

Es wird angenommen, dass die Anzahl endogener DNA-Doppelstrangbrüche zwischen 10 und 100 pro Zellkern und Tag beträgt [Burma et al., 2006].

Die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen und die damit einhergehende Wiederherstellung der genomischen Integrität kann durch drei Mechanismen erreicht werden: Durch den „Non Homologous End Joining“ (NHEJ)-Signalweg, die konservative homologe Rekombination (HR) und die nichtkonservative HR, die als „single-strand annealing“ (SSA) bezeichnet wird [Pastink et al., 2001].

Der NHEJ-Signalweg ist an der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen insbesondere während der G₁-Phase des Zellzyklus beteiligt, kann jedoch auch aktiv in anderen Zellzyklusphasen wirken [Whitmore et al., 1989]. Dieser DNA-Reparaturmechanismus stellt in Säugerzellen häufig den bevorzugten Signalweg zur Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen dar, wobei das Bruchstück mit einem anderen freien DNA-Ende verknüpft wird, ohne dass die Abschnitte Sequenzhomologie aufweisen müssen, was zu einer Fehleranfälligkeit führt [Lieber, 1999].

Der NHEJ-Signalweg beginnt mit der Anlagerung eines heterodimeren Komplexes, bestehend aus den Proteinen Ku70 und Ku80, an die schadhafte Stelle. Nach der DNA-Bindung assoziieren die Ku-Heterodimere mit dem Protein XRCC7 und es entsteht ein Komplex mit Kinaseaktivität. Durch Phosphorylierung wird der nun hinzugezogene Komplex aus XRCC4 und DNA-Ligase IV aktiviert, der zwei DNA-Enden zusammenführt (Abbildung 2-13).

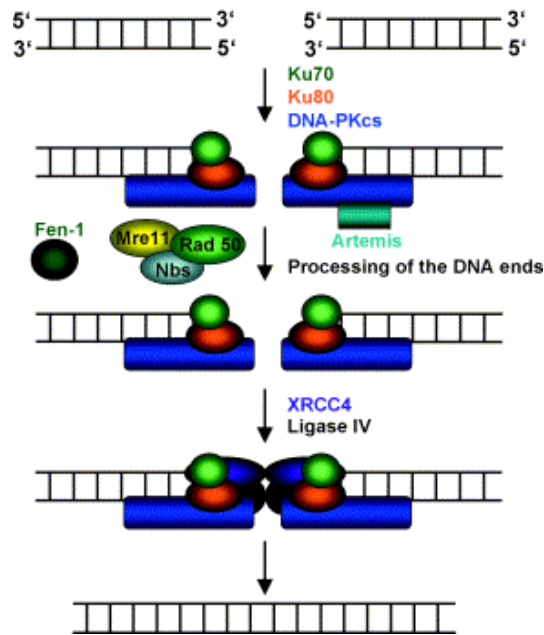


Abbildung 2-13: DNA-Reparaturmechanismus des „Non Homologous End Joining“ (NHEJ)-Signalweges. DNA-PKcs, DNA-abhängige katalytische Proteinkinase-Untereinheit; Fen-1, Flap Endonuklease 1; Rad50: Homolog zum *E. coli* RecA Protein 50; XRCC4, „X-ray cross complementing group“ 4 [Christmann et al., 2003].

Nach der Annäherung der beiden Bruchstücke müssen oft weitere Arbeitsschritte stattfinden, beispielsweise 3'- oder 5'- Überhänge entfernt werden, bevor die Enden verknüpft werden können. An diesem Prozess können z. B. der Mre11-Rad50-Nbs1-Komplex oder die Endonuklease Fen-1 beteiligt sein. Die prozessierten Enden werden schließlich durch den XRCC4-Ligase IV Komplex verknüpft [Christmann et al., 2003].

Die HR ist als größtenteils fehlerfreier Reparaturmechanismus bekannt, der die Information in ungeschädigten homologen DNA-Sequenzen zur Reparatur nutzt. In Säugerzellen zeigte sich, dass die HR nur eine Rolle während der S-Phase und G₂-Phase des Zellzyklus spielt, da nur in diesen Phasen des Zellzyklus eine Kopie der DNA verfügbar ist [Rothkamm et al., 2003].

Das Hauptprotein der konservativen HR stellt RAD51 dar [Sonoda et al., 1998; Henning und Stürzbecher, 2003]. Die Primärfunktion der HR ist die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen nahe der Replikationsgabel, während der NHEJ-Signalweg zumeist DNA-Doppelstrangbrüche repariert, die an anderen Stellen der DNA generiert werden [Scott und Pandita, 2006].

Im Gegensatz zur HR wird RAD51 für die SSA nicht benötigt [Van Dyck et al., 2001]. Dabei scheint RAD54 zu entscheiden, ob HR oder SSA erfolgt, da die Abwesenheit von RAD54 zur SSA führt [Dronkert et al., 2000]. Die SSA erfolgt häufig in der S-Phase des Zellzyklus und ist fehleranfällig [Frankenberg-Schwager et al., 2008].

2.3.2.1. Ku70/Ku80

Beim NHEJ-Signalweg spielt der Ku70/Ku80-Komplex zu Beginn der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen eine wichtige Rolle [Lieber, 1999]. Beide Ku-Proteine besitzen ein Leucin-Zipper-Motiv, wobei die Funktion hierfür bislang nicht geklärt ist. Des Weiteren besitzen beide Proteine schwache ATP-Bindungsaktivität, die für die Helikase-Funktion wichtig sein könnte. Diese Funktion dient vermutlich dazu, die DNA am Strangbruch zu entwinden. Somit können Reparaturenzyme, wie die Ligase IV, ihre katalytische Funktion ausüben.

Untersuchungen ergaben, dass vermutlich eine aus ca. 150 Aminosäuren bestehende Region am C-terminalen Ende der Ku-Proteine für die Dimerisierung zuständig ist, und dass die Bindung an die DNA durch längere Sequenzabschnitte der beiden Proteine vermittelt wird [Smith und Jackson, 1999].

Biochemische Studien haben gezeigt, dass die Bindung der Ku-Proteine in einer Sequenz-unabhängigen Weise geschieht und vom DNA-Doppelstrangbruch selbst abhängt [Dyran und Yoo, 1998]. Dabei formt das Ku-Protein eine offene, ringähnliche Struktur, die an einem Ende der DNA einfädeln kann. Eine Seite des Rings bildet ein Gestell, das eine Oberfläche der DNA-Doppelhelix schützt, während die andere Seite deutlich weiter geöffnet wird, wodurch diese für weitere Faktoren des NHEJ zugänglich wird [Walker et al., 2001].

In Wirbeltieren dient das Ku-Protein als zielende Untereinheit der DNA-abhängigen katalytischen Proteinkinase-Untereinheit (DNA-PKcs), die zusammen mit dem Ku-Protein das DNA-PK Holoenzym formen [Smith und Jackson, 1999].

2.4. Oxidativer Stress

Der Ausdruck oxidativer Stress ist weitläufig definiert und umfasst ein breites Spektrum an biologischen Wirkungen [Halliwell und Whiteman, 2004]. Wird das zelluläre Gleichgewicht zwischen der Generierung reaktiver Spezies und der antioxidativen Abwehr zu Gunsten des oxidativen Stresses verschoben, können zelluläre Schäden auftreten [Monaghan et al., 2009], was in Abbildung 2-14 gezeigt ist.

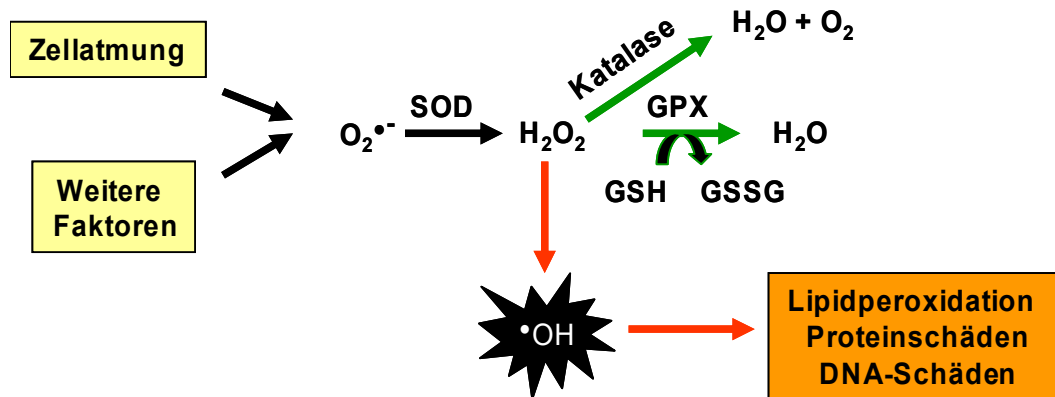


Abbildung 2-14: Überblick zur Bildung von ROS und zelluläre, antioxidative, enzymatische Detoxifizierungsmöglichkeiten. SOD, Superoxiddismutase; GPX, Glutathionperoxidase; GSH, Glutathion (reduzierte Form); GSSG, Glutathion (oxidierte Form) [modifiziert nach Roberts und Sindhu, 2009].

Molekularer Sauerstoff (O_2) ist für die Energieproduktion in aeroben Organismen essentiell. Dieser in den Mitochondrien ablaufende Prozess der oxidativen Phosphorylierung reduziert O_2 über die Atmungskette zu H_2O , wobei toxische Intermediate, so genannte reaktive Sauerstoffspezies (ROS) entstehen können [Murphy, 2009].

ROS werden häufig mit verschiedenen altersbedingten Krankheiten und dem Altern selbst in Verbindung gebracht [Sohal et al., 2002]. Daneben spielt oxidativer Stress eine Rolle bei der Krebsentstehung [Halliwell, 2002], Arteriosklerose [Banfi et al., 2008], Diabetes [Hamada et al., 2009], kardiovaskulären [Kalmar und Greensmith, 2009] und neurodegenerativen Erkrankungen [Sayre et al., 2008].

Es gibt eine Vielzahl an Verbindungen, die durch die erhöhte Produktion von ROS, oxidativen Stress induzieren. Ein Beispiel stellt Menadion dar, eine Substanz aus der Familie der K-Vitamine (K₃). Menadion generiert ROS durch das so genannte „Redoxcycling“. Abbildung 2-15 zeigt das Prinzip des „Redoxcyclings“ und relevante Enzyme der antioxidativen Abwehr.

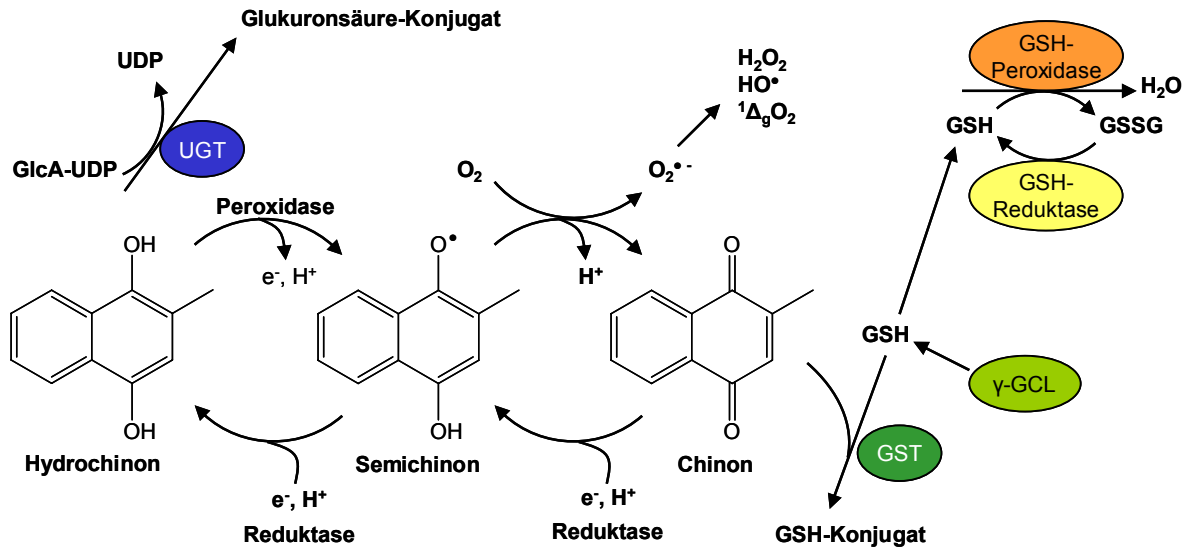


Abbildung 2-15: Prinzip des „Redoxcycling“ und zelluläre antioxidative Detoxifizierungsmöglichkeiten. UDP, Uridindiphosphat; GlcA-UDP, Glukuronsäure-Uridindiphosphat; UGT, UDP-Glukuronosyltransferase; GSH, Glutathion; GSSG, Glutathion (oxidierte Form); GST, Glutathion-S-Transferase; γ-GCL, γ-Glutamylcysteinyl-Ligase [modifiziert nach Eisenbrand und Metzler, 2002].

Neben einer erhöhten Produktion von ROS, kann oxidativer Stress ebenfalls aus einem reduzierten Gehalt an Antioxidantien resultieren [Halliwell und Whiteman, 2004]. Die antioxidativen Verteidigungsmechanismen beinhalten Enzyme wie Katalase, Superoxiddismutase (SOD) und Glutathion-S-Transferasen (GST) [Scandalios, 2005], wobei Noxen häufig durch Konjugation mit Glutathion (GSH) entgiftet werden [Temple et al., 2005]. Jedoch können hohe Dosen an Xenobiotika GSH depletieren und damit oxidativen Stress auslösen, obwohl der Fremdstoff selbst keine ROS bildet.

2.4.1. Reaktive Sauerstoffspezies

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) können in freie Radikale und Nichtradikale eingeteilt werden. Ein freies Radikal besitzt ein oder mehrere ungepaarte Elektronen, also Elektronen, die einzeln in Atom- oder Molekülorbitalen vorliegen. Weiterhin sind

reaktive Stickstoffspezies (RNS), reaktive Chlorspezies (RCIS) und reaktive Bromspezies (RBrS) bekannt, die in Tabelle 2-3 zusammengestellt sind.

Tabelle 2-3: Reaktive Spezies [modifiziert nach Halliwell, 2006].

	Freie Radikale	Keine Radikale
ROS	Superoxid ($O_2^{\cdot-}$)	Wasserstoffperoxid (H_2O_2)
	Hydroxyl (OH^{\cdot})	Ozon (O_3)
	Hydroperoxyl (HO_2^{\cdot})	Singulett Sauerstoff (O_2^1)
	Peroxyl (RO_2^{\cdot})	Organische Peroxyde (ROOH)
	Alkoxyl (RO^{\cdot})	
	Carbonat ($CO_3^{\cdot-}$)	
RNS	Stickstoffmonoxid (NO^{\cdot})	Salpetrige Säure (HNO_2)
	Stickstoffdioxid (NO_2^{\cdot})	Nitrosylkation (NO^+)
		Nitrosylanion (NO^-)
		Distickstofftetroxid (N_2O_4)
		Distickstofftrioxid (N_2O_3)
		Peroxynitrit (ONOO)
RCIS	Chlor (Cl^{\cdot})	Hypochlorige Säure (HOCl)
		Nitrylchlorid (NO_2Cl)
		Chloramine
		Chlorgas (Cl_2)
RBrS	Brom (Br^{\cdot})	Bromgas (Br_2)

ROS stellen die häufigste und bekannteste Gruppe dar [Liochev und Fridovich, 1994], wobei wichtige Vertreter das Superoxidradikalanion ($O_2^{\cdot-}$), Wasserstoffperoxid

(H₂O₂) und das hoch reaktive Hydroxylradikal (OH[•]) darstellen [Toyokuni und Akatsuka, 2007].

Häufig werden ROS als toxische Nebenprodukte des Metabolismus betrachtet, die in der Lage sind, biologische Makromoleküle zu schädigen [Frank et al., 2000].

Die oxidative Schädigung von Lipiden kann zum Verlust der Membranintegrität führen [Halliwell, 2006], während die Schädigung von Proteinen zur Modifikation der Proteinstruktur führt, wodurch die Funktion und Aktivität der Proteine stark eingeschränkt werden kann. Dies betrifft vor allem Strukturproteine, Proteine, die an der zellulären Signalantwort und der Genexpression beteiligt sind, sowie Enzyme des Fremdstoffmetabolismus und der DNA-Reparatur [Marnett et al., 2003].

Eine oxidative DNA-Schädigung wird durch die Exposition mit Oxidantien oder Elektrophilen und anschließender Reaktion mit den DNA-Basen, den Desoxyribose-Residuen oder dem Phosphodiester-Rückgrat hervorgerufen [Halliwell und Whiteman, 2004]. So wird geschätzt, dass etwa 10⁵ oxidative DNA-Läsionen täglich in jeder Zelle entstehen [Park et al., 1992]. Hinsichtlich der Krebsentstehung steht vor allem die Oxidation der DNA-Base Guanin durch das OH[•] zum 8-Oxo-Guanin im Vordergrund. So ist bekannt, dass 8-Oxo-Guanin mutagen wirkt [Paz-Elizur et al., 2008], indem es die normale Basenpaarung von Guanin mit Cytosin in eine Paarung mit Adenin ändert und sich so Mutationen manifestieren können [Grollman und Moriya, 1993]. Neben dem primären physiologischen Substrat 8-Oxo-Guanin [Tchou et al., 1991] ist auch 8-Oxo-Adenin dafür bekannt, sich einer Imidazol-Ringöffnung unterziehen und dadurch Formamidopyrimidin (FAPY)-Addukte zu bilden [Krishnamurthy et al., 2008]. Häufig auftretende oxidative DNA-Läsionen sind in Abbildung 2-16 dargestellt.

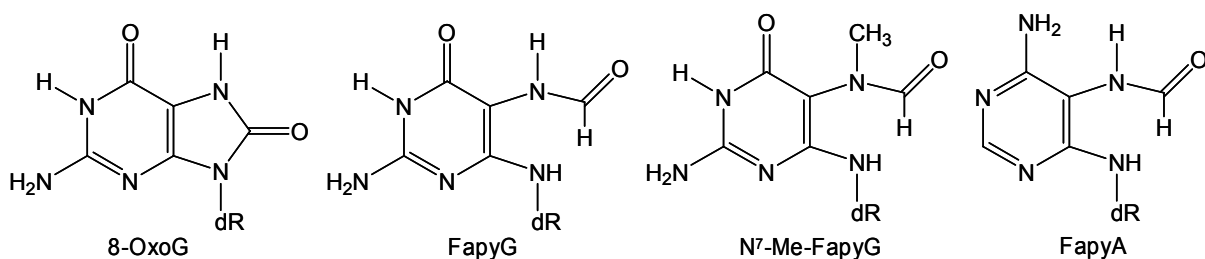


Abbildung 2-16: Oxidative Läsionen der DNA-Purinbasen. dR, Desoxyribose; 8-OxoG, 8-Oxo-Guanin; FapyG, Guanin mit geöffnetem Imidazolring; N⁷-Methyl-FapyG, Guanin mit geöffnetem Imidazolring und Methylgruppe in N⁷-Position; FapyA, Adenin mit geöffnetem Imidazolring [Frosina, 2006].

Neben den Purinen werden auch Pyrimidine durch OH^\bullet oxidiert. So entsteht zum einen 5-Hydroxy-Desoxy-Cytidin, das zum 5-Hydroxy-Desoxy-Uracil desaminieren kann und zum anderen Thymidinglycol [Marnett et al., 2003].

Neben der schädigenden Wirkung von ROS sollte jedoch nicht vergessen werden, dass sie eine weit verbreitete und wichtige Rolle in der zellulären Abwehr und als Signalmoleküle spielen [Liu et al., 2005]. So haben ROS einen Einfluss auf die Genexpression, die Zellproliferation und die Induktion von Apoptose durch die Beeinflussung ROS-assoziiierter Signalwege [Hancock et al., 2001; Susnow et al., 2009].

2.4.2. Der Nrf2/ARE-Signalweg

ROS und elektrophile Moleküle sind in der Lage, den Transkriptionsfaktor „Nuclear Factor Erythroid 2p45 (NF-E2)-Related Factor“ 2 (Nrf2) zu aktivieren, welcher durch die Bindung an das antioxidativ responsive Element (ARE) die Gentranskription detoxifizierender Enzyme induziert [Toyokuni und Akatsuka, 2007]. Von besonderer Bedeutung sind darunter die Phase II-Enzyme des Fremdstoffmetabolismus, wie die Glutathion-S-Transferasen (GST), die NAD(P)H-Chinonoxidoreduktase 1 (NQO1), UDP-Glukuronosyltransferasen (UGT), Epoxidhydrolasen, die γ -Glutamylcysteinyligase (γ -GCL) sowie die Hämoxygenase 1 (HO1).

Das humane Nrf2-Protein besitzt eine Molekülmasse von 66,1 kDa und ist Mitglied der Familie der basischen „Leucine zipper“ (bZIP)-Transkriptionsfaktoren [Moi et al., 1994]. Nrf2 wird ubiquitär in unterschiedlichen Geweben und Zelltypen exprimiert [Pi et al., 2007].

In seiner inaktiven Form ist Nrf2 im Zytoplasma an „Kelch-like ECH-associated protein“ 1 (Keap1) gebunden, welches mit dem Aktin des Zytoskeletts assoziiert ist [Kang et al., 2004]. Dabei besitzt Keap1 mehrere Cysteinreste, denen eine besondere Rolle in der Erkennung von oxidativem Stress zugeschrieben wird, wodurch sie maßgeblich an der Funktion von Keap1 als Nrf2-Suppressor beteiligt sind [de Vries et al., 2008].

Die Aktivierung des Nrf2-Signalweges erfolgt durch oxidativen Stress oder so genannte ARE-Aktivatoren, die zu einer Dissoziation des Nrf2-Keap1-Komplexes führen. Hierdurch kann das Nrf2-Protein in den Zellkern translozieren, wo es nach

Bildung eines Heterodimers mit weiteren Transkriptionsfaktoren, die ebenfalls eine bZIP-Domäne enthalten, die Transkription ARE-vermittelter Gene induziert [Lee und Johnson, 2004]. Die Translokation von Nrf2 kann entweder durch Modifikation von Keap1 und einer damit verbundene Stabilisierung von Nrf2 oder durch eine Erhöhung des nukleären Imports ausgelöst werden [Huang et al., 2002]. Auch kann die Aktivierung von Nrf2 durch vorgeschaltete Signalkaskaden erfolgen. Einen Überblick über die Aktivierung des Nrf2/ARE Signalweges gibt Abbildung 2-17.

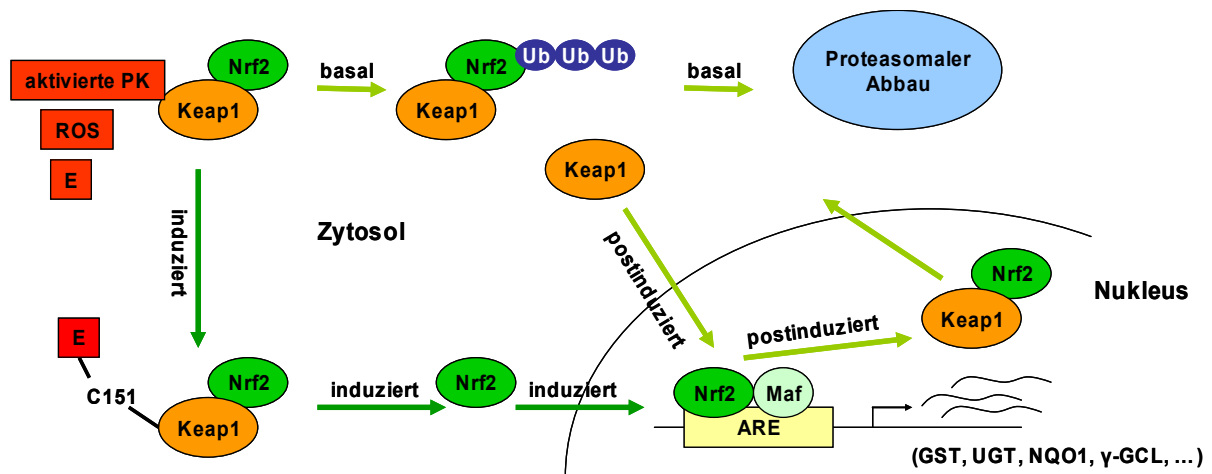


Abbildung 2-17: Schematisches Modell der Nrf2-Regulation durch Keap1. ARE, Antioxidatives responsives Element; E, Elektrophil; GST, Glutathion-S-Transferase; Keap1, „Kelch-like ECH-associated protein“ 1; Maf, Makrophagen aktivierender Faktor; NQO1, NAD(P)H Chinonoxidoreduktase 1; Nrf2, „Nuclear Factor Erythroid 2p45 (NF-E2)-Related Factor“ 2; PK, Proteinkinasen; ROS, reaktive Sauerstoffspezies; Ub, Ubiquitin; UGT, UDP-Glukuronosyltransferasen; γ-GCL, γ-Glutamylcysteinilgase [modifiziert nach Lau et al., 2008].

Entgegen der früheren Annahme, dass Keap1 ausschließlich im Zytosol lokalisiert ist, konnte von Nguyen et al. [2005] gezeigt werden, dass Keap1 sich zwischen Zytoplasma und Kern bewegt. Des Weiteren wird von einem konstitutiven Nrf2-Abbau im Zellkern berichtet, wodurch unter basalen Bedingungen ein geringer Nrf2-Gehalt aufrecht gehalten wird. In neueren Studien wird eine Beteiligung des Abbaus von Keap1 an der Aktivierung von Nrf2 diskutiert. So konnte gezeigt werden, dass einige ARE-Aktivatoren den Ubiquitin-vermittelten Abbau von Keap1 erhöhen. Jedoch scheint die Beeinflussung des Keap1-Abbaus von der Zelllinie und dem ARE-Aktivator abhängig zu sein [Kensler et al., 2007].

2.4.3. Das zelluläre Antioxidans Glutathion

Das Tripeptid γ -L-Glutamyl-L-Cysteinyl-Glycin, auch bekannt als Glutathion (GSH), stellt das wichtigste niedermolekulare zelluläre Antioxidans dar [Meyer, 2008]. Die Synthese von GSH erfolgt durch eine sequenzielle Bindung, katalysiert durch das Enzym γ -Glutamylcysteinyligase, des Cysteins an Glutamat, wobei γ -L-Glutamyl-L-Cystein gebildet wird, woraufhin die Glutathion-Synthetase die Addition eines Glycin an das Molekül katalysiert, wodurch GSH entsteht (Abbildung 2-18).

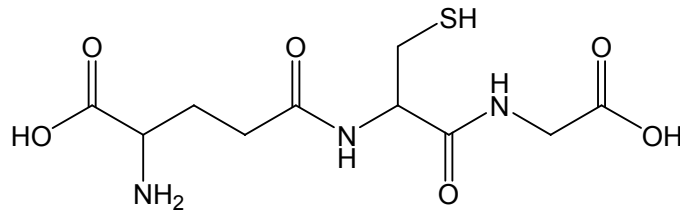


Abbildung 2-18: Strukturformel des Tripeptids GSH.

GSH übernimmt wichtige zelluläre Funktionen als Reduktionsmittel [Rebrin und Sohal, 2008], wobei die Thiolgruppe des Cysteins zur Wirkung des Moleküls einen entscheidenden Beitrag leistet. So kann dieser Thiolrest als äußerst sensitive funktionelle Gruppe leicht oxidiert werden [Meyer, 2008].

Das zumeist im Zytosol lokalisierte GSH liegt in den meisten Zellen in Konzentrationen von 1-10 mM vor [Forman et al., 2009].

Eine Hauptaufgabe von GSH besteht darin, die Zelle vor ROS und Elektrophilen zu schützen [Ublacker et al., 1991]. Neben der antioxidativen Wirkung spielt GSH auch in weiteren physiologischen Prozessen eine wichtige Rolle [Forman et al., 2009]. Obwohl GSH nur im Zytosol gebildet wird, ist das Molekül über verschiedene zelluläre Kompartimente verteilt [Circu und Aw, 2008]. So ist GSH in den Mitochondrien an der Entscheidung bezüglich einer Apoptose- oder Nekrose-induktion beteiligt [Yuan und Kaplowitz, 2009], während GSH im Zellkern eine Rolle als Regulator der Zellteilung spielt [Pallardó et al., 2009].

2.4.4. Glutathion-S-Transferasen

Glutathion-S-Transferasen (GSTs) katalysieren den nukleophilen Angriff von reduziertem GSH auf unpolare Verbindungen, wobei neben reaktiven Elektrophilen, auch α , β -ungesättigte Carbonylverbindungen, reaktive Ester, Chinone, reaktive Spezies sowie freie Radikale abgefangen werden. Daneben besitzen sie eine wesentliche Bedeutung in der Detoxifizierung von Kanzerogenen [Hayes und Pullford, 1995], der Zellproliferation, der Apoptose [Lo und Ali-Osman, 2007] und der Fremdstoffresistenz [Beaumont et al., 1998]. GSTs werden in vielen Spezies und Geweben exprimiert und kommen in großen Mengen im Epithelgewebe des menschlichen Gastrointestinaltraktes vor [Peters et al., 1991].

GST-Isoenzyme werden in drei Hauptfamilien eingeteilt: die zytosolischen, mitochondrialen und mikrosomalen GSTs [Hayes et al., 2005].

Humane zytosolische GSTs sind als Dimere mit Untereinheiten von 23-30 kDa katalytisch aktiv [Frova, 2006], die sich anhand ihrer Substratspezifität und Organverteilung unterscheiden [Hayes und Pullford, 1995]. Basierend auf ihrer Sequenzhomologie werden sieben Klassen unterschieden: GST α , GST μ , GST π , GST σ , GST θ , GST ω und GST ζ [Hayes und McLellan, 1999; Sheehan, 2001]. Dabei teilen Isoenzyme einer Klasse mehr als 40% Sequenzhomologie.

Im Menschen ist die GST κ als einzige mitochondriale Klasse bekannt. Daneben wurden sechs mikrosomale GSTs identifiziert und in die Subgruppen I, II und IV eingeteilt [Jakobsson et al., 1999].

Zytosolische GSTs repräsentieren die größte Familie dieser Transferasen und besitzen übergreifende Substratspezifitäten. Sie zeigen genetische Polymorphismen, wobei diese Variationen in der Kanzerogenese und bei inflammatorischen Krankheiten zu Anfälligkeiten führen können [Hayes et al., 2005].

2.5. Fremdstoffmetabolismus

Der Organismus ist ständig einer Vielzahl an chemischen Verbindungen ausgesetzt, die über die Nahrung, die Atemluft oder die Haut aufgenommen werden können. Ein Großteil dieser körperfremden Stoffe ist dabei lipophiler Natur. Da nur wasserlösliche Substanzen ausgeschieden werden können, muss die Hydrophilie der Xenobiotika erhöht werden, um eine Akkumulation dieser Substanzen und eine damit einhergehende potentielle Schädigung des Organismus zu vermeiden. Die Biotransformation ermöglicht dies durch Einführung polarer Gruppen sowie deren Konjugation mit hydrophilen Verbindungen [Guengerich und Shimada, 1991].

Die Biotransformation wird in zwei Phasen unterteilt. In Phase I-Reaktionen, sogenannten Funktionalisierungsreaktionen, werden funktionelle Gruppen an das unpolare Molekül eingeführt. Des Weiteren können durch Oxidation, Reduktion, Hydrolyse oder Hydratisierung entsprechende funktionelle Gruppen freigelegt werden. Eine häufige Oxidationsreaktion stellt dabei die Hydroxylierung relevanter Substanzen mithilfe des Cytochrom-P450 abhängigen Monooxygenasesystems (CYP) dar [Hines et al., 1988]. Phase II-Reaktionen, sogenannte Konjugationsreaktionen, koppeln die in Phase I entstandenen funktionellen Gruppen durch Transferasen mit endogenen Molekülen wie Glukuronsäure, Sulfat, Methylgruppen oder Glutathion.

Die Biotransformation führt in den meisten Fällen zu Metaboliten mit geringerer biologischer Aktivität. Einige Noxen hingegen werden aufgrund der so genannten metabolischen Aktivierung erst in die ultimalen toxischen Metaboliten überführt. Der oxidative Phase I Metabolismus ist beispielsweise für das kanzerogene Potential von Benz[a]pyren [Lewis et al., 1994] oder Aflatoxin B₁ [Zhou et al., 2008] verantwortlich.

2.5.1. Der „Arylhydrocarbon“ Rezeptor-Signalweg

Der „Arylhydrocarbon“ Rezeptor (AhR)-Signalweg reguliert unter anderem die Expression von Phase I-Enzymen der Biotransformation. Daneben scheint der Ah-Rezeptor eine wichtige Rolle während physiologischer Entwicklungen zu besitzen [Nguyen und Bradfield, 2008]. So ist der AhR-Signalweg durch Kontrolle des

Zellzyklus an Wachstum und Differenzierung beteiligt [Bock und Köhle, 2006], indem er den Übergang von der G₁- in die S-Phase blockieren kann [Nebert et al., 2000].

Der AhR wurde in der Literatur erstmals von Poland und Glover [1976] als „Induktionsrezeptor“ von aromatischen Verbindungen wie 2,3,7,8-Tetrachlor-Dibenzo-*p*-Dioxin (TCDD) für die Genexpression beschrieben. Es handelt sich um einen löslichen Liganden-aktivierten nukleären Transkriptionsfaktor, der in einer Vielzahl an Geweben exprimiert wird und zur Familie der „basic-Helix-Loop-Helix-Per-Arnt-Sim“ (bHLH-PAS) Proteine gehört [Hankinson, 1995].

Im inaktiven Zustand liegt der AhR im Zytosol als heterotetramerer 9S Komplex mit zwei Hitzeschock Proteinen Hsp90, dem immunophilinähnlichen Protein XAP2 und dem Co-Chaperon p23 vor [Delescluse et al., 2000]. Im Zellkern bindet der aktivierte AhR unter Abspaltung von Hsp90, p23 und XAP2 an das AhR Kerntranslokator (Arnt) Protein und bildet so ein Heterodimer, das nun an spezifische DNA-Sequenzen, dem so genannten Xenobiotischen Responsiven Element“ (XRE), binden kann. Das Signal wird über den Ubiquitin/Proteasom Signalweg beendet. Hierfür wird der AhR durch eine Reihe von Enzymen (Ubiquitin-Aktivierungs-Enzym E1, Ubiquitin-Konjugations-Enzym E2 und Ubiquitin-Ligase-Enzym E3) mehrfach ubiquitinyliert und durch das 26S Proteasom abgebaut [Ma und Baldwin, 2000]. Eine ligandeninduzierte Aktivierung des AhR-Signalweges ist in Abbildung 2-19 dargestellt.

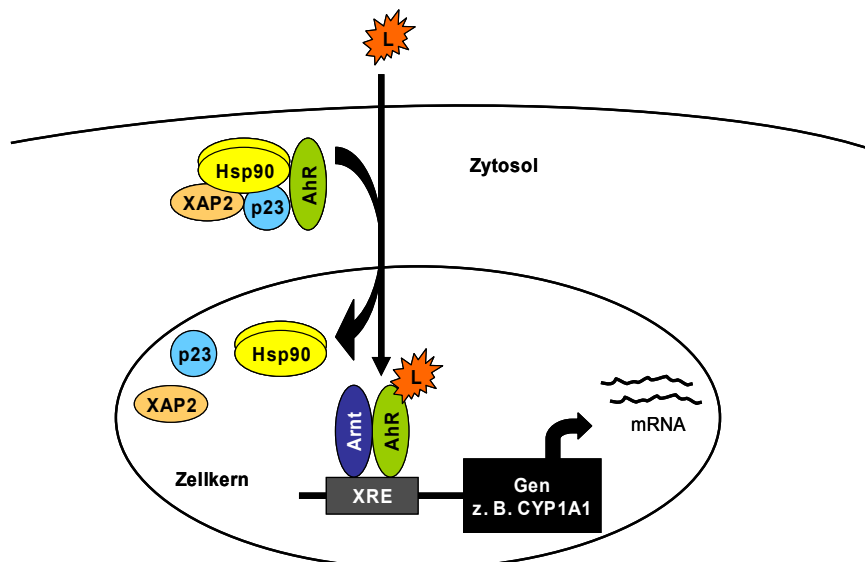


Abbildung 2-19: Schematische Darstellung des AhR-Signalweges. AhR, „Aryl hydrocarbon Receptor“; Arnt, AhR nukleärer Translokator; CYP1A1, Cytochrom-P450 abhängige Monooxygenase 1A1; Hsp90, Hitzeschockprotein 90; p23, Cochaperon; XAP2, Hepatitis B Virus X-assoziiertes Protein; XRE, Xenobiotisches Responsives Element [modifiziert nach Mimura und Fujii-Kuriyama, 2003].

Eines der bekanntesten Gene, dessen Expression durch den AhR-Signalweg induziert wird, ist das Phase I Enzym CYP1A1. Daneben werden weitere Mitglieder der CYP-Familie, wie CYP1A2 oder CYP1B1 [Shimada et al., 2002] über den AhR-Signalweg in ihrer Expression beeinflusst.

Der AhR-Signalweg ist zudem in der Lage mit anderen Signalwegen zu interagieren, wie beispielsweise dem NF- κ B-Signalweg [Ke et al., 2001] oder dem Nrf2-Signalweg [Shin et al., 2007]. Miao et al. [2005] konnten zeigen, dass in Maushepatomzellen (1c1c7) die Expression von Nrf2 direkt durch die Aktivierung des AhR-Signalweges mit TCDD reguliert wird. Dies lässt den Schluss zu, dass Nrf2 dem AhR/XRE-Signalweg nachgeschaltet ist (Abbildung 2-20).

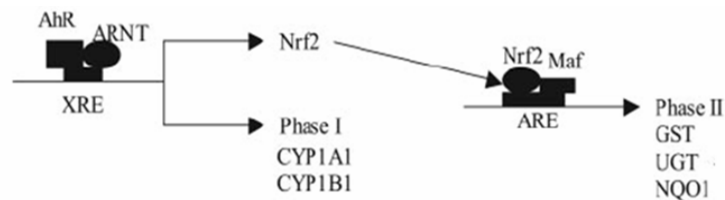


Abbildung 2-20: Schematische Darstellung der Regulation des Nrf2/ARE Signalweges durch den Ah-Rezeptor. AhR, „Aryl hydrocarbon Receptor“; ARE, Antioxidatives Responsives Element; ARNT, AhR nukleärer Translokator; CYP, Cytochrom-P450 abhängige Monooxygenase; GST, Glutathion-S-Transferase; Maf, Makrophagen aktivierender Faktor; NQO1, NAD(P)H Chinonoxidoreduktase 1; Nrf2, „Nuclear Factor Erythroid 2p45 (NF-E2)-Related Factor“ 2; UGT, UDP-Glukuronosyltransferasen; XRE, Xenobiotisches Responsives Element [Miao et al., 2005].

Dem entgegen konnten Shin et al. [2007] zeigen, dass umgekehrt die Regulation des AhR-Signalweges durch Nrf2 moduliert werden kann. So nimmt Nrf2 Einfluss auf die Transkription des AhR Gens sowie der im Signalweg nachgeschalteten Zielgene, was bedeutet, dass Nrf2 Einfluss auf die Transkription des AhR-Signalweges nehmen kann (Abbildung 2-21).

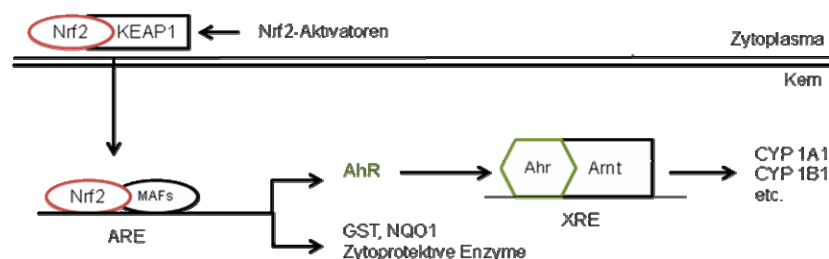


Abbildung 2-21: Schematische Darstellung der Regulation des AhR/XRE Signalweges durch Nrf2. AhR, „Aryl hydrocarbon Receptor“; ARE, Antioxidatives Responsives Element; ARNT, AhR nukleärer Translokator; CYP, Cytochrom-P450 abhängige Monooxygenase; GST, Glutathion-S-Transferase; Keap1, „Kelch-like ECH-associated protein“ 1; Maf, Makrophagen aktivierender Faktor; NQO1, NAD(P)H Chinonoxidoreduktase 1; Nrf2, „Nuclear Factor Erythroid 2p45 (NF-E2)-Related Factor“ 2; XRE, Xenobiotisches Responsives Element [modifiziert nach Shin et al., 2005].

Der bekannteste Ligand des Ah-Rezeptors ist TCDD [Ma et al., 2000], weshalb er in der Literatur auch unter der Bezeichnung Dioxin-Rezeptor zu finden ist [Fujii-Kuriyama und Mimura, 2005]. Weitere Liganden können in zwei Hauptgruppen eingeteilt werden: die synthetischen halogenierten aromatischen Kohlenwasserstoffe (HAK) und die nicht-halogenierten polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe (PAK). Zur zweiten Gruppe zählen natürlich vorkommende Liganden, beispielsweise Flavonoide, Carotinoide oder Phenole, die im Vergleich zu den synthetischen Liganden zumeist deutlich schwächer wirken [Denison et al., 2002].

2.5.2. Cytochrom-P450 abhängige Monooxygenasen

Cytochrom-P450 abhängige Monooxygenasen (CYP) sind eine Superfamilie der Hämproteine, zu der mehr als 300 Proteine zählen und die in einer Vielzahl von Spezies vorhanden sind. Ihre Aufgabe ist die Monooxygenierung von zahlreichen endogenen und exogenen Substanzen [Fujii-Kuriyama und Mimura, 2005]. Die Mitglieder dieser Superfamilie lassen sich gemäß ihrer Aminosäuresequenz in unterschiedliche Klassen einteilen. Im Menschen sind derzeit 57 unterschiedliche funktionelle CYP-Isoenzyme bekannt [Zanger et al., 2008], die in 18 Genfamilien eingeteilt werden [Kawajiri und Fujii-Kuriyama, 2007].

CYP-Enzyme werden in unterschiedlichen Geweben exprimiert, wobei die Expression mit der physiologischen Rolle der einzelnen CYP-Enzyme assoziiert. So ist beispielsweise die Mehrheit der Enzyme, die am Fremdstoffmetabolismus beteiligt ist, im endoplasmatischen Retikulum der Leber lokalisiert [Scripture et al., 2005].

Die Enzyme der CYP-Familie werden oftmals in Abhängigkeit der Fremdstoffexposition induziert. Neben der transkriptionellen Induktion spielen bei der Aktivität von CYP-Isoenzymen auch Translationsprozesse oder der Proteinabbau eine wichtige Rolle [Tompkins und Wallace, 2007].

2.6. Mykotoxine der Schimmelpilzgattung *Alternaria*

Alternaria-Toxine gehören zur großen Klasse der Mykotoxine. Schimmelpilze können diese sekundären Stoffwechselprodukte produzieren, welche die Gesundheit von Mensch und Tieren beeinträchtigen können [Bennett und Klich, 2003]. Der Grund für die Produktion der meist niedermolekularen Verbindungen ist bislang nicht vollständig geklärt. Diskutiert wird dabei ein schützender und/oder kompetitiver Vorteil der Organismen innerhalb ihrer Umgebung [Coulombe, 1993].

Mykotoxinbildende Schimmelpilze gehören überwiegend der Klasse Deuteromyceten an. Von Bedeutung sind insbesondere die Gattungen *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* und auch *Alternaria*. Da all diese Arten Heterokaryose (Vereinigung von Protoplasten, die verschiedene Kerntypen enthalten) betreiben, erfolgt die Toxinbildung nicht streng artspezifisch, sondern sehr variabel [Schlegel, 1992].

Die Mykotoxinforschung setzt den Fokus seit vielen Jahren auf Toxine, die genotoxisches und mutagenes Potential besitzen und daher möglicherweise in die menschliche Kanzerogenese involviert sind, wie beispielsweise die Aflatoxine, Ochratoxine und Fumonisine [Fink-Gremmels, 2009].

2.6.1. Die Schimmelpilzgattung *Alternaria*

Schimmelpilze der Gattung *Alternaria* gehören zu den weit verbreiteten Schwärzepilzen (*Dematiaceae*) aus der Klasse der Deuteromyceten. Laut einer Stellungnahme des Bundesinstitutes für Risikobewertung (BfR) waren im Jahre 2003 etwa 40 Arten der äußerst komplexen Gattung *Alternaria* bekannt. *Alternaria*-Arten leben als Saprophyten auf abgestorbenem Pflanzenmaterial, in der Erde oder parasitisch auf Pflanzen [Robiglio und Lopez, 1995]. Jedoch können sie auch lebende Pflanzen, Tiere und den Menschen befallen [McKay et al., 2001; Vieira et al., 2006].

Zu den wichtigsten Spezies der Gattung *Alternaria* zählen neben *A. alternata*, *A. brassicae*, *A. citrii*, *A. cucumerina*, *A. mali*, *A. solani*, *A. tenuis* und *A. tenuissima*. Einige *Alternaria*-Arten sind wirtsspezifisch, wie *A. citrii* (Zitrusfrüchten) und *A. solani* (Nachtschattengewächse), während andere auf mehreren Wirten wachsen können [Stinson et al., 1980].

2.6.1.1. Morphologie von *Alternaria*

Alternaria spp. bilden unscheinbare Substratmyzelien und lockere, olivgrüne, braune bis schwarze Hyphen mit kurzen dickwandigen Konidienträgern. Die dunkle Färbung ist dabei auf die Einlagerung von Melanoiden zurückzuführen [Roth et al., 1990]. Die Konidien ändern sich im Laufe der Zeit, indem sie zunächst einzellig und fast rund sind, später mehrzellig und unregelmäßig keulenförmig (Abbildung 2-22).



Abbildung 2-22: Morphologie von *Alternaria alternata* [www.mycology.adelaide.edu].

2.6.1.2. Vorkommen von *Alternaria*

Alternaria Spezies kommen ubiquitär in der Umwelt, wie im Erdboden, im Saatgut und in landwirtschaftlichen Rohstoffen vor und sind weltweit zu finden [Logrieco et al., 2003]. Dabei tritt die durch *Alternaria spp.* hervorgerufene Mykotoxikose am häufigsten in Ländern mit mildem, feuchttropischen bis subtropischen Klima auf, da unter diesen Bedingungen *Alternaria* bevorzugt auf Nahrungsmitteln wächst [Barkai-Golan, 2008]. Jedoch ist *Alternaria* auch in der Lage, bei deutlich niedrigeren Temperaturen zu wachsen, wobei die minimale Entwicklungstemperatur der Schimmelpilzgattung im Bereich von -3°C beschrieben wird [Sommer, 1985].

Die Kontamination von Lebens- und Futtermitteln mit Mykotoxinen stellt ein weltweites Problem dar [Kabak et al., 2006], was auch im Falle von *Alternaria* beobachtet wird [Barkai-Golan, 2008]. Der Befall von *Alternaria* kann diverse Krankheiten von Nutzpflanzen auslösen. *Alternaria*-Toxine sind eng mit Virulenzsymptomen auf einigen Pflanzen wie Weizen (*Triticum*) [Li und Yoshizawa, 2000], Tomaten (*Lycopersicon*) [Ruelas et al., 2006], Äpfeln (*Malus*) [Filajdić und

Sutton, 1992] und Mangos (Mangifera) [Prusky et al., 2002] verbunden. Die wirtschaftliche Bedeutung zeigte Rao bereits im Jahre 1964, als *Alternaria* Spezies eine Vielzahl an kultivierten Rosen infizierten und damit großen ökonomischen Schaden verursachten.

Eine Kontamination von Nahrungsmitteln durch *Alternaria* stellt ein ernst zu nehmendes Problem dar, wobei ein Befall während des landwirtschaftlichen Anbaus, der Ernte, des Transports, der Verarbeitung oder der Lagerung erfolgen kann [Stinson et al., 1980]. Abbildung 2-23 zeigt einen Apfel, der mit *Alternaria alternata* kontaminiert ist.



Abbildung 2-23: Mit *Alternaria alternata* kontaminierter Apfel [Roth et al., 1990].

Tabelle 2-4 fasst wichtige Nahrungsmittel und Gegenstände zusammen, die ebenfalls mit einem Befall von *Alternaria* beschrieben sind.

Tabelle 2-4: Nahrungsmittel und Gegenstände, die mit einer Kontamination von *Alternaria* beschrieben sind.

	Lebensmittel / Gegenstand	Literatur
Getreide	Weizen Hafer Roggen Gerste Mais Reis Hirse Raps	Li und Yoshizawa, 2000 Kosiak et al., 2004 Lee et al., 1986 Medina et al., 2006 Broggi et al., 2007 Makun et al., 2007 Seitz et al., 1975 Humpherson-Jones, 1985
Früchte/Gemüse	Heidelbeeren Karotten Mandarinen Melonen Orangen Sonnenblumenkerne Tomaten Kartoffeln Äpfel	Stinson et al., 1980 Solfrizzo et al., 2004 Magnani et al., 2007 Huang et al., 2000 Stinson et al., 1981 Torres et al., 1993 Iglesias et al., 2007 Harwig et al., 1979 Ozcelik et al., 1990
Weitere Nahrungsmittel	Pfeffer Doldengewächse	Halfon-Meiri und Rylski, 1983 Solfrizzo et al., 2005
Verarbeitete Produkte	Vollkornbrot Tomatenprodukte (Saft, Mark, Püree und Paste) Trauben- und Beerensäfte Rot- und Weißwein	Reiß et al., 1983 da Motta und Valente Soares, 2001 Scott et al., 2006 Shephard, 2007
Gegenstände	Weinkorken Dachziegel	Centeno und Calvo, 2002 Ren et al., 1998

2.6.2. *Alternaria*-Toxine

Bekannte Mykotoxine der Schimmelpilzgattung *Alternaria* sind in Abbildung 2-24 dargestellt.

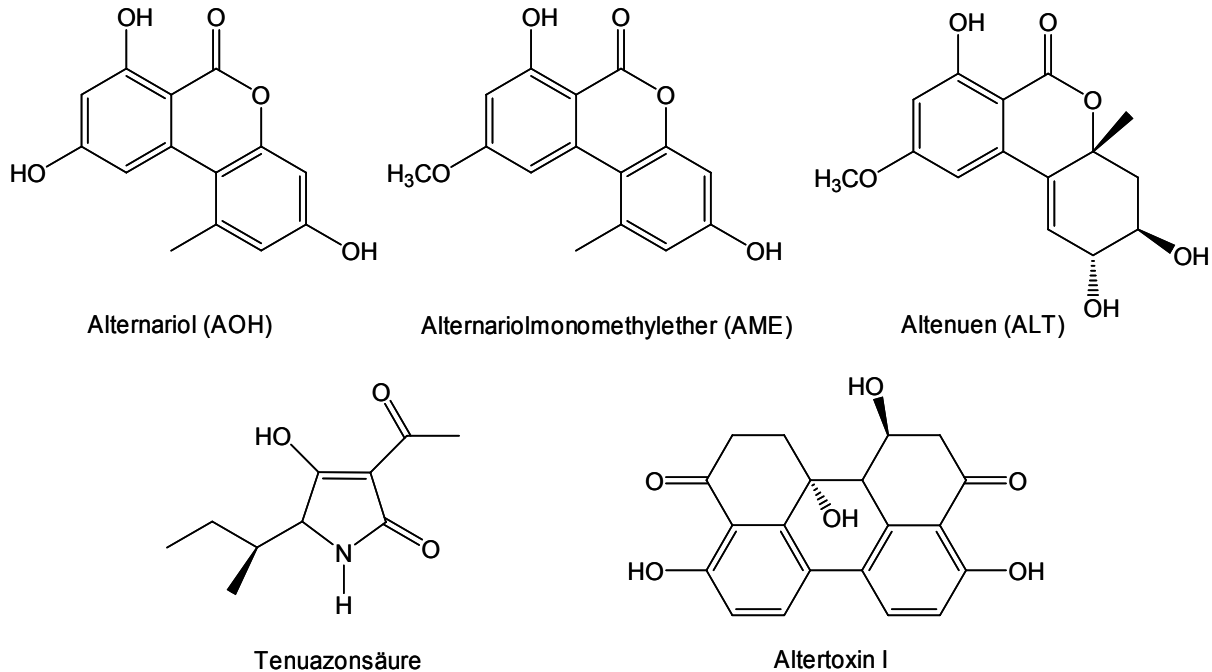


Abbildung 2-24: Strukturformeln bekannter *Alternaria*-Toxine.

2.6.2.1. Einfluss der Umweltbedingungen auf die Toxinbildung

Studien zeigen, dass *Alternaria*-Toxine nicht nur an sichtbar verschimmelten Stellen gegenwärtig sind, sondern auch in das umgebende Gewebe eindringen können [Robiglio und Lopez, 1995].

Ein Zusammenhang der Toxinproduktion mit unterschiedlichen Umwelteinflüssen, wie Temperatur, Wasseraktivität (a_w -Wert), pH-Wert, Lichteinfluss und Nährstoffangebot, wird in einigen Publikationen beschrieben [Burroughs et al., 1976; Magan et al., 1984; Hasan, 1995].

So wird postuliert, dass weißes und blaues Licht eine Hemmung der Synthese von AOH und AME verursacht, wobei der Mechanismus der Lichthemmung noch unklar ist. Möglicherweise initiiert Licht einen synthetischen Reaktionsweg hin zum β -Carotin und zur Lipidproduktion, und weg von der Polyketidsynthese, was zu einer Reduzierung der Toxingehalte führt [Haegglom und Unestam, 1979].

2.6.2.2. Toxizität von *Alternaria*-Extrakten

In den 80er Jahren erweckte die Schimmelpilzgattung *Alternaria* Interesse, als in der Region Linxian in China eine erhöhte Inzidenz an Speiseröhrenkrebs festgestellt wurde, da in dieser Region überdurchschnittlich häufig Schimmelpilz-kontaminiertes Getreide gefunden wurde und *Alternaria alternata* die Hauptkontaminante darstellte. Aufgrund dieser Befunde wurden *Alternaria*-Toxine mit der Ätiologie von Speiseröhrenkrebs in Verbindung gebracht [Dong et al., 1987].

Liu et al. [1991] zeigten eine mutagene Wirkung verschiedener *Alternaria* Extrakte in der Hamsterlungenfibroblastenzelllinie V79, wobei die Notwendigkeit einer metabolischen Aktivierung je nach Extrakt variierte. Darüber hinaus wurden morphologische Veränderungen in Maus-Fibroblasten (NIH/3T3) beobachtet. Die mutagene Wirkung eines *Alternaria*-Extraktes ohne vorherige metabolische Aktivierung konnte von Schrader et al. [2001] im Ames-Test in den beiden *Salmonella*-Stämmen TA97 und TA100 bestätigt werden.

Zur akuten Toxizität von Extrakten ist wenig bekannt. Sauer et al. [1978] beschreiben eine schwache toxische Wirkung von kontaminiertem Getreide bei Hühnern und Ratten. Pero et al. [1973] berichten von einer akuten letalen Dosis eines *Alternaria*-Extraktes auf Mäuse ab 300 mg/kg Körpergewicht (KG).

Alternaria spp. gehören zu den am meisten verbreiteten Luftallergenen in vielen Teilen der Welt [Barkai-Golan, 2008]. Das allergene Potential von *Alternaria* wird zunehmend als Risikofaktor für die Entwicklung und Persistenz von Asthma, seinem Schweregrad und einer eventuellen Verstärkung beschrieben [Bush und Prochnau, 2004]. Dabei kann eine Exposition mit *Alternaria*, im Vergleich zu anderen Allergenen, im Jahr mehrere Monate andauern [Sanchez und Bush, 2001]. Des Weiteren wirken *Alternaria* Extrakte antibakteriell [Slifkin et al., 1973] und als Insektizide [Christias et al., 2001].

Die Toxizität von *Alternaria*-Extrakten erwies sich in unterschiedlichen Testsystemen deutlich potenter im Vergleich zu den getesteten Einzeltoxinen [Schwarz, 2008], was die Möglichkeit eines additiven bzw. synergistischen Effektes der *Alternaria*-Toxine untereinander eröffnet. Zudem ist häufig unklar, welches Toxin in welchem Ausmaß zu den genannten Effekten beiträgt [Pero et al., 1973; Schrader et al., 2001].

2.6.2.3. Toxizität und biologische Wirkungen von AOH, AME und ALT

Neben komplexen *Alternaria*-Extrakten sind in der Literatur auch toxische Effekte und biologische Wirkungen einzelner *Alternaria*-Toxine beschrieben. Im Folgenden soll daher auf das toxische Potential der Mykotoxine AOH, AME und ALT eingegangen werden.

Akute Toxizität

Die akute Toxizität von AOH, AME und ALT wurde an Mäusen [Pero et al., 1973], Ratten und Hühnern [Sauer et al., 1978] untersucht und ist als gering einzustufen. Dabei beschreibt Pero et al. [1973] eine additive Wirkung im Falle einer Coinkubation von AOH und AME.

Reproduktionstoxizität

An Hühnerembryos wurden bis zu einer maximalen Konzentration von 1 mg/Ei mit den *Alternaria*-Toxinen AOH, AME oder ALT weder fetotoxische noch teratogene Effekte hervorgerufen [Griffin und Chu, 1993]. In einer Studie an Mäusen wiesen Pero et al. [1973] nach, dass AOH in einer subkutan verabreichten Dosis von 100 mg/kg KG fetotoxisch wirkt und eine Mischung aus AOH und AME additive Wirkung zu haben scheint. AME führte in einer Konzentration von 200 mg/kg KG in syrischen Goldhamstern nach intraperitonealer Gabe zu einer Abnahme der Anzahl an Geburten [Pollock et al., 1982a].

Zytotoxizität

Pero et al. [1973] untersuchten die Zytotoxizität verschiedener *Alternaria* Metaboliten in der Gebärmutterhalskarzinomzelllinie HeLa. AOH hemmt das Wachstum mit einem IC₅₀-Wert (Konzentration einer Substanz, die eine 50%-ige Hemmung im Vergleich zur Kontrolle zeigt) von 23 µM, während für AME und ALT IC₅₀-Werte von 29-51 µM bzw. 96 µM angegeben sind. Darüber hinaus konnte eine zytotoxische Wirkung der Mykotoxine auf Bakterien im *Bacillus mycoides* Assay beobachtet werden, wobei 60 µg AOH, 500 µg AME bzw. 125 µg ALT pro Petrischale nötig waren, um einen Hemmhof auszubilden. AOH und AME zeigten in diesem Testsystem einen

synergistischen Effekt, da die Bildung eines Hemmhofs durch lediglich je 0,25 µg der beiden Toxine in Kombination gezeigt wurde [Pero et al., 1973].

Genotoxizität

DiCosmo und Straus [1985] vermuten eine Interkalation des planaren AOH-Moleküls in den DNA-Doppelstrang. Zwar wurde keine Interkalation von AOH bis zu einer Konzentration von 25 µM mittels Fluoreszenz-Kompetitionsexperimenten im zellfreien Testsystem beobachtet, jedoch kam es zu einer Interaktion des Mykotoxins mit der DNA, was auf eine Bindung an die kleine Furche der DNA hindeutet [Fehr et al., 2009]. Liu et al. [1992] konnten mittels alkalischer Filterelution die DNA-strangbrechende Wirkung von AOH und AME in Rattenhepatozyten und Fibroblasten-2BS-Zellen nachweisen. Hierbei überstieg die Wirkung von AOH die von AME um ca. das Achtfache [Liu et al., 1992]. AME erhöhte zudem ab einer Gabe von 54 mg/kg KG die Anzahl der Mikrokerne in polychromatischen Erythrozyten des Rattenknochenmarks *in vivo*. Lehmann et al. [2006] berichteten von einer schwachen Induktion von Mikrokerneln durch AOH in der Gebärmutterhalskarzinomzelllinie Ishikawa und einer ausgeprägten Induktion von Mikrokerneln in chinesischen V79-Hamsterfibroblasten. Nach Inkubation mit mehr als 10 µM AOH konnte eine klastogene Wirkung auf V79- und Ishikawa-Zellen gezeigt werden. An humanen Kolonkarzinomzellen (HT29) wurde nach einstündiger Inkubation mit AOH eine signifikante und konzentrationsabhängige Induktion von DNA-Strangbrüchen beschrieben. AME zeigte hierbei in seiner Wirkung ein ähnliches Potential wie AOH [Pfeiffer et al., 2007a; Fehr et al., 2009].

Mutagenität

Die mutagene Wirkung von AOH und AME auf Prokaryoten *in vitro* wird kontrovers bewertet und scheint vom Testsystem abhängig zu sein. So zeigten Davis und Stack [1994], dass AOH und AME im Ames-Test an den *Salmonella typhimurium* Stämmen TA98, TA100, TA1537 und TA1538 unabhängig von einer vorausgegangenen metabolischen Aktivierung kein mutagenes Potential besitzen. Zu ähnlichen Ergebnissen gelangten Scott und Stoltz [1980], die AOH ebenfalls als nicht mutagen in den *Salmonella typhimurium* Stämmen TA98 und TA100 beschreiben. AME wirkt dagegen auf TA98 ohne metabolische Aktivierung schwach mutagen. Im Gegensatz

dazu beschreibt Schrader et al. [2001] sowohl AOH als auch AME als schwach mutagen auf TA100 nach metabolischer Aktivierung. Des Weiteren zeigt AOH an Adenin/Thymin (AT)-reichen Stellen in TA102 unabhängig von einer metabolischen Aktivierung einen mutagenen Effekt, während AME nach metabolischer Aktivierung in TA102 und in TA104 schwach mutagen wirkt [Schrader et al., 2006]. Im Falle von *Escherichia coli* ND160 zeigen sowohl AOH als auch AME (An et al., 1989) ohne metabolische Aktivierung Mutationen, wobei AOH eine um das 4-8-fach stärkere Wirkung zeigt als AME [Zhen et al., 1991].

In Tests mit Säugerzellen konnte übereinstimmend gezeigt werden, dass sowohl AOH als auch AME mutagen wirken. So zeigten sowohl AOH [Brugger et al., 2006] als auch AME [Liu et al., 1991] im Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase (HPRT)-Test in V79-Zellen unabhängig von einer metabolischen Aktivierung ein mutagenes Potential, wobei AME ohne S9 deutlich stärker war, was vermuten lässt, dass AME als direktes Mutagen wirkt [Liu et al., 1992]. Auch im Thymidinkinase-Test in Mauslymphoma L5178Y *tk*^{+/-} Zellen zeigt AOH mutagene Wirkung [Brugger et al., 2006].

Kanzerogenität

Liu et al. [1992] zeigten, dass AOH und AME einen Proliferationsstimulus in humanen, fetalem Speiseröhrenepithel auslösen. Die basalen Zellen des Ösophagusepithels waren hyperplastisch, die Anordnung der Epithelzellen war formlos, die Basalzellen vermehrten sich schichtweise und der karyoplasmatische Anteil war erhöht. Die Zellkerne hatten unterschiedliche Größen, waren dunkel gefärbt und Karyokinese fand statt. Werden die mit AOH behandelten Epithelzellen Nacktmäusen subkutan injiziert, bilden diese Tumore aus [Liu et al., 2002]. Yekeler et al. [2001] beobachteten in „Swiss“ Albino Mäusen nach einer Fütterungsdosis von 100 mg/kg KG AME pro Tag Dysplasien, welche von mild bis mittelmäßig eingestuft wurden. Weiterhin zeigten alle Tiere dieser Gruppe neoplastische Veränderungen des Ösophagusepithels.

Hormonelle/Estrogene Wirkungen

AOH bindet sowohl an den humanen Estradiol-Rezeptor (ER) α als auch an den ER β , erhöht darüber hinaus die Aktivität der alkalischen Phosphatase (ALP) und induziert

die Expression der mRNA der ALP in kultivierten Ishikawa-Zellen. AOH agiert als reiner Estradiol-Agonist in der Ishikawa-Zelllinie. Obwohl die estrogenen Wirkung von AOH ungefähr um das 10 000-fache geringer ist als das estrogenes Potential des endogenen Hormons 17 β -Estradiol, ist seine Estrogenität vergleichbar mit der des Phytoestrogens Daidzein oder dem Umweltestrogen Bisphenol A in diesem Zellsystem [Lehmann et al., 2006]. Das estrogenes Potential von AOH konnte jedoch von Wollenhaupt et al. [2008] in endometriellen Zellen des Schweins nicht beobachtet werden. Des Weiteren hemmen AOH und AME die Sekretion des Steroidhormons Progesteron in kultivierten granulären Zellen des Schweins [Tiemann et al., 2009].

2.6.2.4. Verteilung und Metabolismus von AOH und AME

Die Verteilung von mit Tritium markiertem AME in Ratten und Mäusen zeigte, dass AME und seine Metaboliten eine besonders hohe Affinität zum Speiseröhrengewebe besitzen [Liu et al., 1991]. Untersuchungen zur Exkretion von C¹⁴-markiertem AME ergaben, dass der Großteil des Mykotoxins unverändert über den Faeces ausgeschieden wird [Pollock et al., 1982b]. Nach der Inkubation von homogenisierten Gewebeproben der intestinalen Mucosa und Leber von jungen Schweinen mit AME wurde gezeigt, dass AME bevorzugt glukuronidiert und ein geringer Teil zu AOH demethyliert wird. Glutathionkonjugate traten nicht auf [Olsen und Visconti, 1988]. Pfeiffer et al. [2007b] konnten zeigen, dass AOH und AME Substrate für Cytochrom-P450 abhängige Monooxygenasen darstellen. Während der Inkubation von Lebermikrosomen der Ratte, Schwein und Mensch mit AOH entstanden durch die oxidative Umsetzung vier aromatische hydroxylierte Metabolite, die alle Katecholstruktur aufweisen. Zudem konnte eine Methylierung der reaktiven Metabolite durch die Katechol-O-Methyltransferase beobachtet werden. Weiterhin zeigten Pfeiffer et al. [2008b], dass AOH und AME in hepatischem und extrahepatischem Gewebe glukuronidiert werden und die Glukuronidierung einen metabolischen Hauptweg in der Verteilung der Mykotoxine darstellt.

3. Ziel der Arbeit

Die Schimmelpilzgattung *Alternaria* wird aufgrund ihres ubiquitären Vorkommens häufig in Zusammenhang mit kontaminierten Nahrungsmitteln gebracht. Dennoch reicht laut einer Stellungnahme des BfR aus dem Jahre 2003 die Datenlage nicht aus, um eine Risikoabschätzung bezüglich *Alternaria*-Toxinen in Lebensmitteln vorzunehmen. Des Weiteren wird die Notwendigkeit weiterer Untersuchungen zur Exposition und Toxizität dieser Mykotoxine hervorgehoben. Alternariol (AOH), Alternariolmonomethylether (AME) und Alternariol (ALT) werden als sekundäre Metabolite der Schimmelpilzgattung *Alternaria* gebildet.

In Voruntersuchungen wurde gezeigt, dass AOH und AME die DNA-Strangbruchrate in humanen Kolonkarzinomzellen (HT29) erhöhen. Darüber hinaus ist AOH im zellfreien Testsystem in der Lage an die kleine Furche der DNA zu binden und mit humaner DNA-Topoisomerase I und II β zu interagieren [Fehr et al., 2009].

Basierend auf diesen Ergebnissen wurde in der vorliegenden Arbeit ergänzend der Einfluss der *Alternaria*-Toxine AOH, AME und ALT auf die katalytische Aktivität der Topoisomerase II α untersucht. Des Weiteren lag der Fokus in der Aufklärung des dabei zugrunde liegenden Wirkmechanismus. Dafür wurden Testsysteme gewählt, welche die Zuordnung dieser Mykotoxine zur Klasse der katalytischen Hemmstoffe bzw. der Topoisomerasegifte ermöglichen. Um in der intakten Zelle zwischen katalytischem Hemmstoff und Topoisomerasegift differenzieren zu können, wurden nach Etablierung der geeigneten Zelllinien der „Immunoband Depletion“ Assay und der „In vivo Complex of Enzyme“ (ICE) Assay durchgeführt.

Topoisomerasegifte stabilisieren das Protein-DNA-Intermediat, indem die Topoisomerase über einen Tyrosylrest kovalent an die DNA gebunden vorliegt. Das Reparaturenzym Tyrosyl-DNA Phosphodiesterase 1 (TDP1) ist in der Lage, den Topoisomerase-DNA-Komplex zu spalten und das Enzym freizusetzen. Um zu untersuchen, inwiefern die Topoisomerasegiftung an der durch AOH und AME induzierten DNA-strangbrechenden Wirkung beteiligt ist, wurde die Modulation der DNA-Schädigung mit Hilfe von Zelllinien untersucht, die TDP1 überexprimieren (humane embryonale Nierenzellen, HEK293) bzw. in denen TDP1 supprimiert wurde (humane Kolonkarzinomzelllinie, HCT116). Darüber hinaus sollte untersucht werden, inwiefern weitere relevante Proteine der DNA-Reparatur (Ku70, „Proliferating Cellular

Nuclear Antigen“ (PCNA)) an der Modulation der DNA-Strangbruchrate nach AOH-Behandlung in Ku70- bzw. PCNA-supprimierenden HCT116-Zellen beteiligt sind. Ku70 stellt eine zentrale Komponente im „Non Homologous End Joining“-Signalweg in der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen dar. PCNA spielt, neben seiner Bedeutung in der DNA-Replikation, eine Rolle in der Basen-Exzisionsreparatur (BER), dem Hauptmechanismus der Reparatur oxidativer DNA-Schäden.

Ferner sollte der Frage nachgegangen werden, ob AOH und AME oxidativen Stress induzieren. Daher wurden die Mykotoxine auf die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) mittels Dichlorofluorescein Assay getestet. Zusätzlich wurde eine mit oxidativem Stress verbundene Aktivierung des „Nuclear Factor Erythroid 2p45 (NFE2)-Related Factor“ 2 (Nrf2) Signalweges mithilfe der Western Blot Analyse untersucht. Eine Aktivierung des Nrf2 Signalweges stellt für die Zelle einen Abwehrmechanismus gegenüber ROS dar, indem die Genexpression detoxifizierender Enzyme des Phase II-Metabolismus induziert wird. Zur weiteren Aufklärung des Einflusses von AOH und AME auf den Redoxstatus der Zelle wurden sowohl der Glutathiongehalt als auch die Aktivität der Glutathion-S-Transferasen untersucht.

Von Liu et al. [1991] wird ein vermehrter Schimmelpilzbefall von Weizen mit *Alternaria* mit einer erhöhten Inzidenz an Speiseröhrenkrebs in Zusammenhang gebracht, was Untersuchungen zur zellspezifischen Wirkung der Mykotoxine AOH und AME veranlasste. Dazu wurden die humanen Karzinomzelllinien des Kolons (HT29), der Leber (HepG2) und der Speiseröhre (KYSE510) gewählt. HT29-Zellen repräsentieren Gewebe des Gastrointestinaltraktes, während die Zelllinie HepG2 eine fremdstoffmetabolisierende Kapazität aufweist. Des Weiteren wurden KYSE510-Zellen eingesetzt, da *Alternaria*-Toxine mit der Entstehung von Speiseröhrenkrebs in Verbindung gebracht werden [Liu et al., 1991]. Da bekannt ist, dass AOH und AME einem oxidativen Metabolismus unterliegen [Pfeiffer et al., 2007b], sollte der Frage nachgegangen werden, inwieweit Cytochrom-P450 abhängige Monooxygenase (CYP) 1A1 als Phase I Enzyme, in den zu untersuchenden Permanentzelllinien exprimiert bzw. induziert wird. Anhand des Expressionsmusters dieser Enzyme in den unterschiedlichen Zelltypen sind Rückschlüsse auf die Bedeutung der Biotransformation für die toxische Wirkung der *Alternaria*-Toxine möglich. Ergänzend zur CYP1A1-Induktion sollten potentielle zellspezifische Wirkungen der Mykotoxine

Ziel der Arbeit

AOH und AME anhand von Untersuchungen zum Zellwachstum, zum Einfluss auf den zellulären Redoxstatus und zur Modulation der DNA-Integrität ermittelt werden.

4. Ergebnisse und Diskussion

4.1. Das *Alternaria*-Toxin Altenuen

Altenuen (ALT) zählt neben Alternariol (AOH) und Alternariolmonomethylether (AME) zur Klasse der Dibenzopyrone. Jedoch ist im Gegensatz zu AOH und AME der C-Ring von ALT nicht aromatisch aufgebaut (Abbildung 4-1).

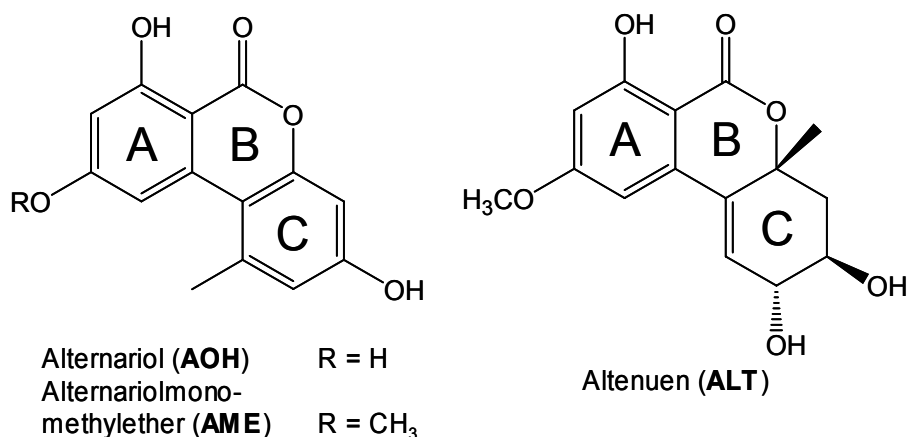


Abbildung 4-1: Strukturformeln der Dibenzopyrone AOH, AME und ALT.

ALT entsteht während der Polyketidsynthese aus AME, das wiederum aus AOH gebildet wird. Daher stellte sich die Frage, ob ALT als Folgemetabolit, ebenso wie AOH und AME [Fehr et al., 2009], ein DNA-strangbrechendes Potential besitzt.

Der Einfluss auf die DNA-Integrität wurde mittels Einzelzellgelelektrophorese (Comet Assay) unter alkalischen pH-Bedingungen untersucht. Der Einsatz von basischen Puffern ermöglicht die Erfassung von DNA-Doppelstrangbrüchen, DNA-Einzelstrangbrüchen, mit Reparaturproteinen verbundenen DNA-Einzelstrangbrüchen, alkalisensitiven Stellen (z.B. apurine Stellen), DNA-DNA-Quervernetzungen und DNA-Protein-Quervernetzungen [Tice et al., 2000]. Durch eine zusätzliche Behandlung der Proben mit dem Enzym Formamidopyrimidin-DNA-Glykosylase (Fpg) können mögliche oxidative DNA-Schädigungen, sogenannte Fpg-sensitive-Stellen, erfasst werden. Fpg ist ein bakterielles Enzym, das unter anderem oxidierte Basen wie 8-Oxo-Guanin, FAPY-Guanin (2,6-Diamino-4-Hydroxy-5-Formamidopyrimidin), FAPY-Adenin sowie apurine Stellen (normal und 5'-oxidiert) erkennt, aus dem DNA-Rückgrat herausschneidet und so einen DNA-Strangbruch generiert [Boiteux, 1993].

Oxidative DNA-Schäden werden als zusätzliche DNA-Strangbrüche in der Fpg-behandelten Probe im Vergleich zur nicht Fpg-behandelten Probe detektiert. Bekannt für seine oxidative Schädigung der DNA ist Menadion (MEN; 2-Methyl-1,4-Naphtochinon; Vitamin K₃) [Chiou und Tzeng, 2000], das als Positivkontrolle verwendet wird. Als Maß für die stattgefundenene DNA-Schädigung wird die Schweifintensität („Tail Intensity“) erfasst. Die Schweifintensität entspricht dem DNA-Gehalt im Kometenschweif bezogen auf die DNA-Menge im Kometenkopf und wird prozentual angegeben.

In Abbildung 4-2 sind die resultierenden DNA-Schäden nach einstündiger serumfreier Inkubation von HT29-Zellen mit der Lösungsmittelkontrolle Dimethylsulfoxid (DMSO), ALT bzw. der Positivkontrolle MEN zusammengefasst.

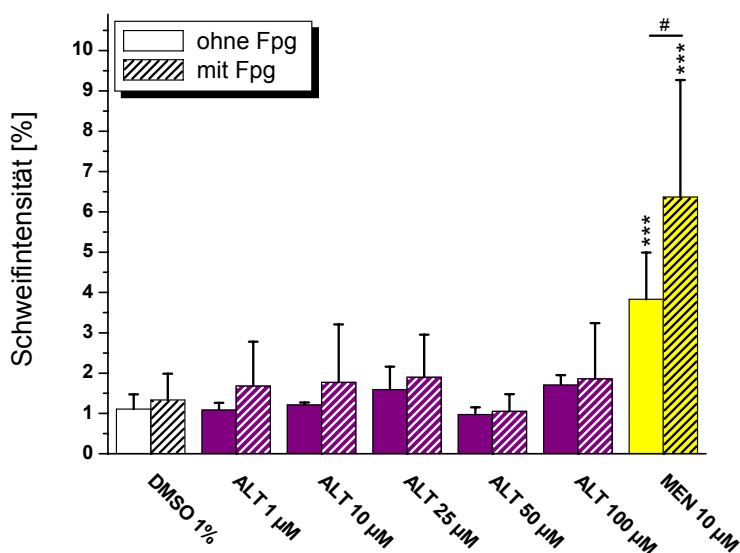


Abbildung 4-2: Induktion von DNA-Schäden, gemessen mittels alkalischem Comet Assay. Die DNA-strangbrechenden Effekte von ALT wurden nach 1 h serumfreier Inkubation von HT29-Zellen untersucht. Die ungeschraffierten Balken repräsentieren die Fpg-unbehandelten Proben, während die geschraffierten Balken den Fpg-behandelten Proben entsprechen. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte \pm SD von drei unabhängigen Experimenten. Signifikante Unterschiede wurden mittels Student's *t*-Test berechnet. Dabei beziehen sich die Sterne auf die jeweilige Lösungsmittelkontrolle, während die Rauten signifikante Unterschiede aufgrund der Fpg-Behandlung darstellen (# = $p < 0,05$; *** = $p < 0,001$).

ALT zeigt im Konzentrationsbereich von 1-100 μ M nach einstündiger Inkubation keine Erhöhung der DNA-Strangbruchrate in HT29-Zellen. Die gemessenen Schweifintensitäten der mit ALT behandelten Proben liegen in einem ähnlichen Bereich (1-2%) wie die der Lösungsmittelkontrolle. Des Weiteren liefert eine zusätzliche Fpg-Behandlung keine Modulation der DNA-Schäden innerhalb der

Proben. Somit scheint eine oxidative DNA-Schädigung, basierend auf Fpg-sensitiven-Stellen, im verwendeten Testsystem nicht stattzufinden. Eine oxidative DNA-Schädigung ist dagegen bei der Positivkontrolle MEN zu beobachten. Dabei entstehen ohne Fpg-Behandlung Schweifintensitäten im Bereich von 3,5%, während diese nach Fpg-Behandlung auf etwa 6,5% signifikant erhöht sind.

Insgesamt lässt das Ergebnis den Schluss zu, dass ALT im Gegensatz zu AOH und AME [Fehr et al., 2009] kein DNA-strangbrechendes Potential besitzt.

Der Einfluss von AOH und AME auf die DNA Integrität scheint von dem planaren Grundgerüst dieser Verbindungen auszugehen, da ALT mit seinem nicht aromatischem C-Ring kein DNA-schädigendes Potential aufweist.

So sind planare, polyzyklische aromatische Moleküle in der Lage, in den Raum zwischen zwei benachbarten Basenpaaren der doppelhelikalen Struktur der DNA zu interkalieren [Ferguson und Denny, 2007]. Interkalatoren sind bekannt dafür, wichtige Prozesse in der DNA-Regulation zu beeinträchtigen [Hendry et al., 2007]. DiCosmo und Straus [1984] wiesen mittels Agarose-Gelelektrophorese nach, dass AOH ab einer Konzentration von 40 μM in Plasmid-DNA interkaliert. Zwar zeigten AOH und ALT bis zu einer Konzentration von 25 μM im zellfreien Ethidiumbromid-Verdrängungsassay keine Interkalation in Kalbsthymus DNA, jedoch führte AOH im Gegensatz zu ALT zu einer Verdrängung des Fluoreszenzfarbstoffes Hoechst 33258, was auf eine Bindung an die kleine Furche der DNA schließen lässt [Fehr et al., 2009].

Studien haben gezeigt, dass die biologische Wirkung DNA-bindender Verbindungen nicht nur durch die Interaktion mit der DNA per se herrührt, sondern zumindest teilweise auf der Hemmung von Enzymen basiert, welche die DNA-Topologie regulieren [Pindur et al., 2005]. Interkalatoren und Liganden der kleinen Furche der DNA stellen daher häufig Topoisomerasehemmstoffe dar [Bestermann et al., 1989; Chen et al., 1993].

Im Falle von ALT konnte keine Hemmung der katalytischen Aktivität der humanen DNA-Topoisomerase I, II α und II β beobachtet werden [Fehr et al., 2009].

Da ALT weder die DNA Integrität beeinflusst noch eine Hemmwirkung auf humane DNA-Topoisomerasen aufweist, standen die Mykotoxine AOH und AME im Fokus der weiteren Arbeit.

4.2. Einfluss von AOH und AME auf die katalytische Aktivität humaner DNA-Topoisomerase II α

Die Untersuchungen zur Beeinflussung von DNA-Topoisomerase II α durch AOH und AME wurden mittels Dekatenierungsassay durchgeführt. Hierzu wurde humane rekombinante DNA-Topoisomerase II α verwendet. Das Enzym wurde freundlicherweise von Prof. Boege (Heinrich Heine Universität, Düsseldorf) zur Verfügung gestellt. Durch die Verwendung von Kinetoplasten-DNA (kDNA) als Substrat, die als hochmolekulares Netzwerk ineinander verknüpfter DNA-Doppelstrangzirkel vorliegt, wird spezifisch die katalytische Aktivität von Topoisomerase II erfasst. Nur das aktive Enzym ist unter ATP-Verbrauch in der Lage durch die Generierung von DNA-Doppelstrangbrüchen einzelne Minizirkel, die eine Größe von etwa 2,5 kb besitzen, aus dem hochmolekularen Netzwerk der kDNA herauszulösen. Die freien DNA-Minizirkel können in ein Agarosegel migrieren, wohingegen die hochmolekulare kDNA in der Geltasche verbleibt. Abbildung 4-3 zeigt ein repräsentatives Agarosegel, resultierend aus der Behandlung humaner DNA-Topoisomerase II α mit der Lösungsmittelkontrolle DMSO, AOH und dem Topoisomerase II-Gift Doxorubicin (DOX, Positivkontrolle).

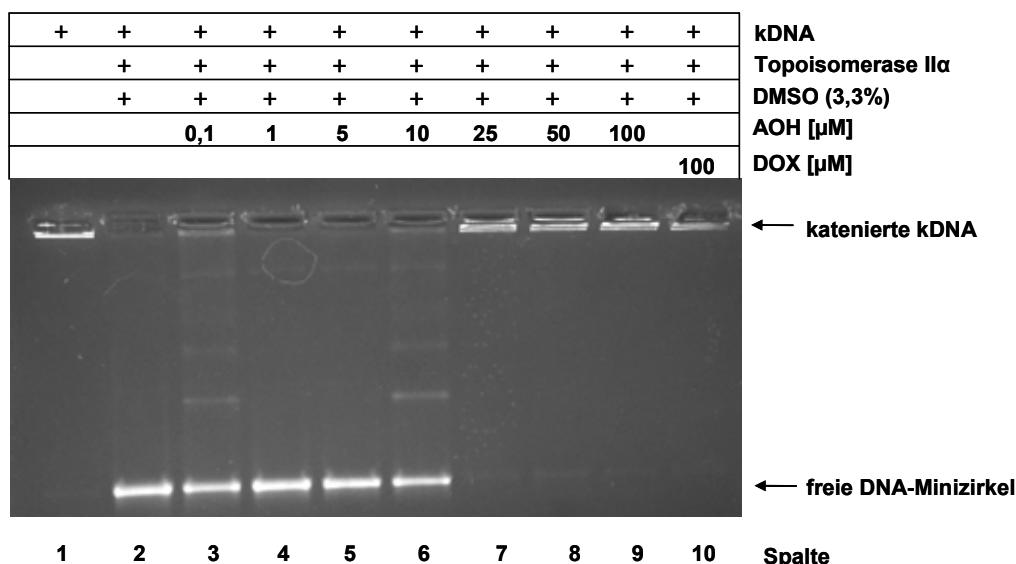


Abbildung 4-3: Katalytische Aktivitätsbestimmung der Topoisomerase II α mittels Dekatenierungsassay. Rekombinante Topoisomerase II α und kDNA wurden mit der Lösungsmittelkontrolle DMSO (Spalte 2), steigenden AOH-Konzentrationen (Spalte 3-9) und der Positivkontrolle DOX (Spalte 10) für 1 h behandelt. kDNA wurde ohne Substanz- und Enzymzugabe (Spalte 1) als Kontrolle mitgeführt. Dargestellt ist ein repräsentatives Agarosegel aus mind. drei unabhängigen Experimenten mit vergleichbarem Ergebnis.

Während die Lösungsmittelkontrolle DMSO (Spalte 2) und die AOH-Konzentrationen bis einschließlich 10 μM (Spalte 3-6) die Aktivität der humanen Topoisomerase II α nicht deutlich beeinträchtigen, wird die katalytische Aktivität des Enzyms ab 25 μM AOH (Spalte 7-9) vollständig gehemmt. Das Verbleiben der kDNA in der Geltasche, als Zeichen der katalytischen Aktivitätshemmung nach Substanzbehandlung, ist zudem für das Topoisomerase II-Gift DOX (Spalte 10) bei einer Konzentration von 100 μM gezeigt.

AME, das weder die humane DNA-Topoisomerase I noch die II β -Isoform bis zu einer Konzentration von 200 μM hemmt [Fehr et al., 2009], zeigt nach Inkubation mit der II α -Isoform ebenfalls eine vollständige Hemmung der katalytischen Aktivität ab 25 μM (Daten nicht gezeigt). AOH und AME hemmen somit in einer äquimolaren Konzentration die katalytische Aktivität der humanen DNA-Topoisomerase II α .

Im Vergleich zu humaner DNA-Topoisomerase I (Hemmung der katalytischen Aktivität des Enzyms: 50 μM AOH; AME keine Hemmwirkung \leq 200 μM) und zur II β -Isoform (Hemmkonzentration der katalytischen Aktivität des Enzyms: 150 μM AOH; AME keine Hemmwirkung \leq 200 μM) hemmen die beiden Mykotoxine die katalytische Aktivität der II α -Isoform in deutlich geringeren Konzentrationen, die somit ein relevantes Zielenzym darzustellen scheint.

Der scheinbare Unterschied zwischen AOH und AME bezüglich der II β -Isoform könnte jedoch darin begründet sein, dass AME in hohen Konzentrationen eine begrenzte Löslichkeit aufweist.

Woynarowski et al. [1989] postulieren, dass die kleine Furche der DNA eine wichtige Rolle in der Funktion der Topoisomerase II spielt. AOH verdrängt mit einem IC₅₀-Gehalt von 8 μM den Fluoreszenzfarbstoff Hoechst 33258 aus der kleinen Furche der DNA [Fehr et al., 2009] und liegt damit in einem vergleichbaren Konzentrationsbereich, in dem AOH die katalytische Aktivität der Topoisomerase II α hemmt. Aus diesem Grund ist anzunehmen, dass die Bindungsaffinität von AOH an die kleine Furche der DNA mit der Topoisomerase II α -Hemmung in Verbindung steht. Insgesamt kann gesagt werden, dass die beiden Mykotoxine AOH und AME eine Präferenz in ihrer Hemmwirkung auf die katalytische Aktivität der humanen DNA-Topoisomerase II α im zellfreien Testsystem aufweisen.

Derzeit sind wenige Topoisomerase II-Hemmstoffe bekannt, die die Hemmung einer Isoenzymform bevorzugt beeinflussen [Azarova et al., 2007].

Selektive Topoisomerase II β -Hemmstoffe sind beispielsweise das Phenanthridin Lycobetain [Barthelmes et al., 2001], das synthetische XK469 [Gao et al., 1999; Snapka et al., 2001] und das Bisdioxopiperazin ICRF-193 [Huang et al., 2001].

Seltener sind Topoisomerasehemmer mit einer Präferenz zur II α -Isoform. Ein Beispiel ist NK314, ein synthetisches Benzo[c]phenanthridinalkaloid [Guo et al., 2007; Toyoda et al., 2008], das eine starke antitumorale Wirkung besitzt [Onda et al., 2008]. Ein weiterer selektiver Topoisomerase II α -Hemmer stellt 3,3'-Diindolylmethan dar [Gong et al., 2006].

Die Tatsache, dass NK314 ein Topoisomerase II-Gift darstellt und 3,3'-Diindolylmethan zu den rein katalytischen Hemmstoffen zählt, zeigt, dass eine Präferenz zu einer Isoform der Topoisomerase II, unabhängig von der Art des Hemmmechanismus vorliegen kann. Daher sollte als nächstes der Wirkmechanismus der Hemmung von AOH bezüglich beider Topoisomerase II-Isoformen untersucht werden.

4.3. Wirkmechanismus der Topoisomerasehemmung

Anhand des Wirkmechanismus der Topoisomerasehemmung wird zwischen rein katalytischen Hemmstoffen und Topoisomerasegiften, die das kovalente Topoisomerase-DNA-Intermediat stabilisieren, unterschieden [Umemura et al., 2003].

Katalytische Hemmstoffe und Gifte wirken generell antagonistisch und können aufgrund ihrer zytotoxischen Kriterien unterschieden werden. Eine erhöhte Topoisomerase-Expression führt zu einer Hypersensitivität der Zellen gegenüber Topoisomerasegiften, jedoch zur Resistenz gegenüber katalytischen Hemmstoffen. Im Gegensatz dazu führt eine reduzierte Expression an Topoisomerasen zur Resistenz der Zellen gegenüber Topoisomerasegiften, jedoch zu einer Hypersensitivität gegenüber den katalytischen Hemmstoffen [Montecucco und Biamonti, 2007].

Abbildung 4-4 stellt die beiden Wirkmechanismen schematisch vereinfacht anhand der Topoisomerase I-Hemmung dar.

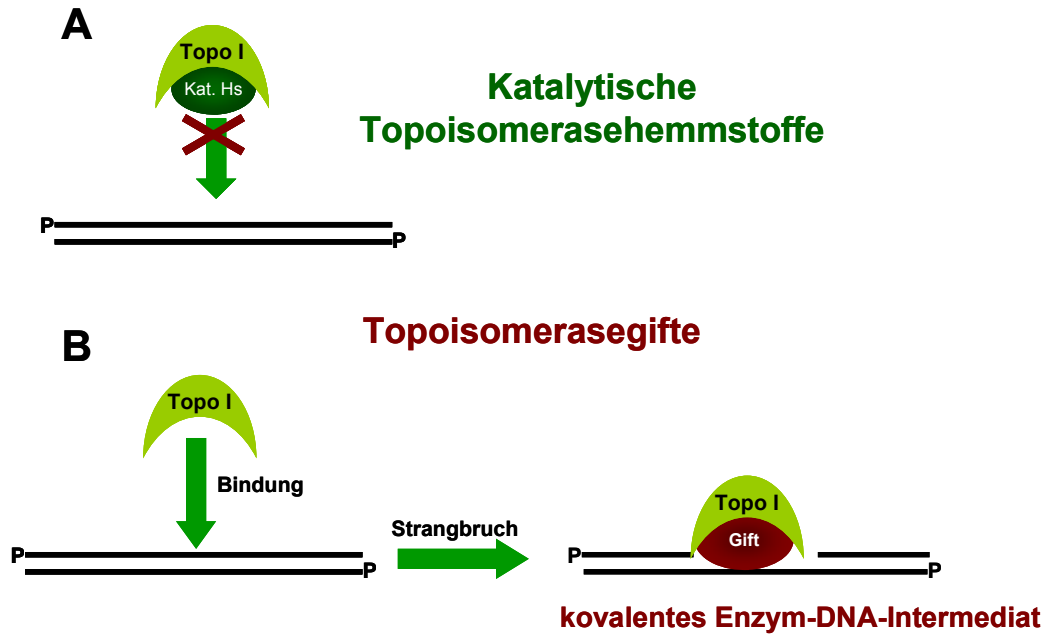


Abbildung 4-4: Schematische Unterteilung nach dem Wirkmechanismus von Topoisomerasehemmstoffen. (A) Mechanismus katalytischer Hemmstoffe (B) Mechanismus zur Stabilisierung des kovalenten Enzym-DNA-Intermediates durch Topoisomerasegifte. Topo I, Topoisomerase I; Kat. Hs, katalytischer Hemmstoff.

Wir konnten bereits in Vorarbeiten zeigen, dass AOH im zellfreien „Cleavage“-Assay das kovalente Topoisomerase I-DNA-Intermediat stabilisiert und somit als Topoisomerase I-Gift wirkt. Analog zum Konzentrationsbereich von AOH ($\geq 50 \mu\text{M}$), in dem eine katalytische Hemmung des Enzyms zu beobachten war, kam es zu einer Intensitätszunahme an offen zirkulärer Plasmid-DNA nach gelelektrophoretischer Auftrennung, was auf eine Giftung der Topoisomerase I hindeutet [Fehr et al., 2009].

4.3.1. Mechanismus der Hemmwirkung von AOH auf humane DNA-Topoisomerase II im zellfreien Testsystem

Da AOH die katalytische Aktivität beider Topoisomerase II-Isoformen hemmt, stand im Fokus des Interesses, ob AOH als rein katalytischer Hemmstoff agiert oder ein Topoisomerase II-Gift darstellt.

Eine Stabilisierung des Enzym-DNA-Intermediates aus rekombinanter humaner Topoisomerase II und pUC18 Plasmid-DNA nach Substanzbehandlung wurde mittels des „Cleavage“-II Assays untersucht. Durch die Inkubation der DNA mit einem Topoisomerase II-Gift erfolgt die Stabilisierung des kovalenten Enzym-DNA-

Komplexes im Zustand des DNA-Strangbruches. Ist katalytisch aktive Topoisomerase II als Homodimer vollständig an der DNA gebunden, liegt die Plasmid-DNA nach Proteinverdau als linearisierte Plasmid-DNA vor, während bei unvollständiger Bindung des Enzyms offen zirkuläre Plasmid-DNA entsteht. Abb. 4-5 zeigt ein repräsentatives Agarosegel des „Cleavage“-II Assays für humane DNA-Topoisomerase II α nach Inkubation mit der Lösungsmittelkontrolle DMSO, AOH bzw. dem Topoisomerase II-Gift Etoposid (ETO).

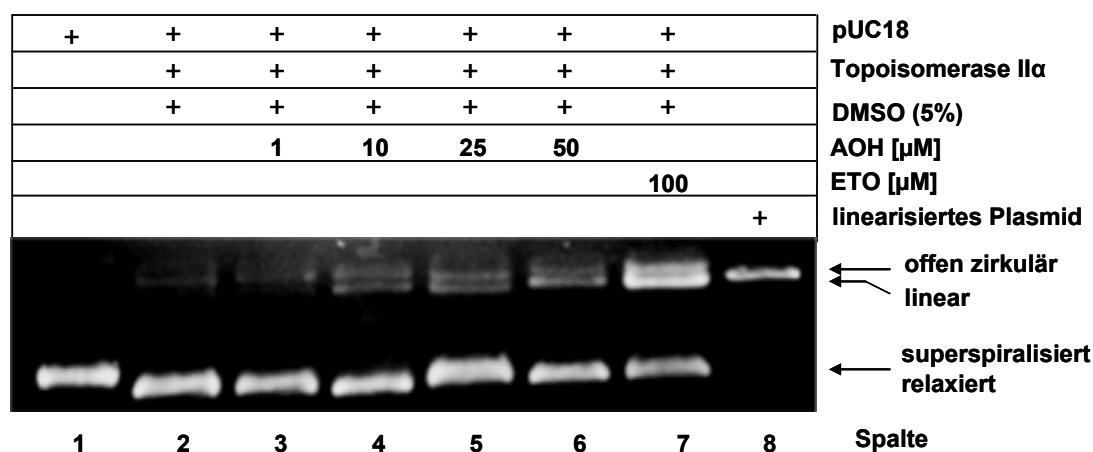


Abbildung 4-5: Detektion des Topoisomerase II α -DNA-Intermediates im „Cleavage“-II Assay. Superspiralisierte pUC18 Plasmid-DNA und rekombinante Topoisomerase II α wurden mit der Lösungsmittelkontrolle DMSO (Spalte 2), steigenden AOH-Konzentrationen (Spalte 3-6) und der Positivkontrolle ETO (Spalte 7) für 6 min behandelt. Das Plasmid pUC18 wurde ohne Substanz- und Enzymzugabe (Spalte 1) als Kontrolle mitgeführt. Linearisierte Plasmid-DNA (Spalte 8) wurde zusätzlich als Marker aufgetragen. Dargestellt ist ein repräsentatives Agarosegel aus drei unabhängigen Experimenten.

Unbehandelte pUC18 Plasmid-DNA (Spalte 1), die Lösungsmittelkontrolle DMSO (Spalte 2) und 1 μ M AOH (Spalte 3) zeigen nur die superspiralisierte bzw. relaxierte DNA-Bande, welche aufgrund der Bedingungen im „Cleavage“-II Assay nicht aufgetrennt werden. Ab 10 μ M AOH (Spalte 4-6) erscheinen DNA-Banden der offen zirkulären und linearisierten Plasmid-Formen, die mit steigender AOH-Konzentration an Intensität zunehmen. Eine intensive offen zirkuläre und linearisierte DNA-Bande ist bei der Positivkontrolle ETO (100 μ M) zu sehen. Linearisierte Plasmid-DNA (Spalte 8) wurde als Marker mitgeführt.

Damit lässt sich sagen, dass im zellfreien Testsystem die Aktivitätshemmung der humanen DNA-Topoisomerase II α durch AOH auf der Stabilisierung des kovalenten

Topoisomerase II α -DNA-Intermediates beruht und AOH daher möglicherweise zur Klasse der Topoisomerase II-Gifte zu zählen ist.

Basierend auf diesem Ergebnis sollte in weiterführenden Untersuchungen die mögliche Präferenz von AOH für die Topoisomerase II α in diesem Testsystem betrachtet werden. Daher wurde der Versuch analog mit rekombinanter humaner DNA-Topoisomerase II β durchgeführt.

Abbildung 4-6 zeigt ein repräsentatives Agarosegel eines „Cleavage“-II Assays für humane DNA-Topoisomerase II β nach Inkubation mit der Lösungsmittelkontrolle DMSO, AOH und ETO.

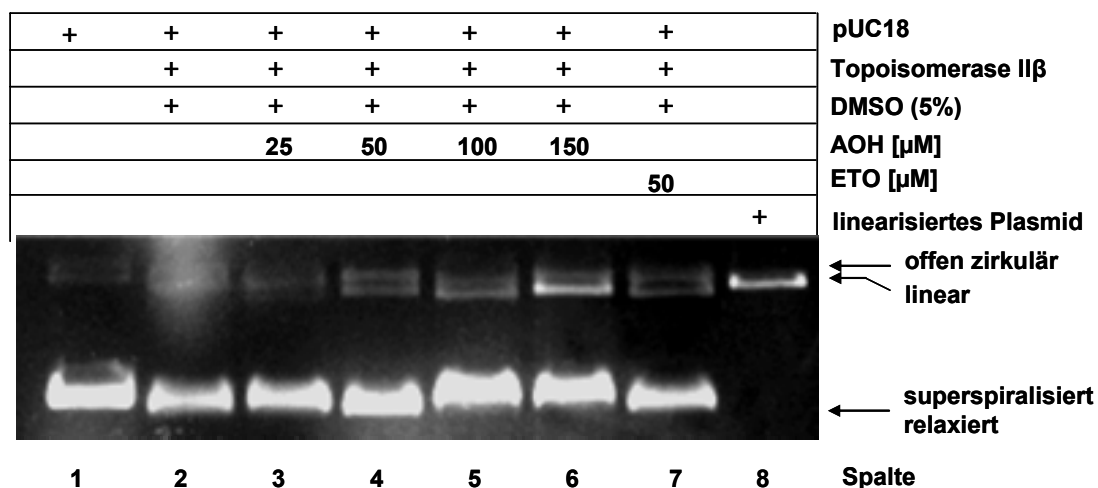


Abbildung 4-6: Detektion des Topoisomerase II β -DNA-Intermediates im „Cleavage“-II Assay. Superspiralisierte pUC18 Plasmid-DNA und rekombinante Topoisomerase II β wurden mit der Lösungsmittelkontrolle DMSO (Spalte 2), steigenden AOH-Konzentrationen (Spalte 3-6) und der Positivkontrolle ETO (Spalte 7) für 6 min behandelt. Das Plasmid pUC18 wurde ohne Substanz- und Enzymzugabe (Spalte 1) als Kontrolle mitgeführt. Linearisierte Plasmid-DNA (Spalte 8) wurde zusätzlich als Marker aufgetragen. Dargestellt ist ein repräsentatives Agarosegel aus drei unabhängigen Experimenten.

Während unbehandelte pUC18 Plasmid-DNA (Spalte 1), die Lösungsmittelkontrolle DMSO (Spalte 2) und 25 μ M AOH (Spalte 3) deutlich die superspiralisierte bzw. relaxierte DNA-Bande zeigen, sind die offen zirkulären und linearisierten DNA-Banden marginal zu erkennen, was an einer möglichen Degradation der eingesetzten Plasmid-DNA liegen könnte. Ab 50 μ M AOH (Spalte 4-6) bzw. 50 μ M ETO (Spalte 7) erscheinen deutlich die DNA-Banden für die offen zirkuläre und

linearisierte Plasmid-Form, die mit steigender AOH-Konzentration an Intensität zunehmen.

Die schwache Intensität der relevanten DNA-Banden bei der Positivkontrolle ETO zeigt, dass der „Cleavage“-II Assay für eine qualitative Auswertung der Fragestellung ausreicht, jedoch für eine absolute Quantifizierung der Hemmwirkung ungeeignet ist. Dennoch deuten die Ergebnisse darauf hin, dass AOH im zellfreien Testsystem die Stabilisierung des kovalenten Topoisomerase II-DNA-Komplexes bevorzugt mit der II α -Isoform bewirkt, was die im Dekatenierungsassay beobachtete Präferenz AOHs in Hinblick auf die Hemmung der Enzymaktivität bekräftigt.

Insgesamt ist die Hemmwirkung von AOH im „Cleavage“-II Assay (II α -Isoform: 10 μ M, II β -Isoform: 50 μ M) bei beiden Topoisomerase II-Isoenzymen in geringeren Konzentrationen erkennbar als im Dekatenierungsassay (II α -Isoform: 25 μ M, II β -Isoform: 150 μ M). Dies erscheint jedoch verständlich, da im Dekatenierungsassay die komplette Hemmung der katalytischen Aktivität der Topoisomerase II detektiert wird, während im „Cleavage“-II Assay die stabilisierten Topoisomerase II-DNA-Intermediate gemessen werden. In Anwesenheit genügend freier Topoisomerase II kann, trotz der Stabilisierung einiger Enzym-DNA-Komplexe, die katalytische Aktivität des Enzyms nicht bzw. nur marginal beeinflusst sein.

So ist bekannt, dass das starke Topoisomerase II-Gift ETO [Hande, 1998] lediglich einen geringen Effekt auf die katalytische Aktivität der Topoisomerase II ausübt [Jiménez-Alonso et al., 2008].

Der Begriff Topoisomerasegift impliziert, dass diese Verbindung mit dem Enzym auf eine Weise interagiert, die das Enzym in ein zelluläres Gift konvertiert [Bodley und Liu, 1988]. Somit wird die frühere Definition einer reinen „klassischen“ Stabilisierung des ternären kovalenten Topoisomerase-DNA-Intermediates mit den so genannten „Clamp“-Giften erweitert [Roca et al., 1994]. Diese verschließen während des Vorgangs der DNA-Strangdurchführung den N-terminalen Durchlass der Topoisomerase II und bilden dabei eine „Proteinklemme“, wobei die DNA vom Enzym umgeben wird [Wang, 2002].

Damit erfolgt eine klare Abgrenzung zu den reinen katalytischen Hemmstoffen [Hajji et al., 2003], die nicht zwangsläufig zu zellulären Schäden führen [Andoh und Ishida, 1998].

Wie schwer dennoch die Unterscheidung zwischen Topoisomerasegiften und reinen katalytischen Hemmstoffen fällt, zeigt das Beispiel ICRF-193. Diese Verbindung galt lange Zeit als katalytischer Hemmstoff [Hasinoff et al., 1995]. Der Hemmmechanismus von ICRF-193 beruht auf der Bindung und dem damit einhergehenden Verschluss des Enzyms in der Formation der geschlossenen „Klammer“. Diese Blockierung erfolgt, nachdem das erste ADP freigelassen und das zweite ATP hydrolysiert wurde und damit der resultierende Komplex eine offene ATP-Bindungsstelle aufweist [Morris et al., 2000].

Huang et al. [2001] zeigten, dass zur Detektion der Topoisomerase II-Giftung durch ICRF-193 ein starkes Denaturierungsreagenz benötigt wird. Es wird vermutet, dass bei häufig verwendeten Detergenzien wie SDS es nicht sofort zur Denaturierung kommt. Damit kann es zur Freisetzung von Verbindungen aus dem ternären Topoisomerase-DNA-Komplex kommen, bevor das Enzym vollständig inaktiviert ist, was dazu führen könnte, dass das immer noch aktive Enzym die DNA-Strangbrüche religiert, bevor es vollständig denaturiert ist. Das Loslösen eines Topoisomerasegiftes vom ternären Komplex während der Bindung des ersten Detergenzmoleküls hängt dabei stark von der jeweiligen Substanz und seinen spezifischen Interaktionen mit dem Enzym und/oder der DNA ab.

Die antitumorale Eigenschaft der auf Topoisomerase II-Giftung basierender Chemotherapeutika wird derzeit primär mit der II α -Isoform assoziiert [Azarova et al., 2007]. Dagegen scheint Topoisomerase II β in die Nebenwirkungen diverser Chemotherapien involviert zu sein, wie die Bildung Therapie-abhängiger Leukämien oder die Kardiotoxizität von Doxorubicin [Lyu et al., 2007]. Anhand dieser Erkenntnisse scheint eine Produktion neuer Chemotherapeutika, die als selektive Topoisomerase II α -Gifte wirken, viel versprechend zu sein, wobei durchaus denkbar wäre, dass AOH für solch eine Entwicklung als Leitstruktur dienen könnte.

Jedoch führt eine durch Lebensmittelkontamination mit dem Mykotoxin AOH einhergehende Giftung der Topoisomerase II zu unerwünschten DNA-Schäden und einer erhöhten Mutagenität.

4.3.2. Mechanismus der Topoisomerasehemmung durch AOH und AME in A431-Zellen

Da die bisherigen Experimente zur Interaktion von AOH und AME mit humanen DNA-Topoisomerasen in zellfreien Versuchen durchgeführt wurden, galt weiterhin die Frage zu klären, ob die Toxine auch humane Topoisomerasen in intakten Zellen in ihrer katalytischen Aktivität beeinflussen.

Als Testsystem wurde die humane Vulvakarzinomzelllinie A431 gewählt, da diese Zellen humane Topoisomerasen stark überexprimieren [Meyer et al., 1997]. Da Karzinomzelllinien untereinander große Unterschiede in Morphologie und Stoffwechsel aufweisen und die Kultivierung biologische Eigenschaften beeinflussen kann, sollten zunächst die A431-Zellen nach Behandlung mit AOH und AME auf wichtige toxikologische Endpunkte untersucht werden.

4.3.2.1. Zytotoxisches Potential von AOH und AME in A431-Zellen

Zytotoxische Effekte beeinflussen und modulieren häufig Ergebnisse im Zellsystem. Deshalb stellt das Zellwachstum nach Behandlung mit den Mykotoxinen einen wichtigen Parameter in der gewählten A431-Zelllinie dar.

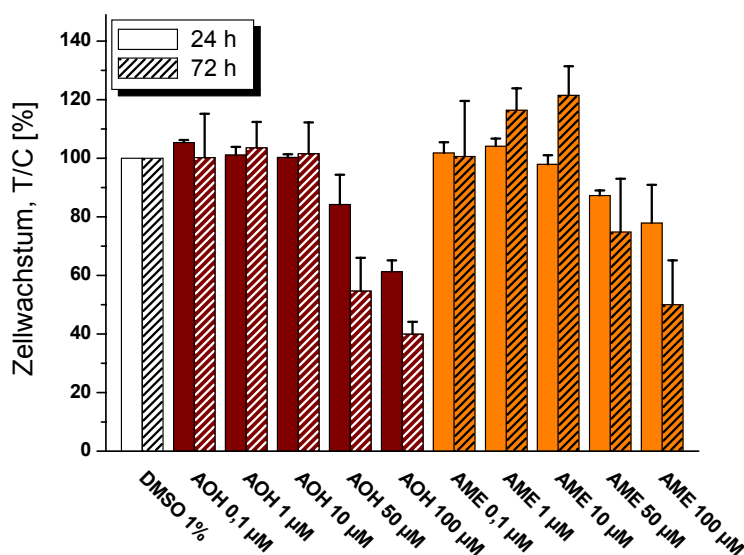


Abbildung 4-7: Einfluss von AOH und AME auf das Wachstum von A431-Zellen mittels SRB Assay. Die unschraffierten Balken stellen die 24 h Inkubation dar, während die schraffierten Balken die gemessenen Werte nach 72 h Substanzbehandlung in serumhaltigem Kulturmedium zeigen. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte \pm SD von mind. vier unabhängigen Experimenten.

Im Sulforhodamin B (SRB) Assay zeigen AOH und AME im Konzentrationsbereich von 0,1 μM bis 10 μM nach 24 h und 72 h serumhaltiger Inkubation mit A431-Zellen keine wachstumshemmenden Effekte (Abbildung 4-7). Nach 72 h scheint es insbesondere bis 10 μM AME zu einer konzentrationsabhängigen Zunahme des Gesamtproteins und somit möglicherweise zu einem Wachstumsstimulus zu kommen.

Dabei könnte die Induktion von oxidativem Stress durch die beiden Mykotoxine (siehe Kapitel 4.5) eine Rolle spielen. So ist bekannt, dass es bei einer moderaten Bildung von ROS zu einem Zellzyklusarrest kommen kann, während geringe Mengen an ROS zur Stimulierung der Zellproliferation führen können [Kamata und Hirata, 1999].

Eine Hemmwirkung auf das Wachstum der A431-Zellen beginnt bei AOH und AME ab 50 μM und nimmt konzentrationsabhängig zu. Nach 24 h Inkubation konnten keine IC_{50} -Werte ermittelt werden, da das Zellwachstum in der höchsten gemessenen AOH-Konzentration noch ca. 60% und in der höchsten AME-Konzentration noch ca. 80% im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle DMSO beträgt. Aufgrund der limitierten Löslichkeit von AOH und insbesondere AME waren höhere Konzentrationen nicht einsetzbar. Der ermittelte IC_{50} -Wert nach 72 h Substanzbehandlung lag für AOH bei $76 \pm 20 \mu\text{M}$ und der IC_{50} -Wert von AME bei $100 \pm 1 \mu\text{M}$. Damit hemmte AOH das Wachstum von A431-Zellen nach den getesteten Inkubationszeiten potenter als AME.

Ein vergleichbares Ergebnis wurde ebenfalls in HT29-Zellen beobachtet, wo der IC_{50} -Wert nach 72 h AOH-Behandlung bei $42 \pm 10 \mu\text{M}$ lag, während AME bis 100 μM keine 50%-ige Wachstumshemmung zeigte [Fehr, 2006].

Eine Hemmung des Zellwachstums nach Substanzbehandlung kann von vielen Faktoren, wie der Verdopplungszeit, zytotoxischen Effekten, dem Status des Zellzyklus sowie der Apoptoseinduktion beeinflusst werden, was eine distinkte Aussagekraft des Versuches einschränkt. Beispielsweise können Topoisomerase II-Gifte den Zellzyklus arretieren [Clifford et al., 2003], wobei das zytotoxische Potential dieser Substanzklasse auf der Generierung von DNA-Strangbrüchen beruht [Caldecott et al., 1990]. Jedoch ist der Hauptanteil Topoisomerase II-vermittelter DNA-Schäden reversibel [Hsiang und Liu, 1989], wobei die Kollision mit Transkriptionsmaschinerien der Zelle zur Konvertierung in irreversible DNA-

Doppelstrangbrüche führt [D'Arpa et al., 1990; Wu und Liu, 1997], was letztendlich zur Apoptoseinduktion führen kann [Pommier und Marchand, 2005]. AOH und AME generieren als Topoisomerase II-Gifte (siehe Kapitel 4.3.2.4) DNA-Doppelstrangbrüche (siehe Kapitel 4.3.3). Des Weiteren führt AOH zu einem Zellzyklusarrest [Lehmann et al., 2006] und ist in der Lage Apoptose zu induzieren [Budde, 2009]. Damit scheint die wachstumshemmende Wirkung der beiden Mykotoxine von vielerlei Faktoren abzuhängen.

Dennoch bleibt festzuhalten, dass AOH und AME erst in relativ hohen Substanzkonzentrationen ($> 10 \mu\text{M}$) in der Zelllinie A431 zu wachstumshemmenden Effekten führen.

Eine mögliche Interaktion der beiden Mykotoxine mit Topoisomerasen sollte nach einer Kurzzeitinkubation untersucht werden, da zum einen etwaige Effekte bereits nach kurzer Zeit auftreten und zum anderen bei Kurzzeitinkubationen Nebeneffekte wie der Fremdstoffmetabolismus eine untergeordnete Rolle spielen.

Daher wurde das zytotoxische Potential von AOH und AME nach 1 h mittels Laktatdehydrogenase (LDH) Assay („Cytotoxicity Detection Kit“ [LDH], Roche Applied Science) in A431- und, dazu vergleichend, in HT29-Zellen untersucht.

Im LDH Assay wird die Membranintegrität untersucht, da ihre Beschädigung ein morphologisches Charakteristikum der Zellnekrose darstellt. Als Positivkontrolle wurde der Kulturüberstand von Zellen verwendet, die durch Behandlung mit Triton X-100 in die Nekrose geführt wurden. Triton X-100 ist ein mildes und relativ schwach denaturierendes Detergenz, das Proteine aus der Membran lösen kann und dabei die Enzymfunktion aufrecht erhält [Wang et al., 2008]. Diese Positivkontrolle wird auf 100% Zytotoxizität normiert und die Proben darauf bezogen (Handbuch des „Cytotoxicity Detection Kit“ [LDH], Roche Applied Science).

In A431- und HT29-Zellen sind im Konzentrationsbereich von $0,1 \mu\text{M}$ bis $50 \mu\text{M}$ AOH und AME nach einstündiger serumfreier Inkubation keine bis marginale zytotoxische Effekte zu beobachten (Daten nicht gezeigt). Die höchste gemessene Zytotoxizität liegt bei etwa 10% im Vergleich zur Positivkontrolle nach Inkubation mit $50 \mu\text{M}$ AME in HT29-Zellen. Dies zeigt, dass die beiden Mykotoxine ein geringes zytotoxisches Potential aufweisen [Fehr et al., 2009].

Des Weiteren wurde ergänzend zur DNA-strangbrechenden Wirkung von AOH und AME in A431-Zellen mittels Comet Assay (siehe Abschnitt 4.3.2.2), die Zellviabilität nach Substanzbehandlung im Trypanblau-Ausschlussverfahren überprüft. Dabei lagen die Viabilitäten bei allen Proben über 80%, was starke zytotoxische Effekte der Mykotoxine nach 1 h Inkubation in diesem Zellsystem ausschließt.

Collins [2004] beschreibt jedoch, dass der Trypanblau-Test nicht die Zellviabilität misst, sondern lediglich auf die Membranintegrität hindeutet. So können sich Zellen mit beschädigter Membran, die im Trypanblau Ausschlussverfahren positiv reagieren, erholen und überleben. Schlussfolgernd können damit die Viabilitäten höher liegen, als im Trypanblau-Test gemessen wird.

Insgesamt kann gesagt werden, dass sowohl AOH als auch AME ein geringes zytotoxisches Potential in A431-Zellen aufweisen.

4.3.2.2. Genotoxisches Potential von AOH und AME in A431-Zellen

AOH und AME führen in niedrigen mikromolaren Konzentrationen zu einer signifikanten Erhöhung der DNA-Strangbruchrate nach 1 h Inkubation von HT29-Zellen [Fehr et al., 2009]. Diese DNA-strangbrechende Wirkung der Mykotoxine sollte nun auch in A431-Zellen mittels Comet Assay untersucht werden. Des Weiteren wurden die Proben mit dem Enzym Formamidopyrimidin-DNA-Glykosylase (Fpg) behandelt, welches oxidative DNA-Modifikationen, basierend auf Fpg-sensitiven-Stellen, erkennt. Diese oxidativen DNA-Schäden werden ausgeschnitten und in DNA-Einzelstrangbrüche konvertiert, die bei der Detektion miterfasst werden. Damit erhöht sich aufgrund oxidativer DNA-Schädigung die Schweifintensität Fpg-behandelter Proben im Vergleich zu den Fpg-unbehandelten Proben [Speit et al., 2004]. Abbildung 4-8 zeigt die resultierenden DNA-Schäden nach einstündiger serumfreier Inkubation von A431-Zellen mit der Lösungsmittelkontrolle DMSO, AOH, AME und der Positivkontrolle MEN.

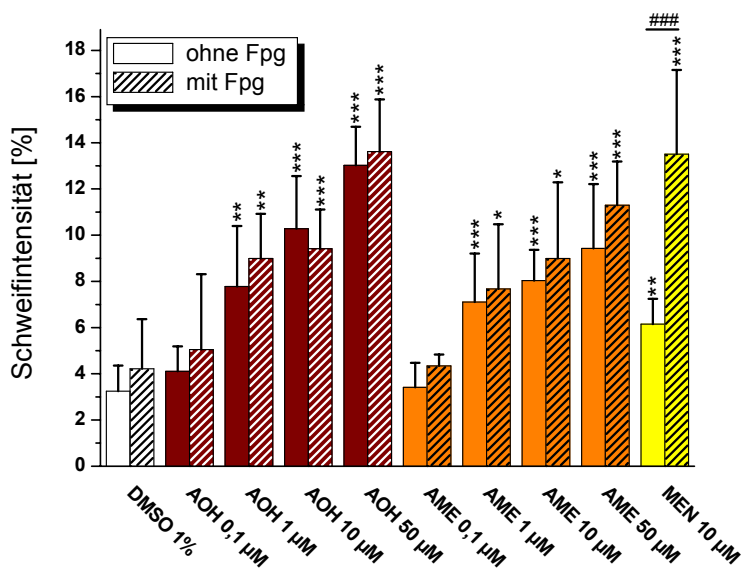


Abbildung 4-8: DNA-strangbrechende Wirkung von AOH und AME nach 1 h serumfreier Inkubation mit A431-Zellen mittels alkalischem Comet Assay. Die unschraffierten Balken repräsentieren die Fpg-unbehandelten Proben, während die schraffierten Balken die Fpg-behandelten Proben darstellen. Als Positivkontrolle dient der „Redoxcyclus“ MEN. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte \pm SD von mind. vier unabhängigen Experimenten. Signifikante Unterschiede wurden mittels Student's *t*-Test berechnet. Dabei beziehen sich die Sterne auf die jeweilige Lösungsmittelkontrolle, während die Rauten signifikante Unterschiede aufgrund der Fpg-Behandlung darstellen (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; ***, ### = $p < 0,001$).

AOH und AME führen zu einer konzentrationsabhängigen Erhöhung der DNA-Strangbruchrate in A431-Zellen nach 1 h Inkubation. Beide Toxine zeigen bereits ab einer Konzentration von 1 μ M einen signifikanten Unterschied zur DMSO-Lösungsmittelkontrolle. Im Gegensatz zum bekannten „Redoxcyclus“ MEN, der eine Erhöhung der DNA-Strangbruchrate bei den Fpg-behandelten Proben im Vergleich zu den Fpg-unbehandelten Proben aufweist, zeigen AOH und AME in allen getesteten Substanzkonzentrationen keinen signifikanten Unterschied. Damit lässt sich sagen, dass beide Toxine keine detektierbaren oxidativen DNA-Schäden, basierend auf Fpg-sensitiven-Stellen verursachen. Dieses Ergebnis wurde ebenfalls in der humanen Kolonkarzinomzelllinie HT29 detektiert [Fehr et al., 2009]. Da das Ergebnis der Fpg-Behandlung für die Untersuchung zum Wirkmechanismus der Topoisomerasehemmung in der Zelle nicht unmittelbar relevant ist, wird auf dieses Ergebnis unter Kapitel 4.7.4.2 näher eingegangen.

Es ist anzumerken, dass im Vergleich zur HT29-Zelllinie die resultierenden DNA-Schäden nach 1 h Inkubation mit AOH und AME in A431-Zellen deutlich stärker

ausgeprägt sind. Die höchste DNA-strangbrechende Wirkung (13%) wird in A431-Zellen durch 50 μ M AOH erreicht, während dieselbe AOH-Konzentration in HT29-Zellen zu einer Schweifintensität von etwa 5% führt [Fehr et al., 2009].

Da DNA-Strangbrüche häufig mit der Enzymklasse der Topoisomerasen in Zusammenhang gebracht werden [Salti et al., 2000; Godard et al., 2002] und A431-Zellen humane Topoisomerasen überexprimieren [Meyer et al., 1997], wäre denkbar, dass diese Zelllinie besonders sensitiv gegenüber Topoisomerasegiften reagiert und dies zu einer erhöhten DNA-Schädigung führt.

Eine Diskrepanz der gemessenen Schweifintensitäten zwischen verschiedenen Zelllinien ist nicht außergewöhnlich. So schlagen Liao et al. [2009] vor, anhand der DNA-Migrationsintensität der Proben, die optimalen Volt-/Ampere-Einstellungen während der Elektrophorese zu kalibrieren, um in einen bestimmten Bereich an Schweifintensität zu gelangen. Um eine valide Vergleichbarkeit der Zelllinien hinsichtlich der DNA-Schädigung nach Mykotoxinbehandlung untereinander zu gewährleisten, wurden in der vorliegenden Dissertationsarbeit mit allen verwendeten Zelllinien identische Elektrophoresebedingungen gewählt.

Die Exposition mit DNA-schädigenden Agenzien führt zu Wachstumsarresten während des Zellzyklus, um die Replikation geschädigter DNA zu vermeiden [Bozko et al., 2002]. Ein Zellzyklusarrest durch AOH konnte bereits von Lehmann et al. [2006] in Ishikawa- (humane endometriale Adenokarzinomzelllinie) und in V79-Zellen (Hamster-Lungenfibroblasten) festgestellt werden. Dabei wurde ein Arrest der Zellen durch AOH in der G₂/M- und/oder in der S-Phase des Zellzyklus beobachtet, was häufig als Antwort eukaryotischer Zellen auf eine genotoxische Schädigung resultiert. Die Entstehung von DNA-Strangbrüchen bewirkt einen Stimulus für die Expression und die nukleäre Akkumulation des Tumorsuppressorproteins p53 dar [Nelson und Kastan, 1994]. Ein Verlust oder Veränderungen der Expression bzw. der Aktivität von p53 werden in einer Vielzahl an humanen Tumoren beobachtet [Yee und Vousden, 2005]. Hochhauser et al. [1999] vermuten, dass p53 die Expression von Topoisomerase II erhöht, da für die Reparatur der DNA-Schäden die katalytische Aktivität des Enzyms benötigt wird. Zudem ist bekannt, dass Topoisomerase II-Gifte zur Stabilisierung von p53 führen [Karpinich et al., 2002], da die Stabilisierung des kovalenten Enzym-DNA-Intermediates eine Gefahr für die Integrität des Genoms darstellt [Li und Liu, 2001]. Aufgrund dieser Tatsachen kann vermutet werden, dass

p53 eine Rolle bei der Zellantwort gegenüber der beiden Topoisomerase II-Gifte AOH und AME einnimmt.

Ganapathi et al. [2002] berichten von einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B nach DNA-Schäden, die durch Topoisomerasegifte vermittelt sind und postulieren weiter, dass die antiapoptotische Funktion von aktiviertem NF- κ B einen wichtigen Mechanismus zur Resistenz gegenüber DNA-schädigenden Agenzien darstellt. Daneben berichten Campbell et al. [2006], dass Doxorubicin NF- κ B durch die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) aktiviert. Da AOH und AME ROS bilden (siehe Kapitel 4.5.1), könnte NF- κ B ebenfalls an der Zellantwort gegenüber der beiden Mykotoxine beteiligt sein.

Die vielen Möglichkeiten der Zelle anhand ihres individuellen Expressionsmusters, auf die Bedrohung durch die Toxine zu reagieren, zeigen deutlich, dass die Wahl der Zelllinie in Bezug auf die Fragestellung einen entscheidenden Faktor darstellt.

Insgesamt bleibt festzuhalten, dass für die geplante Untersuchung zum Wirkmechanismus der Topoisomerasehemmung durch AOH und AME die Zelllinie A431 keine ausgeprägte Resistenz bzw. Sensitivität gegenüber AOH und AME aufweist und damit geeignet erscheint.

4.3.2.3. Nachweis der Topoisomerasegiftung durch AOH in A431-Zellen

Wie bereits der Name „Immunoband Depletion“ Assay andeutet, liegt dem Experiment das Prinzip zugrunde, dass bei einer Topoisomerasegiftung freie ungebundene Enzyme bei der immunochemischen Detektion depletiert sind, da nach Behandlung mit Topoisomerasegiften das Protein, durch Stabilisierung des kovalenten Enzym-DNA-Komplexes, kovalent an der DNA gebunden vorliegt. Aufgrund seiner Größe ist dieser Komplex nicht in der Lage in ein Polyacrylamidgel zu migrieren.

Kommt es zu keiner Topoisomerasegiftung, wie bei Behandlung mit rein katalytischen Topoisomerasehemmstoffen, läuft das Enzym bei der SDS-Gelelektrophorese ins Gel und kann nach Western Blot und anschließender Behandlung mit spezifischen Antikörpern gegen Topoisomeraseproteine, detektiert werden.

Die Proteinbanden der DNA-Topoisomerase I konnten in den durchgeführten Versuchen nach einstündiger serumfreier Inkubation mit der Lösungsmittelkontrolle DMSO, AOH, sowie dem Topoisomerase I-Gift Camptothecin (CPT) [Hsiang et al., 1985] zum Teil nur sehr schwach detektiert werden, was eine Aussage über einen möglichen Einfluss AOHs auf humane Topoisomerase I in diesem Testsystem nicht zulässt (Daten nicht gezeigt).

Die Ergebnisse bezüglich der Topoisomerase II-Isoenzyme nach einstündiger serumfreier Inkubation von A431-Zellen mit AOH sind in Abb. 4-9 zusammengefasst.

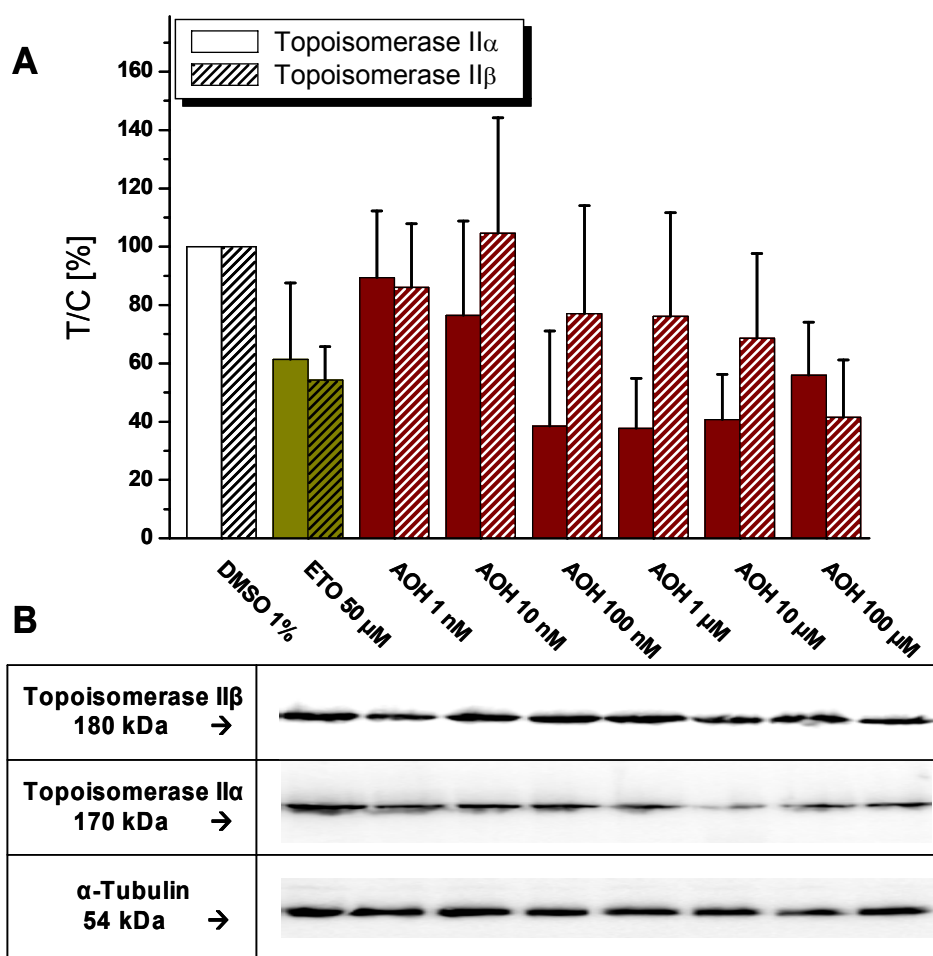


Abbildung 4-9: Untersuchung zum Wirkmechanismus der Topoisomerasehemmung mittels „Immunoband Depletion“ Assay. Dargestellt sind die Ergebnisse nach einstündiger serumfreier Inkubation der Lösungsmittelkontrolle DMSO, AOH und dem Topoisomerase II-Gift ETO in A431-Zellen. (A) Zusammenfassung der T/C-Werte bezogen auf die Lösungsmittelkontrolle DMSO. Unschraffierte Balken stehen für die Inkubationen mit Topoisomerase II α , schraffierte Balken für die Inkubation mit Topoisomerase II β . (B) Repräsentative Membranausschnitte nach Inkubation mit DMSO, AOH und der Positivkontrolle ETO aus mindestens fünf unabhängigen Experimenten mit vergleichbarem Ergebnis.

Ab 100 nM AOH reduziert sich die Proteinbande für die Topoisomerase II α -Isoform, erreicht ein Maximum der Hemmwirkung bei 1 μ M und nimmt in den nächst höheren AOH-Konzentrationen (10 μ M und 100 μ M) wieder zu.

Dagegen zeigt Topoisomerase II β ab 100 nM AOH eine konzentrationsabhängige Verringerung an freiem Protein, die bei 100 μ M AOH ihr Maximum im untersuchten Konzentrationsbereich erfährt.

Die Behandlung von A431-Zellen mit 50 μ M ETO zeigt eine deutliche Reduktion der beiden Topoisomerase II-Isoformen im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle DMSO. Diese Verminderung der Proteinbande erfolgt bei beiden Isoformen in ähnlichem Ausmaß, was mit Daten aus der Literatur übereinstimmt, die zeigen dass ETO keine Präferenz zu einer Isoform aufweist [Errington et al., 1999; Das et al., 2007].

Anhand der Ergebnisse gibt es erste Anzeichen dafür, dass AOH als Topoisomerase II-Gift in der intakten Zelle wirkt. Topoisomerase II-Gifte sind dafür bekannt einen G₂/M-Zellzyklusarrest zu verursachen [Clifford et al., 2003]. Somit korreliert die Stabilisierung des kovalenten Topoisomerase II-DNA-Intermediates mit der Induktion eines Zellzyklusarrestes in der G₂/M-Phase durch AOH [Lehmann et al., 2006].

Weiterhin bleibt festzuhalten, dass im Konzentrationsbereich von 100 nM bis 10 μ M AOH die II α -Isoform stärker depletiert wurde als die II β -Isoform, was für eine Präferenz von AOH zur Topoisomerase II α spricht. Eine mögliche Erklärung für die fehlende Konzentrationsabhängigkeit bei der II α -Isoform könnte am schnell induzierten „Turnover“ des Enzyms liegen, da als mögliche Reaktion auf höhere AOH-Konzentrationen die Menge an Topoisomerase II α -Protein erhöht wird. Dies könnte zum einen durch eine Erhöhung der *de novo* Synthese des Enzyms [Williams et al., 2007], als auch der Reduzierung des proteasomalen Abbaus [Congdon et al., 2008] erfolgen. Da die Proteinexpression erfahrungsgemäß Zeit benötigt, kann vermutet werden, dass nach der einstündigen Inkubationsdauer die Modulation des proteasomalen Abbaus eine entscheidende Rolle für die Enzymregulation nach AOH-Behandlung spielt.

Vor einem Abbau im Proteasom wird das Zielprotein mit Ubiquitin markiert [Agostinho et al., 2008], woraufhin die ubiquitinylierten Proteine durch ein ATP-abhängiges Proteasom erkannt und in kleinere Peptide abgebaut werden. Dabei wird Topoisomerase II α vermutlich am aminoterminalen Ende ubiquitinyliert [Nakajima et al., 1997]. In MCF-7-Zellen *in situ* beträgt die Halbwertszeit von Topoisomerase II α

6,6 ± 0,3 h bzw. die von Topoisomerase II β 17,6 ± 2,3 h. Die Analyse der Halbwertszeit von Topoisomerase II α und II β in MCF-7-Zellen macht deutlich, dass DNA-Topoisomerase II α einen nahezu dreimal so schnellen „Turnover“ hat als die β -Isoform [Salmena et al., 2001].

Aus der Literatur ist zudem bekannt, dass einige Topoisomerase II-Gifte ihre Fähigkeit zur Stabilisierung des kovalenten Enzym-DNA-Intermediates in höheren Konzentrationen selbst hemmen können [Capranico et al., 1990; Zwelling et al., 1991], was aufgrund der bisherigen Datenlage auch für AOH nicht ausgeschlossen werden kann.

AOH benötigt in der intakten Zelle geringere Konzentrationen für eine Hemmwirkung als in den zellfreien Testsystemen (Dekatenierungsassay (siehe 4.2) und „Cleavage“-II Assay (siehe 4.3.1)). Ein direkter Vergleich der Testsysteme zur Topoisomerasehemmung ist jedoch nicht möglich, da im „Immunoband Depletion“ Assay die Menge an freier ungebundener Topoisomerase II gemessen wird, während im Dekatenierungsassay die katalytische Aktivitätshemmung des Enzyms als Endpunkt dient und im „Cleavage“-II Assay, Strangbrüche in der Plasmid DNA, basierend auf dem stabilisierten Enzym-DNA-Intermediat, bestimmt werden. Aufgrund der unterschiedlichen Endpunkte können die Wirkkonzentrationen von AOH nicht direkt miteinander verglichen werden.

Ein Unterschied zwischen zellfreiem System und Zelle erscheint plausibel, da Topoisomerase an Protein-gebundener DNA in der Zelle ein anderes Spektrum an katalytischer Aktivität aufweist als an isolierter DNA [Darcy et al., 2008].

Des Weiteren bleibt festzuhalten, dass es sich beim „Immunoband Depletion“ Assay um keinen direkten Nachweis für eine potentielle Topoisomerasegiftung handelt, da die eigentliche Stabilisierung des kovalenten Enzym-DNA-Komplexes nicht detektiert wird und die Messung eines freien Proteins in der Zelle durch weitere Faktoren beeinflusst werden kann. Somit ist die Interpretation des Gehaltes an freier Topoisomerase II α , die proliferationsabhängig exprimiert wird [Hsiang et al., 1988] und deshalb zellulären Schwankungen, neben der eigentlichen Enzymgiftung, ausgesetzt ist, erschwert. Die Expression an Topoisomerase II α steigt in der späten S-Phase, erreicht das Maximum in der G₂/M-Phase und sinkt, während die Zellen die Mitose vervollständigen [Austin et al., 1995].

Weiterhin spricht für eine Topoisomerase II-Giftung durch AOH, dass die Konzentrationen zur Verringerung der Enzymmenge im Versuch im gleichen Konzentrationsbereich erfolgt, die im Comet Assay zu einer signifikanten Erhöhung der DNA-Strangbruchrate führt (siehe Abschnitt 4.3.2.2). Reine katalytische Hemmstoffe der Topoisomerase führen zumeist erst in höheren Konzentrationen zu DNA-Schäden, wie das Beispiel Delphinidin, einem katalytischen Topoisomerase-hemmstoff, zeigt [Esselen et al., 2009].

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass im Rahmen dieser Arbeit der „Immunoband Depletion“ Assay mit der humanen Vulvakarzinomzelllinie A431 mit den DNA-Topoisomerase II-Isoenzymen erfolgreich im Arbeitskreis etabliert werden konnte und die Verminderung an freier Topoisomerase II darauf hindeutet, dass AOH im zellulären Testsystem als Topoisomerase II-Gift wirkt.

4.3.2.4. Detektion kovalenter DNA-Topoisomerase-Intermediate in A431-Zellen

Während im „Immunoband Depletion“ Assay als Endpunkt der Gehalt an freier ungebundener Topoisomerase bestimmt wird, bietet der „*In vivo* Complex of Enzyme“ (ICE) Assay die Möglichkeit, das stabilisierte Topoisomerase-DNA-Intermediat direkt zu detektieren.

Nach Inkubation der A431-Zellen mit den Testsubstanzen werden die Zellen mit Sarkosylat lysiert. Die Auftrennung der Zellbestandteile erfolgt durch Ultrazentrifugation im Cäsiumchlorid-Dichtegradienten und anschließender Fraktionierung. Kovalent an die DNA gebundenes Enzym befindet sich in den DNA haltigen Fraktionen, die aufgrund ihrer hohen Dichte relativ weit unten im Gradienten verbleibt, während freie Topoisomerasen aufgrund ihrer geringen Größe in den oberen Fraktionen zu finden ist. Zwanzig Fraktionen werden von unten abgenommen und mittels Slot-Blot auf eine Nitrozellulosemembran übertragen, die nach Behandlung mit spezifischen Topoisomeraseantikörpern immunochemisch detektiert werden kann.

Der DNA-Gehalt in den einzelnen Fraktionen wird mit dem Nanodrop®-Spektrophotometer (siehe 6.2) ermittelt, wobei der höchste DNA-Gehalt in den Fraktionen 4-9 zu finden war.

Zunächst wurde im ICE Assay die Wirkung von AOH und AME nach einstündiger serumfreier Inkubation auf die Topoisomerase I in A431-Zellen untersucht. Als Positivkontrolle diente das Topoisomerase I-Gift CPT. Abbildung 4-10 zeigt den Zusammenschnitt von Membranen, die mit AOH- und CPT-behandelten Proben beladen wurde.

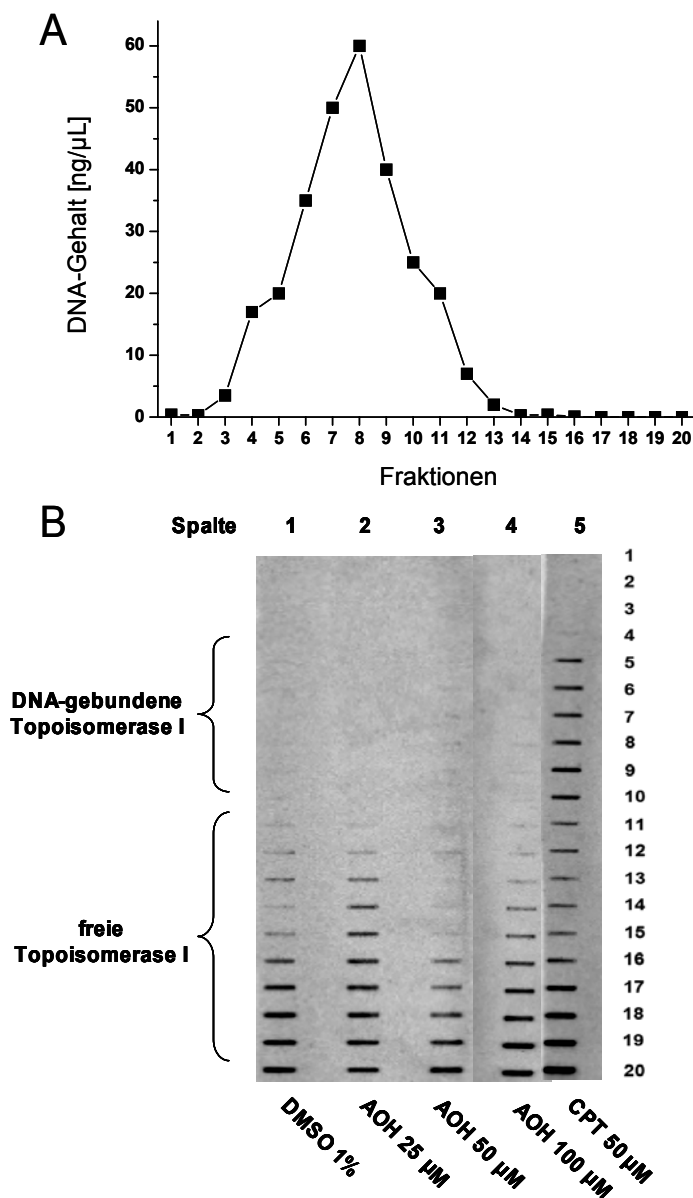


Abbildung 4-10: Detektion von Topoisomerase I-DNA-Intermediaten mittels ICE Assay (in Zusammenarbeit mit S. Bächler, Wissenschaftliche Abschlussarbeit, 2008). Dargestellt sind die Ergebnisse nach einstündiger serumfreier Inkubation von A431-Zellen mit der Lösungsmittelkontrolle DMSO, AOH und dem Topoisomerase I-Gift CPT. **(A)** Typischer DNA-Verlauf der erhaltenen Fraktionen. **(B)** Repräsentative Membranen aus drei unabhängigen Experimenten mit vergleichbarem Ergebnis.

Auf den Membranen ist zu sehen, dass die Lösungsmittelkontrolle DMSO und verschiedene AOH-Konzentrationen (25, 50, 100 μM) deutliche Proteinbanden in den Fraktionen aufweist, in denen sich freie ungebundene Topoisomerase I befindet. Dagegen sind in den DNA-Fraktionen, in denen DNA-gebundene Topoisomerase I sein sollte, keine Proteinbanden zu erkennen.

Mit CPT behandelte Proben zeigen deutliche Proteinbanden in den Fraktionen 4-20, wodurch DNA-gebundene Topoisomerase I detektiert wird.

AME führt ebenfalls zu keiner Stabilisierung des kovalenten Topoisomerase I-DNA-Intermediates (Daten nicht gezeigt) und wirkt damit in der intakten Zelle, in Analogie zu AOH, nicht als Topoisomerase I-Gift.

Da im zellfreien „Cleavage“-I Assay durch AOH ab einer Konzentration von 50 μM offen zirkuläre Plasmid DNA entsteht [Fehr et al., 2009], was für eine Stabilisierung des Topoisomerase I-DNA-Komplexes spricht [Carey et al., 2003], steht das Ergebnis des ICE Assays mit dem Resultat im „Cleavage“-I Assay im Widerspruch.

Jedoch existieren aufgrund zellulärer Abwehrmechanismen und Biotransformationsvorgänge, in der Zelle häufig große Unterschiede zwischen zellfreiem Testsystem und der Untersuchung in der Zelle.

So ist bekannt, dass Substanzen, die im zellfreien System als Topoisomerase I-Gifte wirken, nicht zwangsläufig diesen Wirkmechanismus in der Zelle aufweisen, wie beispielsweise die Flavonoide Genistein und Luteolin [López-Lázaro et al., 2007].

Eine Wirkung von AOH im zellfreien Testsystem und das Fehlen dieses Effektes in der Zelle konnte ebenfalls von Aly et al. [2008] beobachtet werden. Während AOH im zellfreien Testsystem die Proteinkinasen Aurora B, FLT3, IGF1-R und VEGF-R2 hemmte, konnte diese Hemmung im zellulären Testsystem nicht bestätigt werden.

Die Diskrepanz zwischen der Wirkung AOHs im Zellsystem und im zellfreien Testsystem könnte in der Wechselwirkung des Mykotoxins mit der DNA begründet sein. AOH bindet an die DNA von humanem fetalem Ösophagusepithel [Liu et al., 1992] und zeigt im niederen mikromolaren Konzentrationsbereich eine Bindungsaffinität zur kleinen Furche der DNA [Fehr et al., 2009], was darauf hindeutet, dass AOH zur heterogenen Gruppe der Liganden der kleinen Furche der DNA zu zählen ist.

Zwar wird postuliert, dass die Interaktion zwischen DNA und Liganden der kleinen Furche der DNA von genereller Bedeutung für die Giftung der Topoisomerase I ist

[Pilch et al., 1997], jedoch bleibt zu sagen, dass ein Unterschied zwischen der hochkondensierten DNA im Zellkern zur Kalbsthymus-DNA und pUC18 Plasmid-DNA besteht, was diesen Unterschied erklären könnte.

Eine direkte Interaktion zwischen AOH und der DNA sollte im zellfreien Testsystem ausgeprägter sein und damit könnte AOH im zellfreien Testsystem eher in der Lage sein, die DNA in ihrer Struktur zu verändern. Modulierte DNA-Strukturen wären ihrerseits in der Lage katalytisch aktive Topoisomerase I an der DNA zu binden, was den Vorgang einer Stabilisierung im zellfreien Testsystem erklären könnte.

Damit einhergehend sind in der Literatur verschiedene DNA-Modifikationen beschrieben, die das Intermediat aus Topoisomerase I und DNA stabilisieren können. Publierte Beispiele sind oxidierte Basen (z.B. 8-Oxo-Guanin) [Pourquier et al., 1999], abasische Stellen, DNA-Fehlpaarungen [Pourquier et al., 1997a] und DNA-Strangbrüche [Pourquier et al., 1997b].

Diese DNA-Modifikationen sollten in der Zelle schnell und effizient repariert werden, wobei unterschiedliche DNA-Reparaturmechanismen in der intakten Zelle zur Verfügung stehen, die diese strukturellen Unregelmäßigkeiten beheben können [Wallace, 1998] und somit eine potentielle Topoisomerase I-Giftung verhindern.

Als mögliche Reparaturantwort Topoisomerase I-vermittelter DNA-Schäden wird eine Ubiquitin/26S Proteasom-abhängige Degradation des Enzyms beschrieben [Desai et al., 1997; Desai et al., 2001]. Weiterhin berichten Mao et al. [2000a] von einer Konjugation der Topoisomerase I mit SUMO-1, einem Ubiquitin-ähnlichen Protein, wobei die aminoterminalen Region des Enzyms die Hauptstelle für eine Sumoylierung darstellt [Rallabhandi et al., 2002]. Während bisher davon ausgegangen wurde, dass die Sumoylierung der Topoisomerase I und der Topoisomerase II [Mao et al., 2000b] den Abbau des Enzyms einleiten, scheint daneben die Konjugation mit SUMO in die DNA-Reparatur involviert zu sein [Bergink und Jentsch, 2009]. So werden beispielsweise neben den DNA-Topoisomerasen, auch DNA-Reparaturproteine, wie Ku70 [Zhao und Blobel, 2005] und PCNA [Hoege et al., 2002] mit einer Modifikation durch SUMO beschrieben.

Neben dem proteasomalen Abbau postulieren Pommier et al. [2003], dass bei der Reparatur Topoisomerase I-vermittelter DNA-Schäden mehrere Signalwege beteiligt sind. Das Entfernen der Topoisomerase I-DNA-Addukte kann durch mehrere Signalwege bewirkt werden, darunter auch der TDP1-Signalweg [Malik und Nitiss,

2004; Connelly und Leach, 2004]. Daneben wurden weitere Endonuklease-abhängige Signalwege, wie der Rad1/Rad10-, der Mre11/Rad50 und der Mus81/Mms4-Signalweg identifiziert [Deng et al., 2005].

Weiterhin können durch Topoisomerase I-Giftung entstehende DNA-Strangbrüche durch mindestens vier weitere Signalwege repariert werden. Das sind zum einen die Basen-Exzisionsreparatur (BER), die DNA-Doppelstrangbruchreparatursignalwege „Non Homologous End Joining“ (NHEJ) und homologe Rekombination (HR), und der RecQ Helikase/Top3 Signalweg [Pommier et al., 2003].

Christmann et al. [2008] konnten zudem zeigen, dass die Werner Syndrom Helikase/3'-Exonuklease (WRN), bei der Reparatur Topoisomerase I-, jedoch nicht Topoisomerase II-vermittelter DNA-Schäden, beteiligt ist. WRN, ein Mitglied der RecQ DNA Helikase-Familie, besitzt eine DNA-Helikase und eine Exonuklease Aktivität und ist darüber hinaus an der DNA-Reparatur und der Replikationsmaschinerie beteiligt. Es wird vermutet, dass WRN vor Topoisomerase I-Hemmstoffen schützt, indem die Umwandlung von DNA-Einzelstrangbrüchen in DNA-Doppelstrangbrüche verhindert wird.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass AOH und AME in A431-Zellen im verwendeten Testsystem nicht das kovalente Topoisomerase I-DNA-Intermediat stabilisieren und somit unter den beschriebenen Bedingungen nicht als Topoisomerase I-Gifte wirken.

Der Einfluss der beiden *Alternaria*-Toxine AOH und AME in A431-Zellen auf humane Topoisomerase II-Isoenzyme nach einstündiger serumfreier Inkubation, gemessen mittels ICE Assay, ist in Abbildung 4-11 dargestellt.

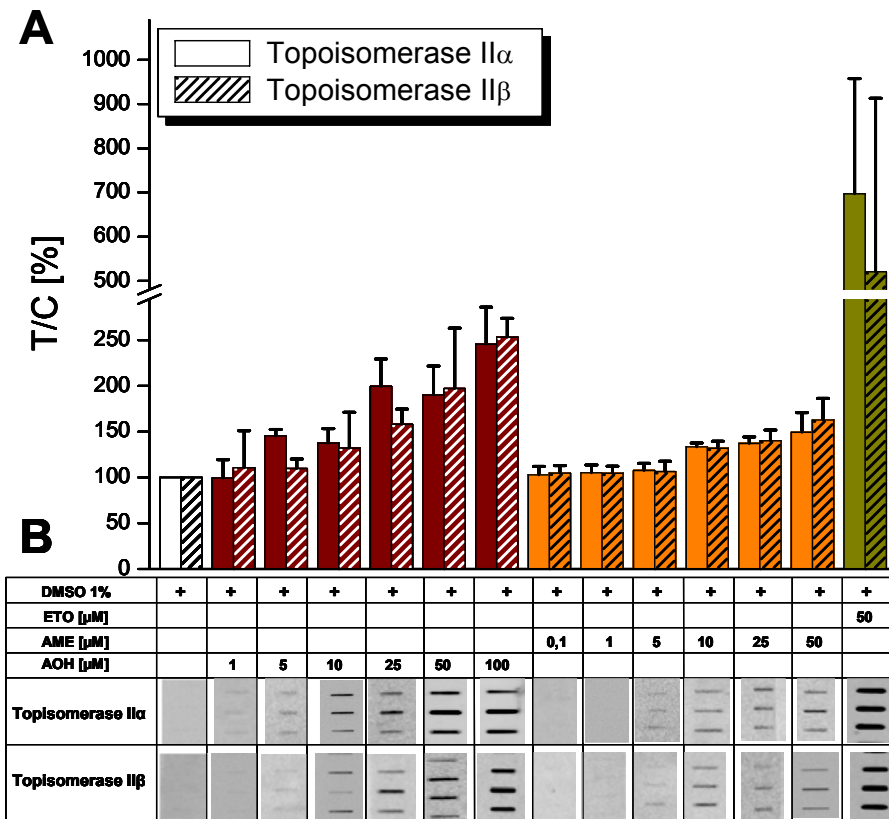


Abbildung 4-11: Detektion von Topoisomerase II-DNA-Intermediaten mittels ICE Assay (in Zusammenarbeit mit S. Bächler, Wissenschaftliche Abschlussarbeit, 2008). Dargestellt sind die Ergebnisse nach einstündiger serumfreier Inkubation von AOH, AME und dem Topoisomerase II-Gift ETO in A431-Zellen. **(A)** Zusammenfassung der T/C-Werte bezogen auf die Lösungsmittelkontrolle DMSO. Unschraffierte Balken stehen für die Detektion von Topoisomerase II α , schraffierte Balken für die Inkubation mit Topoisomerase II β . **(B)** Repräsentative DNA-haltige Fraktionen für die Inkubation von A431-Zellen mit AOH, AME und der Positivkontrolle ETO aus mindestens drei unabhängigen Experimenten mit vergleichbarem Ergebnis.

AOH und AME führen bei beiden Topoisomerase II-Isoformen α und β zu einer konzentrationsabhängigen Erhöhung an Enzym-DNA-Komplexen. AOH zeigt im Konzentrationsbereich 5-25 μM eine schwache Präferenz zur II α -Isoform, die in höheren Konzentrationen nicht mehr gegeben ist, was bereits im „Immunoband Depletion“ Assay beobachtet werden konnte (siehe Kapitel 4.3.2.3). AME zeigt dagegen keinerlei selektive Hemmwirkung gegenüber einer Topoisomerase II-Isoform.

Die Erhöhung der Intermediatmenge aus Topoisomerase II und DNA ist bei 50 μM AOH um das 2-fache erhöht, während 50 μM AME etwa den Faktor 1,5-fach aufweist. Damit scheint AOH das stärkere Topoisomerase II-Gift darzustellen.

Verglichen mit der Positivkontrolle ETO (50 μM), die zu einer Erhöhung der Topoisomerase II-DNA-Intermediate über den Faktor 5 führt, erscheinen jedoch beide Mykotoxine als eher schwache Topoisomerase II-Gifte.

Diese starke Giftwirkung der Positivkontrolle könnte an der langen Persistenz des durch ETO stabilisierten „Cleavage“-Komplexes liegen. So zeigten Bandele und Osheroff [2008b], dass die induzierte Stabilisierung von ETO eine deutlich längere Persistenz aufweist verglichen mit Genistein, einem weiteren Topoisomerase II-Gift.

Des Weiteren stabilisiert ETO das kovalente Topoisomerase II-DNA-Intermediat bezogen auf die beiden Isoformen in vergleichbarem Ausmaß, was mit dem Ergebnis im „Immunoband Depletion“ Assay (siehe Abschnitt 4.3.2.3) und mit Literaturwerten [Willmore et al., 1998] übereinstimmt.

Die Präferenz von AOH zur $\text{II}\alpha$ -Isoform ist in der intakten Zelle deutlich schwächer ausgeprägt als in den zellfreien Testsystemen (siehe Kapitel 4.2 und 4.3). Eine mögliche Erklärung beinhaltet die Tatsache, dass in der Zelle etliche Faktoren die Expression der Topoisomerase II-Isoenzymen beeinflussen.

Einen entscheidenden Faktor für die Expression der Topoisomerase II stellt der Proliferationsstatus der Zelle und damit der Status des Zellzyklus dar [Sullivan et al., 1986; Zwelling et al., 1987]. So konnten Estey et al. [1987] zeigen, dass die Anzahl an Topoisomerase II-DNA-Komplexen in synchronisierten HeLa-Zellen bei der Mitose 4-15 mal höher lag als in der S-Phase, während die Anzahl dieser Intermediate in der G_1 - und G_2 - Phase im Bereich dazwischen war. Dabei variierte besonders die Menge an Topoisomerase $\text{II}\alpha$, die Zellzyklus-abhängig exprimiert wird, während die Expression der Topoisomerase $\text{II}\beta$ unabhängig vom Wachstumsstatus ist [Kimura et al., 1994]. Um die Präferenz einer Verbindung in der intakten Zelle zu beurteilen, muss daher die Zellzyklusverteilung mitbeachtet werden. So bewirkt beispielsweise eine Erhöhung der Zellpopulation in der G_1 -Phase eine Erniedrigung der Transkript- und Proteinmenge an Topoisomerase $\text{II}\alpha$, während Topoisomerase I und $\text{II}\beta$ wenig beeinflusst werden [Kang und Chung, 2002]. Eine erniedrigte Gentranskription und die damit verbundene Proteinexpression können ebenfalls aus einer Serumreduktion [Kim et al., 1999] oder einem Wachstumsarrest, aufgrund einer zu hohen Zelldichte, resultieren [Isaacs et al., 1996]. Dabei scheint der Einfluss auf Topoisomerase II-Proteine in verschiedenen transformierten Zellen zu variieren

[Hsiang et al., 1988]. Da Kurzzeitinkubationen mit den Mykotoxinen stets in serumfreiem Medium durchgeführt wurden, kann nicht ausgeschlossen werden, dass diese Serumreduktion die Expression der II α -Isoform beeinflusst haben könnte.

Neben der verminderten Gentranskription kann eine reduzierte Translation die Menge an Topoisomerase II α -Protein senken [Kang und Chung, 2002], während eine Erhöhung der Ubiquitinylierung zu einem schnelleren Abbau des Topoisomerase II α -Proteins führt [Nakajima et al., 1996]. Dabei erfolgt der Abbau beider Topoisomerase II-Isoformen anhand des Proteasoms [Zhang et al., 2006].

Daneben beschreiben Kimura et al. [1996] eine spezifische Phosphorylierung der Topoisomerase II in der M-Phase des Zellzyklus in HeLa-Zellen. Dabei hatte die II α -Isoform eine Halbwertszeit von etwa 25 h und die phosphorylierte Form des Enzyms etwa 20 h. Jedoch wurden 35% der Topoisomerase II α innerhalb von 4 h beim Übergang der M-Phase zur G₁-Phase abgebaut, was auf eine schnelle Degradation dieses Isoenzym in dieser Periode des Zellzyklus hindeutet. Topoisomerase II β war beständig mit einer Halbwertszeit von mehr als 40 h und stabil während des Übergangs von der M-Phase in die G₁-Phase. Im Gegensatz dazu war die phosphorylierte Form der II β -Isoform unbeständig mit einer Halbwertszeit von 13 h.

Zusammengefasst ist eine potentielle Präferenz der beiden Mykotoxine AOH und AME gegenüber einer Topoisomerase II-Isoform in der intakten Zelle schwer zu beurteilen, da Faktoren wie der Zellzyklusstatus, der Proteinumsatz oder Protein-Modifikationen die Interaktion zwischen Mykotoxin und Topoisomerase aktiv beeinflussen können.

Die Ergebnisse zur Interaktion der Mykotoxine AOH und AME mit humanen Topoisomerasen vom Typ II zeigen zwischen den unterschiedlichen Testsystemen Diskrepanzen, insbesondere zwischen den zellfreien Testsystemen und der intakten Zelle. Dabei scheinen die Toxine im Zellsystem potenter zu wirken.

Zur Sensitivität von Zellen gegenüber Topoisomerase II-Hemmstoffen können etliche Faktoren beitragen [Froelich-Ammon et al., 1995]. Beispiele sind der Fremdstoff-metabolismus, die zelluläre Aufnahme, die subzelluläre Verteilung oder der Efflux.

Da AOH und AME oxidativ metabolisiert werden [Pfeiffer et al., 2007b], wäre eine metabolische Aktivierung denkbar. Häufig werden Verbindungen durch Metabolismusvorgänge zur eigentlichen Wirksubstanz umgesetzt.

DNA-Topoisomerase II reagiert sensitiv auf Thiol-reaktive Agenzien [Hassinoff et al., 2006]. Dazu vermuten Wu et al. [2007], dass Cysteinreste die potentiellen Ziele für die Topoisomerase II-Hemmung darstellen. Topoisomerase II-Gifte können in zwei Gruppen unterteilt werden [Lindsey et al., 2005]. Die Gifte der ersten Gruppe wirken mittels des „traditionellen“ redox-unabhängigen Mechanismus. Diese Verbindungen interagieren mit Topoisomerase II an der Protein-DNA Grenzfläche in einer nichtkovalenten Weise [McClendon und Osheroff, 2007]. Topoisomerase II-Gifte der zweiten Klasse reagieren redoxabhängig und bilden kovalente Addukte mit dem Enzym [Bender et al., 2006]. Mitglieder dieser Gruppe sind Substanzen mit Chinonstruktur, wie 1,4 Benzochinon [Lindsey et al., 2004], N-Acetyl-p-benzochinon [Bender et al., 2004] und Metabolite von polychlorierten Biphenylchinonen [Srinivasan et al., 2002]. Es wird vermutet, dass Chinone zur Giftung der Topoisomerase II das N-terminale Tor des Enzyms blockieren [Bender und Osheroff, 2007]. Zudem sind auch Naturstoffe bekannt, die als redoxabhängige Topoisomerase II-Gifte wirken, wie z. B. (-)Epigallocatechingallat [Bandeled und Osheroff, 2008a] oder botanische Alkylhydrochinone, die aus verschiedenen Pflanzen isoliert wurden [Huang et al., 2008].

Der Mechanismus der Topoisomerase II-Giftung kann durch geringe strukturelle Unterschiede variieren, wie das Beispiel der beiden Flavonole Quercetin und Myricetin zeigt (Abbildung 4-12). Während Quercetin als traditionelles Topoisomerase II-Gift wirkt, agiert Myricetin als traditionelles und auch als redoxabhängiges Topoisomerase II-Gift [Bandeled et al., 2008].

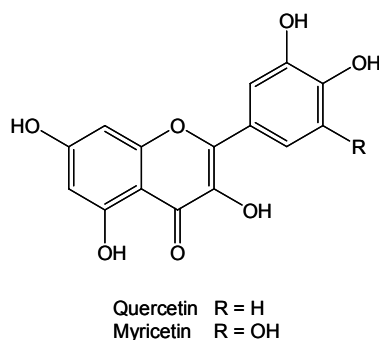


Abbildung 4-12: Struktur der Flavonole Quercetin und Myricetin.

AOH und AME bilden im oxidativen Fremdstoffmetabolismus Metabolite mit Katechol- und Hydrochinonstruktur, die ihrerseits zu reaktiven Semichinonen und Chinonen reagieren können [Pfeiffer et al., 2007b]. Daher wäre es möglich, dass durch diese Metabolite, die Topoisomerasegiftung im Vergleich zu AOH und AME verstärkt werden könnte.

Ein Beispiel für eine metabolische Aktivierung zur verstärkten Topoisomerasegiftung stellt das Epipodophyllotoxin ETO (4'-Demethyl-Epipodophyllotoxin-9-(4,6-O-Ethyliden-β-D-glucopyranosid)) dar [Mans et al., 1992]. ETO besteht aus einem polyzyklischen Ringsystem, einem glykosidischen Rest an der C4-Position und einem angehängten E-Ring an der C1-Position (Abbildung 4-13).

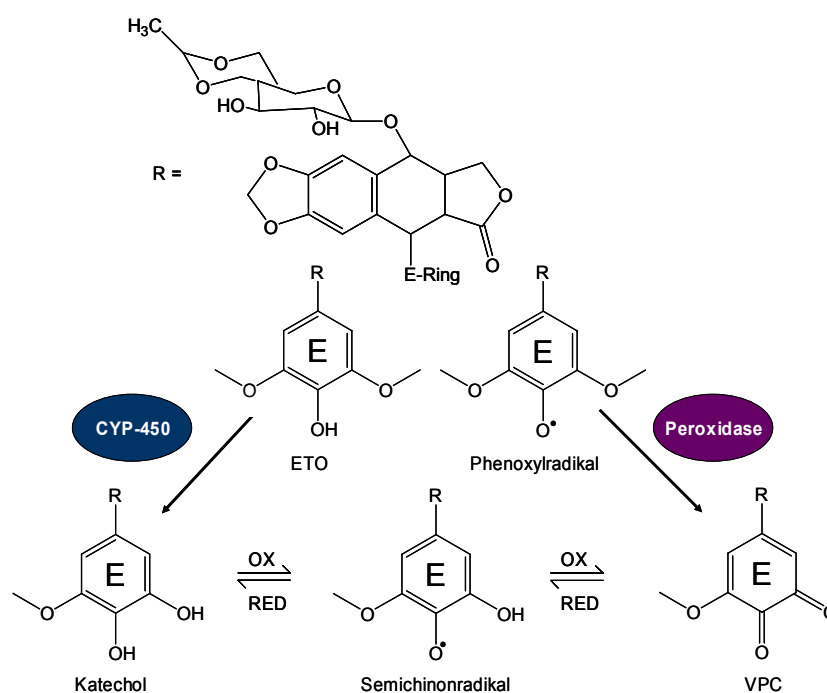


Abbildung 4-13: Oxido-Reduktive Hauptwege der metabolischen Umwandlung von ETO. ETO, Etoposid, VPC, ETO ortho-Chinon-Derivat; CYP-450, Cytochrom-P450 abhängige Monooxygenasen; OX, Oxidation; RED, Reduktion [nach Gantchev und Hunting, 1998].

Die Metabolisierung von ETO erfolgt über zwei Hauptwege, zum einen anhand der O-Demethylierung, katalysiert durch Cytochrom-P450 abhängige Monooxygenasen [van Maanen et al., 1987] und zum anderen durch Peroxidasen-vermittelte Oxidationen [Haim et al., 1986]. Diese enzymatischen Transformationen können zu diversen Produkten führen, wobei das Hauptprodukt VPC (abgeleitet aus dem klinischen Namen von ETO: VP-16 ortho Chinon) darstellt. VPC stellt einen stärkeren Hemmstoff als ETO dar und stabilisiert das Topoisomerase II-DNA-Intermediat vor

der Durchführung des DNA-Stranges [Gantchev und Hunting, 1998], während ETO den Komplex vor und nach der DNA-Strang-Passage stabilisiert [Robinson und Osheroﬀ, 1991]. Das zytotoxische Potential von VPC könnte zusätzlich aus der Umwandlung zum toxischen Semichinonradikal resultieren [Kalyanaraman et al., 1987]. VPC kann daneben direkt DNA-Schäden induzieren [Mans et al., 1991], wobei Glutathion (GSH) einen Schutz vor VPC bietet [Mans et al., 1992].

Eine weitere Möglichkeit für die stärkere Wirkung in der Zelle wäre, dass die Mykotoxine weitere biologische Effekte intrazellulär induzieren können, die ihrerseits in der Lage sind die Wirkung der Topoisomerase II-Giftung zu verstärken, wie beispielsweise die Induktion von oxidativem Stress [Lu et al., 2005]. Im Falle von oxidativem Stress können reaktive Spezies wie H_2O_2 entstehen, die das Topoisomerase-DNA-Intermediat direkt stabilisieren können und so als Topoisomerase I-Gift [Daroui et al., 2004] bzw. Topoisomerase II-Gift wirken [Cai et al., 2008]. Daneben sind in der Literatur Substanzen beschrieben, die erst durch die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) in der Lage sind das Topoisomerase-DNA-Intermediat zu stabilisieren, wie Staurosporin [Sordett et al., 2004] und Plumbagin [Kawiak et al., 2007].

Weiterhin können vermehrte Topoisomerase II-DNA-Komplexe durch DNA-Läsionen in physiologischen Systemen entstehen [Vélez-Cruz et al., 2005]. Dabei wird vermutet, dass DNA-Läsionen die Interaktion mit Topoisomerasen durch Änderung der DNA-Doppelhelixstruktur in der Schnittstelle des Enzyms beeinflussen [Cline et al., 1999]. Abasische DNA-Stellen können beispielsweise endogene Topoisomerase II-Gifte darstellen [Kingma et al., 1995]. Dabei können apurine DNA-Stellen [Kingma und Osheroﬀ, 1997a] und apyrimidinische DNA-Stellen [Kingma und Osheroﬀ, 1997b], sowie desaminierte Cytosinreste [Kingma et al., 1997] zu einer Giftung der Topoisomerase II führen. Ebenso können Modifikationen der Desoxyribose in der DNA die Funktion der Topoisomerase II verändern [Cline und Osheroﬀ, 1999].

Im Konzentrationsbereich der Topoisomerase II-Giftung durch AOH und AME sind ebenfalls DNA-Schäden zu erkennen (siehe Kapitel 4.3.2.2). Daher wäre es durchaus möglich, dass die AOH- und AME-vermittelten DNA-Schäden zu einer verstärkten Stabilisierung der Topoisomerase II-DNA-Intermediate beitragen.

DNA-Läsionen, wie oxidierte und alkylierte DNA-Basen, die einen geringen Einfluss auf Topoisomerase II haben, können durch die Basen-Exzisionsreparatur [Izumi et al., 2003] in abasische DNA-Stellen umgewandelt werden, die ihrerseits mit dem Enzym interagieren können. Damit führen DNA-Läsionen indirekt zu einer Giftung der Topoisomerase II [Sabourin und Osheroff, 2000]. Möglichkeiten zur Induktion einer Topoisomerase II-Giftung sind in Abbildung 4-14 dargestellt.

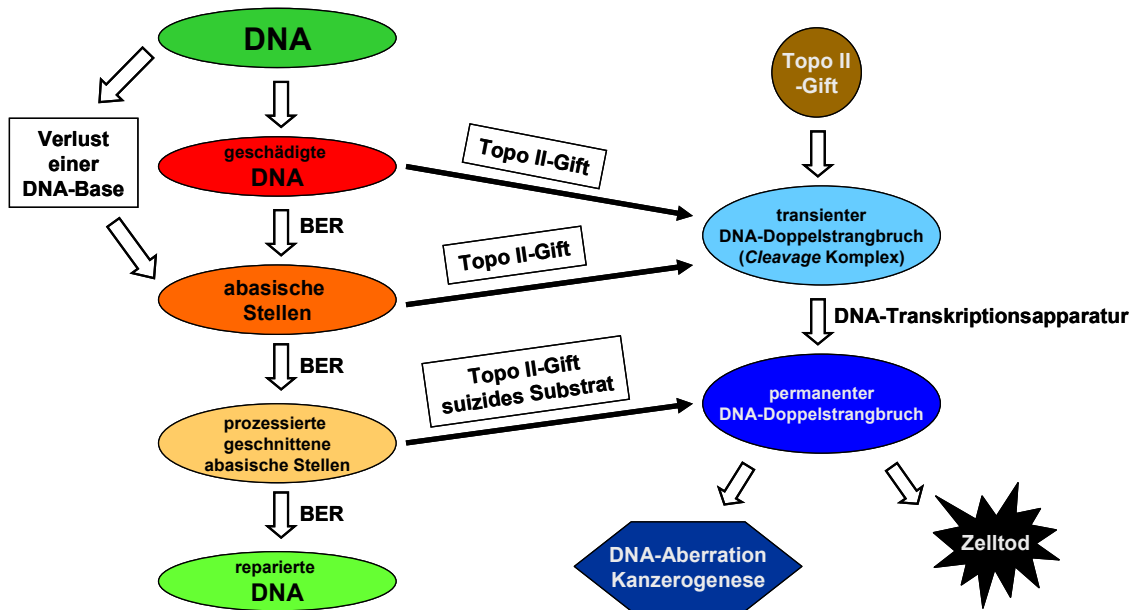


Abbildung 4-14: Mögliche Wege für die vermehrte Entstehung von Topoisomerase II-DNA-Intermediaten [modifiziert nach Vélez-Cruz et al., 2005]. Topo, Topoisomerase; BER, Basen-Exzisionsreparatur.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass AOH und AME die Stabilisierung des Topoisomerase II-DNA-Intermediates bewirken. Aufgrund der Tatsache, dass die beiden Mykotoxine im gleichen Konzentrationsbereich DNA-Schäden verursachen, kann postuliert werden, dass die Topoisomerase II-Giftung zum genotoxischen Potential der beiden Mykotoxine beiträgt.

4.3.3. Nachweis von DNA-Doppelstrangbrüchen durch AOH und AME in A431-Zellen

DNA-Doppelstrangbrüche entstehen, wenn beide Stränge des Zucker-Phosphat-Rückgrates in unmittelbarer Nähe voneinander getrennt werden [Banáth und Olive, 2003]. Innerhalb der Vielfalt von möglichen DNA-Schäden in der Zelle sind DNA-Doppelstrangbrüche die schädlichsten. So ist bekannt, dass ein DNA-Doppelstrangbruch, der nicht repariert wird, potentiell zum Zelltod führen kann [Takahashi und Ohnishi, 2005].

Topoisomerase II-Gifte sind in der Lage DNA-Doppelstrangbrüche zu generieren. Der vermutete Grund hierfür ist, dass stabilisierte Topoisomerase-DNA-Intermediate durch Kollisionen mit zellulären Transkriptionsmaschinerien in DNA-Doppelstrangbrüche konvertiert werden [Gorczyca et al., 1993].

Da AOH und AME in der intakten Zelle als Topoisomerase II-Gifte wirken, wurden die beiden Mykotoxine des Weiteren mittels Comet Assay unter neutralen pH-Bedingungen getestet, was im Falle einer Schweifbildung einen Hinweis auf die Generierung von DNA-Doppelstrangbrüchen darstellt. Damit sollte die Hypothese, dass AOH und AME als Topoisomerase II-Gifte wirken, weiter bekräftigt werden.

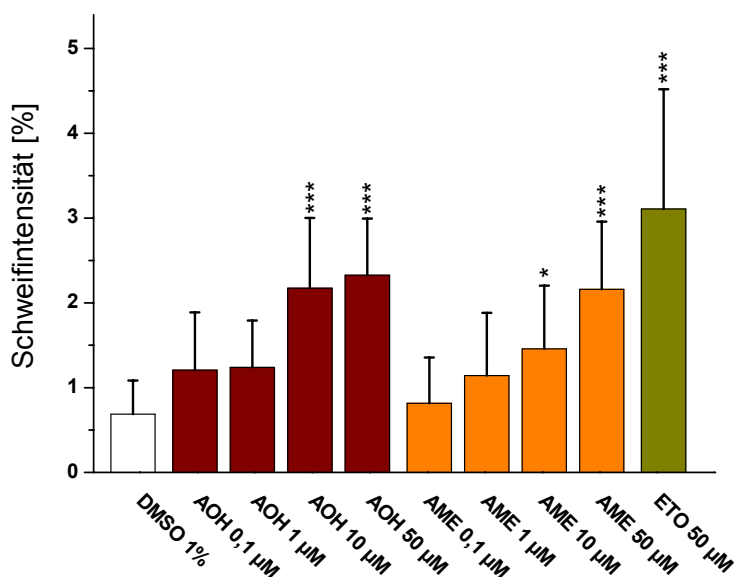


Abbildung 4-15: Bildung von DNA-Doppelstrangbrüchen nach Inkubation mit AOH und AME mittels neutralem Comet Assay. Die Schweifintensität wurde nach 1 h serumfreier Inkubation der Testsubstanzen mit A431-Zellen bestimmt. Als Positivkontrolle wurde ETO mitgeführt. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte \pm SD von mind. vier unabhängigen Experimenten. Signifikante Unterschiede der Proben zur Lösungsmittelkontrolle wurden mittels Student's *t*-Test berechnet (* = $p < 0,05$; *** = $p < 0,001$).

AOH und AME zeigen nach einstündiger serumfreier Inkubation in A431-Zellen eine konzentrationsabhängige Erhöhung der DNA-Doppelstrangbruchrate, die ab einer Konzentration von 10 μM bei beiden Mykotoxinen signifikant ist (Abb. 4-15). Das Topoisomerase II-Gift ETO wurde als Positivkontrolle mitgeführt und zeigt ebenfalls eine signifikante Erhöhung der Schweifintensität im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle.

Dies stimmt mit den Ergebnissen von Smart et al. [2008] überein, die ebenfalls mittels neutralem Comet Assay die Generierung von DNA-Doppelstrangbrüchen durch ETO zeigen konnten. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass ETO im niederen Konzentrationsbereich keinen signifikanten Effekt aufweist, was auf einen Schwellenwert hindeutet. Lynch et al. [2003] vermuten, dass ETO als Topoisomerase II-Gift in niedrigen Konzentrationen ein so genanntes „No Effect Level“ aufweist. Dennoch besitzt jeder stabilisierte Topoisomerase II-Komplex das Potential zu einem DNA-Doppelstrangbruch zu konvertieren, der seinerseits in der Lage ist, die apoptotische Signalkaskade zu aktivieren [Rich et al., 2000; Lips und Kaina, 2001].

Des Weiteren zeigten Smart et al. [2008], dass die DNA-Doppelstrangbruchrate nach ETO-Behandlung nur in dem Konzentrationsbereich signifikant anstieg, in dem stabilisierte Topoisomerase II-DNA-Komplexe detektiert wurden, was auch im Falle von AOH und AME zutrifft (siehe Kapitel 4.3.2.4). Sie vermuten, dass eine gewisse Hemmwirkung der Topoisomerase II α für die Induktion von DNA-Schäden benötigt wird, während sich unter diesem Level, aufgrund einer effizienten DNA-Reparatur, keine genotoxischen Effekte manifestieren können. In diesem Zusammenhang konnte in der vorliegenden Arbeit ein genotoxisches Potential von AOH gezeigt werden, welches aufgrund der Veränderungen in der Expression relevanter Proteine für die DNA-Reparatur variiert (siehe Kapitel 4.4.1 und 4.4.2), was für die Hypothese eines Schwellenwertes spricht.

Derzeit gehen die Meinungen auseinander, welche Art der DNA-Schädigung im neutralen Comet Assay detektiert wird. Ursprünglich wurde der Comet Assay unter neutralen pH-Bedingungen von Östling und Johanson [1984] durchgeführt, wobei die Autoren die verstärkte Migration der DNA zur Anode dadurch erklärten, dass DNA-Strangbrüche eine Relaxierung der superspiralisierten DNA bewirken.

Die Vermutung, dass unter neutralen pH-Bedingungen ausschließlich DNA-Doppelstrangbrüche detektiert werden, kam durch die Weiterentwicklung der

Methode von Singh et al. [1988]. Sie erklären dies dadurch, dass unter neutralen pH-Bedingungen die DNA doppelsträngig verbleibt und somit lediglich DNA-Regionen, die DNA-Doppelstrangbrüche enthalten, im elektrischen Feld migrieren können. Mithilfe alkalischer Puffer kommt es zur Auftrennung der DNA-Doppelhelix, was neben der Detektion von DNA-Doppelstrangbrüchen auch die Detektion von DNA-Einzelstrangbrüchen, alkalilabilen Stellen und transienten DNA-Reparaturstellen erlaubt [Møller, 2006].

Olive et al. [1991] zeigten, dass der neutrale Comet Assay nur DNA-Doppelstrangbrüche erfasst. Jedoch vermuten andere Autoren, dass weitere DNA-Schäden detektiert werden.

Nach Collins [2004] werden im Comet Assay während der Zellyse die meisten Histone durch den hohen Salzgehalt des Lysepuffers aufgelöst und übrig bleibt das so genannte Nucleoid, welches aus einer nukleären Matrix besteht. Jedoch wird die Konstitution und die Existenz dieser nukleären Matrix sehr kontrovers diskutiert [Spivak et al., 2009]. Das postulierte Nucleoid wird als Gerüst bestehend aus RNA und Proteinen, zusammen mit negativ superspiralierter DNA, beschrieben [Cook et al., 1976]. Diese Superspiralisierung kann durch einen DNA-Einzelstrangbruch, sowohl unter neutralen als auch unter alkalischen Elektrophoresebedingungen, zu einer DNA-Schleife relaxieren [Collins et al., 2008]. Daher besteht die Möglichkeit, dass derartige DNA-Schleifen als Kometenschweif unter neutralen Bedingungen detektiert werden können, wie Abbildung 4-16 verdeutlicht.

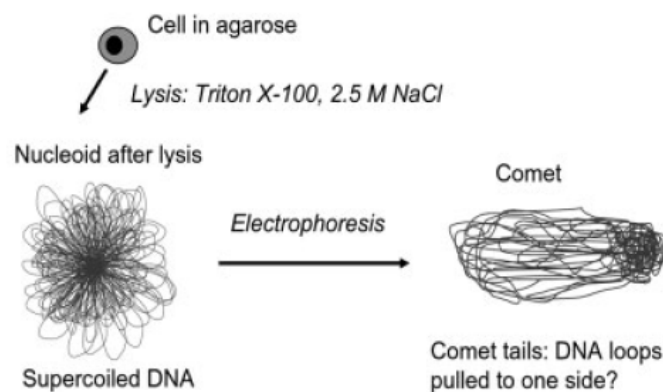


Abbildung 4-16: Postuliertes Prinzip der Bildung des Kometenschweifes im Comet Assay [Shaposhnikov et al., 2008].

Gegen diese Hypothese sprechen die Beobachtungen von Wojewódzka et al. [2002], die zur Detektion von DNA-Doppelstrangbrüchen den Comet Assay unter neutralen

und alkalischen pH-Bedingungen eingesetzt haben. Sie konnten nach UV-C-Bestrahlung, die bekannt für die Generierung von DNA-Einzelstrangbrüchen ist, nur eine DNA-Schädigung unter alkalischen Bedingungen im Comet Assay detektieren, während keine DNA-Schäden im neutralen Comet Assay sichtbar waren.

Dennoch besteht die Möglichkeit, dass bei geringen Bestrahlungsdosen die Bildung des Kometenschweifes im neutralen Comet Assay durch die Relaxierung superspiralisierter DNA herrührt, was zu Fehlinterpretationen der Ergebnisse führen kann und mit einer Überschätzung der Sensitivität der Methode einhergeht [Olive et al., 1991]. Jedoch ist in höheren Dosen die komplette superspiralisierte DNA relaxiert, was bedeutet, dass nur DNA-Doppelstrangbrüche die DNA-Migration beeinflussen [Wojewódzka et al., 2002].

Damit spricht die konzentrationsabhängige Erhöhung der Schweifintensität durch die beiden Mykotoxine AOH und AME für die Generierung von DNA-Doppelstrangbrüchen. Sollte dieser Effekt alleine auf der Relaxierung der superspiralisierten DNA beruhen, wäre somit in höheren Konzentrationen ein Plateau der Schweifintensität zu erwarten. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass dieses Plateau erst in noch höheren Substanzkonzentrationen erreicht wird, da keine Angaben existieren, wie viele DNA-Einzelstrangbrüche nötig sind um die komplette DNA einer Zelle zu relaxieren.

Da AOH und AME in der alkalischen Variante zu Schweifintensitäten bis zu 14% führen, während in der gleichen A431-Zelllinie unter neutralen pH-Bedingungen lediglich Schweifintensitäten bis 2,5% beobachtet werden, wird klar, dass ein deutlicher Unterschied der gemessenen Schweifintensität unter alkalischen und neutralen Bedingungen erkennbar ist.

Viele Agenzien, die in der Lage sind DNA-Doppelstrangbrüche zu generieren, verursachen primär DNA-Einzelstrangbrüche, Schäden an DNA-Basen und oxidative DNA-Schäden in der Zelle, und nur ein kleiner Teil der DNA-Schäden stellen DNA-Doppelstrangbrüche dar [Takahashi und Ohnishi, 2005]. Dies steht im Einklang mit den beobachteten Effekten von AOH und AME, die in der alkalischen Variante des Comet Assays (siehe 4.3.2.2) deutlich stärkere Schweifintensitäten aufweisen.

Für die Detektion von DNA-Doppelstrangbrüchen sprechen auch Studien, die andere Methoden für die Detektion der DNA-Doppelstrangbruchrate vergleichend mit dem neutralen Comet Assay untersucht haben. Dabei sind im Besonderen Methoden zu

nennen, die auf der Grundlage basieren, dass die Bildung nukleärer DNA-Doppelstrangbrüche zur Phosphorylierung des Histons H2AX an Position Serin-139 führt [Rogakou et al., 1998]. So konnten Smart et al. [2008] mit dem Topoisomerase II-Gift ETO eine Korrelation zwischen der Anzahl an DNA-Doppelstrangbrüchen, die im neutralen Comet Assay gemessen wurden, und der Phosphorylierung des Histons H2AX zeigen.

Damit sprechen einige Fakten dafür, dass AOH und AME in höheren Konzentrationen zu zellulären DNA-Doppelstrangbrüchen führen, was ebenfalls im Einklang mit dem von Lehmann et al. [2006] beobachteten klastogenen Effekt von AOH steht. Weiterhin spricht für eine Generierung von DNA-Doppelstrangbrüchen durch die beiden Mykotoxine, dass AOH und AME Topoisomerase II-Gifte darstellen (siehe Kapitel 4.3.2.4). So postulieren Lynch et al. [2003], dass das klastogene Potential von Topoisomerasegiften aus der Stabilisierung des Enzyms mit der DNA während des katalytischen Zyklus resultiert. Beispielsweise wird das klastogene Potential des Isoflavons Genistein [Kulling und Metzler, 1997], welches viele zelluläre Wirkungen aufweist, auf die Topoisomerase II-Giftung zurückgeführt [Lynch et al., 2003].

Zusammenfassend bleibt zu sagen, dass AOH und AME in dem Konzentrationsbereich, in dem auch eine Stabilisierung des Topoisomerase II-DNA-Komplexes erfolgt, zu einer Erhöhung der Schweifintensität führen, und dies aufgrund der oben erläuterten Argumente ein deutlicher Hinweis auf die Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen darstellt.

Überblick zur Interaktion von AOH und AME mit humanen Topoisomerasen

Es bleibt festzuhalten, dass die Mykotoxine AOH und AME mit der Enzymklasse der humanen DNA-Topoisomerasen interagieren.

Die Hemmung von Topoisomerase I durch AOH ab 50 μM wurde lediglich im zellfreien Testsystem beobachtet [Fehr et al., 2009], was darauf hindeutet, dass AOH kein Topoisomerase I-Gift darstellt und die Interaktion von weiteren biologischen Parametern, wie der DNA-Bindungsaffinität des Mykotoxins, herrührt.

Dagegen wirkt AOH als Topoisomerase II-Gift mit einer Präferenz zur II α -Isoform. Diese Präferenz ist im zellfreien Testsystem stärker ausgeprägt und konnte für das Toxin AME nur im Dekatenierungsassay beobachtet werden. Jedoch erscheint diese Tatsache plausibel, da in Anbetracht der Komplexität einer Zelle viele weitere Faktoren involviert sind.

Ebenfalls für den Wirkmechanismus einer Topoisomerasegiftung spricht, dass AOH und AME im Konzentrationsbereich der Stabilisierung des Topoisomerase II-DNA-Intermediates, DNA-Doppelstrangbrüche generieren.

Im Vergleich der beiden Mykotoxine untereinander stellt AOH das potentere Topoisomerase II-Gift dar.

Damit lässt sich sagen, dass AOH und AME als erste Mitglieder der großen Substanzklasse der Mykotoxine, als Topoisomerase II-Gifte beschrieben wurden und dabei zu den seltenen Verbindungen zählen, die selektiv gegenüber einer Isoform wirken. Als potentieller Angriffspunkt könnten Untersuchungen zur Interaktion mit der Enzymklasse der DNA-Topoisomerasen dazu beitragen die genotoxischen Wirkmechanismen anderer mutagener Mykotoxine zu entschlüsseln, wie im Falle von Ochratoxin A, das vergleichsweise in deutlich höheren Konzentrationen als Topoisomerasehemmstoff wirkt [Cosimi et al., 2009].

Aufgrund der Präferenz zur Topoisomerase II α könnte AOH als Leitstruktur für ein mögliches Chemotherapeutikum dienen, da Verbindungen, die selektiv mit dieser Topoisomerase II-Isoform interagieren zu einer effektiven Chemotherapie mit reduzierten Nebenwirkungen führen könnten [Azarova et al., 2007].

Sicher ist jedoch, dass Verbindungen mit solch einem biologischen Potential als Nahrungsmittelkontaminanten unerwünscht sind und eine Gefahr für den Verbraucher darstellen können.

4.4. Einfluss der DNA-Reparatur auf das genotoxische Potential von AOH

4.4.1. Einfluss der TDP1 auf die Genotoxizität von AOH

Das Enzym Tyrosyl-DNA-Phosphodiesterase 1 (TDP1) ist in der Lage, die Bindung der Topoisomerase I mit der DNA zu hydrolysieren und somit das kovalent gebundene Enzym von der DNA am 3'-Ende zu lösen [Yang et al., 1996]. Aus diesem Grund wurde lange Zeit postuliert, dass TDP1 lediglich an der Reparatur von Topoisomerase I-vermittelten DNA-Strangbrüchen beteiligt ist. Neuere Studien jedoch zeigten, dass TDP1 ebenso in die Reparatur Topoisomerase II-vermittelter DNA-Schäden involviert ist [Nitiss et al., 2006]. Um die Bedeutung der Topoisomerasegiftung für das genotoxische Potential von AOH näher zu beleuchten, sollte im Rahmen dieser Arbeit der Einfluss der TDP1 auf die DNA-schädigende Wirkung von AOH untersucht werden.

4.4.1.1. Modulation der DNA-strangbrechenden Wirkung durch AOH an TDP1-überexprimierenden HEK293-Zellen

Der Arbeitsgruppe von Prof. Boege (Universitätsklinikum Düsseldorf) gelang die stabile Transfektion folgender HEK293-Zelllinien, die unserer Arbeitsgruppe freundlicherweise zur Verfügung gestellt wurden:

- Die HEK293-GFP Zelllinie überexprimiert konstitutiv das grün fluoreszierende Protein („green fluorescent protein“; GFP).
- Die Zelllinie HEK293-GFP-TDP1 überexprimiert ein Fusionsprotein aus GFP und der humanen TDP1 [Barthelmes et al., 2004].
- Die HEK293-GFP-TDP1^{H263A} Zelllinie überexprimiert ein Fusionsprotein aus GFP und humaner TDP1, wobei im katalytischen Zentrum des Enzyms das Histidin 263 durch Alanin ersetzt ist. Diese Variante ist katalytisch inaktiv.

Da humane TDP1 eine Rolle in der Reparatur von Topoisomerasegiften-vermittelten DNA-Strangbrüchen spielt, würde die Überexpression des Enzyms zu einer Verringerung des DNA-strangbrechenden Potentials von Topoisomerasegiften führen.

Mit Hilfe des alkalischen Comet Assays sollte daher der Einfluss von TDP1 auf das DNA-strangbrechende Potential von AOH und dem Topoisomerase II-Gift ETO anhand der oben beschriebenen HEK293-Zellen nach einstündiger serumfreier Inkubation untersucht werden (Abbildung 4-17).

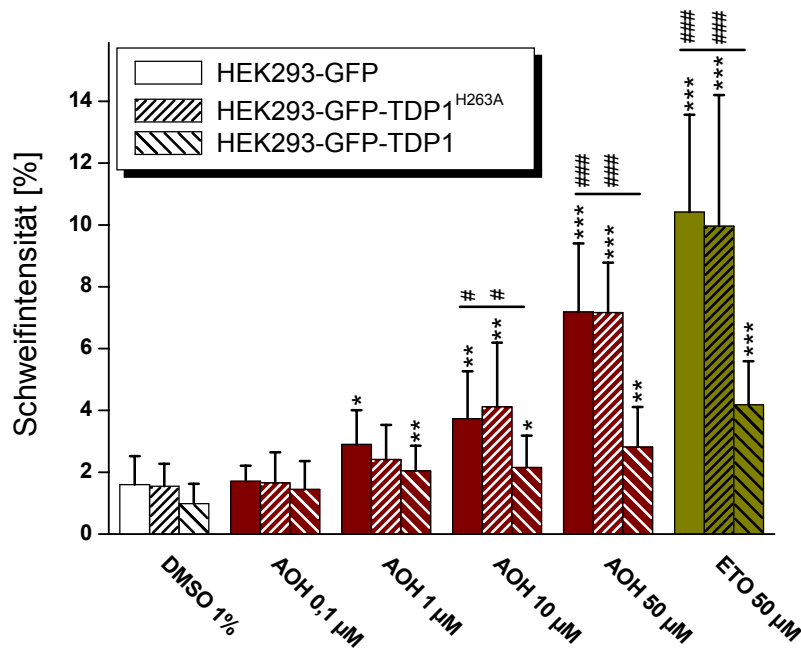


Abbildung 4-17: Untersuchung zum Einfluss von TDP1 auf das DNA-strangbrechende Potential von AOH mittels alkalischem Comet Assay in TDP1-überexprimierenden HEK293-Zellen. Die DNA-strangbrechenden Effekte von AOH wurden nach 1 h serumfreier Inkubation mit transfizierten HEK293-Zellen untersucht. Balken ohne Schraffierung repräsentieren die Zelllinie HEK293-GFP, die dicht schraffierten Balken stehen für die Zelllinie HEK293-GFP-TDP1^{H263A} und die dünn schraffierten Balken stellen die Zelllinie HEK293-GFP-TDP1 dar. Als Positivkontrolle wurde ETO mitgeführt. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte \pm SD von mind. vier unabhängigen Experimenten. Signifikante Unterschiede wurden mittels Student's *t*-Test berechnet. Dabei beziehen sich die Sterne auf die jeweilige Lösungsmittelkontrolle, während die Rauten signifikante Unterschiede der Zelllinie HEK293-GFP-TDP1 im Vergleich zu den Zelllinien HEK293-GFP und HEK293-GFP-TDP1^{H263A} aufzeigen (*, # = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; ***, ### = $p < 0,001$).

AOH führt in den drei getesteten HEK293-Zelllinien zu einer konzentrationsabhängigen Erhöhung der DNA-Strangbruchrate im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle DMSO. Ein signifikanter Anstieg der DNA-Strangbruchrate ist in der HEK293-GFP Zelllinie und der HEK293-GFP-TDP1 Zelllinie bereits ab einer Konzentration von 1 μ M AOH zu erkennen. Jedoch ist bei dieser Konzentration kein signifikanter Unterschied zwischen den HEK293-GFP-TDP1-Zellen zu den HEK293-GFP-Zellen und HEK293-GFP-TDP1^{H263A}-Zellen zu beobachten. Ab 10 μ M AOH ist eine signifikante Verminderung der Schweifintensität in der Zelllinie HEK293-GFP-

TDP1 (2,2%) im Vergleich zu den beiden anderen Zelllinien (HEK293-GFP-Zellen: 3,7%; HEK293-GFP-TDP1^{H263A}-Zellen: 4,1%) erkennbar, was noch deutlicher bei der Inkubation mit 50 µM AOH zu beobachten ist. Diese Erniedrigung der DNA-Schäden in TDP1-überexprimierten Zellen (2,8%), die etwa die 100-fache Menge an endogenem TDP1 exprimieren [Barthelmes et al., 2004], ist ebenfalls bei der Positivkontrolle ETO (4,1%) erkennbar. Dabei zeigt 50 µM ETO in der Zelllinie HEK293-GFP mit Schweifintensitäten von 10,4% bzw. 10% in den HEK293-GFP-TDP1^{H263A}-Zellen eine stärkere DNA-Schädigung als AOH in der äquimolaren Konzentration (7,2% in beiden Zelllinien). Somit besitzt ETO in den verwendeten HEK293-Zellen das stärkere DNA-schädigende Potential.

Im Experiment konnte kein Unterschied zwischen den Zelllinien HEK293-GFP und HEK293-GFP-TDP1^{H263A} festgestellt werden, was zeigt, dass die mutierte Variante des Enzyms inaktiv ist. Diese fehlende katalytische Aktivität des mutierten H263A-Proteins ist bereits in der Literatur beschrieben [Interthal et al., 2001].

Der signifikante Rückgang der DNA-Strangbruchrate in den HEK293-GFP-TDP1-Zellen im Vergleich zu den Zelllinien HEK293-GFP und HEK293-GFP-TDP1^{H263A} ist damit ein weiterer Beleg, dass AOH als Topoisomerasegift wirkt und spricht zudem für die Beteiligung des Enzyms TDP1 bei der Reparatur AOH-vermittelter DNA-Strangbrüche.

Nach der Charakterisierung des Enzyms TDP1 durch Yang et al. [1996] wurde lange Zeit angenommen, dass TDP1 exklusiv stabilisierte Topoisomerase I von der DNA trennen könne. Barthelmes et al. [2004] zeigten jedoch, dass bei der Überexpression humaner TDP1 in HEK293-Zellen die DNA-Strangbruchrate nach Behandlung mit dem Topoisomerase II-Gift ETO im Vergleich zur parentalen HEK293 Zelllinie reduziert wurde. Da in dieser Publikation die hier beschriebenen Zelllinien verwendet wurden und die Potenz von ETO, DNA-Strangbrüche zu generieren, im Vergleich zum Topoisomerase I-Gift CPT deutlich stärker war, wurde in der vorliegenden Arbeit ETO mitgeführt, womit zusätzlich das Ergebnis von Barthelmes et al. [2004] bestätigt werden konnte.

Des Weiteren bleibt festzuhalten, dass in der TDP1-überexprimierender Zelllinie HEK293-GFP-TDP1 eine erhöhte DNA-Strangbruchrate durch AOH und ETO im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle besteht. Daher kann postuliert werden, dass

neben der TDP1 weitere DNA-Reparaturmechanismen bei AOH-vermittelten DNA-Schäden involviert sind.

4.4.1.2. Modulation der DNA-strangbrechenden Wirkung durch AOH in TDP1-supprimierten HCT116-Zellen

In TDP1-überexprimierenden HEK293-Zellen kam es zu einer Verringerung der DNA-Strangbruchrate nach AOH-Behandlung. Damit einhergehend stellte sich im Folgenden die Frage, ob es bei TDP1-supprimierter Zellen zu einer Erhöhung der DNA-Strangbruchrate nach AOH-Inkubation kommt. Daher sollte mittels alkalischem Comet Assay anhand eines weiteren Versuchsprotokolls verifiziert werden, ob TDP1 in der Reparatur von DNA-Schäden involviert ist, die durch Topoisomerase I-Gifte (CPT), als auch durch Topoisomerase II-Gifte (AOH, ETO) vermittelt werden.

Dafür wurden HCT116-Zellen während der wissenschaftlichen Abschlussarbeit von C. Kropat [2008] mittels siRNA-Technologie transfiziert, um die Suppression der humanen TDP1 in HCT116-Zellen zu bewirken. Dabei zeigte sich, dass nach 48 h Behandlung mit dem Transfektionsreagenz der mRNA-Gehalt an TDP1 in den siRNA-transfizierten Zellen mit 90% im Vergleich zur Kontrolle unterdrückt war. Daher wurden die HCT116-Zellen nach 48 h Behandlung mit dem Transfektionsreagenz für 1 h mit der Lösungsmittelkontrolle DMSO, AOH, CPT und ETO inkubiert (Abbildung 4-18).

Um zytotoxische Effekte des Transfektionsmittels auszuschließen wurde mittels Trypanblau-Ausschluss-Test die Zellviabilität bestimmt, die im Experiment in allen untersuchten Proben über 91% lag und damit gegen eine toxische Wirkung des Transfektionsreagenzes spricht.

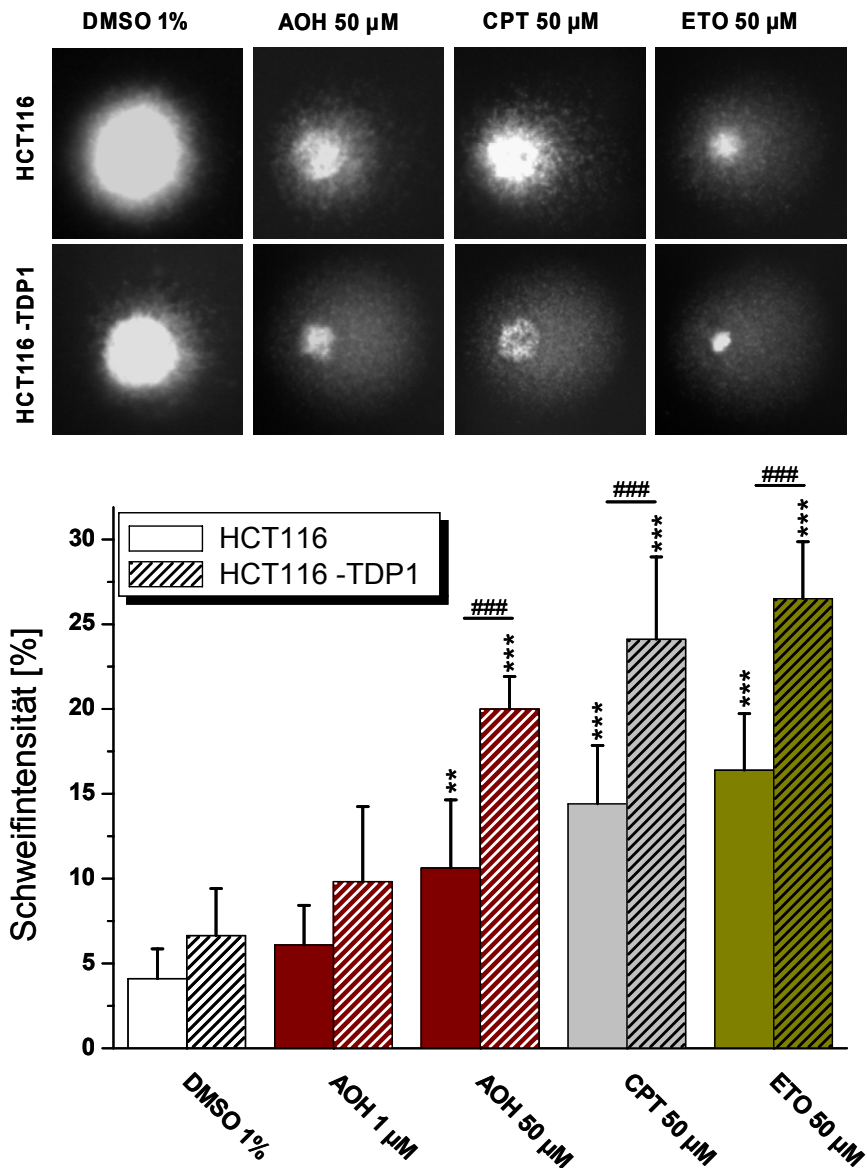


Abbildung 4-18: Untersuchung zum Einfluss von TDP1 auf das DNA-strangbrechende Potential von AOH mittels alkalischem Comet Assay in TDP1-supprimierten HCT116-Zellen. Die DNA-strangbrechenden Effekte von AOH wurden nach 1 h serumfreier Inkubation mit HCT116-Zellen untersucht. Die unschraffierten Balken stehen für die parentale Zelllinie HCT116, während die schraffierten Balken die Zelllinie HCT116-TDP1 darstellen. Als Positivkontrollen wurden CPT und ETO mitgeführt. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte \pm SD von vier unabhängigen Experimenten. Signifikante Unterschiede wurden mittels Student's *t*-Test berechnet. Dabei beziehen sich die Sterne auf die jeweilige Lösungsmittelkontrolle, während die Rauten signifikante Unterschiede der Zelllinie HCT116 zur Zelllinie HCT116-TDP1 aufzeigen (** = $p < 0,01$; ***, ### = $p < 0,001$).

TDP1-supprimierte Zellen weisen nach Inkubation mit der Lösungsmittelkontrolle DMSO (6,6%) im Vergleich zur parentalen Zelllinie (4,1%) eine erhöhte Schweifintensität auf, die jedoch nicht statistisch signifikant ist. Im Falle der Konzentration 1 µM AOH zeigt sich bereits eine Erhöhung der DNA-Strangbruchrate

in TDP1-supprimierten HCT116-Zellen (9,8%) gegenüber den parental HCT116-Zellen (6,1%), wobei sich des Weiteren eine Erhöhung der DNA-Strangbruchrate im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle DMSO andeutet. Zu einer signifikanten Erhöhung an DNA-Schäden kommt es nach Inkubation mit 50 μ M AOH in den parental HCT116-Zellen bezogen auf DMSO. Zusätzlich wird eine deutliche Erhöhung der Schweifintensität in den TDP1-supprimierten HCT116-Zellen (20%) im Vergleich zur nicht transfizierten HCT116 Zelllinie (10,6%) erreicht. Damit kommt es zur Verstärkung der DNA-strangbrechenden Wirkung von AOH durch die Unterdrückung der Expression humaner TDP1, was abermals für eine Beteiligung der TDP1 bei der Reparatur AOH-vermittelter DNA-Strangbrüchen spricht.

ETO (26,5%) und CPT (24,1%) führen in der Konzentration 50 μ M zu einer signifikanten Erhöhung der DNA-Strangbruchrate in TDP1-supprimierten HCT116-Zellen im Vergleich zu den parental HCT116-Zellen (ETO: 16,4%; CPT: 14,4%) und wirken somit äquipotent im untersuchten Testsystem. Im Vergleich zu den beiden bekannten Topoisomerasegiften CPT und ETO zeigt AOH in der äquimolaren Konzentration eine vergleichbare Induktion von DNA-Strangbrüchen.

Dieses Ergebnis untermauert die Hypothese, dass humane TDP1 in die Reparatur Topoisomerase I- [Miao et al., 2006] und auch Topoisomerase II-vermittelter DNA-Schäden [Barthelmes et al., 2004] involviert ist.

Neben TDP1 existieren zusätzliche Signalwege zur Entfernung stabilisierter Topoisomerase-DNA-Intermediate [Vance und Wilson, 2002; Liu et al., 2002], wobei nicht auszuschließen ist, dass mehrere DNA-Reparaturmechanismen im Falle von AOH-induzierter DNA-Schäden involviert sein könnten (Abbildung 4-19).

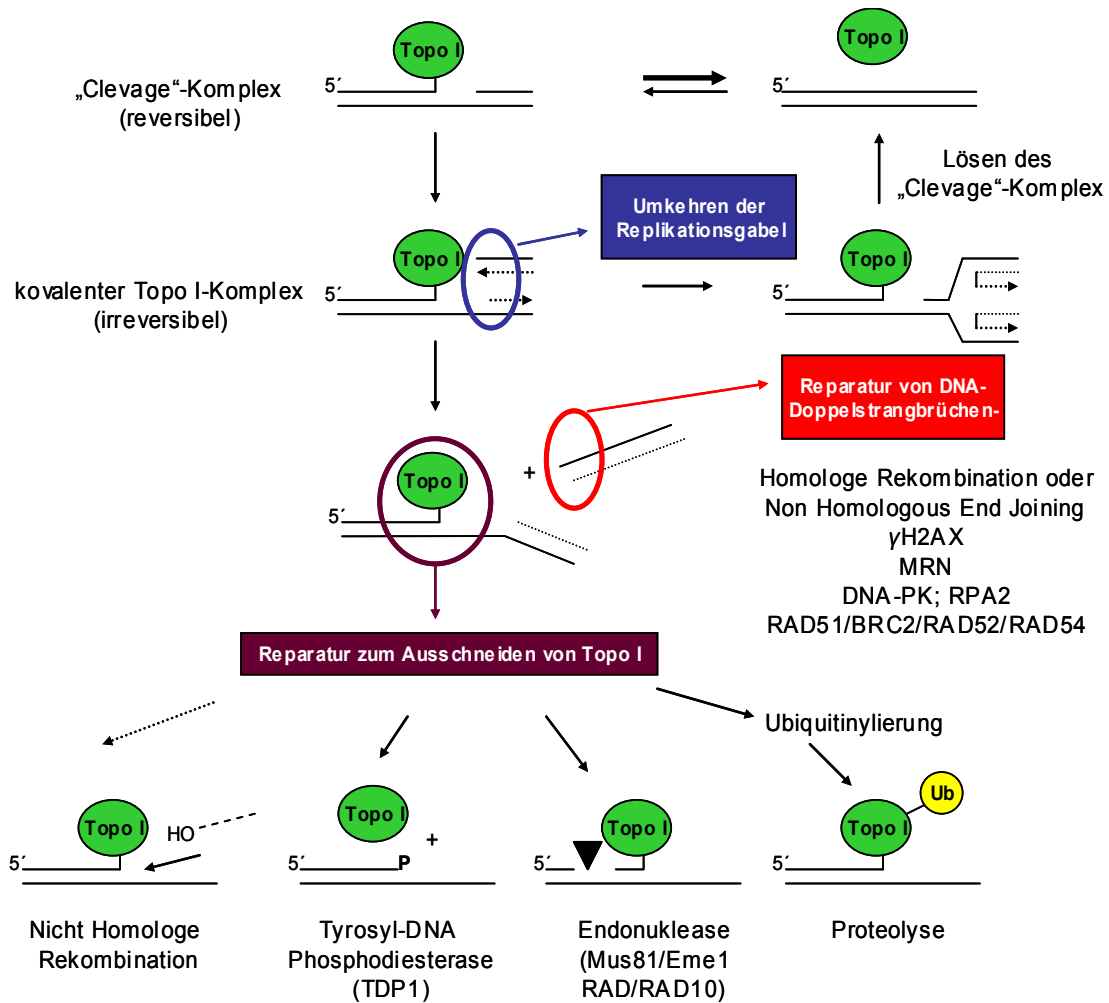


Abbildung 4-19: Bekannte Signalwege, die in der Reparatur Topoisomerase I-vermittelter DNA-Schäden involviert sind. Topo I, Topoisomerase I; Ub, Ubiquitin; γ H2AX, phosphoryliertes Histon 2AX; DNA-PK, DNA-Proteinkinasen [modifiziert nach Pommier, 2004].

Insgesamt bleibt festzuhalten, dass das Enzym TDP1 die DNA-strangbrechende Wirkung des Mykotoxins AOH moduliert und damit an der Reparatur AOH-vermittelter DNA-Schäden beteiligt ist. Jedoch spricht die bestehende Viabilität der Zellen nach AOH Behandlung für weitere beteiligte DNA-Reparaturmechanismen, die im Folgenden näher untersucht wurden.

4.4.2. Modulation der genotoxischen Wirkung durch AOH an Ku70- und PCNA-supprimierten HCT116-Zellen

Bisherige Gentranskriptionsstudien mittels Microarray-Technologie zeigten eine Modulation der Transkriptmenge der DNA-Reparaturgene Ku70 und „Proliferating Cellular Nuclear Antigen“ (PCNA) [Fehr, 2006]. Ku70, ein entscheidender Bestandteil im „Non Homologous End Joining“ (NHEJ)-Signalweg ist bei der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen involviert. PCNA spielt, neben seiner Funktion in der DNA-Reparatur, eine wichtige Rolle bei der DNA-Replikation. Um der Frage einer Beteiligung dieser Proteine an der DNA-Reparatur AOH-vermittelter DNA-Schäden nachzugehen, wurden HCT116-Zellen während der wissenschaftlichen Abschlussarbeit von C. Kropat [2008] mittels siRNA-Technologie transfiziert, um gezielt die Expression der Proteine Ku70 und PCNA zu unterdrücken. Die Unterdrückung von Ku70 und PCNA wurde dabei um etwa 70% sowohl auf Transkriptions- als auch auf Proteinebene festgestellt. Um einen Einfluss des Transfektionsreagenzes ausschließen zu können, wurden neben der parentalen HCT116 Zelllinie zusätzlich HCT116-Zellen (HCT116+siRNA) eingesetzt, die lediglich mit dem Transfektionsmittel behandelt wurden. HCT116+siRNA-Zellen zeigen in allen untersuchten Proben keinen deutlichen Unterschied bei der DNA-Strangbruchrate im Vergleich zu den parentalen HCT116-Zellen, womit sich sagen lässt, dass das Transfektionsreagenz keinen Einfluss auf die Zelllinie selbst ausübt. Weiterhin wurden keine induzierten zytotoxischen Effekte mittels Trypanblau-Ausschluss-Test detektiert, da die Zellviabilität in allen untersuchten Proben über 87% lag.

Abbildung 4-20 zeigt die Zusammenfassung der Ergebnisse nach einstündiger serumfreier Inkubation mit der Lösungsmittelkontrolle DMSO, AOH oder dem Topoisomerase II-Gift ETO.

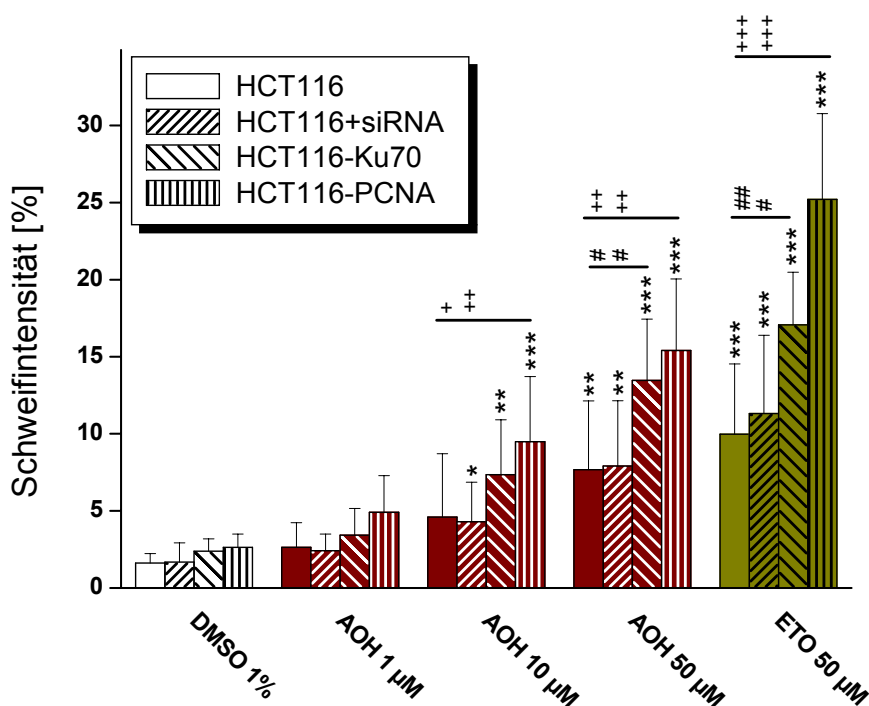


Abbildung 4-20: Untersuchung der genotoxischen Wirkung mittels alkalischem Comet Assay. Die DNA-strangbrechenden Effekte von AOH wurden nach 1 h serumfreier Inkubation mit transfizierten HCT116-Zellen untersucht. Die Balken ohne Schraffierung repräsentieren die parentale Zelllinie HCT116, die dicht schraffierten Balken stehen für die Zelllinie HCT116+siRNA, die dünn schraffierten Balken stellen die Zelllinie HCT116-Ku70 dar und die längs gestreiften Balken zeigen die Zelllinie HCT116-PCNA. Als Positivkontrolle wurde ETO mitgeführt. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte \pm SD von vier unabhängigen Experimenten. Signifikante Unterschiede wurden mittels Student's *t*-Test berechnet. Dabei beziehen sich die Sterne auf die jeweilige Lösungsmittelkontrolle, die Rauten zeigen signifikante Unterschiede der Zelllinie HCT116-Ku70 im Vergleich zu den Zelllinien HCT116 und HCT116+siRNA und die Pluszeichen beziehen sich auf einen signifikanten Effekt der Zelllinie HCT116-PCNA im Vergleich zu den Zelllinien HCT116 und HCT116+siRNA (*, #, + = $p < 0,05$; **, ##, ++ = $p < 0,01$; ***, ###, +++ = $p < 0,001$).

Die Unterdrückung der Proteine Ku70 und PCNA scheint nach einstündiger Inkubation in HCT116-Zellen zu keinen endogenen DNA-Schäden zu führen, wie anhand der Lösungsmittelkontrolle DMSO zu sehen ist, wobei die Schweifintensitäten zwischen 1,6% und 2,6% liegen.

Es kommt in allen untersuchten Zelllinien zu einem konzentrationsabhängigen Anstieg der DNA-Strangbruchrate nach AOH-Behandlung. Während 1 μ M AOH keine signifikanten Unterschiede aufweist, ist ein deutlicher Anstieg der DNA-Strangbruchrate bei 10 μ M AOH zu erkennen. Die induzierten DNA-Schäden betragen bei den parentalen HCT116-Zellen 4,6%, während die HCT116+siRNA Zelllinie eine Schweifintensität von 4,3% aufweist. Im Vergleich zur parentalen und

mit Transfektionsreagenz behandelten Zelllinie ist die DNA-Strangbruchrate bei den Ku70- (7,3%) und PCNA-supprimierten Zellen (9,5%) nach Behandlung mit 10 μ M AOH deutlich erhöht. Dabei ist der Effekt in der PCNA-supprimierten HCT116 Zelllinie stärker ausgeprägt als in Ku70-supprimierten Zellen, was in einem signifikanten Unterschied der PCNA-supprimierten Zelllinie zu den parentalen und mit Transfektionsmittel behandelten Zellen resultiert.

50 μ M AOH verursacht in allen untersuchten HCT116 Zellklonen einen signifikanten Anstieg der DNA-Strangbruchrate bezogen zur Lösungsmittelkontrolle DMSO. Dabei ist, sowohl in der Ku70-supprimierten Zelllinie (13,5%), als auch in PCNA-supprimierten Zellen (15,4%) eine signifikante Erhöhung der DNA-Schäden im Vergleich zu den parentalen HCT116- (7,7%) und HCT116+siRNA-Zellen (7,9%) zu beobachten.

Ein ähnlicher Effekt ist auch bei der Positivkontrolle ETO (50 μ M) zu erkennen, wobei abgesehen von den höheren Schweifintensitäten im Vergleich zu AOH (HCT116-Zellen: 10%; HCT116+siRNA: 11,3%), die Protein-supprimierten Zelllinien deutlich mehr DNA-Schäden aufweisen als die anderen beiden Zelllinien. In Analogie scheinen die PCNA-supprimierten Zellen (25,2%) nach ETO-Behandlung größeren genotoxischen Effekten ausgesetzt zu sein als Ku70-supprimierte Zellen (17,1%).

Jedoch ist eine valide Quantifizierung der DNA-Schäden bei diesen hohen Schweifintensitäten nicht möglich. Daher wird häufig in der Literatur empfohlen starke DNA-Schäden zu vermeiden, was durch Verdünnungen, geänderte Inkubationszeiten oder durch veränderte Elektrophoreseeinstellungen realisiert werden kann [Liao et al., 2009].

Damit kann postuliert werden, dass aufgrund der erhöhten Sensitivität von Ku70- und PCNA-supprimierten HCT116-Zellen gegenüber AOH, beide Proteine eine Rolle in der Reparatur von AOH-induzierten DNA-Strangbrüchen spielen.

Die erhöhte DNA-schädigende Wirkung von AOH in Ku70-supprimierten Zellen deutet auf die Beteiligung des NHEJ-Signalweges, da das Protein Ku70 einen wichtigen Bestandteil in diesem DNA-Reparaturmechanismus darstellt (siehe Kapitel 2.3.2). Weiterhin sprechen folgende Gründe für die Involvierung des NHEJ-Signalweges bei AOH-induzierten DNA-Schäden:

- (1) AOH wirkt als Topoisomerase II-Gift (siehe Kapitel 4.3) und der NHEJ-Signalweg stellt den dominierenden Mechanismus der DNA-Doppelstrang-

bruchreparatur im Falle Topoisomerase II-vermittelter DNA-Schäden dar [Adachi et al., 2004].

(2) Das Mykotoxin führt in der Zelllinie HCT116 zu DNA-Doppelstrangbrüchen (siehe Abschnitt 4.4.3), was nahe legt, dass Mechanismen zur Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen involviert sind.

(3) AOH führt zur Generierung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) (siehe Kapitel 4.5), die ihrerseits in der Lage sind DNA-Doppelstrangbrüche zu generieren [Wang, 2007]. Durch die mögliche Entstehung von H_2O_2 , kann es zusätzlich zu einer indirekten Beteiligung des NHEJ-Signalweges nach AOH-Behandlung kommen, da dieser Signalweg den Hauptmechanismus für die Reparatur H_2O_2 -vermittelter DNA-Doppelstrangbrüche in der G_1 -Phase darstellt [Frankenberg-Schwager et al., 2008].

Der NHEJ-Signalweg fügt die gebrochenen DNA-Enden mit DNA-Fragmenten, die kein homologes Charakteristikum aufweisen, zusammen. Daher ist der NHEJ-Signalweg in allen Phasen des Zellzyklus vertreten und damit der vorherrschende DNA-Reparatursignalweg für DNA-Doppelstrangbrüche in Säugerzellen [Burma et al., 2006]. Jedoch ist die Reparatur mittels NHEJ-Signalweg stark fehleranfällig und es kommt häufig zu Sequenzdeletionen verschiedener Längen [Jackson, 2002].

Aufgrund dieser Fehleranfälligkeit des NHEJ-Signalweges [Lieber, 1999], könnte die Beteiligung dieser Art der DNA-Reparatur, zur Mutagenität von AOH [Brugger et al., 2006] beitragen.

Reparaturprozesse im Falle der NHEJ können, je nach Art des DNA-Schadens und der Zelllinie, Halbwertszeiten zwischen 15 Minuten und 20 Stunden besitzen [Iliakis, 1991; DiBiase et al., 2000]. So wurden nach 24-stündiger Inkubation von HT29-Zellen mit AOH und AME keinerlei DNA-Strangbrüche beobachtet [Pfeiffer et al., 2007a], was auf eine effiziente DNA-Reparatur hindeutet.

Eine erhöhte Sensitivität von Ku70-defizienten DT40 (Hühner)-Zellen gegenüber ETO und ICRF-193 zeigten bereits Adachi et al. [2003]. Da es sich bei ETO und ICRF-193 um Topoisomerase II-Gifte handelt, die zur Giftung des Enzyms unterschiedliche Mechanismen aufweisen, scheint der Mechanismus der Generierung von DNA-Doppelstrangbrüchen nicht ausschlaggebend zu sein, ob der NHEJ-Signalweg aktiviert wird.

Im Falle von AOH ist ein Zusammenspiel unterschiedlicher Signalkaskaden und DNA-Reparaturmechanismen durchaus denkbar und wird von der Tatsache gestützt, dass trotz des inaktiven NHEJ-Signalweges, die Zellen zwar höhere DNA-Schäden aufweisen, aber dennoch lebensfähig sind.

Komplexe DNA-Läsionen, in denen beide DNA-Stränge involviert sind, sind deutlich schwerer zu reparieren als DNA-Einzelstrangbrüche oder Schäden an den DNA-Basen. Dies führt dazu, dass eine unvollständige Reparatur oft mit Chromosomenaberrationen und Zelltod verbunden sind [Banáth und Olive, 2003]. Damit könnte das klastogene Potential von AOH [Lehmann et al., 2006] und die Induktion von Apoptose durch das Mykotoxin [Budde, 2009] teilweise auf eine fehlerhafte DNA-Reparatur zurückzuführen sein.

AOH führt in PCNA-supprimierten Zellen zu deutlich höheren DNA-Schäden im Vergleich zur parentalen HCT116 Zelllinie, was darauf hindeutet, dass neben dem Einfluss auf die DNA-Reparatur, eine weitere Wirkung des Mykotoxins auf die DNA-Replikation abzielt. PCNA ist wohl das bekannteste Beispiel eines Proteins, das eine Doppelrolle in der DNA-Replikation und DNA-Reparatur spielt [Toueille und Hübschner, 2004]. So wird PCNA mit der Basen-Exzisionsreparatur (BER) [Dianova et al., 2001], Nukleotid-Exzisionsreparatur (NER) [Aboussekhra und Wood, 1995], Basenfehlpaarungsreparatur („Mismatch“ Reparatur, MMR) [Zhang et al., 2003] und der Homologen Rekombination (HR) [Meister et al., 2003] in Verbindung gebracht. Die Induktion von oxidativem Stress durch AOH (siehe Kapitel 4.5) steht in Einklang mit einer erhöhten DNA-schädigenden Wirkung in PCNA-defizienten Zellen, da PCNA an der BER beteiligt ist, dem dominierenden Reparaturmechanismus für oxidative DNA-Schäden [Maynard et al., 2009].

PCNA kann die DNA-Polymerase δ aktivieren [Waga et al., 1994], was die bedeutende Rolle von PCNA in der DNA-Replikation zeigt. Damit einhergehend ist PCNA an der Regulation des Zellzyklus beteiligt [Gulbis et al., 1996].

Induzierte DNA-Schäden können zu einer höheren Aktivität von DNA-Reparaturenzymen führen [Collins, 2009]. Dagegen kann eine Hochregulierung an Reparatursignalwegen beteiligter Proteine auch toxisch wirken, da diese Komponenten häufig in Multienzymkomplexen agieren und eine Überexpression einzelner Proteine zu einem Funktionsverlust führen kann [Campisi und Vijg, 2009].

Es bleibt festzuhalten, dass AOH im Vergleich zur parentalen HCT116 Zelllinie in Ku70- und PCNA-defizienten HCT116-Zellen zu einer höheren DNA-Strangbruchrate führt. Da diese DNA-Schädigung mit der DNA-Strangbruchrate in TDP1-defizienten Zellen vergleichbar ist, wird klar, dass dieser Effekt nicht spezifisch für TDP1 zutrifft. Aufgrund dessen tragen neben dem Reparaturenzym TDP1 die Proteine Ku70 als Mitglied des NHEJ-Signalweges und PCNA, das eine bedeutende Rolle in verschiedenen DNA-Reparaturmechanismen spielt, in der Reparatur AOH-vermittelter DNA-Schäden bei.

4.4.3. Genotoxisches Potential von AOH und AME in humanen Kolonkarzinomzellen

Der Einfluss der Proteine TDP1, Ku70 und PCNA auf das genotoxische Potential von AOH hat die Bedeutung der beteiligten DNA-Reparatur, auch im Falle von DNA-Doppelstrangbrüchen gezeigt. Neben der DNA-Reparatur, könnte die Biotransformation von AOH und AME eine entscheidende Rolle bezüglich des toxischen Potentials der beiden Mykotoxine spielen. Eine detoxifizierende Wirkung gegenüber AOH und AME scheinen dabei insbesondere die Phase II-Enzymklasse der UDP-Glukuronosyltransferasen (UGTs) zu spielen [Pfeiffer et al., 2008b]. Zelllinien in Permanentkultur können sich auch bei vergleichbarem Gewebeerstursprung deutlich in ihrem Expressionsmuster unterscheiden. Während HT29-Zellen eine starke Glukuronidierungsaktivität aufweisen [Pfeiffer et al., 2007a], besitzen HCT116-Zellen vergleichsweise geringe Mengen an UGTs [Cummings et al., 2002]. Damit stellte sich die Frage inwieweit diese unterschiedliche Expression an Phase II-Enzymen Einfluss auf das genotoxische Potential von AOH und AME nach Kurzzeitinkubation ausübt. Hierzu sollte die Bildung potentieller DNA-Doppelstrangbrüche durch AOH und AME in den humanen Kolonkarzinomzellen HCT116 und HT29, mittels neutralem Comet Assay untersucht werden.

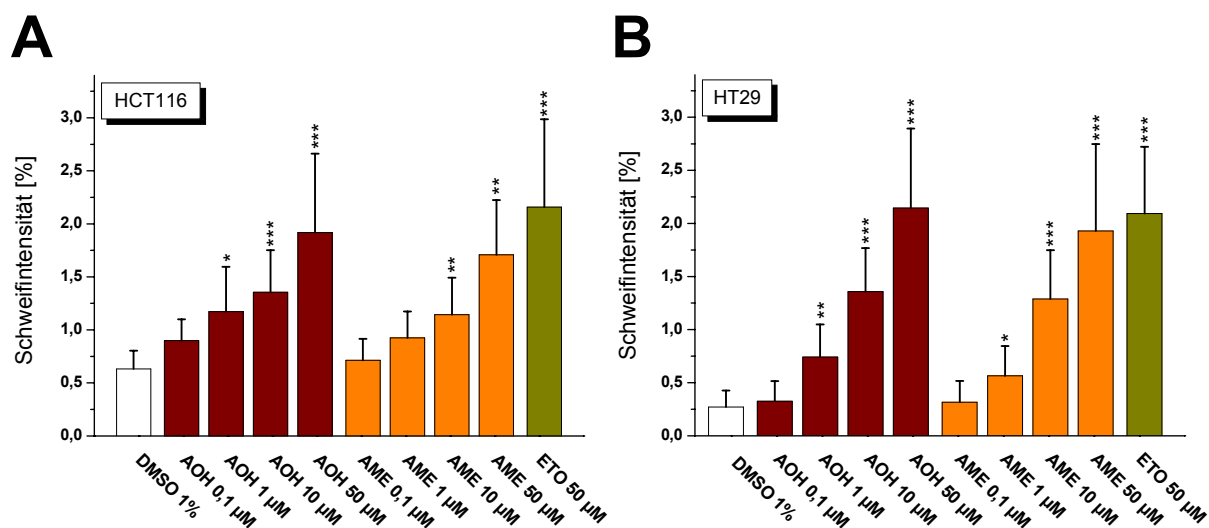


Abbildung 4-21: Untersuchung zur Genotoxizität von AOH und AME mittels neutralem Comet Assay. Die DNA-Doppelstrangbruchrate von AOH und AME wurden nach 1 h serumfreier Inkubation mit (A) HCT116-Zellen (B) und HT29-Zellen untersucht. Als Positivkontrolle wurde ETO mitgeführt. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte \pm SD von mind. vier unabhängigen Experimenten. Signifikante Unterschiede der Proben zur Lösungsmittelkontrolle wurden mittels Student's *t*-Test berechnet (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$).

AOH und AME führen in HCT116-Zellen nach einstündiger serumfreier Inkubation zu einer konzentrationsabhängigen Erhöhung der DNA-Doppelstrangbruchrate (Abb. 4-21 A). Ein statistisch signifikanter Effekt im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle ist ab 1 μ M AOH und 10 μ M AME zu beobachten. Daneben führt die Positivkontrolle 50 μ M ETO zu einer erhöhten Schweifintensität, die mit der von AOH und AME in der äquimolaren Konzentration vergleichbar ist.

In HT29-Zellen führen AOH und AME ebenfalls zu einer konzentrationsabhängigen Erhöhung der Schweifintensität (Abb. 4-21 B). Dabei ist ein signifikanter Effekt im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle ab 1 μ M AOH und 1 μ M AME erkennbar. Weiterhin führt 50 μ M ETO zu einer erhöhten DNA-Doppelstrangbruchrate, vergleichbar mit der äquimolaren Konzentration von AOH und AME.

Im Vergleich der beiden Kolonkarzinomzelllinien untereinander ist kein Unterschied der DNA-Strangbruchrate nach Toxinbehandlung zu erkennen. Damit scheint die unterschiedliche Glukuronidierungsaktivität in HT29- und HCT116-Zellen nach 1 h in Hinblick auf die Generierung von DNA-Doppelstrangbrüchen keinen deutlichen Einfluss auszuüben. Pfeiffer et al. [2007a] beschreiben, dass bereits nach einstündiger Inkubation von HT29-Zellen mit 10 μ M AOH bzw. AME etwa 25% der

Mykotoxine als Glukuronidkonjugate vorliegen. Dabei ist die Glukuronidierung von AOH und AME konzentrations- und zeitabhängig. So wurden AOH und AME nach einer Inkubationszeit von 24 h in HT29-Zellen zu annähernd 100% glukuronidiert. Da die Glukuronidierung von AOH und AME die DNA-strangbrechende Wirkung der Mykotoxine aufhebt, scheinen bei der Kurzzeitinkubation genügend freie Mykotoxine vorzuliegen, welche die beobachteten DNA-Doppelstrangbrüche verursachen. Aufgrund der limitierten Sensitivität der Methode und der niedrigen Schweifintensitäten können jedoch geringe Unterschiede der DNA-Schädigung nicht detektiert werden.

Fest zu halten bleibt, dass sowohl AOH als auch AME im neutralen Comet Assay in den humanen Kolonkarzinomzelllinien HCT116 und HT29 zu einer Erhöhung der Schweifintensität führen, was auf die Generierung von DNA-Doppelstrangbrüchen hindeutet.

Überblick zum Einfluss der DNA-Reparatur auf AOH-induzierte DNA-Schäden

TDP1 spielt eine Rolle in der Reparatur AOH-induzierter DNA-Schäden, was ein weiteres Argument darstellt, dass AOH als potentes Topoisomerasegift wirkt. So verringert sich die durch AOH-induzierte DNA-Strangbruchrate, in TDP1-überexprimierenden HEK293-Zellen. Daneben führt in TDP1-supprimierten HCT116-Zellen die Inkubation mit AOH zu einer erhöhten DNA-Strangbruchrate.

Zudem zeigte die Suppression von Ku70 und PCNA, die ebenfalls in Prozessen der DNA-Reparatur involviert sind, ein verstärktes genotoxisches Potential des Mykotoxins AOH. Dabei beeinflusst die Unterdrückung der Proteine Ku70 und PCNA, in vergleichbarem Ausmaß wie TDP1 die DNA-strangbrechende Wirkung von AOH. Dies legt die Vermutung nahe, dass bei der Reparatur AOH-vermittelter DNA-Schäden, neben dem Enzym TDP1, der NHEJ-Signalweg und die BER involviert sind.

Während die BER einen wichtigen Reparaturmechanismus für oxidative DNA-Schäden darstellt, ist der NHEJ-Signalweg an der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen beteiligt. Eine fehlerhafte DNA-Reparatur kann zu Mutationen führen, die ihrerseits ein kanzerogenes Potential besitzen [Jackson, 2002]. Dabei ist insbesondere der NHEJ-Signalweg zu erwähnen, der bekannt für seine Fehleranfälligkeit ist und daher zum mutagenen Potential von AOH [Brugger et al., 2006] beitragen kann.

Die Aktivierung von DNA-Reparaturmechanismen durch AOH unterstützt die Befunde zum genotoxischen Potential des Mykotoxins aus der alkalischen Entwindung [Pfeiffer et al., 2007a] und dem Comet Assay [Fehr et al., 2009].

4.5. AOH und AME als Induktoren des oxidativen Stresses in humanen Kolonkarzinomzellen

In Hinblick auf das genotoxische Potential von AOH und AME wurde bereits gezeigt, dass beide Mykotoxine in der Lage sind DNA-Doppelstrangbrüche in A431- (siehe Kapitel 4.3.3), HCT116- und HT29-Zellen (siehe Abschnitt 4.4.3) zu generieren, was zumindest mit dem Wirkmechanismus der Topoisomerase II-Giftung zu erklären ist. Auffällig ist, dass die ermittelten Schweifintensitäten im neutralen Comet Assay im Vergleich zur alkalischen Variante dieser Methode (siehe Kapitel 4.4.2 und Fehr et al., 2009) deutliche Unterschiede aufweisen, was dafür spricht, dass der Anteil an AOH- und AME-induzierten DNA-Doppelstrangbrüchen nur einen geringen Teil der DNA-Schäden ausmacht.

Dieses Verhältnis zu weiteren Arten der DNA-Schädigung konnte bereits bei anderen Agenzien gezeigt werden, die in der Lage sind, DNA-Doppelstrangbrüche zu generieren, wie im Falle der beiden Topoisomerase II-Gifte ETO und DOX [Takahashi und Ohnishi, 2005].

Daher sollte als nächstes der Frage nachgegangen werden, ob neben der Interaktion mit humanen Topoisomerasen, weitere biologische Wirkungen zur Genotoxizität von AOH und AME beitragen. Ein Unterschied zwischen Topoisomerasegiften und anderen genotoxischen Verbindungen ist, dass DNA-Topoisomerasen aktiv am Erkennen und Prozessieren von DNA-Läsionen teilnehmen, indem sie in den Zellzyklus eingreifen, womit Topoisomerasegifte zugleich eine Vielzahl von biologischen Prozessen beeinflussen [Larsen et al., 2003b].

In der Literatur sind Topoisomerasegifte häufig mit einer Induktion von oxidativem Stress beschrieben [Li et al., 1999]. Das wohl bekannteste Topoisomerase II-Gift, das zusätzlich reaktive Sauerstoffspezies (ROS) generiert ist das Anthracyclin Doxorubicin [Mizutani et al., 2005]. Als Chemotherapeutikum wird es häufig in der Behandlung von Karzinomen eingesetzt [Beillerot et al., 2008], wobei die häufig als Nebenwirkung auftretende Kardiomyopathie auf die Generierung von ROS zurückgeführt wird [Takemura und Fujiwara, 2007]. Daneben gibt es Substanzen, wie TAS-103 [Mizutani et al., 2002], Staurosporin [Sordett et al., 2004], Plumbagin [Kawiak et al., 2007] oder Aclarubicin [Rogalska et al., 2008], die durch ROS-Bildung zu einer Topoisomerasegiftung führen können.

Des Weiteren sind Mykotoxine, wie Deoxynivalenol [Desmond et al., 2008], Fumonisin B₁ [Stockmann-Juvala et al., 2004], Ochratoxin A [Palma et al., 2007], Patulin [Liu et al., 2007] oder Zearalenon [El Gholli Bennour et al., 2008] in der Literatur als Auslöser von oxidativem Stress beschrieben.

In diesem Zusammenhang wurden die Mykotoxine AOH und AME auf eine Generierung von ROS mittels Dichlorofluorescein (DCF) Assay untersucht. Eine damit verbundene Erhöhung des Transkriptionsfaktors „Nuclear Factor Erythroid 2p45 (NF-E2)-Related Factor“ 2 (Nrf2) im Zellkern wurde mithilfe der Western Blot Analyse in der humanen Kolonkarzinomzelllinie HT29 hin untersucht.

4.5.1. Generierung von ROS durch die Mykotoxine AOH und AME

Der DCF Assay gilt als Methode zur quantitativen Erfassung intrazellulär gebildeter ROS [Royall und Ischiropoulos, 1993], wobei die Oxidation des Fluoreszenzfarbstoffes unspezifisch erfolgt und keine Aussage darüber macht, um welche reaktiven Spezies es sich im Testsystem handelt [Frank et al., 2000]. ROS stellen die wichtigste Klasse reaktiver Spezies in lebenden Systemen dar [Liochev und Fridovich, 1994], wobei nicht vergessen werden sollte, dass gerade im DCF Assay weitere reaktive Spezies gemessen werden (siehe Kapitel 2.4.1), deren physiologische Relevanz derzeit jedoch nicht abschätzbar ist.

Abbildung 4-22 zeigt die Zusammenfassung der Ergebnisse im DCF Assay nach einstündiger serumfreier Inkubation mit AOH, AME und der Positivkontrolle MEN in HT29-Zellen.

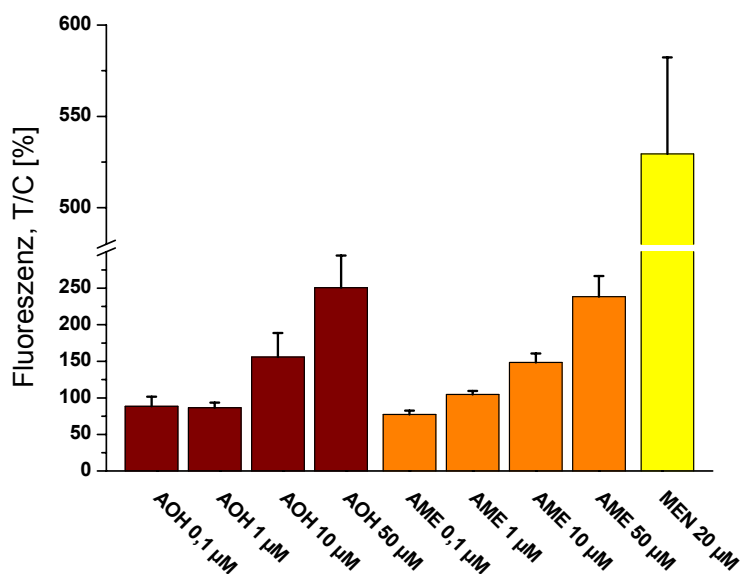


Abbildung 4-22: Nachweis zur Bildung von ROS durch AOH und AME mittels DCF Assay. Die Bildung von intrazellulären ROS durch AOH und AME wurde nach 1 h Inkubation in HT29-Zellen untersucht. Als Positivkontrolle wurde MEN mitgeführt. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte \pm SD von mind. vier unabhängigen Experimenten in einer 8-fachen Bestimmung.

AOH zeigt in den Konzentrationen 0,1 μ M (88%) und 1 μ M (86%) eine verminderte Fluoreszenzintensität im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle DMSO, was auch im Falle von AME in der Konzentration 0,1 μ M (77%) erkennbar ist. Damit scheinen die beiden Mykotoxine in niederen Konzentrationen einen antioxidativen Effekt zu besitzen. Das Phänomen einer Konzentrationsabhängigkeit in Bezug auf eine antioxidative oder prooxidative Wirkung ist beispielsweise im Falle des Topoisomerase II-Giftes ETO bekannt, das je nach intrazellulärer Verteilung pro- oder antioxidativ wirken kann. Dabei wird postuliert, dass ETO, basierend auf seiner Phenolstruktur, reaktive Radikale abfangen kann. Die Reaktivität und Menge an resultierenden ETO-Phenoxyradikalen entscheidet letztlich, ob ETO in der Zelle pro- oder antioxidativ wirkt [Kagan et al., 2001]. Da AOH und AME ebenfalls phenolische Strukturelemente besitzen scheint ein ähnlicher Reaktionsmechanismus, wie im Falle von ETO möglich.

Ab 10 μ M erhöhen AOH (155%) und AME (149%) die gemessene Fluoreszenzintensität, die konzentrationsabhängig bei 50 μ M AOH (251%) und AME (238%)

weiter ansteigt, sodass die Verbindungen in diesem höheren Konzentrationsbereich prooxidativ wirken.

Somit generieren beide Mykotoxine in vergleichbarem Ausmaß ROS. Daneben erhöht der „Redoxcycler“ MEN (20 μ M) die Fluoreszenzintensität auf 550% gegenüber DMSO.

ROS können eine Vielzahl an DNA-Schäden induzieren, wie abasische (apurine/apyrimidine) Stellen, Basenmodifikationen und DNA-Strangbrüche [Demple und Harrison, 1994]. In diesem Zusammenhang bleibt zu sagen, dass trotz der Generierung von ROS durch AOH und AME, keine oxidativen DNA-Schäden, basierend auf Fpg-sensitiven-Stellen durch die beiden Mykotoxine in HT29-Zellen detektiert wurden [Fehr et al., 2009]. Jedoch werden nicht alle oxidativen DNA-Schäden von Fpg erfasst, da das Enzym oxidierte Purinbasen prozessiert, während Pyrimidine beispielsweise vom Enzym NTH1, dem humanen Homolog des bakteriellen Nth Enzyms (Endonuklease III), erkannt werden [Morland et al., 2002].

Zudem betreffen häufige Fpg-Modifikationen die DNA-Base Guanin. So stellen 8-Oxo-Guanin, 2,6-Diamino-4-Hydroxy-5-Formamidopyrimidin (FapyG), N7-Methyl-FapyG und FapyA, welche in Kapitel 2.4.1 abgebildet sind, die am meisten vorkommenden DNA-Läsionen von Purinbasen dar [Coste et al., 2004]. Für eine potentielle oxidative DNA-Schädigung durch AOH und AME, die von Fpg zum großen Teil nicht erkannt werden, sprechen die Ergebnisse von Schrader et al. [2006]. Sie zeigten, dass AOH als direktes Mutagen an Adenin-Thymin-(AT)-Stellen wirkt, während das Mykotoxin an Guanin-Cytosin-(GC)-Stellen lediglich schwach mutagen reagiert [Schrader et al., 2001], was nahelegt, dass AOH eine gewisse Spezifität gegenüber DNA-Basen aufweist.

Oxidativ-induzierte DNA-Strangbrüche enthalten häufig unkonventionelle terminale Gruppen, wie 3'-Phosphoglykolate und 3'-Phosphate, die aus der Fragmentierung des Desoxyribosezuckers resultieren [Vance und Wilson, 2001]. TDP1 ist in der Lage diese DNA-Läsionen zu reparieren [Interthal et al., 2005b]. Einen Einfluss von TDP1 auf die DNA-strangbrechende Wirkung von AOH wurde unter Kapitel 4.4.1 gezeigt. Darauf basierend lässt sich postulieren, dass neben der induzierten Topoisomerasegiftung durch AOH (siehe Kapitel 4.3) auch die Bildung von ROS einen Einfluss auf den TDP1-vermittelten Signalweg darstellen kann. Daneben stellt die BER, als Hauptmechanismus für die Reparatur oxidativer DNA-Schäden, einen

weiteren Reparaturmechanismus für die Entfernung der 3'-terminalen DNA-Läsionen dar [Johnson und Demple, 1988]. Die Unterdrückung von PCNA als wichtiges Protein der BER resultierte in einer erhöhten DNA-Strangbruchrate durch AOH (siehe Abschnitt 4.4.2).

Daher scheint die ROS-Bildung zur DNA-strangbrechenden Wirkung von AOH und AME beizutragen. Dies steht in Einklang mit den Ergebnissen aus den verschiedenen Varianten des Comet Assays mit HT29-Zellen (siehe Kapitel 4.4.3 und Fehr et al., 2009), da die Mykotoxine deutlich mehr DNA-Einzelstrangbrüche generieren als DNA-Doppelstrangbrüche.

Jedoch sollte berücksichtigt werden, dass der DCF Assay viele Faktoren beinhaltet, die zu einer falschen Interpretation der Ergebnisse führen können [Rota et al., 1999]. So ist in der Literatur beschrieben, dass der experimentelle Ablauf mit einem Minimum an Licht durchgeführt werden muss, da der Fluoreszenzfarbstoff durch Licht in Anwesenheit reduzierender Agenzien, wie NADH oder Glutathion, photoreduziert wird [Marchesi et al., 1999]. Des Weiteren zeigte sich, dass die Detektion freier Hydroxylradikale ($\text{OH}\cdot$) [LeBel et al., 1992] und Superoxidradikalanionen ($\text{O}_2^{\cdot-}$) [Rota et al., 1999] mit diesem Testsystem unzuverlässig ist. Für die Erfassung von H_2O_2 im Testsystem wird ein Katalysator benötigt [Jakubowski und Bartosz, 2000]. Dabei zeigte sich, dass Cytochrom C im nanomolaren Bereich sehr effektiv wirkt [Wardman et al., 2002]. Jedoch kann es daneben ebenso zu einem erhöhten zytosolischen Cytochrom C-Gehalt durch den Transfer aus den Mitochondrien in apoptotischen Zellen kommen [Kluck et al., 1997; Burkitt und Wardman, 2001]. Damit bleibt festzuhalten, dass der DCF Assay als Hinweis auf oxidativen Stress, und nicht als direkter Nachweis der ROS-Bildung, betrachtet werden sollte [Jakubowski und Bartosz, 2000].

Insgesamt bleibt festzuhalten, dass die Ergebnisse im DCF Assay darauf hindeuten, dass AOH und AME in der Lage sind intrazelluläre ROS zu generieren, was neben der Topoisomerase II-Giftung durch die beiden Mykotoxine, einen weiteren potentiellen genotoxischen Wirkmechanismus darstellt.

4.5.2. Der Transkriptionsfaktor Nrf2 als zelluläres Zielenzym von AOH und AME

Um die Ergebnisse aus dem DCF Assay weiter zu verifizieren, wurde mittels Western Blot Analyse der Einfluss von AOH bzw. AME auf den nukleären Nrf2-Gehalt in HT29-Zellen untersucht. Durch oxidativen Stress kann es zu einem Anstieg von Nrf2-Protein im Zellkern kommen, wo Nrf2 nach Heterodimerisierung an der Aktivierung der Genexpression detoxifizierender Enzyme beteiligt ist [Osburn und Kensler, 2008]. Durch Lysepuffer aufsteigender Stärke erfolgt eine Trennung von zytosolischer Fraktion und Kernfraktion. Die Bestimmung des Gehaltes an Nrf2-Protein erfolgt mittels Western Blot Analyse mit anschließender immunochemischer Detektion. Als Positivkontrolle dient tert.-Butylhydrochinon (*t*BHQ), das durch Autoxidation zum entsprechenden Semichinon und in der Folge zum Chinon oxidiert werden kann (Abbildung 4-23), wobei ROS entstehen, die zur Aktivierung von Nrf2 führen [Pinkus et al., 1996].

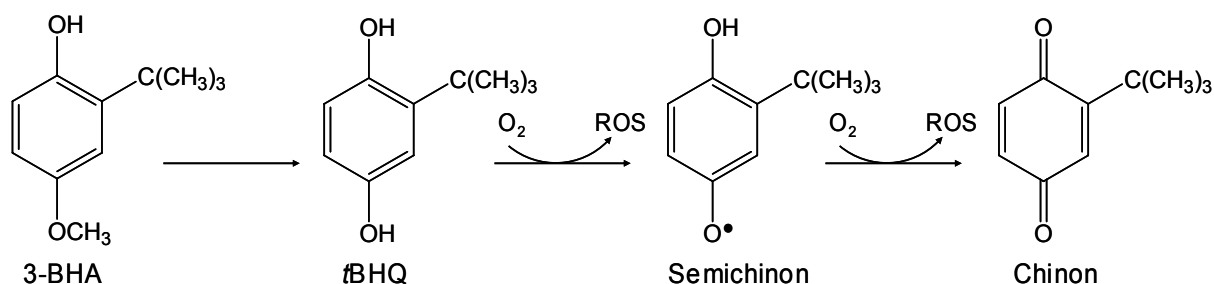


Abbildung 4-23: Autoxidation von *t*BHQ [modifiziert nach Yu et al., 1997]. 3-BHA, 3-Butylhydroxyanisol; *t*BHQ, tert.-Butylhydrochinon; ROS, reaktive Sauerstoffspezies.

Da die Induktion von oxidativem Stress häufig zu einer schnellen antioxidativen Antwort der Zelle führt [Halliwell, 2002], sollte daneben eine mögliche Zeitabhängigkeit mitbestimmt werden.

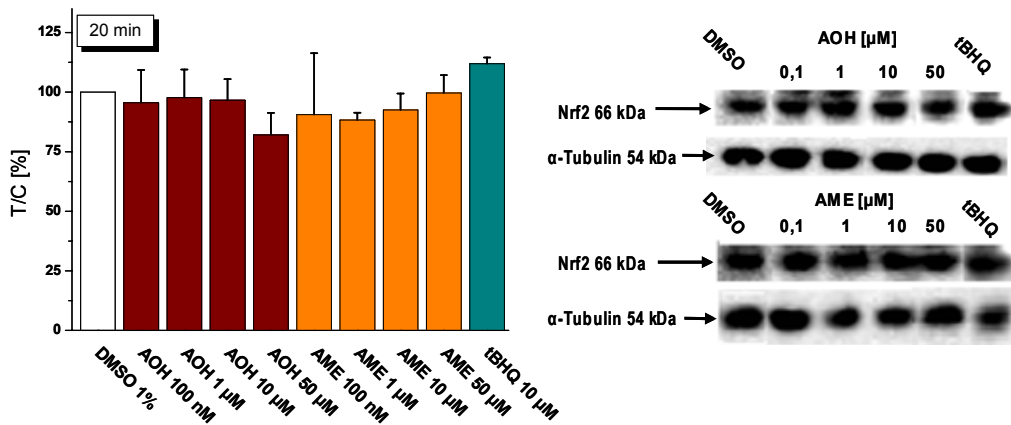


Abbildung 4-24: Western Blot Analyse zum nukleären Nrf2-Gehalte (in Zusammenarbeit mit S. Bächler, Wissenschaftliche Abschlussarbeit, 2008). Zusammenfassung der T/C-Werte zur Modulation des nukleären Nrf2-Gehalte durch AOH, AME und tBHQ nach 20 min serumfreier Inkubation bezogen auf die Lösungsmittelkontrolle DMSO in HT29-Zellen. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte \pm SD und repräsentative Blotbilder aus mindestens fünf unabhängigen Experimenten.

Nach 20-minütiger serumfreier Inkubation mit AOH und AME wurde in HT29-Zellen kein erhöhter Gehalt an Nrf2-Protein im Zellkern beobachtet (Abbildung 4-24). Die Positivkontrolle tBHQ zeigt einen leicht erhöhten Gehalt an nukleärem Nrf2-Protein, der jedoch mit 112% im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle schwach ausgeprägt ist. Dennoch deutet sich eine Aktivierung von Nrf2 bereits nach 20 min an, was mit Werten aus der Literatur übereinstimmt [Purdom-Dickinson et al., 2007].

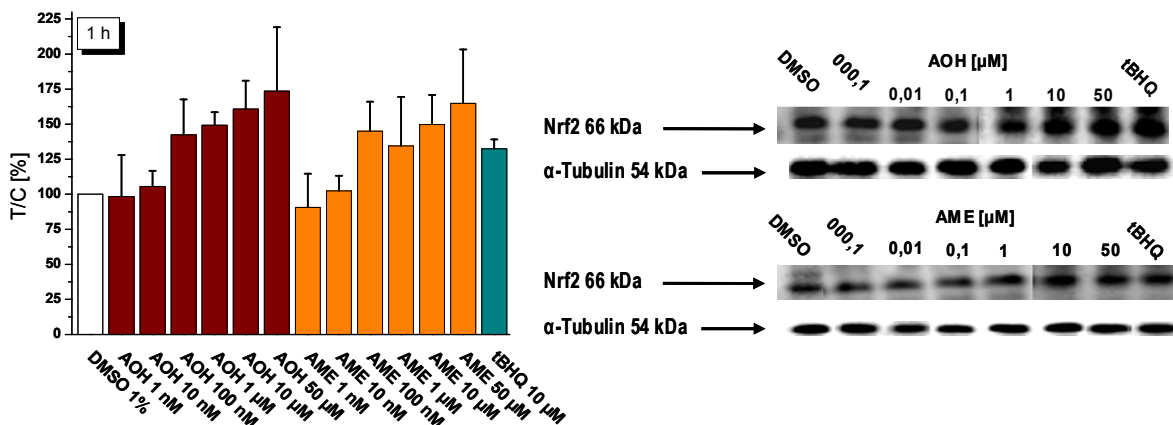


Abbildung 4-25: Western Blot Analyse zum nukleären Nrf2-Gehalte (in Zusammenarbeit mit S. Bächler, Wissenschaftliche Abschlussarbeit, 2008). Zusammenfassung der T/C-Werte zur Modulation des nukleären Nrf2-Gehalte durch AOH, AME und tBHQ nach 1 h serumfreier Inkubation bezogen auf die Lösungsmittelkontrolle DMSO in HT29-Zellen. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte \pm SD und repräsentative Blotbilder aus mindestens fünf unabhängigen Experimenten.

Nach einstündiger Inkubation der beiden Mykotoxine mit HT29-Zellen kann ab einer Konzentration von 100 nM eine konzentrationsabhängige Zunahme des Nrf2-Gehaltes in der Kernfraktion beobachtet werden (Abbildung 4-25). In der 50 μ M AOH-Konzentration ist der Gehalt gegenüber der Lösungsmittelkontrolle auf 175% erhöht. Die 50 μ M AME-Konzentration ist demgegenüber auf 165% erhöht und damit mit AOH vergleichbar. Die Positivkontrolle *t*BHQ zeigt mit 132% einen erhöhten Gehalt an nukleärem Nrf2-Protein.

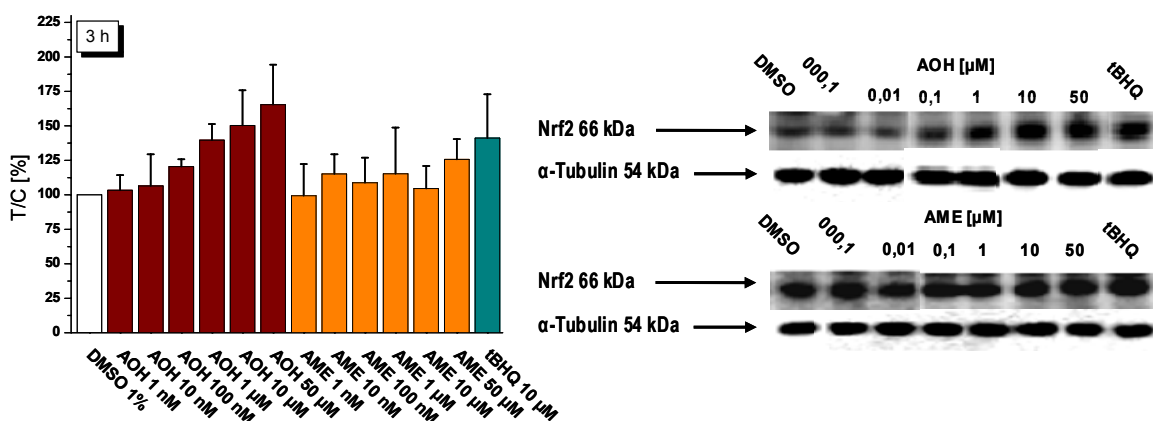


Abbildung 4-26: Western Blot Analyse zum nukleären Nrf2-Gehaltes (in Zusammenarbeit mit S. Bächler, Wissenschaftliche Abschlussarbeit, 2008). Zusammenfassung der T/C-Werte zur Modulation des nukleären Nrf2-Gehaltes durch AOH, AME und *t*BHQ nach 3 h serumfreier Inkubation bezogen auf die Lösungsmittelkontrolle DMSO in HT29-Zellen. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte \pm SD und repräsentative Blotbilder aus mindestens fünf unabhängigen Experimenten.

Nach 3 h ist ab einer Konzentration von 100 nM AOH und 10 nM AME der Kerngehalt an Nrf2 zur Lösungsmittelkontrolle erhöht und steigt bei AOH bis zu einer Konzentration von 50 μ M konzentrationsabhängig an (Abbildung 4-26). In der 50 μ M AOH-Konzentration wird hierbei ein Wert von etwa 165% erreicht, während 50 μ M AME zu einer Erhöhung des nukleären Nrf2-Proteingehaltes auf 126% führt. Die Positivkontrolle *t*BHQ zeigt mit 141% einen erhöhten Gehalt an nukleärem Nrf2-Protein. Damit besitzt AOH nach 3 h einen deutlich stärkeren Effekt als AME, was nach 1 h nicht beobachtet werden konnte. Dies deutet auf ein Anschalten der Expression detoxifizierender Enzyme durch AME im Vergleich zu AOH im Inkubationszeitraum zwischen 1 h und 3 h hin. Ein weiterer Hinweis auf eine schnell ablaufende Nrf2-Signalkaskade in HT29 Zellen zeigt sich dadurch, dass im Mittel nach dreistündiger Inkubationsdauer der Einfluss von AOH und AME auf den nukleären Nrf2-Gehalt wieder abnimmt. Daneben könnte ebenfalls, die von Pfeiffer et

al. [2007a] beschriebene Glukuronidierung von AOH und AME in HT29-Zellen, eine Rolle spielen.

Im Falle von AOH und AME blieb der zytosolische Gehalt an Nrf2-Protein nach allen Inkubationszeiten unverändert (Daten nicht gezeigt), was dafür spricht, dass neben der Translokation weitere Faktoren bei der Regulierung des Nrf2/ARE-Signalweges beteiligt sind. Dies steht in Einklang mit Studien, die oxidativen Stress nicht zwingend in Zusammenhang mit einer Änderung der subzellulären Verteilung von Nrf2 bringen, sondern auch die Modulation der Gesamtmenge an Nrf2 berücksichtigen [Pi et al., 2003]. So beschreiben Pi et al. [2007], dass Nrf2 anhand verschiedener Mechanismen in koordinierten Prozessen reguliert wird. Zu erwähnen sind dabei die Translokation zwischen Zytoplasma und Zellkern, eine erhöhte Gentranskription und/oder eine reduzierte Degradation des Transkriptionsfaktors. So unterliegt Nrf2 im Zytoplasma unter homöostatischen Bedingungen einem raschen, Keap1-vermittelten proteasomalen Abbau, wobei die Halbwertszeit des Proteins weniger als 20 min beträgt. Unter Einwirkung von oxidativem Stress kann es zu einer Stabilisierung des Nrf2-Proteins kommen, wodurch die Halbwertszeit um bis zu 75% verlängert wird [McMahon et al., 2004]. Weiterhin zeigten Kobayashi et al. [2006], dass oxidativer Stress und Elektrophile die Akkumulation von Nrf2 im Zellkern anhand einer *de novo* Synthese des Proteins induzieren.

Die Ergebnisse bezüglich einer Aktivierung des Nrf2-Signalweges durch die Mykotoxine AOH und AME korrelieren mit den Resultaten im DCF Assay (siehe Abschnitt 4.5.1). Hierbei zeigten sowohl AOH als auch AME ab einer Konzentration von 10 μM eine Fluoreszenzintensitätserhöhung, was auf die Generierung von ROS hindeutet.

Eine Korrelation zwischen ROS und einer Topoisomerasehemmung wird zuweilen in der Literatur beschrieben. So wiesen Li et al. [1999] die Induktion von Topoisomerase II-vermittelten DNA-Strangbrüchen durch H_2O_2 nach. Dabei wird postuliert, dass durch H_2O_2 Thiol-Reste des Enzyms oxidiert werden, was in einer Stabilisierung des Enzym-DNA-Komplexes resultiert, wobei der genaue molekulare Mechanismus dafür noch nicht vollständig geklärt ist.

Da sowohl die Erhöhung vom nukleären Nrf2-Protein als auch die ROS-Bildung von AOH und AME (siehe Kapitel 4.5.1) gezeigt wurde, scheint deren Beteiligung an der Stabilisierung des Topoisomerase II-DNA-Komplexes durch die beiden Mykotoxine

(siehe Kapitel 4.3), und der dadurch bedingten DNA-Schädigung [Fehr et al., 2009] möglich. Damit bleibt zu sagen, dass eine Beteiligung der entstehenden ROS an der Topoisomerase II-Giftung, eine mögliche Erklärung für die stärkeren Effekte von AOH und AME im zellulären System (siehe Abschnitt 4.3.2.3 und 4.3.2.4) im Vergleich zum zellfreien Testsystem (siehe Kapitel 4.2 und 4.3.1) bietet.

Des Weiteren besteht ein enger Zusammenhang zwischen der ROS-Bildung, der katalytischen Aktivität der Topoisomerase II und der induzierten DNA Reparatur [Lu et al., 2005]. So führen ROS zu einer Apoptoseinduktion durch eine gleichzeitige Hemmung der Topoisomerase II und DNA-abhängigen Proteinkinasen des NHEJ-Signalweges. Eine mögliche Analogie zu den in dieser Arbeit untersuchten Mykotoxinen wird deutlich, da AOH-vermittelte DNA-Schäden wohl zumindest unter Beteiligung des NHEJ-Signalweges repariert werden (siehe Kapitel 4.4.2) und das Toxin ferner in der Lage ist, Apoptose zu induzieren [Budde, 2009].

Zur allgemeinen chemopräventiven Wirkung durch die Aktivierung des Nrf2/ARE-Signalweges [Giudice und Montella, 2006; Surh et al., 2008], sollte die Induktion des antioxidativen GSH-Signalweges hervorgehoben werden. GSH hält den zellulären Redoxstatus aufrecht, wobei die Homöostase unter anderem durch die eigene *de novo* Synthese reguliert wird, welche ebenfalls durch Nrf2 kontrolliert wird [Harvey et al., 2009]. Jedoch sollte auch erwähnt werden, dass der Nrf2-Signalweg nicht nur für den Schutz der Zelle steht. So existieren Studien, die zeigen, dass eine gestörte Regulation von Nrf2 für Resistenzen gegenüber Chemotherapeutika verantwortlich ist [Singh et al., 2006; Wang et al., 2008]. Weiterhin beschreiben Lau et al. [2008], dass Nrf2 eine tumorpromovierende Funktion besitzt und begründen dies mit der Tatsache, dass Nrf2 und die damit verbundenen ARE-Gene in vielen Karzinomzelllinien und humanen Krebsgeweben überexprimiert werden und damit den Krebszellen einen Überlebens- und Wachstumsvorteil verschaffen.

Die Aktivierung des Nrf2-Signalweges durch AOH und AME unterstützt die Ergebnisse zur Bildung von ROS und impliziert, dass die Mykotoxine AOH und AME oxidativen Stress induzieren.

4.6. Beeinflussung des zellulären Redoxstatus durch die *Alternaria*-Toxine AOH und AME

Da der Nrf2-Signalweg eng mit dem Redoxstatus von GSH verbunden ist und ein Zusammenspiel dieser beiden Systeme einen effektiven Schutz der Zellen vor oxidativem Stress darstellt, sollte als weiterer Fokus dieser Arbeit der Redoxstatus von GSH nach AOH- und AME-Behandlung in der humanen Kolonkarzinomzelllinie HT29 untersucht werden.

Der physiologische Redoxstatus eines Organismus kann nur durch ein gepuffertes Redoxsystem aufrecht erhalten werden, wobei die Redoxeigenschaften von Thiolen und einem komplexen Puffersystem basierend auf dem Tripeptid Glutathion (GSH) eine zentrale Rolle spielen [Meyer, 2008]. GSH stellt das bekannteste niedermolekulare Thiol in den meisten eukaryotischen und prokaryotischen Zellen dar [Foyer und Noctor, 2005], wobei die Konjugationsreaktion häufig durch die Enzymklasse der Glutathion-S-Transferasen (GST) katalysiert wird [Hayes et al., 2005].

4.6.1. Modulation des Glutathionspiegels durch AOH und AME

Die Ergebnisse einer ROS-Bildung und der Aktivierung des Nrf2/ARE-Signalweges durch AOH und AME sprechen dafür, dass die Mykotoxine in der Lage sind oxidativen Stress zu induzieren. Dabei könnte der rückläufige Effekt nach 3 h im Falle der Nrf2-Aktivierung auf ein relativ rasches Anschalten des Phase II-Metabolismus hindeuten.

Die Konjugation mit GSH stellt einen der wichtigsten Entgiftungsmöglichkeiten im Organismus gegen Elektrophile und ROS dar [Forman et al., 2009], woraufhin im Folgenden der GSH-Gehalt nach der Methode von Tietze [1969] bestimmt wurde.

Diese Methode beinhaltet, neben der Bestimmung des Gesamt-GSH-Gehaltes („total“ GSH, tGSH) zusätzlich die Messung von oxidiertem GSH (GSSG) durch eine Behandlung mit Vinylpyrimidin (VP).

Jedoch waren die Messungen von GSSG, wohl aufgrund der geringen Konzentration in den verwendeten HT29-Zellen, stets im Bereich der Detektionsgrenze, was die

Aussagekraft dieser Ergebnisse stark einschränkt (Daten nicht gezeigt). Dies wurde auch bei der Positivkontrolle MEN beobachtet. MEN ist bekannt für eine schnelle GSH-Depletion, wobei der involvierte oxidative Mechanismus primär zur Bildung von GSSG führt [Stevenson et al., 2002]. Daher kann in der vorliegenden Arbeit keine Aussage zur Modulation des GSSG-Gehaltes in HT29-Zellen nach AOH und AME-Behandlung gemacht werden.

Im Folgenden wird darum ausschließlich auf die Beeinflussung des tGSH-Gehaltes eingegangen.

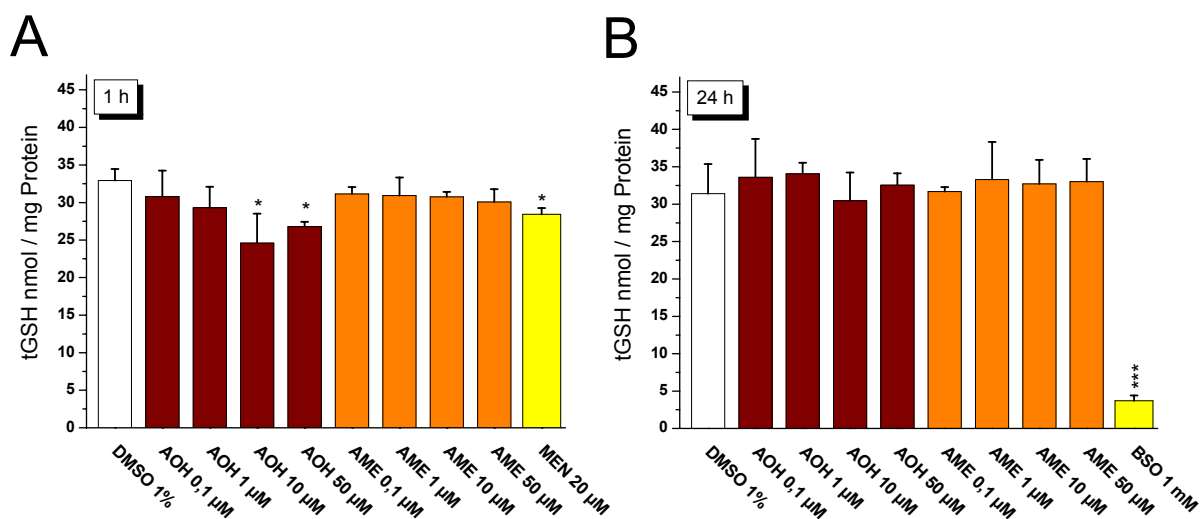


Abbildung 4-27: Messung des tGSH-Gehaltes mittels GSH Assay nach Tietze [1969]. Der Einfluss von AOH und AME auf den intrazellulären tGSH-Gehalt wurde nach (A) 1 h serumfreier und (B) 24 h serumhaltiger Inkubation in HT29-Zellen untersucht. Als Positivkontrolle wurden MEN (1 h) und BSO (24 h) mitgeführt. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte \pm SD von drei unabhängigen Experimenten. Signifikante Unterschiede der Proben zur Lösungsmittelkontrolle wurden mittels Student's *t*-Test berechnet (* = $p < 0,05$; *** = $p < 0,001$).

Der Gehalt an tGSH verringert sich konzentrationsabhängig im Bereich von 0,1 μ M - 10 μ M AOH nach einstündiger serumfreier Inkubation, während 50 μ M AOH zu einem Wiederanstieg des tGSH-Gehaltes führt (Abb. 4-27 A). Dabei ist die Abnahme bei 10 μ M und 50 μ M AOH statistisch signifikant. Im Falle von AME ist keine Änderung bezüglich des tGSH-Status erkennbar. Die Positivkontrolle MEN (20 μ M) führt zu einer signifikanten Verringerung an tGSH, was bereits in der Literatur gezeigt wurde [Monks et al., 1992].

Nach 24 h serumhaltiger Inkubation modulieren AOH und AME nicht den tGSH-Gehalt in HT29-Zellen im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle DMSO (Abb. 4-27 B).

Dagegen ist eine deutliche tGSH-Depletion bei der Positivkontrolle L-Buthioninsulfoximin (BSO) zu erkennen. BSO ist durch die Hemmung der γ -Glutamylcysteinylase dafür bekannt, den tGSH-Gehalt zu reduzieren [Griffith und Meister, 1979].

Die Abnahme des Gehaltes an tGSH nach 1 h durch AOH korreliert damit mit den erfassten ROS im DCF Assay im selben Zeitraum (siehe Abschnitt 4.5.1), da GSH bekannt dafür ist, ROS abzufangen [Yuan und Kaplowitz, 2009]. Damit liegt die Vermutung nahe, dass die Reduktion des tGSH-Gehaltes durch AOH im Bereich 10-50 μ M durch die gebildeten ROS verursacht wird.

Daneben zeigt die Langzeitinkubation von 24 h keine Modulation des Gehaltes an tGSH. Im Falle einer effektiven Entgiftung kann es durchaus sein, dass sich der GSH-Spiegel wieder normalisiert, da GSH einem raschen „Turnover“ unterliegt [Forman et al., 2009]. Dies spricht für eine effiziente Detoxifizierung von AOH im Zeitraum bis 24 h in HT29-Zellen, was in Einklang mit der Studie von Pfeiffer et al. [2007a] steht. Sie zeigten, dass AOH nach 24 h in HT29-Zellen keine DNA-Strangbrüche generiert, bedingt durch die starke Glukuronidierungsaktivität dieser Zelllinie.

Anhand der gezeigten Ergebnissen kann postuliert werden, dass GSH an der Detoxifizierung AOH-vermittelter Effekte beteiligt ist.

4.6.2. Einfluss von AOH und AME auf die Aktivität humaner Glutathion-S-Transferasen

AOH und AME verringern den tGSH-Gehalt in HT29-Zellen nach 1 h Inkubation, während nach 24 h keine Modulation zu sehen ist. Daher sollte im Folgenden die Enzymklasse der GSTs, welche die Konjugation mit GSH katalysieren, untersucht werden. Als Substrat dient nach der Methode von Habig et al. [1974] 1-Chlor-2,4-dinitrobenzol (CDNB), das von nahezu allen GSTs umgesetzt wird, wobei die GSTP1 die häufigste Isoform in HT29-Zellen darstellt [Ebert et al., 2003].

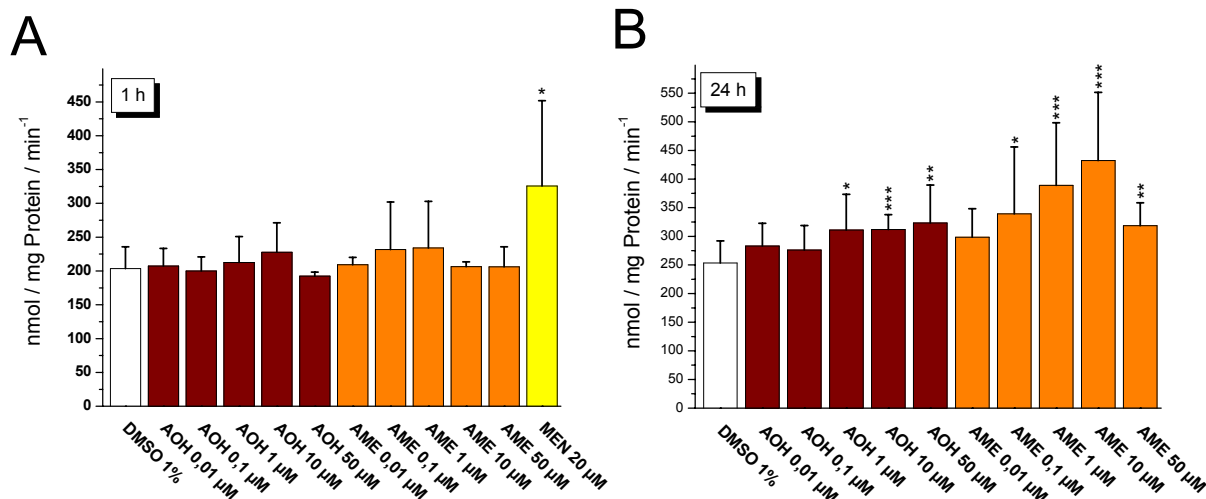


Abbildung 4-28: Messung der GST-Aktivität mittels GST Assay nach Habig et al. [1974]. Der Einfluss von AOH und AME auf die GST-Aktivität wurde nach (A) 1 h serumfreier und (B) 24 h serumhaltiger Inkubation in HT29 Zellen untersucht. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte \pm SD von mind. vier unabhängigen Experimenten. Signifikante Unterschiede der Proben zur Lösungsmittelkontrolle wurden mittels Student's *t*-Test berechnet (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$).

Nach einstündiger serumfreier Inkubation der HT29-Zellen ist kein Einfluss von AOH und AME auf die Enzymaktivität humaner GSTs zu beobachten (Abb. 4-28 A). Dagegen kommt es durch die Positivkontrolle MEN (20 μ M) zu einer signifikanten Erhöhung der GST-Aktivität.

Eine 24 h Inkubation von HT29-Zellen mit AOH und AME führt zur Aktivierung der GST-Isoenzymaktivität (Abb. 4-28 B). Ab 1 μ M AOH und 0,1 μ M AME ist die Erhöhung statistisch signifikant und steigt weiter konzentrationsabhängig an. Eine Ausnahme hierbei bildet AME in der Konzentration 50 μ M, dessen Wirkung im Vergleich zu 10 μ M reduziert ist. Ein möglicher Grund hierfür könnten potentielle zytotoxische Effekte sein. Wie unter Kapitel 6.7.4 beschrieben, wurden, aufgrund der Korrelation der GST-Aktivität zum Gehalt an tGSH, die behandelten Zellen für die GSH- und die GST-Bestimmung aus derselben Zellsuspension entnommen. BSO, das bekannt für seine GSH-Depletion nach Langzeitinkubation ist, beeinflusste jedoch nicht die GST-Aktivität (Daten nicht gezeigt).

Damit wurde kein direkter Zusammenhang zwischen der GST-Aktivität und dem zellulären tGSH-Gehalt (siehe Abschnitt 4.6.1) in HT29-Zellen beobachtet. Während nach 1 h der tGSH-Gehalt durch AOH verringert wird ist die GST-Aktivität durch das Mykotoxin nicht beeinflusst. Dagegen ist die GST-Aktivität durch AOH und AME nach

24 h erhöht, während zu diesem Zeitpunkt keine Modulation des zellulären tGSH-Gehaltes durch die Mykotoxine erfolgt. Eine mögliche Erklärung dafür bietet die Induktion des Nrf2/ARE-Signalweges (siehe Kapitel 4.5.2), der zwar nach 1 h bereits aktiviert ist, jedoch möglicherweise die Phase II Enzyme, in diesem Fall die GSTs, noch nicht exprimiert sind. Dafür spricht zudem, dass nach 24 h Inkubation eine erhöhte GST-Aktivität vorliegt, wobei postuliert werden kann, dass die Aktivitätserhöhung anhand erhöhter Konzentrationen an GSTs resultiert, da bekannt ist, dass GSTs ARE-regulierte Gene sind, die mittels des Nrf2-Signalweg transkribiert werden [Pool-Zobel et al., 2005].

Weiterhin konnte C. Kropat [2008] in seiner wissenschaftlichen Abschlussarbeit zeigen, dass die Gentranskription von GSTA2 nach 3 h Inkubation mit AOH in HT29-Zellen erhöht vorliegt, was diese Hypothese weiter untermauert.

Daher liegt es nahe, dass die Enzymklasse der GSTs in der Detoxifizierung der Mykotoxine AOH und AME mitinvolviert ist.

Überblick zur Induktion von oxidativem Stress durch AOH und AME

Die vorgestellten Ergebnisse deuten darauf hin, dass AOH und AME in der humanen Kolonkarzinomzelllinie HT29 oxidativen Stress induzieren. Dabei wurde nach einstündiger Inkubationsdauer die ROS-Bildung durch die beiden Mykotoxine mittels DCF Assay nachgewiesen und des Weiteren anhand einer Erhöhung des nukleären Nrf2-Proteingehaltes verifiziert. Im selben Zeitraum wurde ebenfalls die Reduktion des tGSH-Gehaltes durch AOH beobachtet, wobei keine Aktivitätsmodulation der relevanten GST-Isoenzyme erkennbar war. Da das Antioxidans GSH eine wichtige zelluläre Verteidigungsrolle gegenüber ROS einnimmt [Circu und Aw, 2008] und die Effekte in den unterschiedlichen Testsystemen im gleichen Konzentrationsbereich gemessen wurden, kann postuliert werden, dass AOH und AME nach 1 h oxidativen Stress induzieren und GSH an der antioxidativen zellulären Abwehr beteiligt ist. Dafür spricht zudem, dass die GST-Aktivität durch AOH und AME, vermutlich aufgrund einer Nrf2-abhängigen induzierten Genexpression der GST-Isoenzyme, nach 24 h erhöht ist, während zu diesem Zeitpunkt der tGSH-Status normalisiert ist. Diese Ergebnisse stehen somit in Einklang mit Studien von Pfeiffer et al. [2007a], die nach 24 h keine DNA-schädigende Wirkung von AOH und AME in HT29-Zellen beobachten konnten. Zusätzlich zur beschriebenen potenten Glukuronidierungsaktivität der HT29-Zellen, kann ein Beitrag der GSH-Konjugation zur Detoxifizierung der Mykotoxine postuliert werden.

Es bleibt festzuhalten, dass neben der Topoisomerase II-Giftung durch AOH und AME, ein weiterer genotoxischer Wirkmechanismus in Form der Induktion von oxidativem Stress durch die beiden Mykotoxine, gezeigt wurde. In diesem Zusammenhang korreliert die postulierte Beteiligung mehrerer DNA-Reparaturmechanismen nach der Behandlung mit AOH und AME, mit der Induktion von oxidativem Stress durch die beiden Mykotoxine, da anhand der Vielfalt an ROS-induzierten DNA-Schäden Reparaturmechanismen übergreifend involviert sind [Paz-Elizur et al., 2008].

4.7. Einfluss von AOH und AME auf Karzinomzellen unterschiedlicher Organe

Bei einigen bekannten Mykotoxinen wird eine gewisse Organspezifität beschrieben. So zeigt Aflatoxin B₁ eine ausgeprägte hepatotoxische Wirkung, während Ochratoxin A starke Effekte in der Niere aufweist [Wang und Groopman, 1999]. Daher sollte im Folgenden untersucht werden, ob die Mykotoxine AOH und AME auf Karzinomzellen eines bestimmten Organs eine Präferenz in ihrem Wirkprofil zeigen.

Dazu wurden humane Karzinomzellen des Kolons (HT29), der Leber (HepG2) und des Ösophagus (KYSE510) gewählt. Neben HT29-Zellen, die eine Zelllinie des Gastrointestinaltraktes repräsentieren, wurden HepG2-Zellen verwendet. Da bekannt ist, dass AOH und AME einem oxidativen Metabolismus unterliegen [Pfeiffer et al., 2007b], sollte die Wirkung der beiden Mykotoxine auf Zellen der Leber als zentrales Organ des Stoffwechsels mit einer ausgeprägten Enzymausstattung für den Fremdstoffmetabolismus untersucht werden. Des Weiteren wurden KYSE510-Zellen eingesetzt, da *Alternaria*-Toxine mit der Entstehung von Speiseröhrenkrebs in Verbindung gebracht werden [Liu et al., 1991].

Als biologische Endpunkte nach Toxinbehandlung mit den unterschiedlichen Zelllinien dienten das Zellwachstum, die Induktion von oxidativem Stress, die mögliche Induktion der Cytochrom-P450 abhängigen Monooxygenase (CYP) 1A1 und das genotoxische Potential.

4.7.1. Einfluss von AOH und AME auf das Zellwachstum von HepG2- und KYSE510-Zellen

Der Einfluss von AOH und AME auf das Zellwachstum wurde mittels SRB Assay untersucht, wobei die Zelllinien HepG2 und KYSE510 mit den Mykotoxinen für 24 h und 72 h in serumhaltigem Medium inkubiert wurden (Abbildung 4-29).

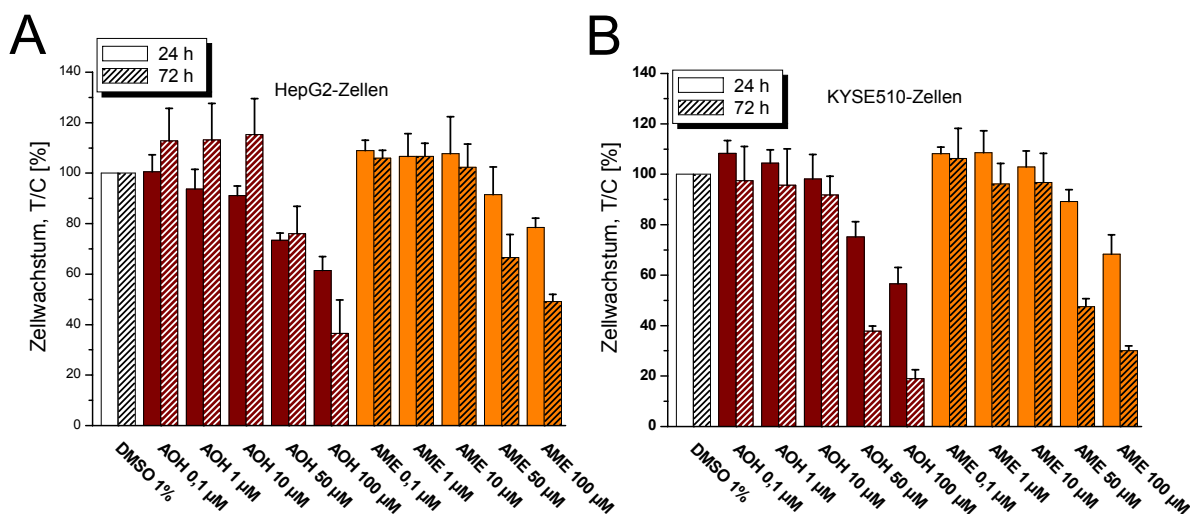


Abbildung 4-29: Einfluss von AOH und AME auf das Wachstum von (A) HepG2-Zellen und (B) KYSE510-Zellen mittels SRB Assay (in Zusammenarbeit mit J. Burkart, Wissenschaftliche Abschlussarbeit, 2009). Die unshraffierte Balken stellen die 24 h Inkubation dar, während die schraffierte Balken die gemessenen Werte nach 72 h Substanzbehandlung in serumhaltigem Kulturmedium zeigen. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte \pm SD von mind. vier unabhängigen Experimenten.

In HepG2-Zellen führt AOH zu einer konzentrationsabhängigen Abnahme des Zellwachstums (Abb. 4-29 A). Dabei konnte nach 24 h kein IC_{50} -Wert ermittelt werden, während der IC_{50} -Wert nach 72 h $84 \mu\text{M} \pm 12 \mu\text{M}$ beträgt. AME weist ebenfalls eine konzentrationsabhängige Abnahme an Lebendprotein in HepG2-Zellen auf, wobei ebenfalls kein IC_{50} -Wert nach 24 h ermittelt wurde, während der IC_{50} -Wert nach 72 h $92 \mu\text{M} \pm 10 \mu\text{M}$ beträgt. Somit scheint AOH potenter als AME das Wachstum von HepG2-Zellen zu hemmen.

Des Weiteren reduziert AOH in einer konzentrationsabhängigen Weise das Wachstum von KYSE510-Zellen (Abb. 4-29 B). Nach 24 h konnte kein IC_{50} -Wert berechnet werden, während der IC_{50} -Wert nach 72 h $42 \mu\text{M} \pm 10 \mu\text{M}$ beträgt. AME führt ebenfalls zu einer Wachstumshemmung in KYSE510-Zellen, wobei kein IC_{50} -Wert nach 24 h ermittelt wurde und der IC_{50} -Wert nach 72 h $48 \mu\text{M} \pm 3 \mu\text{M}$ beträgt. Damit scheinen AOH und AME einen vergleichbaren Einfluss auf das Wachstum von KYSE510-Zellen zu haben.

Der Vergleich der beiden untersuchten Zelllinien zeigt, dass KYSE510-Zellen sensibler auf die Mykotoxine AOH und AME reagieren, was anhand der höheren IC_{50} -Werte in HepG2-Zellen nach Toxinbehandlung erkennbar ist.

Die Wirkung von AOH und AME auf das Zellwachstum humaner Karzinomzelllinien ist in Tabelle 4-1 zusammengefasst, und umfasst Zelllinien des Kolons (HT29; Fehr, 2006), der Leber (HepG2) und der Speiseröhre (KYSE510).

Tabelle 4-1: Zusammenfassung der Ergebnisse des SRB Assays durch AOH und AME.

Zelllinie	Substanz	Wachstumshemmung IC ₅₀ -Wert	
		24 h	72 h
HT29	AOH	> 50 µM	42 ± 10 µM
	AME	nicht getestet	> 100 µM
HepG2	AOH	> 100 µM	84 ± 12 µM
	AME	> 100 µM	92 ± 10 µM
KYSE510	AOH	> 100 µM	42 ± 10 µM
	AME	> 100 µM	48 ± 3 µM

Es bleibt festzuhalten, dass AOH und AME das Wachstum aller untersuchter humaner Karzinomzelllinien in einer konzentrationsabhängigen Weise hemmen, wobei die Hemmwirkung nach 72 h stärker ausgeprägt war als nach 24 h.

Die Zelllinien weisen in Bezug auf ihre Sensitivität gegenüber den beiden Mykotoxinen deutliche Unterschiede auf. Dabei nimmt die Sensitivität der getesteten Zelllinien in der folgenden Reihenfolge ab: KYSE510 > HT29 > HepG2.

Die Verdopplungszeiten der Zelllinien scheint eine entscheidende Rolle hinsichtlich der Intensität der Hemmwirkung von AOH und AME spielen. So zeigen HepG2-Zellen mit einer Verdopplungszeit von 50-60 h eine langsamere Teilungsrate im Vergleich zu den anderen untersuchten Zelllinien, was in einer geringeren Sensitivität gegenüber den Mykotoxinen resultiert. KYSE510-Zellen hingegen zeigen mit ihrer vergleichsweise schnellen Verdopplungsrate (30 h) die größte Sensitivität hinsichtlich der untersuchten Mykotoxine.

Zudem ist zu erkennen, dass AOH in den untersuchten Zelllinien, mit Ausnahme der KYSE510-Zellen, potenter als AME wirkt. Dies steht im Einklang mit Untersuchungen von Aly et al. [2008], die aus *Alternaria*-Extrakten mittels chromatographischer Trennverfahren bekannte und neue sekundäre Metabolite von *Alternaria* isolieren

konnten. Neben AOH und AME wurden sulfatierte Derivate der Polyketide und neue Verbindungen, wie 4-Hydroxyalternariol 9-O-Methylether identifiziert (Abbildung 4-30) und mittels MTT Assay auf ihr zytotoxisches Potential hin untersucht.

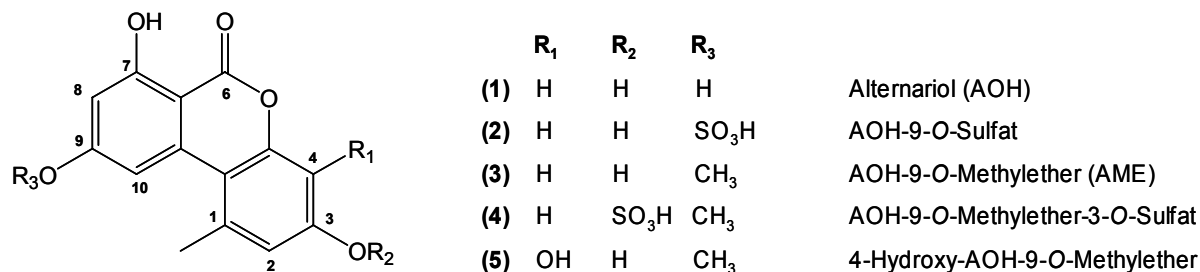


Abbildung 4-30: Chemische Strukturen der Alternariol-Derivate.

Dabei zeigte AOH den stärksten zytotoxischen Effekt, gefolgt von AOH-9-O-Sulfat und AME. Keine proliferationshemmende Wirkung dagegen zeigten die Verbindungen AOH-9-O-Methylether-3-O-Sulfat und 4-Hydroxy-AOH-9-O-Methylether. Dies lässt vermuten, dass die freie Hydroxylgruppe in Position 3 eine wichtige Rolle in Bezug auf das zytotoxische Potential spielt, da die Substitution dieser funktionellen Gruppe die Aktivität signifikant herabsetzt. Des Weiteren wurde gezeigt, dass die Anwesenheit einer zusätzlichen Hydroxylgruppe an Position 4 ebenfalls zu einer deutlichen Reduzierung an biologischer Wirkung führt. Weiterhin erhöht die Existenz des Laktone rings das zytotoxische Potential. Schließlich konnte aufgrund der Vielzahl an strukturell ähnlichen Verbindungen gezeigt werden, dass Moleküle, die nur einen Phenylring besitzen kein zytotoxisches Potential besitzen [Aly et al., 2008].

Insgesamt bleibt festzuhalten, dass die beiden Mykotoxine erst im mikromolaren Konzentrationsbereich (> 10 µM) in den untersuchten humanen Karzinomzelllinien zu wachstumshemmenden Effekten führen, was mit Smart et al. [2008] in Einklang steht, die zeigten, dass ein gewisses Maß an DNA-Schäden nötig ist, um zytotoxische Effekte manifestieren zu können.

4.7.2. Untersuchung zur Bildung von ROS durch AOH und AME

Es wurde bereits gezeigt, dass AOH und AME in HT29-Zellen die Fluoreszenzintensität im DCF Assay erhöhen, was auf die Generierung von ROS hindeutet (siehe Kapitel 4.5.1). Um eine valide Vergleichbarkeit der Karzinomzelllinien untereinander zu gewährleisten, wurden neben den HepG2-Zellen und den KYSE510-Zellen, nochmals HT29-Zellen im Experiment mitgeführt.

Des Weiteren konnte anhand der Untersuchungen zum Einfluss von AOH und AME auf den Transkriptionsfaktor Nrf2 gezeigt werden, dass zwar nach 20 min noch keine Erhöhung des nukleären Nrf2-Gehaltes vorlag, jedoch der Effekt nach 1 h bereits deutlich zu sehen ist (siehe Abschnitt 4.5.2). Da der Nrf2-Signalweg als potentielle Antwort auf reaktive Spezies gilt, sollte die Generierung der verantwortlichen ROS zuvor stattfinden.

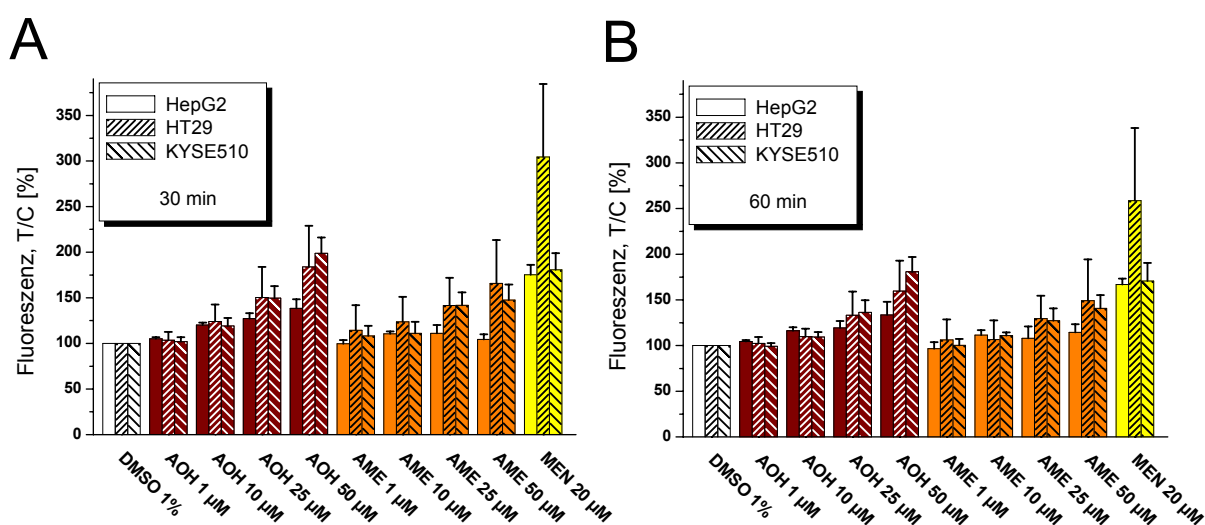


Abbildung 4-31: Nachweis zur Bildung von ROS durch AOH und AME mittels DCF Assay (in Zusammenarbeit mit J. Burkart, Wissenschaftliche Abschlussarbeit, 2009). Die Generierung von intrazellulären ROS durch AOH, AME und MEN wurde nach (A) 30 min und (B) 1 h Inkubation in HepG2- (unschraffierte Balken), KYSE510- (dicht schraffierte Balken) und HT29-Zellen (dünn schraffierte Balken) untersucht. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte \pm SD von mind. vier unabhängigen Experimenten.

AOH und AME führen, mit der Ausnahme von AME in HepG2-Zellen, nach 30 min serumfreier Inkubation in den drei untersuchten Zelllinien zu einem konzentrationsabhängigen Anstieg der Fluoreszenzintensität (Abb. 4-31 A). Dabei ist

erkennbar, dass HT29- und KYSE510-Zellen in ihrer Intensität vergleichbar sind, während HepG2-Zellen nach Mykotoxinbehandlung weniger ROS generieren.

Nach 1 h kommt es ebenfalls zu einem konzentrationsabhängigen Anstieg der Fluoreszenzintensität durch AOH und AME in den drei untersuchten Zelllinien (Abb. 4-31 B). Dabei zeigt der Graph ein ähnliches Profil im Vergleich zur 30-minütigen Inkubation, mit dem Unterschied, dass nach der einstündigen Inkubation ein Anstieg der Fluoreszenzintensität durch AME in HepG2-Zellen zu erkennen ist, was nach 30 min nicht der Fall ist. Daher kann vermutet werden, dass AME in HepG2-Zellen eine gewisse Zeit benötigt um ROS zu generieren. In diesem Zusammenhang könnte auch die Aufnahmekinetik der Mykotoxine in die Zelle relevant sein. So zeigten Burkhardt et al. [2009] mittels Caco-2 Millicell[®] System, dass AOH schneller als AME resorbiert wird.

Weiterhin fällt auf, dass die gemittelten Fluoreszenzintensitäten in HT29- und KYSE510-Zellen nach 30 min höher liegen, als nach 1 h. Somit scheint nach einer Stunde die ROS-Bildung bereits rückläufig zu sein. Eine Verringerung der Fluoreszenzintensität ist nach 2 h deutlich erkennbar (Daten nicht gezeigt).

Daneben wurde zusätzlich nach 15 min gemessen, um zu überprüfen, ob das Maximum der ROS-Bildung bereits noch früher eintritt. Jedoch waren nach 15 min lediglich schwache Effekte zu messen (Daten nicht gezeigt).

Damit stimmen die Ergebnisse der verschiedenen Inkubationszeiten in HT29-Zellen mit den Resultaten der Nrf2-Aktivierung durch AOH und AME (siehe Kapitel 4.5.2) überein, wo die Erhöhung des nukleären Nrf2-Proteins nach 1 h erkennbar war, während nach 20 min noch kein Effekt beobachtet wurde.

Da AOH und AME selbst nicht in der Lage sind „Redoxcycling“ zu betreiben, bleibt es ungeklärt wie dieser Effekt hervorgerufen wird. Jedoch besteht die Möglichkeit, dass AOH und AME zu reaktiveren Verbindungen metabolisiert werden. Diese oxidativen Metabolite mit Katechol- oder Hydrochinonstruktur [Pfeiffer et al., 2007b] wären weiterhin in der Lage reaktive Semichinone und Chinone zu generieren und dabei dem „Redoxcycling“ zu unterliegen. Beispielsweise kann das Anthracyclin Doxorubicin in Anwesenheit von Enzymen wie NADPH-Cytochrom-P450 Reduktase oder NADH Dehydrogenase zum Semichinon reduziert werden. Der Transfer eines Elektrons auf molekularen Sauerstoff führt zur Bildung von Superoxidradikalanionen, woraus wiederum H₂O₂ oder Hydroxylradikale entstehen können [Monneret, 2001].

AOH und AME zeigen eine geringe ROS-Bildung in den HepG2-Zellen im Vergleich zu den Zelllinien HT29 und KYSE510. Dies könnte mit dem hohen Glutathiongehalt in Leberzellen erklärt werden. So beschreiben Jakubowski und Bartosz [2000], dass je größer die Fluoreszenzerhöhung ist, desto geringer die Glutathion-Konzentration in der Zelle sei. Weiterhin besitzt die Leber als Hauptort der Biotransformation eine Vielzahl an weiteren Phase II-Enzymen, die möglicherweise in anderen Geweben nicht bzw. marginal exprimiert werden.

Insgesamt wurde gezeigt, dass AOH und AME in HepG2-, HT29- und KYSE510-Zellen ROS generieren, wobei die Bildungsrate in den unterschiedlichen Zellen nach Mykotoxinbehandlung variiert.

4.7.3. Einfluss von AOH und AME auf die Cytochrom-P450 abhängige Monooxygenase 1A1

AOH und AME führen in HT29- und KYSE510-Zellen zu oxidativem Stress, während lediglich ein marginaler Effekt in HepG2-Zellen beobachtet werden konnte. So stellte sich als nächstes die Frage, inwieweit detoxifizierende Enzyme in den verwendeten Zelllinien einen Einfluss auf das toxische Potential von AOH und AME ausüben. So ist bekannt, dass Naturstoffe im Phase I Fremdstoffmetabolismus durch eine metabolische Aktivierung ihr toxisches Potential deutlich erhöhen können [Pobst und Ames, 2006].

AOH und AME können oxidativ metabolisiert werden, wobei insbesondere die Cytochrom-P450 abhängige Monooxygenase (CYP) 1A1 an der Umsetzung beteiligt ist, gefolgt von CYP1A2, CYP2C19 und CYP3A4 [Pfeiffer et al., 2008a]. Weiterhin zeigte Chudziak [2008] in ihrer Diplomarbeit die Induktion der CYP1A1 in Maushepatomzellen (HepaC7) nach AOH-Behandlung, wobei diese Induktion wohl unter Beteiligung des „Arylhydrocarbon“ Rezeptor (AhR)-Signalweges abläuft.

Im Falle von CYP1A1 handelt es sich um ein extrahepatisches Isoenzym [Ding und Kaminsky, 2003], das verstärkt im Ösophagus exprimiert wird [Morita et al., 1997]. Durch die Bioaktivierung vieler Prokanzerogene ist CYP1A1 häufig in der Kanzerogenese beteiligt [Hernández- Martínez et al., 2007].

Daher sollte im Folgenden untersucht werden, ob AOH und AME die Gentranskription und Aktivität der CYP1A1-Isoform induzieren und dabei eine Präferenz der beiden Mykotoxine gegenüber den humanen Karzinomzelllinien der Leber (HepG2), des Kolons (HT29) und des Ösophagus (KYSE510) aufweist. Dabei sollte die relative Transkriptmenge von CYP1A1 mittels Real Time PCR untersucht werden sowie die CYP1A1-Aktivität im Ethoxyresorufin-O-Deethylase (EROD) Assay gemessen werden.

4.7.3.1. Einfluss von AOH und AME auf die Gentranskription von CYP1A1

Enzyme der CYP-Familie werden oftmals in Abhängigkeit von der Fremdstoffexposition induziert, wobei die Gentranskription der CYP1-Familie zumeist mittels des AhR-Signalweges erfolgt [Kawajiri und Fujii-Kuriyama, 2007].

Die Modulation der Gentranskription nach der Behandlung mit AOH und AME wurde mittels Real Time PCR untersucht. Als Positivkontrolle wurde Aroclor (ARO) verwendet, ein Gemisch aus polychlorierter Biphenyle (PCB), das für die Induktion von CYP1-Isoenzymen bekannt ist [Whitlock, 1999].

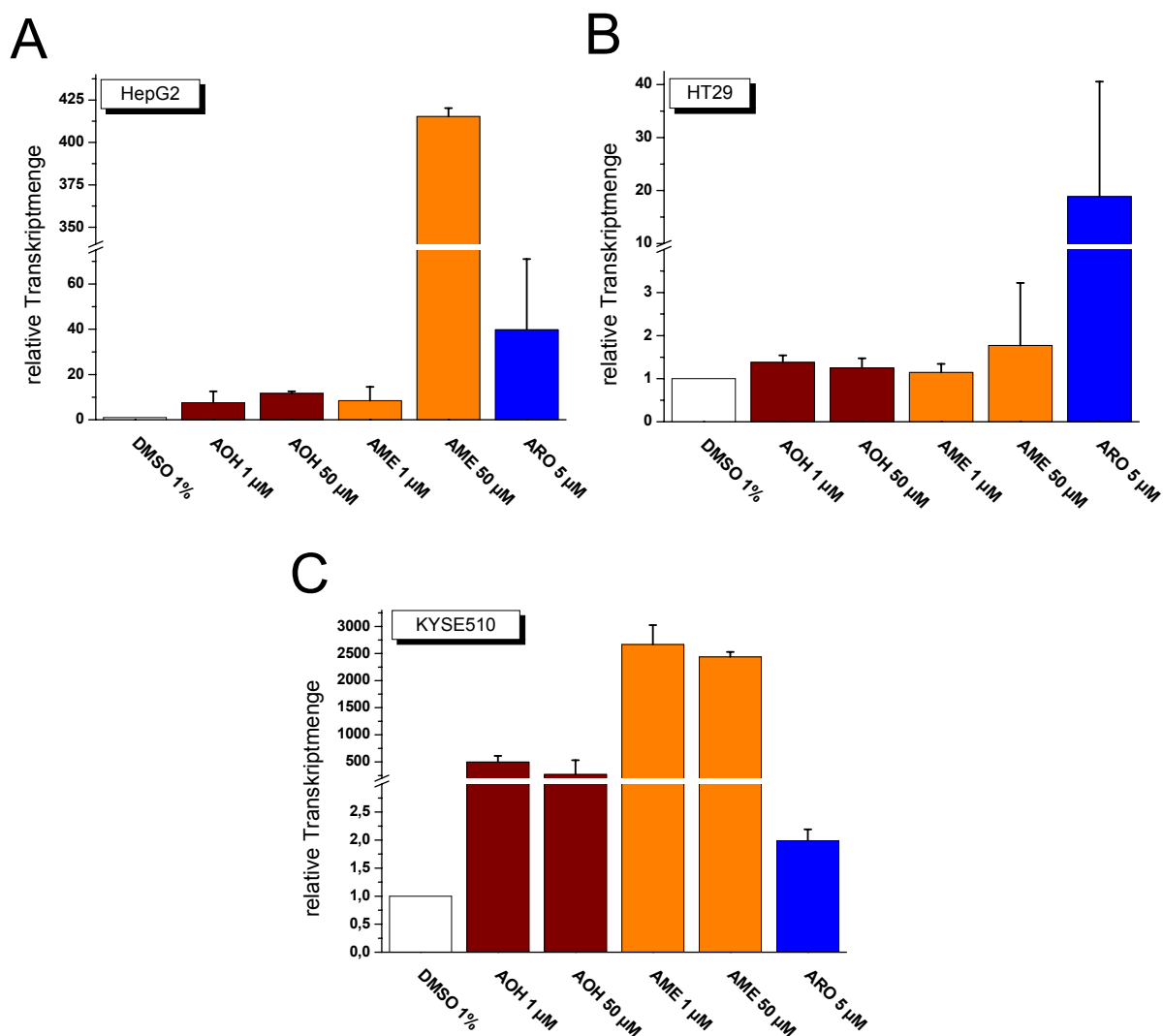


Abbildung 4-32: Modulation der relativen Gentranskription von CYP1A1 in (A) HepG2-, (B) HT29- und (C) KYSE510-Zellen nach 24 h serumhaltiger Inkubation mit AOH, AME und ARO. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte \pm SD von mind. drei unabhängigen Experimenten.

Die relative Transkriptmenge von CYP1A1 ist in HepG2-Zellen nach 24 h Inkubation durch AOH, AME und ARO im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle erhöht (Abb. 4-32 A). Im Falle von AOH und AME ist eine konzentrationsabhängige Erhöhung der transkriptionellen Induktion von CYP1A1 zu erkennen. Während 1 μM AOH um das 8-fache erhöht ist, steigt die Induktion bei 50 μM auf das 12-fache an. Ein deutlich stärkerer Unterschied ist bei AME zu erkennen. 1 μM AME erhöht die relative Transkriptmenge von CYP1A1 auf das 8-fache und ist damit mit 1 μM AOH vergleichbar, wogegen 50 μM AME eine etwa 415-fache Induktion aufweist und damit den stärksten Effekt der untersuchten Substanzen aufweist. Daneben ist die Positivkontrolle ARO (5 μM) 40-fach erhöht.

In HT29-Zellen führt lediglich die Inkubation mit 5 μM ARO zu einer deutlichen Modulation der Gentranskription von CYP1A1 mit einer 19-fachen Erhöhung der relativen Transkriptmenge bezogen zur Lösungsmittelkontrolle (Abb. 4-32 B), während AOH und AME keine transkriptionelle Induktion von CYP1A1 vermitteln.

Dagegen zeigen AOH und AME eine potente Induktion von CYP1A1 in KYSE510-Zellen auf Transkriptionsebene, bezogen zur Lösungsmittelkontrolle DMSO (Abb. 32 C). Während 1 μM AOH die relative Transkriptmenge um das 498-fache erhöht, ist bei 50 μM AOH ein 263-facher Anstieg erkennbar. Eine deutlich stärkere Induktion von CYP1A1 im Vergleich zu AOH ist in dieser Zelllinie mit AME zu beobachten. AME erhöht in der Konzentration 1 μM die Transkription um das 2668-fache und 50 μM AME führen zu einer Erhöhung der relativen Transkription um das 2438-fache. Auffallend bei den KYSE510-Zellen ist, dass die Positivkontrolle ARO mit einer 2-fachen Erhöhung der relativen Transkriptmenge zu einer marginalen Induktion der Transkription von CYP1A1 führt.

Zum besseren Überblick der deutlichen Unterschiede bezüglich der induzierten Gentranskription von CYP1A1 nach 24 h Inkubation mit AOH, AME und ARO im Falle der Zelllinien HepG2, HT29 und KYSE510 untereinander, sind die Ergebnisse in Abbildung 4-33 zusammengefasst.

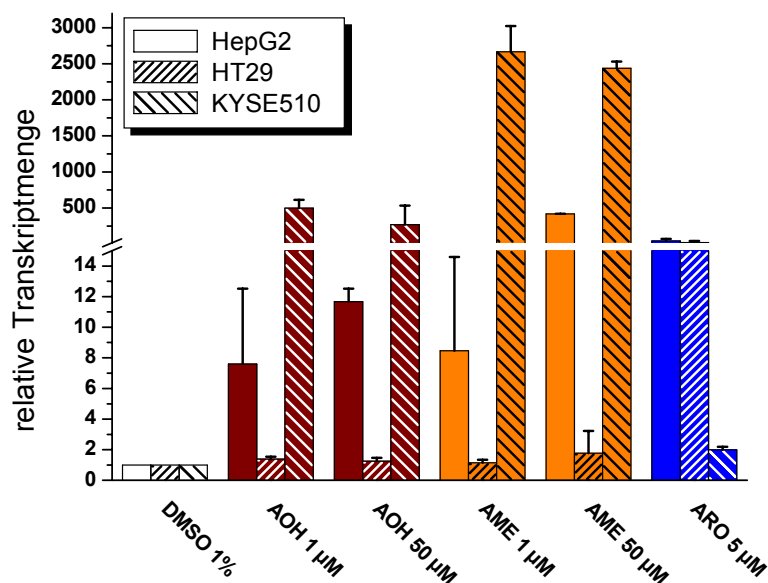


Abbildung 4-33: Modulation der relativen Gentranskription von CYP1A1 in HepG2-, HT29- und KYSE510-Zellen nach 24 h serumhaltiger Inkubation mit AOH, AME und ARO. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte \pm SD von mind. drei unabhängigen Experimenten.

Es bleibt festzuhalten, dass AOH und AME die Gentranskription von CYP1A1 in HepG2-Zellen und in einem stärkeren Ausmaß in KYSE510-Zellen induzieren, während in HT29-Zellen keine Induktion von CYP1A1 durch die Mykotoxine detektiert wurde.

Es kann davon ausgegangen werden, dass AOH und AME CYP1A1 durch die Aktivierung des Ah-Rezeptors induzieren, was im Falle von AOH in der Diplomarbeit von Chudziak [2008] gezeigt werden konnte. Das CYP1A1-Gen wird nicht konstitutiv exprimiert, ist jedoch stark induzierbar [Guigal et al., 2000], was mit der Induktion der relativen Transkriptmenge von CYP1A1 durch die Mykotoxine einhergeht.

Die transkriptionelle Induktion von CYP1A1 durch die beiden Mykotoxine AOH und AME zeigt, dass im Falle einer Risikoabschätzung es Sinn macht, den oxidativen Metabolismus der beiden Mykotoxine mit zu berücksichtigen. Daher sollte als nächstes der Frage nachgegangen werden, ob diese Induktion von CYP1A1 auf Transkriptionsebene, auch mit den korrespondierenden Proteinen, genauer auf Enzymaktivitätsebene beobachtet werden kann.

4.7.3.2. Einfluss von AOH und AME auf die Enzymaktivität von CYP1A1

Anhand der starken transkriptionellen Induktion von CYP1A1 durch AOH und AME sollte im Folgenden die Aktivitätsbestimmung von CYP1A1 mittels Ethoxyresorufin-O-Deethylase (EROD) Assay nach Behandlung der drei verschiedenen Karzinomzelllinien mit den beiden Mykotoxinen untersucht werden. Neben einer potentiellen Aktivitätserhöhung von CYP1A1 durch die beiden Mykotoxine, stand dabei eine mögliche Zeitabhängigkeit im Fokus.

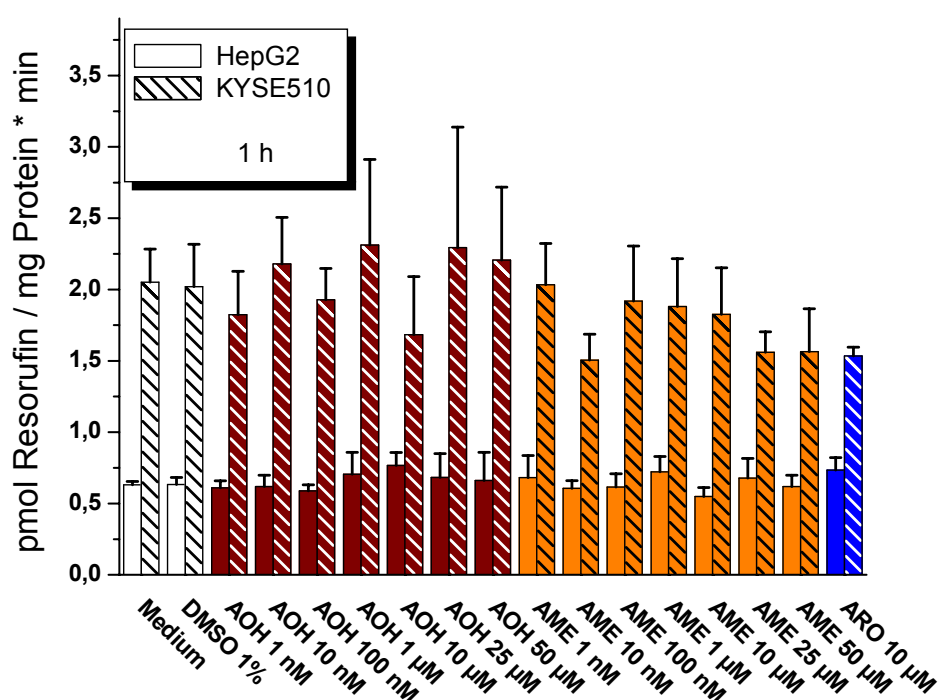


Abbildung 4-34: CYP1A1 Aktivitätsmessung in HepG2- und KYSE510-Zellen nach 1 h, serumfreier Inkubation mit AOH, AME und ARO. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte \pm SD von mind. drei unabhängigen Experimenten.

AOH und AME zeigen nach 1 h Inkubation keine Erhöhung der CYP1A1-Aktivität in HepG2- und KYSE510-Zellen, was auch für die Positivkontrolle ARO gilt. Anhand der Lösungsmittelkontrolle DMSO wird deutlich, dass KYSE510-Zellen eine stärkere CYP1A1-Aktivität als HepG2-Zellen aufweisen (Abbildung 4-34). Damit scheinen KYSE510-Zellen eine gewisse Grundaktivität an CYP1A1 aufzuweisen. Dies korreliert mit der Tatsache, dass die Mukosa des humanen Ösophagus große Mengen an CYP1A1 exprimiert [Lechevrel et al., 1999].

Bei Kurzzeitinkubationen ist es eher unwahrscheinlich, dass Biotransformationsreaktionen die biologische Wirkung von Xenobiotika in Karzinomzelllinien beeinflussen, da fremdstoffmetabolisierende Enzyme, speziell im Falle der CYPs, marginal exprimiert werden und die Induktion der Biotransformation Zeit benötigt. Jedoch könnten anhand der Grundaktivität der vorhandenen CYP1A1-Isoenzyme in KYSE510-Zellen AOH und AME bereits nach 1 h oxidativ metabolisiert werden.

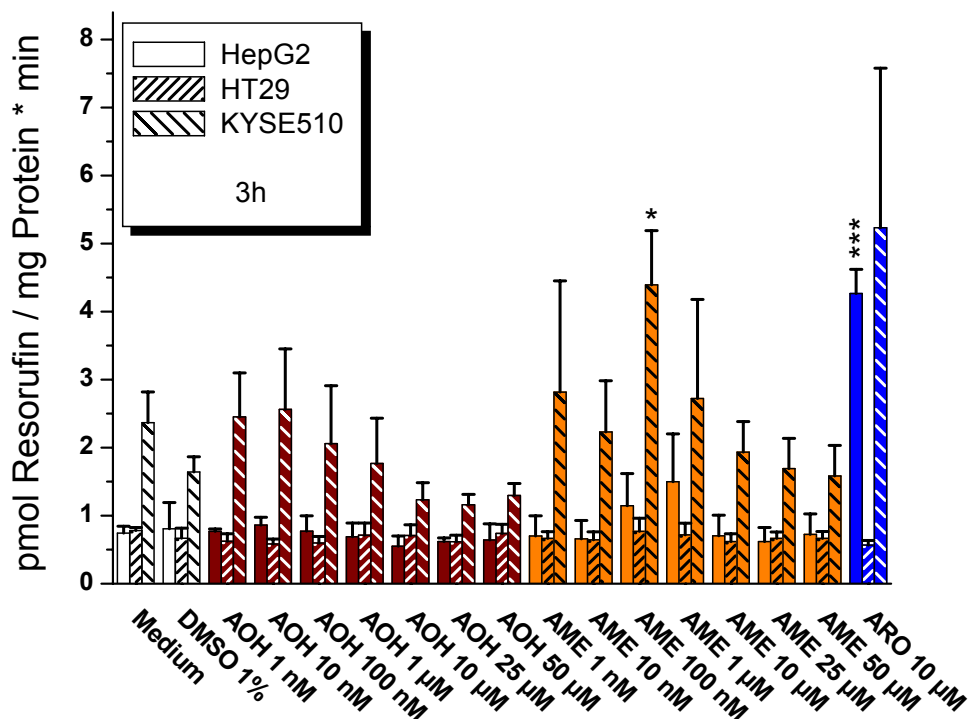


Abbildung 4-35: CYP1A1 Aktivitätsmessung in HepG2-, HT29- und KYSE510-Zellen nach 3 h serumfreier Inkubation mit AOH, AME und ARO. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte \pm SD von mind. drei unabhängigen Experimenten. Signifikante Unterschiede der Proben zur Lösungsmittelkontrolle wurden mittels Student's *t*-Test berechnet (* = $p < 0,05$; *** = $p < 0,001$).

In HT29-Zellen ist nach 3 h Inkubation in serumfreiem Kulturmedium mit AOH, AME und ARO keine erhöhte CYP1A1-Aktivität zu erkennen (Abbildung 4-35).

In HepG2-Zellen zeigt AOH ebenfalls keine Erhöhung der Aktivität von CYP1A1, während ein Anstieg der Enzymaktivität von AME marginal und von ARO (10 μ M) statistisch signifikant zu erkennen ist.

In KYSE510-Zellen führt AME in der Konzentration 100 nM zu einer signifikanten Erhöhung der CYP1A1-Aktivität, während es im Falle von AOH zu keiner deutlichen Erhöhung kommt. Ebenfalls eine deutliche Erhöhung der CYP1A1-Aktivität weist ARO auf, die jedoch nicht statistisch signifikant ist.

Weiterhin fällt auf, dass AOH und AME in höheren Konzentrationen ($\geq 10 \mu\text{M}$) die Enzymaktivität vermindern. Möglicherweise dominieren in höheren Konzentrationen andere biologische Wirkungen der Mykotoxine, die eine CYP1A1-Aktivitätserhöhung beeinflussen. So wird die CYP1A1-Expression größtenteils über den AhR-Signalweg vermittelt [Whitlock, 1999], wobei auch bekannt ist, dass Serum CYP1A1, unabhängig vom AhR-Signalweg aktiviert [Guigal et al., 2000]. Der AhR/XRE-Signalweg ist beispielsweise mit dem Nrf2/ARE-Signalweg gekoppelt [Köhle und Bock, 2007]. Da AOH und AME den Nrf2-Signalweg aktivieren (siehe Kapitel 4.5.2) wäre eine Möglichkeit, dass hohe Konzentrationen der Mykotoxine zu einer Modulation im „Crosstalk“ zwischen dem AhR- und Nrf2-Signalweg führen und damit alternative Reaktionen der Zelle ausgelöst werden. Weiterhin ist bekannt, dass der Ah-Rezeptor weitere Gene der Biotransformation aktivieren kann [Nebert et al., 2000]. Eine relevante Genfamilie könnten dabei humane UDP-Glukuronosyltransferasen (UGTs) darstellen, die AhR-vermittelt induziert werden [Münzel et al., 1999] und AOH und AME effektiv entgiften können [Pfeiffer et al., 2008b].

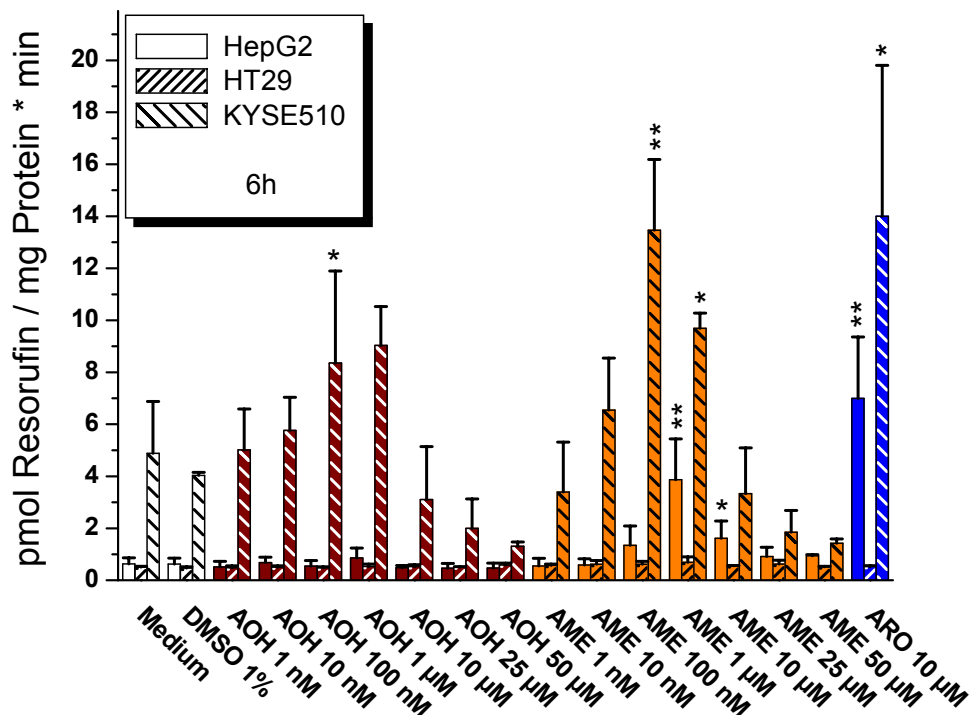


Abbildung 4-36: CYP1A1 Aktivitätsmessung in HepG2-, HT29- und KYSE510-Zellen nach 6 h serumfreier Inkubation mit AOH, AME und ARO. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte \pm SD von mind. drei unabhängigen Experimenten. Signifikante Unterschiede der Proben zur Lösungsmittelkontrolle wurden mittels Student's *t*-Test berechnet (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$).

Nach 6 h Inkubation der HT29-Zellen in serumfreien Kulturmedium mit AOH, AME und ARO ist wiederum keine erhöhte CYP1A1-Aktivität zu erkennen (Abb. 4-36).

In HepG2-Zellen ist bei 1 μM AOH eine schwache Erhöhung der Aktivität von CYP1A1 erkennbar, während in der gleiche Konzentration von AME ein signifikanter Anstieg der Enzymaktivität von CYP1A1 zu beobachten ist. Weiterhin erscheint der Konzentrationsbereich zwischen 100 nM und 10 μM AME als U-Kurve, da es wiederum in höheren Konzentrationen zu einem Abfall der CYP1A1-Aktivität kommt, wobei 10 μM AME gegenüber der Lösungsmittelkontrolle ebenfalls statistisch signifikant erhöht ist. Den stärksten Effekt auf die CYP1A1-Aktivität in HepG2-Zellen, der ebenfalls signifikant ist, weist ARO auf.

In KYSE510-Zellen führen AOH (100 nM) und AME (100 nM und 1 μM) zu einer signifikanten Erhöhung der CYP1A1-Aktivität. Wiederum kommt es in höheren Konzentrationen von AOH und AME ($\geq 10 \mu\text{M}$) zu einem Abfall der CYP1A1-Aktivität. Weiterhin zeigt die Positivkontrolle ARO eine signifikante Erhöhung der CYP1A1-Aktivität, die mit 100 nM AME vergleichbar ist.

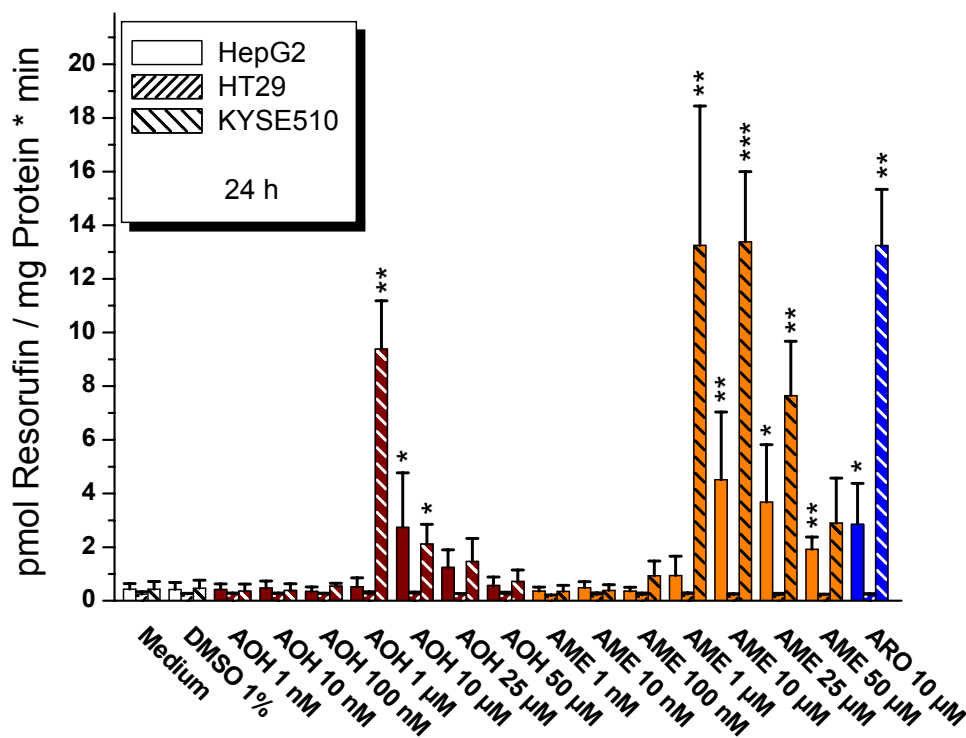


Abbildung 4-37: CYP1A1 Aktivitätsmessung in HepG2-, HT29- und KYSE510-Zellen nach 24 h serumhaltiger Inkubation mit AOH, AME und ARO. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte \pm SD von mind. drei unabhängigen Experimenten. Signifikante Unterschiede der Proben zur Lösungsmittelkontrolle wurden mittels Student's *t*-Test berechnet (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$).

Nach 24 h Inkubation der HT29-Zellen in serumhaltigem Kulturmedium mit AOH, AME und ARO ist weiterhin keine erhöhte CYP1A1-Aktivität zu erkennen (Abb. 4-37). In HepG2-Zellen führen AOH (1 μM) und AME (10 μM , 25 μM und 50 μM) zu einer signifikanten Erhöhung der CYP1A1-Aktivität. Damit scheinen sich die Wirkmaxima der beiden Mykotoxine hin zu höheren Konzentrationen zu verschieben, was besonders im Falle von AME auffällt. Zwar ist die Erhöhung der Enzymaktivität von ARO signifikant, jedoch weniger ausgeprägt als nach 6 h Inkubation.

In KYSE510-Zellen führen AOH (1 μM und 10 μM) und AME (1 μM , 10 μM und 25 μM) zu einer signifikanten Erhöhung der CYP1A1-Aktivität. Damit verschieben sich die Wirkmaxima der beiden Mykotoxine wiederum hin zu höheren Konzentrationen. Daneben zeigt die Positivkontrolle ARO eine signifikante Erhöhung der CYP1A1-Aktivität, die mit AME im Konzentrationsbereich 1-10 μM vergleichbar ist.

Nach 24 h ist im Vergleich zu den Kurzzeitinkubationen die CYP1A1-Aktivität in der Medium- und Lösungsmittelkontrolle in KYSE510-Zellen verringert, ebenso wie in den Konzentrationen von AOH und AME, wo es zu keiner Erhöhung der CYP1A1-Aktivität kommt. Ein möglicher Grund hierfür ist, dass bei der Langzeitinkubation serumhaltiges Medium verwendet wurde und damit die CYP1A1-Grundaktivität verändert vorliegen könnte. So konnten Guigal et al. [2000] zeigen, dass Serum die CYP1A1-Aktivität beeinflussen kann und damit einhergehend das Grundlevel an Enzymaktivität moduliert. Dabei wird vermutet, dass physiologische Komponenten, die im FKS enthalten sind, die CYP1A1-Genexpression induzieren und zwar unabhängig vom AhR-Signalweg [N'Guyen et al., 2002]. Ein Einfluss von FKS auf die CYP1A1-Aktivität kann in den Kurzzeitinkubationen ausgeschlossen werden, da hierbei serumfrei inkubiert wurde. Auch im Falle der Langzeitinkubation von 24 h bleibt zu sagen, dass im Experiment 10%-FKS-haltiges Kulturmedium verwendet wurde, während in der Studie von Guigal et al. [2000] 20% FKS eingesetzt wurde.

Zellen mit einer ausgeprägten CYP-Aktivität besitzen verstärkte Detoxifizierungsmöglichkeiten gegenüber ROS, da CYPs an der Bildung von ROS beteiligt sein können [Green et al., 2008]. Dies wäre eine mögliche Erklärung für die geringe ROS-Bildung der Mykotoxine in HepG2-Zellen (siehe Abschnitt 4.7.2). Zwar führen die KYSE510-Zellen zu einer im Vergleich zu HepG2-Zellen stärkeren Erhöhung der CYP1A1-Aktivität nach Mykotoxinbehandlung, jedoch sollte bedacht werden, dass CYP1A1 ein extrahepatisches Enzym darstellt, das vor allem in der Speiseröhre

vorkommt [Lechevrel et al., 1999]. Dagegen exprimiert die Leber als wichtiges Organ im Fremdstoffmetabolismus eine Vielzahl an CYPs [Seliskar und Rozman, 2007], deren Aktivität im EROD Assay nicht detektiert werden. In diesem Zusammenhang ist zu erwähnen, dass die Methode zwar als Nachweis für die CYP1A1-Aktivität gilt, dieses Testsystem jedoch nicht absolut spezifisch wirkt. So ist bekannt, dass im EROD Assay auch die Aktivität der CYP1B1 gemessen wird [Green et al., 2008].

Damit korrelieren die Ergebnisse der Enzymaktivitätsmessung mit den Untersuchungen auf Transkriptionsebene bezüglich des Proteins CYP1A1. Während AOH und AME keine Induktion von CYP1A1 in HT29-Zellen zeigen, kommt es in HepG2-Zellen zu einer moderaten und in KYSE510-Zellen zu einer starken Induktion von CYP1A1. Insgesamt zeigt AME stets den stärkeren Effekt im Vergleich zu AOH, was in Einklang mit Beobachtungen von Pfeiffer et al. [2008a] steht, die zeigten, dass AME ein besseres Substrat für CYP1A1 darstellt. Der potente Anstieg der CYP1A1-Aktivität durch die Inkubation mit AOH und AME könnte anhand der planaren Struktur der beiden Mykotoxine erklärt werden, da diese als Voraussetzung für potentielle Substrate der CYP1A1 beschrieben ist [Lewis et al., 1994].

Die erhöhte CYP1A1-Aktivität könnte mit einer verstärkten oxidativen Metabolisierung von AOH und AME einhergehen und damit eine metabolische Aktivierung darstellen, die für das mutagene Potential der beiden Mykotoxine eine bedeutende Rolle einnehmen könnte. Die kanzerogene Wirkung der *Alternaria*-Toxine wird vor allem mit einer erhöhten Inzidenz an Speiseröhrenkrebs assoziiert [Liu et al., 1991]. Es ist bekannt, dass CYP1A1 verstärkt in der Speiseröhre exprimiert wird [Murray et al., 1994]. Daher könnten in der Speiseröhre verstärkt oxidative Metaboliten von AOH und AME gebildet werden, die möglicherweise ein stärkeres toxisches Potential als die Ausgangsverbindungen aufweisen.

Weiterhin werden im Speiseröhrengewebe verstärkt Glutathion-S-Transferasen (GSTs) exprimiert, jedoch mit großen individuellen Unterschieden [Peters et al., 1993]. Dass GSTs eine mögliche Detoxifizierungsmöglichkeit von AOH und AME darstellen, wurde im Kapitel 4.6.2 gezeigt. Damit besteht eine gewisse Analogie zu polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen, die ebenfalls von CYPs metabolisch aktiviert werden und anhand einer Konjugation mit Glutathion, vermittelt durch die GSTs, detoxifiziert werden können [Kabler et al., 2009]. Aufgrund von Polymorphismen der GSTs sind Menschen unterschiedlich stark betroffen. Dabei

kann die Detoxifizierung in unterschiedlichem Maße ablaufen und somit zu einem individuellen Krebsrisiko beitragen. So zeigten Zhou et al. [2009], dass auch der so genannte *exon7*-Polymorphismus von CYP1A1 das Risiko für Speiseröhrenkrebs bei Asiaten erhöht, während Westeuropäer nicht betroffen sind. Anhand dieser Tatsachen erscheint es möglich, dass die *Alternaria*-Toxine AOH und AME, möglicherweise nach metabolischer Aktivierung, in den beschriebenen Fällen in China [Liu et al., 1991] in der Ätiologie von Speiseröhrenkrebs mitinvolviert waren. Inwiefern eine metabolische Aktivierung das toxische Potential vieler Verbindungen modulieren kann [Guengerich, 2008], zeigt das Beispiel Ellipticin, das zudem gewisse Parallelitäten zu den Mykotoxinen AOH und AME aufweist. Ellipticin (Abbildung 4-38), ein Alkaloid isoliert aus *Apocyanacea* Pflanzen, stellt eine antineoplastische Verbindung dar [Poljaková et al., 2009].

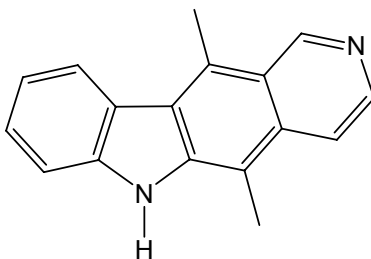


Abbildung 4-38: Struktur von Ellipticin.

Die Wirkmechanismen von Ellipticin basieren hauptsächlich auf DNA-Interkalation [Chu und Hsu, 1992] und Hemmung der Topoisomerase II [Auclair, 1987; Monnot et al., 1991]. Daneben erhöht sich das genotoxische Potential von Ellipticin nach Zugabe von S9-Mix [DeMarini und Lawrence, 1992], was einer metabolischen Aktivierung gleichkommt. Weiterhin ist bekannt, dass die Verbindung selbst CYP1A1, mittels des AhR-Signalweges, induziert [Gasiewicz et al., 1996; Chang und Puga, 1998] und oxidative Metaboliten von Ellipticin, verursacht durch CYPs [Stiborová et al., 2001] und Peroxidasen [Poljaková et al., 2005] zur Bildung von kovalenten DNA-Addukten führen. Aufgrund ähnlicher biologischer Wirkungen von AOH und AME gegenüber Ellipticin, wäre es zu diskutieren, ob die beiden Mykotoxine nach metabolischer Aktivierung ebenfalls kovalente DNA-Addukte bilden könnten. Es bleibt festzuhalten, dass AOH und AME die Enzymaktivität von CYP1A1 in HepG2- und KYSE510-Zellen erhöhen und dieser Effekt zeitabhängig zunimmt, während in HT29-Zellen keine CYP1A1-Aktivität messbar ist.

4.7.4. Vergleich des genotoxischen Potentials von AOH und AME in HepG2- und KYSE510-Zellen

Das genotoxische Potential von AOH und AME wurde bereits in der humanen Vulvakarzinomzelllinie A431 und den beiden Kolonkarzinomzelllinien HCT116 und HT29 (siehe Kapitel 4.3.3 und 4.4.3; Fehr et al., 2009) gezeigt. Dabei wiesen die Zelllinien zum Teil große Unterschiede bezüglich der durch AOH und AME induzierten DNA-Strangbruchrate auf. Daher sollte im Rahmen der Fragestellung einer potentiellen Organspezifität der beiden Mykotoxine, der Einfluss von AOH und AME auf die DNA-Integrität in humanen Karzinomzelllinien der Leber (HepG2) und des Ösophagus (KYSE510) mittels neutralem und alkalischem Comet Assay untersucht werden

4.7.4.1. Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen durch AOH und AME in HepG2- und KYSE510- Zellen

AOH und AME führen in humanen Vulvakarzinomzellen (A431, siehe Kapitel 4.3.3) und den Kolonkarzinomzelllinien (HCT116 und HT29, siehe Kapitel 4.4.3) nach einstündiger Inkubation zu einer Erhöhung der Schweifintensität im neutralen Comet Assay. Darauf basierend sollten im Folgenden die humanen Karzinomzelllinien HepG2 und KYSE510 untersucht werden.

Abbildung 4-39 zeigt das Ergebnis der beiden Mykotoxine nach einstündiger serumfreier Inkubation in HepG2- und KYSE510-Zellen.

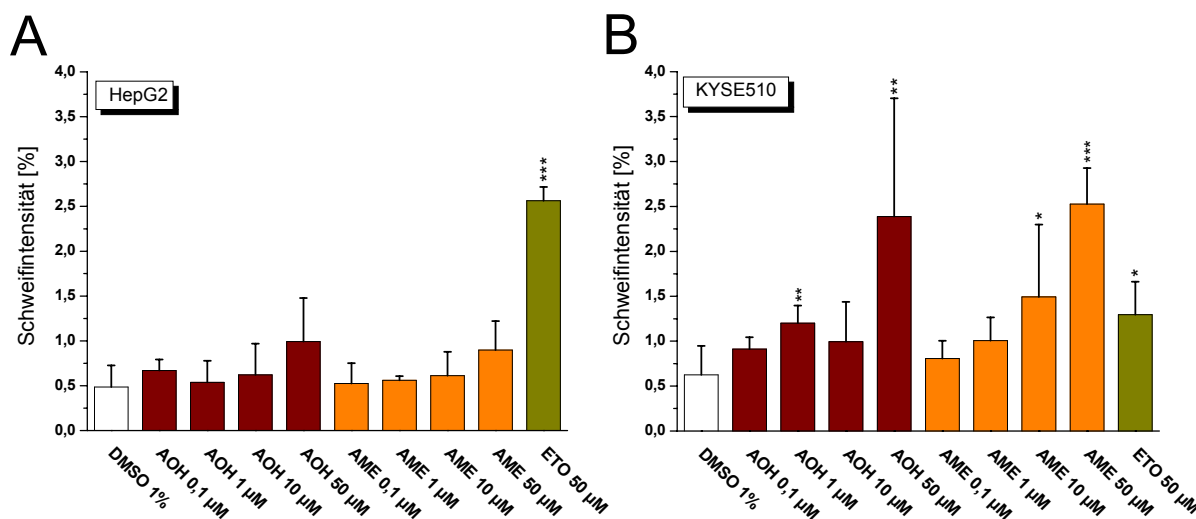


Abbildung 4-39: Nachweis des genotoxischen Potentials von AOH und AME mittels neutralem Comet Assay (in Zusammenarbeit mit J. Burkart, Wissenschaftliche Abschlussarbeit, 2009). Die Schweifintensitäten von AOH, AME und ETO wurden nach 1 h Inkubation in (A) HepG2- und in (B) KYSE510-Zellen untersucht. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte \pm SD von mind. vier unabhängigen Experimenten. Signifikante Unterschiede der Proben zur Lösungsmittelkontrolle wurden mittels Student's *t*-Test berechnet (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$).

In HepG2-Zellen führen weder AOH, noch AME nach 1 h Inkubation zu einer deutlichen Erhöhung an Schweifintensität (Abb. 4-39 A). Es ist zwar eine schwache Tendenz einer konzentrationsabhängigen Steigung der DNA-Schäden zu erkennen, jedoch ist diese auch in der höchsten eingesetzten Konzentration von 50 μ M nicht statistisch signifikant, wohingegen eine signifikante Erhöhung der DNA-Doppelstrangbruchrate durch die Positivkontrolle ETO zu erkennen ist.

Dagegen führt die Inkubation der KYSE510-Zellen sowohl mit AOH als auch mit AME im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle DMSO zu einer Erhöhung der DNA-Doppelstrangbruchrate (Abb. 4-39 B). Eine signifikante Erhöhung der Schweifintensität wird bei einer Konzentration von 1 μ M AOH und bei 10 μ M AME gemessen. Auffällig im Experiment mit den KYSE510-Zellen ist, dass ETO, zwar im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle signifikant, jedoch relativ schwach ausgeprägt ist.

Damit deutet sich in der Ösophaguskarzinomzelllinie KYSE510, nicht aber in der HepG2-Zelllinie, eine Generierung von DNA-Doppelstrangbrüchen nach AOH- und AME-Behandlung an.

Ein Grund für die ausgeprägte Resistenz der HepG2-Zellen gegenüber AOH und AME könnte die Proteinexpression der Leberzellen darstellen. Der häufigste

Mechanismus einer Resistenz gegenüber exogener Verbindungen in Tumorzellen wird in Korrelation mit MDR-Transportern [Gros et al., 1986] oder MDR assoziierter Proteinexpression [Grant et al., 1994; Zaman et al., 1994] gebracht. Daneben scheinen insbesondere relevante DNA-Reparaturenzyme und Enzyme des Fremdstoffmetabolismus involviert zu sein. Neben einer effektiven DNA-Reparatur sollte die Leber als Hauptort der Biotransformation eine Vielzahl an detoxifizierenden Enzymen enthalten, die ausreichen könnten, AOH und AME zu entgiften.

Diese erhöhte Resistenz der HepG2-Zellen gegen eine Generierung von DNA-Doppelstrangbrüchen durch AOH- und AME, korreliert mit den Ergebnissen im DCF Assay, wo die HepG2-Zelllinie eine geringere Sensitivität gegenüber Mykotoxin-induzierter ROS aufweist. Ein Zusammenhang dieser toxikologisch relevanten Parameter wird von Boldogh et al. [2003] beschrieben, indem sie postulieren, dass oxidativer Stress zu einer Erniedrigung der DNA-Doppelstrangbruchreparatur führt, aufgrund einer reduzierten Kinaseaktivität der DNA-Proteinkinasen.

In Tabelle 4-2 sind die gemessenen Schweifintensitäten der Lösungsmittelkontrolle DMSO, sowie den höchsten AOH- und AME-Konzentrationen (50 µM) nach einstündiger serumfreier Inkubation in den untersuchten humanen Karzinomzelllinien zusammengefasst.

Tabelle 4-2: Zusammenfassung der Ergebnisse im neutralen Comet Assay nach Inkubation mit der Lösungsmittelkontrolle DMSO, AOH und AME.

Zelllinie	Schweifintensität [%]		
	DMSO 1%	AOH 50 µM	AME 50 µM
A431	0,7 ± 0,4	2,3 ± 0,7	2,2 ± 0,8
HCT116	0,6 ± 0,2	1,9 ± 0,7	1,7 ± 0,5
HT29	0,3 ± 0,2	2,1 ± 0,8	1,9 ± 0,8
HepG2	0,5 ± 0,2	1,0 ± 0,5	0,9 ± 0,3
KYSE510	0,6 ± 0,3	2,4 ± 1,3	2,5 ± 0,4

Zusammengefasst kann gesagt werden, dass AOH und AME in vergleichbarem Ausmaß in den humanen Karzinomzelllinien A431, HCT116, HT29 und KYSE510

DNA-Doppelstrangbrüche generieren, während dies in HepG2-Zellen nicht beobachtet wurde.

4.7.4.2. DNA-strangbrechende Wirkung von AOH und AME in HepG2- und KYSE510-Zellen

Der Unterschied an gemessener Schweifintensitäten zwischen den HepG2- und KYSE510-Zellen nach einstündiger AOH- und AME-Behandlung im neutralen Comet Assay, wirft die Frage auf, ob dieser Unterschied im Comet Assay unter alkalischen pH-Bedingungen ebenfalls Bestand hat, da diese Form der Einzelzellelektrophorese deutlich mehr Arten an DNA-Modifikationen bzw. DNA-Schäden erfassen kann [Møller, 2006]. Zusätzlich wurden die Proben mit dem bakteriellen Enzym Formamidopyrimidin-DNA-Glykosylase (Fpg) behandelt, um potentielle oxidative DNA-Schäden, basierend auf Fpg-sensitiven-Stellen, zu erkennen.

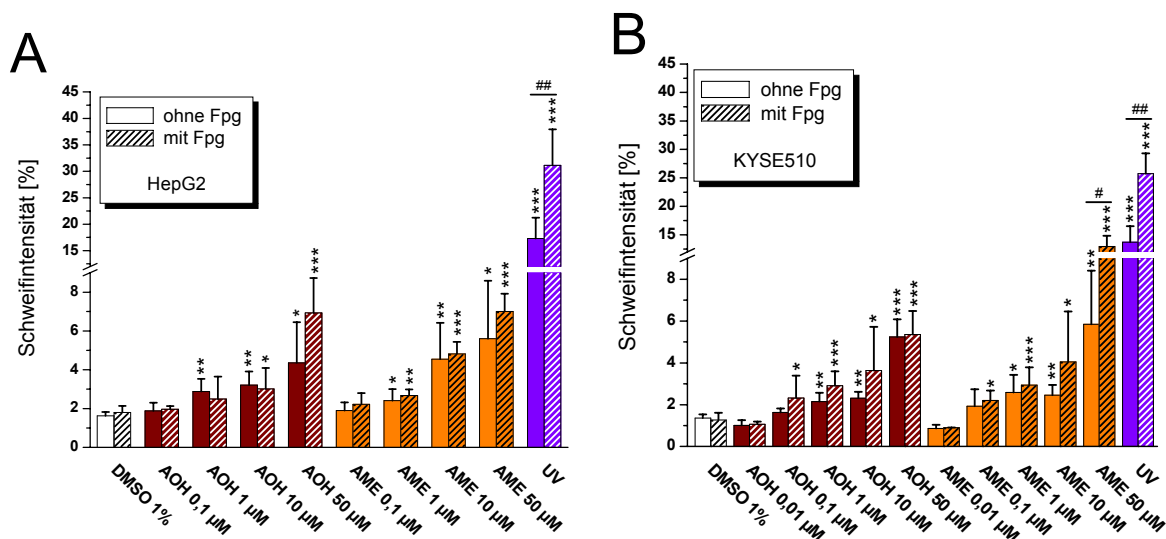


Abbildung 4-40: Untersuchung zur genotoxischen Wirkung mittels alkalischem Comet Assay (in Zusammenarbeit mit J. Burkart, Wissenschaftliche Abschlussarbeit, 2009). Die DNA-strangbrechenden Effekte von AOH und AME wurden nach 1 h serumfreier Inkubation mit (A) HepG2- und (B) KYSE510-Zellen untersucht. Als Positivkontrolle dienten Zellen, die mit UV-B bestrahlt wurden. Die schraffierten Balken repräsentieren die Fpg-behandelten Proben. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte \pm SD von mind. vier unabhängigen Experimenten. Signifikante Unterschiede wurden mittels Student's *t*-Test berechnet. Dabei beziehen sich die Sterne auf die jeweilige Lösungsmittelkontrolle, während die Rauten signifikante Unterschiede aufgrund der Fpg-Behandlung darstellen (*, # = $p < 0,05$; **, ## = $p < 0,01$; ***, ### = $p < 0,001$).

Während die Inkubation der Lösungsmittelkontrolle DMSO, AOH und AME in HepG2- und KYSE510-Zellen für 1 h in serumfreien Kulturmedium stattfand, wurden die Zellen als Positivkontrolle für 2 min mit UV-B (312 nm, 15 J) bestrahlt. AOH und AME führen nach 1h Inkubation in HepG2-Zellen zu einer konzentrationsabhängigen Erhöhung der DNA-Strangbruchrate (Abb. 4-40 A). Dabei führen die Toxine ab 1 μM zu einem statistisch signifikanten Unterschied zur DMSO-Lösungsmittelkontrolle. Weiterhin zeigen weder AOH noch AME, die in ihrer induzierten DNA-Schädigung untereinander vergleichbar sind, keinen signifikanten Unterschied im Falle der induzierten DNA-Strangbruchrate zwischen den Fpg-unbehandelten und Fpg-behandelten Proben, was gegen eine oxidative DNA-Schädigung, basierend auf Fpg-sensitiven-Stellen durch die Mykotoxine spricht. Eine signifikante Erhöhung der Schweifintensität der Fpg-behandelten Probe im Vergleich zur Fpg-unbehandelten Probe zeigt die Positivkontrolle UV-bestrahlter Zellen.

In KYSE510-Zellen führen AOH und AME ebenfalls zu einer konzentrationsabhängigen Erhöhung der DNA-Strangbruchrate (Abb. 4-40 B). Dabei ist die DNA-Strangbruchrate bereits ab 0,1 μM AOH und AME bei den Fpg-behandelten Proben erkennbar. Damit gibt es erste Hinweise, dass AOH und AME Fpg-sensitive-Modifikationen in der Zelllinie KYSE510 induzieren. Jedoch kann lediglich ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen Fpg-unbehandelten und Fpg-behandelten Proben, im Falle von 50 μM AME bestimmt werden. Daneben führen ebenfalls UV-bestrahlte Zellen zu einer signifikanten Erhöhung der DNA-Strangbruchrate bei der Fpg-behandelten Probe im Vergleich zur Fpg-unbehandelten Probe. Damit bleibt festzuhalten, dass AOH und AME in KYSE510-Zellen ein vergleichbares DNA-strangbrechendes Potential wie in HepG2-Zellen aufweisen, mit der Ausnahme 50 μM AME nach Fpg-Behandlung, in der ein deutlich stärkeres genotoxisches Potential gemessen wurde.

Die DMSO-Lösungsmittelkontrolle liegt in beiden Zelllinien im Bereich von 1-2% und zeigt des Weiteren keine Unterschiede aufgrund der Fpg-Behandlung. Dies steht in Einklang mit den Beobachtungen von Smith et al. [2006], die selbst im Falle toxischer DMSO-Konzentrationen in Mauslymphomzellen (L5178Y) keine Erhöhung der DNA-Strangbruchrate nach Fpg-Behandlung beobachten konnten.

Neben der Positivkontrolle UV-Bestrahlung, die zusätzlich eine signifikante Erhöhung der DNA-Strangbruchrate bei den Fpg-behandelten Proben im Vergleich zu den Fpg-

unbehandelten Proben in beiden Zelllinien aufweist, ist dies ebenfalls bei 50 μM AME (ohne Fpg: 5,8%; mit Fpg 12,9%), nicht jedoch bei 50 μM AOH (ohne Fpg: 5,2%; mit Fpg 5,4%) in KYSE510-Zellen zu erkennen. Diese erhöhte Schweifintensität nach Fpg-Behandlung stellt einen Hinweis dar, dass oxidative DNA-Schäden, basierend auf Fpg-sensitiven-Stellen, nach Behandlung der KYSE510-Zellen mit 50 μM AME entstanden sind. Das bakterielle Fpg-Protein besitzt neben einer N-Glykosylase-Aktivität auch eine apurine(AP)-Lyase-Aktivität [Tchou et al., 1994]. 8-Oxoguanin-DNA-Glykosylase (OGG1) stellt das humane Homolog dar, wobei Fpg etwa 80-fach schneller mutagene oxidative DNA-Läsionen reparieren kann [Frosina, 2006]. Die bekannteste oxidative DNA-Läsion, die von Fpg prozessiert wird, stellt 8-Oxo-Guanin dar [Sidorenko und Zharkov, 2008]. Daneben ist Fpg in der Lage, weitere oxidative DNA-Modifikationen zu erkennen, die in Kapitel 2.4.1 dargestellt sind.

Die Detektion oxidativer DNA-Schäden, basierend auf Fpg-sensitiven-Modifikationen von 50 μM AME in KYSE510-Zellen, könnte eine Folge der Bildung oxidativer Metaboliten sein. So induziert AME in KYSE510-Zellen CYP1A1-Isoenzyme (siehe Abschnitt 4.7.3), die in der Lage sind, AME zu hydroxylieren und damit oxidative Metabolite mit Katecholstruktur zu generieren. Der weitere Metabolismus der Katechole kann zu reaktiven Semichinonen und Chinonen führen, die in der Lage sind, ROS und DNA-Addukte zu bilden [Pfeiffer et al., 2008a]. Zwar ist eine CYP1A1-Induktion ebenfalls in HepG2-Zellen zu sehen, jedoch ist diese deutlich schwächer ausgeprägt als in KYSE510-Zellen.

Weiterhin sind oxidative DNA-Schäden dafür bekannt durch die BER repariert zu werden [Wallace, 1998], die bekanntlich abhängig von PCNA ist [Frosina, 2006]. Der Einfluss von PCNA auf die DNA-schädigende Wirkung von AOH wurde bereits in Kapitel 4.4.2 gezeigt. Daneben kann ebenfalls die NER in der Reparatur oxidativer DNA-Schäden involviert sein [Reardon et al., 1997]. Die Reparatur von oxidativen DNA-Schäden erfolgt relativ schnell, wobei Halbwertszeiten von etwa 10 Minuten typisch sind [Collins und Horváthová, 2001; Aka et al., 2004]. Daher ist es möglich, dass die anderen Substanzkonzentrationen von AOH und AME zwar oxidative DNA-Schäden verursachen, jedoch diese nicht ausreichend sind, um detektiert zu werden. Ein Einfluss potentieller oxidativer Metabolite von AOH und AME in HepG2-Zellen und KYSE510-Zellen wird zudem bekräftigt, dass AME in diesen Zelllinien stärkere Effekte hervorruft als AOH. Dagegen wirkt AOH in HT29-Zellen, die keine

detektierbare CYP1A1-Aktivität besitzen, stärker als AME, was auch im Falle der A431-Zellen beobachtet werden konnte.

Tabelle 4-3 fasst die durchgeführten Experimente mittels alkalischem Comet Assay mit AOH und AME in den untersuchten Zelllinien zusammen.

Tabelle 4-3: Zusammenfassung der Ergebnisse im alkalischen Comet Assay nach Inkubation mit der Lösungsmittelkontrolle DMSO, AOH und AME mit und ohne Fpg Behandlung. Fpg, Formamidopyrimidin-DNA-Glykosylase; n. b., nicht bestimmt.

Zelllinie	Schweifintensität [%]					
	DMSO 1%		AOH 50 µM		AME 50 µM	
	- Fpg	+ Fpg	- Fpg	+ Fpg	- Fpg	+ Fpg
A431	3,2 ± 1,1	4,2 ± 2,1	13,0 ± 1,7	13,6 ± 2,3	9,4 ± 2,8	11,3 ± 1,9
HCT116	1,6 ± 0,6	n. b.	7,7 ± 4,5	n. b.	n. b.	n. b.
HT29	1,0 ± 0,8	1,3 ± 1,3	4,8 ± 2,1	4,6 ± 2,8	3,0 ± 1,7	3,2 ± 1,8
HepG2	1,6 ± 0,2	1,8 ± 0,3	4,4 ± 2,1	6,9 ± 1,8	5,6 ± 3,0	7,0 ± 0,9
KYSE510	1,3 ± 0,2	1,7 ± 0,6	4,6 ± 1,5	5,0 ± 1,2	5,2 ± 2,4	8,6 ± 4,9

Es bleibt festzuhalten, dass AOH und AME in allen getesteten Zelllinien DNA-Schäden induzieren, was mit Literaturwerten übereinstimmt [Liu et al., 1992; Pfeiffer et al., 2007b]. Dabei konnten Unterschiede in der Sensitivität gegenüber AOH und AME festgestellt werden, wobei HT29-Zellen scheinbar eine ausgeprägte Resistenz besitzen, während A431-Zellen sensitiv auf die beiden Mykotoxine reagieren.

Diese Unterschiede in der Sensitivität von verschiedenen Zelllinien korreliert mit Daten aus der Literatur. So ist bekannt, dass genotoxische Effekte Zelltyp-spezifisch ausfallen und hierbei von Faktoren abhängig sind, wie der DNA-Schadensantwort und Reparaturkapazität, was zumeist zwischen Zelllinien variiert [Lynch et al., 2003]. Es bleibt zu sagen, dass die DNA-strangbrechende Wirkung von AOH und AME die genotoxische Relevanz der beiden Mykotoxine zumindest *in vitro* bekräftigt.

Überblick zum Einfluss von AOH und AME auf unterschiedliche Karzinomzellen

Die Ergebnisse aus den Untersuchungen von AOH und AME mit unterschiedlichen humanen Karzinomzelllinien sind in Tabelle 4-4 zusammengefasst.

Tabelle 4-4: Zusammenfassung der Ergebnisse zur zellspezifischen Wirkung von AOH und AME. -, keine Wirkung; ↑, schwache Wirkung; ↑↑, mittlere Wirkung; ↑↑↑, starke Wirkung, AOH, AME.

Biologische Wirkung (Testsystem)	Zelllinie (Organ)					
	HepG2 (Leber)		HT29 (Kolon)		KYSE510 (Speiseröhre)	
Hemmung des Zellwachstums (SRB Assay)	↑↑	↑	↑↑↑	↑	↑↑↑	↑↑↑
ROS-Bildung (DCF Assay)	↑	-	↑↑↑	↑↑	↑↑↑	↑↑
Gentranskription CYP1A1 (Real Time PCR)	↑	↑↑	-	-	↑↑	↑↑↑
CYP1A1-Aktivität (EROD Assay)	↑	↑↑	-	-	↑↑	↑↑↑
DNA-Doppelstrangbrüche (neutraler Comet Assay)	-	-	↑↑	↑↑	↑↑↑	↑↑↑
DNA-Schäden (alkalischer Comet Assay)	↑↑	↑↑	↑	↑	↑↑↑	↑↑↑
Oxidative DNA-Schädigung (Fpg-Behandlung)	-	-	-	-	-	↑

AOH und AME hemmen das Zellwachstum aller untersuchter humaner Karzinomzelllinien: HepG2, KYSE510, A431 (siehe Kapitel 4.3.2.1) und HT29 [Fehr, 2006]. Dabei scheint die Wirkstärke der Wachstumshemmung mit der

Verdopplungszeit der Zelllinie zu korrelieren, wobei AOH stets einen stärkeren Effekt als AME ausübt.

Dies wurde ebenfalls anhand der Induktion von oxidativem Stress beobachtet, wo AOH nach 30 min Inkubation von HT29- und KYSE510-Zellen eine ähnliche ROS-Bildung auslöst, während HepG2-Zellen deutlich resistenter reagieren. Im Falle von AME ist eine ROS-Bildung in HepG2-Zellen erst nach 1 h Inkubation schwach zu erkennen, wogegen diese Inkubationsdauer im Allgemeinen schwächere Effekte aufweist als nach 30-minütiger Mykotoxininkubation.

Die Gentranskription und Enzymaktivität von CYP1A1 wird durch AOH und AME in HepG2 und KYSE510 Zellen deutlich induziert, wobei AME eine stärkere Wirkung als AOH vermittelt und weiterhin KYSE510-Zellen eine stärkere Induktion als HepG2-Zellen zeigen. Dagegen wird in HT29-Zellen nach Toxinbehandlung die CYP1A1-Aktivität nicht beeinflusst. Damit besteht die Möglichkeit, dass die metabolische Aktivierung von AOH und AME gewebsspezifisch erfolgen könnte.

Die DNA-Schädigung durch AOH und AME wurde in verschiedenen Zelllinien nachgewiesen. Während KYSE510-Zellen Hinweise auf DNA-Doppelstrangbrüche nach AOH- und AME-Behandlung aufweisen, war dies in HepG2-Zellen nicht der Fall. Damit zeigen die Leberzellen wie bei der ROS-Bildung eine gewisse Resistenz gegenüber den Mykotoxinen, was möglicherweise mit der metabolischen Kapazität der Leberzellen zu tun hat. Dagegen konnten im Comet Assay unter alkalischen pH-Bedingungen in HepG2- und KYSE510-Zellen DNA-Schäden detektiert werden, was das genotoxische Potential der beiden Mykotoxine unterstreicht. Dabei wurde in Hinblick auf alle in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien zwar keine deutliche Präferenz beobachtet. Jedoch wurden im Fall von 50 μM AME in KYSE510-Zellen oxidative DNA-Schäden, basierend auf Fpg-sensitiven-Stellen, detektiert. Im Zusammenhang mit dem Ergebnis zur CYP1A1-Induktion kann vermutet werden, dass diese Schäden durch oxidative Metabolite von AME herrühren.

5. Zusammenfassung

Im Fokus dieser Arbeit stand die Untersuchung potentieller Wirkmechanismen zur Genotoxizität der Mykotoxine Alternariol (AOH) und Alternariolmonomethylether (AME). Eine Interaktion beider Mykotoxine mit humanen Topoisomerase II-Enzymen konnte sowohl im zellfreien Testsystem als auch in der intakten Zelle nachgewiesen werden. Hierbei wurde eine Präferenz zur II α -Isoform festgestellt, die im Zellsystem schwächer ausgeprägt war. Weiterhin wurde gezeigt, dass der Hemmmechanismus auf einer Stabilisierung des kovalenten Enzym-DNA-Intermediates beruht und damit AOH und AME als Topoisomerase II-Gifte wirken. Hingegen konnte keine Topoisomerase I-Giftung in der Zelle beobachtet werden.

Um den Beitrag der Topoisomerase II-Giftung an der DNA-strangbrechenden Wirkung zu untersuchen, wurden transfizierte Zellen, in denen die Expression der Tyrosyl-DNA-Phosphodiesterase 1 (TDP1) moduliert wurde, nach AOH-Behandlung auf ihre DNA-Integrität untersucht. Das humane Enzym TDP1 ist in der Lage, den stabilisierten Topoisomerase-DNA-Komplex zu lösen. Daher wurde zum einen die Zelllinie HEK293-GFP-TDP1 gewählt, die TDP1 überexprimiert und zum anderen die Zelllinie HCT-116 eingesetzt, bei welcher mittels siRNA-Technologie die Expression humaner TDP1 unterdrückt wurde. In HEK293-GFP-TDP1-Zellen konnte eine deutliche Erniedrigung der DNA-Schäden im Vergleich zu den Kontrollzelllinien HEK293-GFP und HEK293-GFP-TDP1^{H263A} (inaktive Form) beobachtet werden, wohingegen in HCT116-Zellen die DNA-Strangbruchrate verglichen mit der parentalen Zelllinie stark erhöht war. Diese Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass die Topoisomerase II-Giftung an der DNA-schädigenden Wirkung von AOH beteiligt ist.

Weiterhin wurde der Einfluss relevanter Proteine, die an der DNA-Reparatur beteiligt sind, auf die DNA-Integrität untersucht. Als Schlüsselproteine dienten dabei Ku70, welches an dem DNA-Reparaturmechanismus von DNA-Doppelstrangbrüchen („Non Homologous End Joining“, NHEJ) beteiligt ist und „Proliferating Cellular Nuclear Antigen“ (PCNA), was eine entscheidende Rolle in der Basen-Exzisionsreparatur (BER) spielt. Hierfür wurde die Expression von Ku70 und PCNA in HCT116-Zellen unterdrückt, was in einem statistisch signifikanten Anstieg der DNA-Strangbruchrate

nach AOH-Behandlung resultierte. Damit konnte gezeigt werden, dass verschiedene Reparaturmechanismen als Zellantwort auf die Einwirkung von AOH aktiviert werden. Aufgrund der Tatsache, dass reaktive Sauerstoffspezies (ROS) sowohl zur Topoisomerasegiftung beitragen als auch oxidative DNA-Schäden verursachen können, wodurch der BER-Mechanismus aktiviert wird, lag ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit auf der Untersuchung der Induktion von oxidativem Stress durch AOH und AME. Die Bildung von ROS und die Erhöhung des nukleären Gehaltes des Transkriptionsfaktors „Nuclear Factor Erythroid 2p45 (NF-E2)-Related Factor“ 2 (Nrf2) konnte in HT29-Zellen gezeigt werden. Als weitere Zellantwort auf oxidativen Stress wurde der zelluläre Glutathion (GSH)-Spiegel untersucht. Durch die Behandlung mit dem Mykotoxin AOH wurde der GSH-Gehalt nach 1 h vermindert, was auf die Bildung von ROS schließen lässt, da GSH als zelluläres Antioxidans wirkt. GSH spielt weiterhin eine wichtige Rolle im Phase II-Metabolismus, wobei die Enzymklasse der Glutathion-S-Transferasen (GST) die Konjugation von GSH an die entsprechenden Xenobiotika katalysiert. Nach 24 h konnte eine Erhöhung der GST-Aktivität festgestellt werden, die vermutlich auf einer Nrf2-abhängigen induzierten Genexpression resultiert. Daher kann postuliert werden, dass zur Detoxifizierung von AOH und AME in HT29-Zellen zum einen der Nrf2-Signalweg und zum anderen die Konjugation mit GSH involviert sind.

Die Hypothese, dass AOH und AME in der Entstehung von Speiseröhrenkrebs beteiligt sind, veranlasste Untersuchungen an Zelllinien unterschiedlicher Organe. Hierzu wurden humane Karzinomzelllinien der Speiseröhre (KYSE510), des Kolons (HT29) und der Leber (HepG2) eingesetzt und nach AOH- und AME-Behandlung auf Bildung von ROS, Induktion von Cytochrom-P450 abhängige Monooxygenasen (CYP) 1A1 und Einfluss auf die DNA-Integrität untersucht.

Dabei konnte gezeigt werden, dass AOH und AME ROS in den untersuchten Zelllinien generieren. HT29- und KYSE510-Zellen zeigten eine ähnliche Sensitivität gegenüber den Mykotoxinen, während HepG2-Zellen eine gewisse Resistenz gegenüber AOH und AME aufwiesen.

Eine zellspezifische Wirkung von AOH und AME zeigte sich in Hinblick auf die CYP1A1-Induktion. Dabei wurde sowohl auf Gentranskriptionsebene als auch bezüglich der CYP1A1-Aktivitätsmessung beobachtet, dass die Induktion von CYP1A1 in KYSE510-Zellen deutlich stärker ausfiel als in HepG2-Zellen. Hingegen

war keinerlei CYP1A1-Induktion durch die Mykotoxine in HT29-Zellen messbar. Weiterhin war AME, sowohl auf Gentranskriptionsebene als auch in der CYP1A1-Enzymaktivität, potenter als AOH.

Weiterhin induzieren AOH und AME in allen untersuchten Zelllinien DNA-Doppelstrangbrüche mit Ausnahme der HepG2-Zellen, in denen keine statistisch signifikante Erhöhung der DNA-Strangbruchrate gemessen wurde. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen zur ROS-Bildung, wo ebenfalls in dieser Zelllinie keine Effekte auftraten. Zudem führten die Mykotoxine in allen untersuchten Zelllinien zu DNA-Einzelstrangbrüchen. Dabei kann die Wirkstärke wie folgt zusammengefasst werden: HT29 < HCT116 ~ HepG2 ~ KYSE510 << A431.

Im Allgemeinen konnten keine oxidativen DNA-Schäden basierend auf Formamidopyrimidin-DNA-Glykosylase (Fpg)-sensitiven-Stellen detektiert werden. Ausschließlich durch AME-Einwirkung wurden derartige oxidative Schäden in einer Konzentration von 50 µM in KYSE510-Zellen beobachtet. In Zusammenhang mit den Ergebnissen von AOH und AME mit CYP1A1 kann postuliert werden, dass dieser intensive Phase I-Metabolismus mögliche oxidative Metaboliten mit Katecholstruktur generiert, die eine erhöhte oxidative DNA-Schädigung hervorrufen. Damit könnte die Speiseröhre, möglicherweise verstärkt durch eine metabolische Aktivierung, einen relevanten Angriffspunkt der beiden *Alternaria*-Toxine AOH und AME darstellen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass AOH und AME ein potentes DNA-strangbrechendes Potential aufweisen und dabei die Interaktion mit humanen Topoisomerasen und die Induktion von oxidativem Stress involviert sind. Darüber hinaus kann postuliert werden, dass DNA-Reparaturmechanismen sowie Biotransformationsreaktionen einen wichtigen Beitrag zur Modulation des genotoxischen Potentials dieser Mykotoxine leisten.

6. Material und Methoden

6.1. Zellkultur

6.1.1. Verwendete Zelllinien

A431 Zelllinie

Diese Zelllinie stammt aus einem Epidermoidkarzinom der Vulva, welches einer 85-jährigen Frau entnommen wurde [Giard et al., 1973]. Die den Fibroblasten ähnlichen Zellen wachsen als Monolayer und zeigen auch nach langer Kultivierung ihre maligne Charakteristik. Der Karyotyp dieser Zelllinie ist hypertriploid (Chromosomenzahl 74) mit 24% Polyploidie. Als Kulturmedium wurde „Minimum Essential Medium“ (MEM) nach Zugabe von 4,5 g/l L-Glutamin verwendet. Die Verdopplungszeit liegt bei etwa 80-100 h [Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Braunschweig].

HCT116 Zelllinie

Die humane Kolonkarzinomzelllinie HCT116 wurde aus dem Tumor eines erwachsenen Mannes isoliert. Durch Mutationen in den Genen Ras, Rad50 und Mre11 werden die entsprechenden Proteine nur in geringem Umfang exprimiert [Koh et al., 2005]. Aufgrund des fehlenden Mlh1 sind diese Zellen NMR-defizient [Parsons et al., 1993] und besitzen keine Glukuronidierungsaktivität [Cummings et al., 2003]. Sie besitzen einen diploiden Karyotyp mit 3% polyploidem Anteil. Als Kulturmedium wurde „Rosswell Park Memorial Institute“ (RPMI) 1640 nach Zugabe von 1 mM Na-Pyruvat verwendet. Die Verdopplungszeit beträgt 25-30 h [DSMZ, Braunschweig].

HEK293 Zelllinien

Die Zelllinie HEK293, welche von Graham et al. [1977] durch Transformation mit einem Adenovirus Typ 5 generiert und etabliert wurde, entstammt einer humanen, embryonalen Niere. Der Karyotyp ist hypertriploid mit 6% Polyploidie. In der vorliegenden Arbeit wurden transfizierte HEK293-Zelllinien, die freundlicherweise von Prof. Boege, Universitätsklinikum Düsseldorf, zur Verfügung gestellt wurden, verwendet. Als Kulturmedium wurde „Dulbecco's Modified Eagle's Medium“ (DMEM) nach Zugabe von 0,4 µg/ml Puromycin eingesetzt. Die Verdopplungsdauer beträgt etwa 24-30 h [DSMZ, Braunschweig].

HEK293-GFP Zelllinie

Überexprimiert konstitutiv das grün fluoreszierende Protein („green fluorescent protein“; GFP) [Christensen et al., 2002].

HEK293-GFP-TDP1 Zelllinie

Charakterisiert durch die Überexpression eines Fusionsprotein aus GFP und der humanen Tyrosyl-DNA-Phosphodiesterase 1 (TDP1) [Barthelmes et al., 2004].

HEK293-GFP-TDP1^{H263A} Zelllinie

Überexprimiert ein Fusionsprotein aus GFP und TDP1, wobei im aktiven katalytischen Zentrum von TDP1 der Histidinrest His263 durch einen Alaninrest ersetzt ist, wodurch TDP1 vollständig seine katalytische Aktivität verliert.

HepG2 Zelllinie

Die humane Tumorzelllinie HepG2 wurde 1975 aus einem hepatozellulären Karzinom eines 15 Jahre alten argentinischen Jungen etabliert. Die Zellen werden als adhärente, epithelartige Zellen beschrieben, die als Monolayer und in kleinen Anhäufungen wachsen. Der Karyotyp der Zelle ist hyperdiploid. Als Kulturmedium verwendet wurde DMEM. Die Verdopplungszeit beträgt 50-60 h [DSMZ, Braunschweig].

HT29 Zelllinie

Die humane Tumorzelllinie HT29 stammt aus einem primären Kolonadenokarzinom einer 44-jährigen Frau aus dem Jahre 1964. Dieser Tumor wird als heterotransplantabel beschrieben und bildet gut differenzierte Tumore ersten Grades aus. Der Karyotyp der Zelle ist hypertriploid mit 17,5% Polyploidie. Die Zelllinie zeichnet sich durch ein adhärentes Wachstum aus, dass sowohl in großen Kolonien mit epithelialen Zellen als auch in Monolayern wächst. Als Kulturmedium wurde DMEM verwendet. Die Verdopplungsdauer beträgt etwa 40-60 h [DSMZ, Braunschweig].

KYSE510 Zelllinie

Diese humanen Plattenepithelkarzinomzellen der Speiseröhre wurden von einer 67 Jahre alten japanischen Frau nach einer Cisplatin- und Radiotherapie etabliert. Die Karzinomzellen tragen eine Mutation in p53 und vervielfältigen MYC, HST1 und

CYCLIN D1. In Nacktmäusen können sie Tumore bilden. Die Zellen weisen eine epithelähnliche Charakteristik auf und können als Monolayer und als Multilayer wachsen. Der Karyotyp der Zelle ist hypertriploid mit 8%-iger Polyploidie. Als Kulturmedium wurde RPMI 1640 verwendet und die Verdopplungszeit der Zellen beträgt circa 30 h [DSMZ, Braunschweig].

6.1.2. Kultivierung und Lagerung

Die *in vitro* Bedingungen beinhalten die Zufuhr essentieller Substanzen, sowie die Neutralisation der Abbauprodukte durch das Kulturmedium. Um die Zellen vor eventuellem Bakterienbefall zu schützen, werden dem entsprechenden Medium zusätzlich Antibiotika zugegeben. Die Kultivierung der unter 6.1.1 aufgeführten adhärennten und semiadhärennten Zelllinien erfolgt als Monolayer in Kulturflaschen bei 37°C, 95% relativer Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂. Das jeweilige Kulturmedium wird mit 10% fetalem hitzeinaktivierten (30 min bei 56°C) Kälberserum (FKS) und 1% Penicillin (10000 units) / Streptomycin (10000 µg/ml) (P/S) versetzt.

Alle zu verwendenden Medien werden vor Gebrauch im Wasserbad auf 37°C temperiert und sämtliche Arbeiten erfolgen unter sterilen Bedingungen an einer Sterilbank.

6.1.2.1. Zellen in Kultur nehmen

Die bei -80°C gelagerten Zellstocks werden im Wasserbad bei 37°C aufgetaut und zügig in 10 ml 20% FKS-haltiges Medium überführt und resuspendiert. Dadurch wird die 10%-ige und damit für die Zellen toxische DMSO-Konzentration auf etwa 1% herabgesetzt. Die Zellsuspension wird bei RT bei 130g für 5 min zentrifugiert und der Überstand vorsichtig entfernt, um so das Frostschutzmittel DMSO zu entfernen. Das weitgehend DMSO-freie Zellpellet wird in 5 ml 20% FKS-haltigem Medium resuspendiert und in eine kleine Kulturflasche (25 cm²) überführt. Wenn sowohl Zellzahl als auch Zelldichte groß genug sind, wird bei der folgenden Passage wieder auf 10% FKS-haltiges Medium umgestellt.

6.1.2.2. Anlegen und Lagerung von Zellstocks

Zur Lagerung können alle verwendeten Zelllinien in 70% des entsprechenden Kulturmediums, 20% FKS und 10% DMSO bei -80°C eingefroren werden.

Dazu werden die Zellen abtrypsiniert und das Trypsin durch Zugabe von 10 ml frischem, serumhaltigem Medium inaktiviert. 1 ml Zellsuspension werden 500 µl einer DMSO/FKS-Lösung (Verhältnis: 1 : 2,3) zugesetzt, wobei das zugegebene DMSO als Frostschutzmittel dient. Die „Zellstocks“ werden anschließend bei -20°C eingefroren und nach 24 h bei -80°C im Biofreezer gelagert.

6.1.2.3. Mediumwechsel

Für das gleichmäßige Wachstum der Zellen im Monolayer ist das regelmäßige Wechseln des Nährmediums notwendig, da durch die Stoffwechselprozesse der Zellen das Medium verbraucht und Stoffwechselprodukte angereichert werden. Die daraus resultierende Absenkung des pH-Wertes ist am Farbwechsel des im Medium enthaltenen Indikators von rot nach gelb erkennbar [Lindl, 2000].

Das verbrauchte Medium wird mittels steriler Pasteurpipette abgesaugt und nach Zugabe eines der Kulturflasche angepassten Volumens an frischem Nährmedium werden die Zellen weiter kultiviert.

6.1.2.4. Subkultivierung der Zellen

Nach Erreichen von etwa 80-90% Konfluenz der Zellen ist eine Subkultivierung (Passagieren) erforderlich [Lindl, 2000]. Wenn die Zellen in Polylayern zu wachsen beginnen kann die Proliferationsrate sinken und es kann bis hin zu einem Ablösen des kompletten Zellrasens kommen. Daher wird das verbrauchte Medium mit einer sterilen Pasteurpipette abgesaugt und der Zellrasen mit 10 ml PBS gewaschen, um Mediumreste und tote Zellen zu entfernen. Nach Absaugen der PBS-Lösung werden die Zellen mit 2-3 ml Trypsin-Lösung überschichtet und für kurze Zeit, abhängig von der Zelllinie (HT29- und HCT116-Zellen: 1,5 min, HepG2- und KYSE510-Zellen: 2,5 min und A431-Zellen: 8 min) bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

Die semiadhärenten, transfizierten HEK293-GFP, HEK293-GFP-TDP1^{H263A}, HEK293-GFP-TDP1 benötigen hingegen keine Trypsinbehandlung. Durch leichtes Klopfen an die Seiten der Flasche löst sich der Zellrasen am Flaschenboden ab.

Die abgelösten Zellen werden in 10 ml frischem Medium aufgenommen, um das Trypsin zu inaktivieren, da eine längere Einwirkzeit zu einer Zellschädigung führen kann [Lindl, 2000]. Durch mehrfaches Resuspendieren mit der Pipette werden die Zellen vereinzelt.

Je nach erwünschter Zelldichte innerhalb eines bestimmten Zeitraums wird ein Teil der Zellsuspension wieder in die Flasche zurückgegeben und mit einer adäquaten Menge an frischem Nährmedium weiter kultiviert. Die restliche Zellsuspension kann für Versuche eingesetzt werden oder wird verworfen. Bei der Subkultivierung ist darauf zu achten, dass zwischen zwei Passagen mindestens 2 Tage liegen sollten, um die Zellen vor Stress zu schützen. Nach 2-3 Passagen erfolgt die weitere Kultivierung in einer frischen Kulturflasche. Neben Stress kann auch eine hohe Passagenzahl die physiologischen Eigenschaften der Zelllinie beeinflussen. Daher sollte die Zelllinie nach einer gewissen Zeit (max. 30 Passagen in Kultur) verworfen und neue Zellstocks in Kultur genommen werden.

6.1.2.5. Zellzahlbestimmung

Um möglichst ähnliche Bedingungen bei der Versuchsdurchführung zu gewährleisten, sollte stets die gleiche Anzahl an Zellen eingesetzt werden. Die Zellzahlbestimmung erfolgt mikroskopisch mittels Neubauer-Zählkammer (Abb. 6-1).

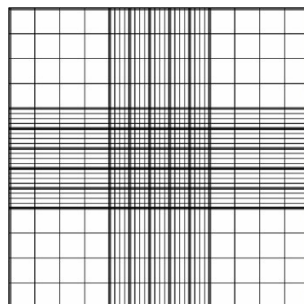


Abbildung 6-1: Neubauer-Zählkammer [Lindl, 2000].

Das Deckglas wird auf die Zählkammer gebracht, so dass Newtonsche Ringe (regenbogenfarbene Schlieren) erscheinen, da das Deckglas erst dann den exakten Abstand zur Zählkammer hat.

Ein je nach der Zelldichte definierter Volumenanteil Zellsuspension wird mit dem entsprechenden Volumenanteil Trypanblaulösung versetzt. Trypanblaulösung färbt tote Zellen aufgrund deren Membrandurchlässigkeit blau an. Der Zwischenraum zwischen Zählkammer und Deckglas wird mit der Suspension gefüllt. Die Neubauer-Zählkammer besteht aus neun großen Quadraten, wobei jedes der vier Eckquadrate eine Fläche von 1 mm² besitzt. Dies ergibt bei einer Tiefe von 0,1 mm ein Volumen von 0,1 µl pro Quadrat. Es werden die vier Eck-Quadrate ausgezählt und gemittelt. Die Zellzahl bezogen auf 1 ml Zellsuspension errechnet sich durch Multiplikation des Mittelwertes mit dem Verdünnungsfaktor und dem Faktor 10⁴. Daraus ergibt sich die Anzahl der Zellen pro Milliliter Zellsuspension [Lindl, 2000].

Verwendete Reagenzien:

PBS 10 x	1710 mM NaCl 100 mM Na ₂ HPO ₄ 34 mM KCl 18 mM KH ₂ PO ₄ pH 7,4; mit H ₂ O _{bidest} auf 1 l auffüllen 1 x PBS autoklavieren
Trypsin	500 mg Trypsin 100 ml 10 x PBS 250 mg EDTA mit H ₂ O _{bidest} auf 1 l auffüllen über Nacht auf Eis rühren pH-Wert überprüfen (7,0-7,4) steril filtrieren (Porengröße: 0,22 µm) Lagerung bei -20°C
Trypanblaulösung	0,4% Trypanblau 0,81% NaCl 0,06% KH ₂ PO ₄

6.1.2.6. Mykoplasmentest

Mykoplasmen sind die kleinsten, sich selbst vermehrenden Prokaryoten und können vielfältig in den Zellstoffwechsel eingreifen. Sie besitzen keine Zellwand und können somit in ihrer Größe (0,22 µm bis 2 µm) und in ihrer Gestalt variieren. Mykoplasmen sind gegenüber den in der Zellkultur eingesetzten Antibiotika unempfindlich. Da sie in engem Verhältnis mit Tier- und Pflanzenzellen leben, sollten Zellkulturen regelmäßig auf Mykoplasmen hin getestet werden, da sie Sterilfilter passieren können.

Durchführung:

- Der sterile Superfrost-Objektträger (OT) wird in eine mittlere Petrischale (Ø 10 cm) mit 10 ml Kulturmedium gegeben und wenige Tropfen Zellsuspension werden darauf pipettiert.
- Ablegen der Zellen auf dem OT für etwa 48 h im Brutschrank (37°C, 5% CO₂, 95% relativer Luftfeuchte).
- Das Medium wird abgesaugt und der OT mit -20°C kaltem Methanol abgespült
- Die Zellen werden auf dem OT fixiert: mind. 30 min bei -20°C in Methanol.
- Es werden 3-4 Tropfen 4',6'-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid (DAPI)-Sulforhodamin (SR) 101-Färbelösung auf den OT pipettiert und mit einem Deckglas bedeckt.
- Die Detektion erfolgt am Fluoreszenzmikroskop, wobei Mykoplasmen als kleine blau gefärbte runde Körperchen zu erkennen sind.

Für die Durchführung aller in dieser Arbeit beschriebenen Experimente wurden nur mykoplasmenfreie Zelllinien verwendet.

Verwendete Reagenzien:

DAPI / SR 101	200 mM Tris 200 mM NaCl 8 µM DAPI 50 µM SR 101 in H ₂ O _{bidest} lösen und pH 7,6 einstellen
Methanol	p.a., -20°C

6.2. Bestimmung der DNA-Konzentration

Die DNA Konzentration und die Reinheit der Proben kann durch die Messung der Absorption bei den Wellenlängen 260 und 280 nm mittels Nanodrop[®]-Spektrophotometer unter Zuhilfenahme der Software ND-1000 V 3.2.1 bestimmt werden.

Durchführung:

- Zur Bestimmung des Grundrauschens wird 1 µl H₂O_{bidest} auf das Gerät gegeben und als „Blank“ gemessen.
- 1 µl der Proben werden anschließend gemessen.

Auswertung:

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

$$c = A * e / b$$

c: Konzentration

A: Absorbanz in AU

e: wellenlängenabhängiger Extinktionskoeffizient in ng * cm/ml (bei 260 nm für doppelsträngige DNA: 50 ng * cm/ml)

b: Streckenlänge, die das Licht zurücklegt in cm (für das Nanodrop[®]-Spektrophotometer: 1 mm (Werte normiert auf 1 cm))

Daraus ergibt sich die folgende Gleichung zur Bestimmung des DNA-Gehaltes:

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

Der Quotient A_{260}/A_{230} gibt Auskunft über die Reinheit. Für $A_{260}/A_{230} \geq 1,7$ gilt die Probe als rein.

6.3. Bestimmung der Protein-Konzentration

6.3.1. Proteinbestimmung nach der Methode von Bradford

Die Methode von Bradford [1976] ermöglicht die Quantifizierung von Proteinmengen im Mikrogramm-Bereich (Nachweisgrenze: ~0,5 µg). Das Absorptionsmaximum des Farbstoffes Coomassie® - Brilliantblau G250 (Abb. 6-2) liegt bei $\lambda = 465 \text{ nm}$ und verschiebt sich in Gegenwart von Aminosäuren bzw. Proteinen nach $\lambda = 595 \text{ nm}$.

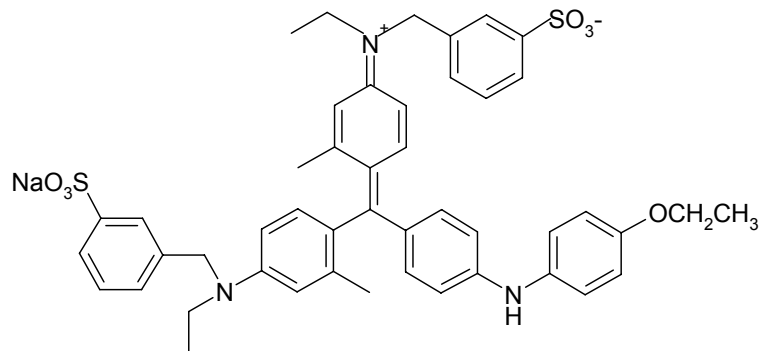


Abbildung: 6-2: Strukturformel von Coomassie® - Brilliantblau G250 (als Sulfonat).

Diese Verschiebung ist durch die Komplexbildung zwischen dem anionischen Farbstoff und den kationischen bzw. unpolaren Seitenketten der Aminosäuren bedingt [Bradford, 1976]. Der Farbstoff lagert sich innerhalb von 2 min an die vorhandenen Aminosäuren bzw. Proteine an und die so gebildeten Komplexe sind für ca. 1 h stabil. Die Standardreihe im Konzentrationsbereich von 0,2 - 2,0 mg/ml wird mit Hilfe einer Rinderserumalbumin („bovine serum albumine“, (BSA))-Standardlösung (2 mg/ml) angesetzt (Tabelle 6-1).

Tabelle 6-1: Pipettierschema der BSA-Standardreihe.

Endkonzentration [mg/ml]	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0	1,2	1,6	2,0
BSA-Standardlösung [µl]	20	40	60	80	100	120	160	200
H₂O_{bidest} [µl]	180	160	140	120	100	80	40	0

Durchführung:

- Als Kontrollen werden ebenfalls mitgeführt:
 - der zur Aufarbeitung verwendete Puffer als Blindwert.
 - der Nullwert ($\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$).
- Sowohl von der Kalibriergerade als auch von den Kontrollen und Proben werden je 10 µl mit 1 ml Bradford-Reagenz versetzt.
- Von jeder Lösung werden 3 x 200 µl in eine 96-Lochplatte pipettiert.
- Die Mikrotiterplatte wird bei $\lambda = 595 \text{ nm}$ photometrisch vermessen.

Der Proteingehalt der Proben wird mittels linearer Regression über die Kalibriergerade bestimmt.

Verwendete Reagenzien:

Bradford-Reagenz

100 mg Coomassie®-Brilliantblau G250
 50 ml EtOH
 100 ml H_3PO_4
 mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ auf 1 l auffüllen
 4 Wochen stehen lassen
 danach filtrieren
 im Dunkeln bei RT lagern

6.3.2. Proteinbestimmung mit BCA

Die Proteinbestimmung mittels Bicinchoninsäure (BCA) beruht auf der Bildung eines Cu^+ -Komplexes im Alkalischen nach Reduktion der Cu^{2+} -Ionen zu Cu^+ -Ionen [Smith et al., 1985]. Die Menge an reduziertem Cu^+ ist dabei proportional zur Proteinmenge. Relevant für die Reduktion der Cu^{2+} -Ionen sind neben der Peptidbindung die Aminosäuren (AS) Cystein, Cystin, Tryptophan und Tyrosin [Wiechelman et al., 1988]. Jedoch kann es zu einer Verfälschung bei Proteinsequenzen kommen, die viele dieser AS beinhalten. Die Cu^+ -Ionen bilden mit BCA einen violettfarbenen, stabilen Komplex (Abb. 6-3), der bei der Wellenlänge 562 nm photometrisch gemessen werden kann.

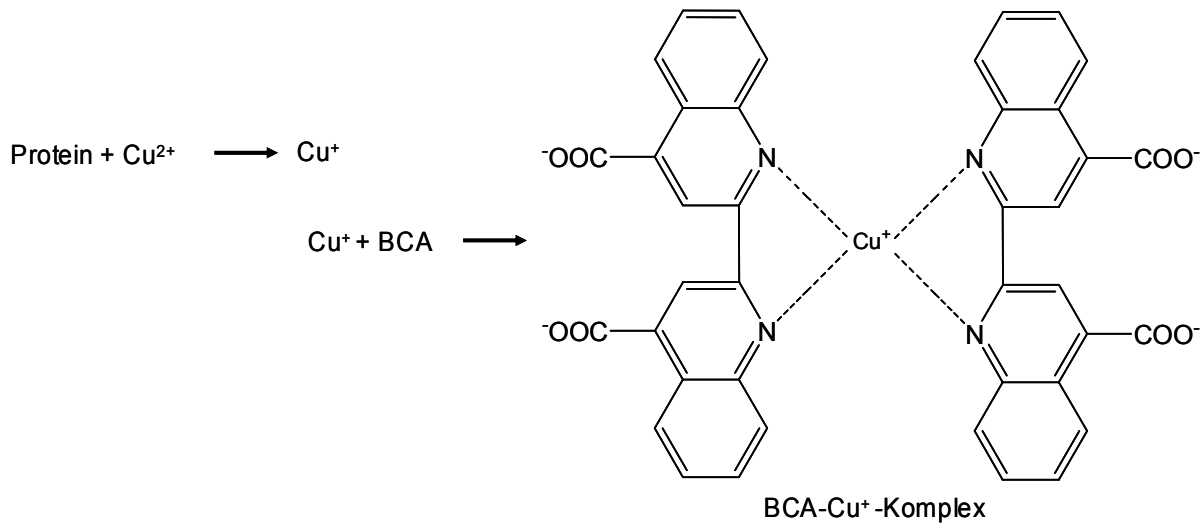


Abbildung 6-3: Bildung des BCA-Cu⁺-Komplexes aus BCA und Cu²⁺ [nach Smith et al., 1985].

Von der unter Abschnitt 6.3.1 beschriebenen Proteinstammlösung aus BSA wurden 25 µl in eine 96-Lochplatte pipettiert, mit 175 µl BCA-Reagenzlösung versetzt und anschließend für 30 min bei 37°C inkubiert. Die Proben werden im verwendeten Assaypuffer 1:10 verdünnt und 100 µl dieser Lösung werden ebenfalls für 30 min bei 37°C mit 700 µl BCA-Reagenzlösung behandelt. Die Proben werden anschließend je zweimal 200 µl in die 96-Lochplatte pipettiert und am Plattenlesegerät bei 595 nm vermessen.

Verwendete Reagenzien:

Assaypuffer A	BCA-Lösung
Assaypuffer B	4% w/v CuSO ₄ -Lösung
BCA-Reagenzlösung	50:1 Mischung aus Reagenz A:B

6.4. Untersuchungen zur Zytotoxizität

6.4.1. Trypanblau-Ausschluss-Test

Die Zellsuspension wird mit Trypanblaulösung versetzt und die Zellen werden mittels Neubauer Zählkammer am Lichtmikroskop ausgezählt. Lebende Zellen sind in der Lage den Farbstoff aktiv aus der Zelle zu transportieren und erscheinen weiß, während tote Zellen aufgrund ihrer Membrandurchlässigkeit blau gefärbt werden.

$$\text{Viabilität [\%]} = \frac{\text{Anzahl lebender Zellen}}{\text{Gesamtzahl der Zellen (lebende + tote)}} \times 100$$

6.4.2. Laktatdehydrogenase (LDH) Assay

Im Laktatdehydrogenase (LDH) Assay wird die Integrität der Zytoplasmamembran gemessen, da deren Zerstörung ein morphologisches Charakteristikum der Zellnekrose darstellt. Diese führt zur Freisetzung von zytoplasmatischen Bestandteilen, wie z.B. Enzymen in das Zellkulturmedium, von denen die meisten schnell abgebaut werden. Eine Ausnahme hierbei bildet die LDH, die auch außerhalb der Zelle stabil ist. Prinzip der Aktivitätsbestimmung ist dabei die Umsetzung des schwach gelben Tetrazoliumsalzes 2-[4-Iodophenyl]-3-[4-Nitrophenyl]-5-Phenyl-Tetrazoliumchlorid (INT) zum entsprechenden, rot gefärbten Formazan.

Zunächst wird Laktat durch die LDH zu Pyruvat oxidiert, wobei reduziertes Nikotinamidadenindinukleotid ($\text{NADH} + \text{H}^+$) entsteht. Dieses wird im nächsten Schritt dazu verwendet, INT zum Formazan zu reduzieren, was durch das Enzym Diaphorase katalysiert wird. Die Absorptionsintensität des gebildeten Formazans stellt ein Maß für die Menge an LDH im Medium der Probe dar [Goergen et al., 1993].

Durchführung:

- Aussäen von 3.000 HT29-, bzw. 4.000 A431-Zellen pro Loch einer 96-Lochplatte und Anwachsen lassen für 48 h bei 37°C, 5% CO₂ und 95% relativer Luftfeuchtigkeit.
- Zweimaliges Waschen der Zellen mit je 100 µl Medium ohne FKS und ohne Natriumpyruvat (Hemmstoff der LDH).
- Inkubation für 1 h mit den Testsubstanzen, der Lösungsmittelkontrolle DMSO (1%-ig) als so genannte „Low Control“ bzw. zur Bestimmung der maximalen LDH-Freisetzung mit einer sog. „High Control“ (1%-ig Triton-X-100).
- Zugabe von 5 µl Lyselösung.
- Nach 15 min werden die Zellen und als Blindwert Medium mit je 100 µl Reagenzlösung versetzt und im Dunkeln aufbewahrt.
- Nach 10 min wird die Reaktion durch Zugabe von 50 µl Abstopplösung unterbrochen und es erfolgt die photometrische Messung der Absorption bei 492 nm in einem Mikroplattenleser.

Auswertung:

Die Auswertung erfolgt nach dem Handbuch des Cytotoxicity Detection Kit [LDH] von Roche Applied Science. Bei den mit Triton-X-100 behandelten Zellen kommt es zur gesamten Freisetzung an LDH, was einer Zytotoxizität von 100% entspricht. Die Zytotoxizität der Proben wird nach Bildung des Mittelwertes der erhaltenen Absorptionswerte mit folgender Formel berechnet:

$$\text{Zytotoxizität [\%]} = \frac{\text{Probe} - \text{Low Control}}{\text{High Control} - \text{Low Control}} \times 100$$

Verwendete Reagenzien:

Katalysator	Diaphorase/NAD ⁺ Gemisch
Farbstofflösung	INT und Natriumlaktat

6.4.3. Sulforhodamin B (SRB) Test

Der Sulforhodamin B (SRB) Assay wurde von Skehan et al. [1990] als neuer kolorimetrischer Zytotoxizitätstest für das „Screening“ von potentiellen chemotherapeutischen Stoffen publiziert. Die Methode wird modifiziert in 24-Lochplatten durchgeführt [Marko et al., 2004].

Dabei wird der Einfluss von Testsubstanzen auf das Wachstum von Zellen bestimmt, indem mit dem Farbstoff Sulforhodamin B (Abbildung 6-4) das Lebendprotein angefärbt wird. Die Intensität des Farbstoffes, der unter leicht sauren Bedingungen an basische Aminosäuren der Zellproteine gebunden vorliegt, wird nach Alkalisieren photometrisch gemessen.

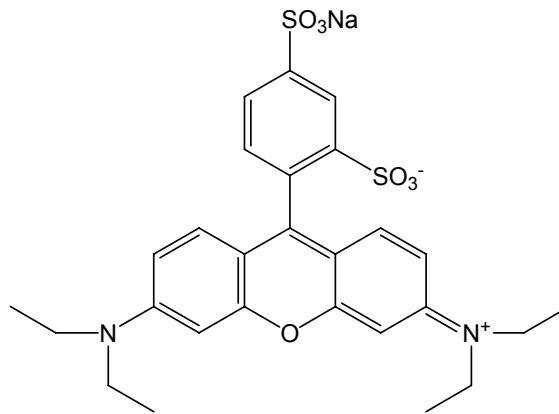


Abbildung 6-4: Strukturformel von Sulforhodamin B.

Der Test wurde mit den Zelllinien A431, HepG2 und KYSE510 durchgeführt.

Durchführung:

- Aussäen von 8.000 - 20.000 Zellen (abhängig von der Zelllinie und der Inkubationsdauer) pro Well einer 24-Lochplatte und Anwachsen lassen für 48 h bei 37°C, 5% CO₂ und 95% relativer Luftfeuchtigkeit.
- Inkubation der Zellen für 24 h und 72 h mit den Testsubstanzen (Lösungsmittelkonzentration im Endansatz: 1%) in serumhaltigen Kulturmedium.
- Abstoppen der Substanzreaktion durch Zugabe von 100 µl 50%-iger (w/v) Trichloressigsäure (TCA).

- Zellen mindestens 1 h bei 4°C belassen, wodurch alle noch lebenden Zellen am Plattenboden fixiert werden.
- Vorsichtiges, viermaliges Waschen der 24-Lochplatte mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ zur Entfernung von Zellresten und überschüssigem Medium mit anschließender Trocknung über Nacht.
- Färbung der fixierten Zellen mit 250 μl 0,4%-igem (w/v) SRB-Reagenz für mindestens 30 min im Dunkeln.
- Entfernen des überschüssigen Farbstoffes durch zweifaches Spülen mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ sowie 2 x mit 1%-iger (v/v) Essigsäure (HAc).
- Nach dem Trocknen der Platten wird der Farbstoff mit Tris Base (pH 10) gelöst.
- Photometrische Vermessung der Proben mittels Mikrotiterplattenlesegerät (Wellenlänge 570 nm).

Verwendete Reagenzien:

TCA	50%-ig (w/v) in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$
HAc-Lösung	1%-ig (v/v) in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$
SRB-Lösung	0,4%-ig (w/v) in 1%-iger HAc-Lösung
Tris Base (pH 10)	10 mM Tris in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$

6.5. Untersuchungen zur Genotoxizität – Comet Assay

Mit der Einzelzellgelelektrophorese, auch Comet Assay genannt, wird das genotoxische Potential von Substanzen erfasst. Zelluläre DNA-Schäden können direkt, beispielsweise durch chemische Substanzen oder physikalische Einflüsse, oder indirekt durch DNA-Reparaturdefekte entstehen. Die Methode wurde von Östling und Johanson [1984] publiziert und ermöglicht die Detektion von DNA-Doppelstrangbrüchen. Singh et al. [1988] beschreiben die Durchführung der Elektrophorese unter alkalischen Bedingungen, wodurch zusätzliche DNA-Modifikationen erfasst werden. Neben DNA-Doppelstrangbrüchen werden DNA-Einzelstrangbrüche, mit Reparaturproteinen verbundene DNA-Einzelstrangbrüche, alkalisensitive Stellen (z.B. apurine Stellen), DNA-DNA- und DNA-Protein-Querverbindungen erfasst [Tice et al. 2000].

Durch eine zusätzliche Behandlung der Proben mit dem DNA-Reparaturenzym Formamidopyrimidin-DNA-glykosylase (Fpg) werden mögliche oxidative DNA-Schäden detektiert, indem das Enzym diese erkennt, aus dem DNA-Rückgrat herausschneidet und damit einen DNA-Strangbruch induziert [Speit et al., 2004].

Der schematische Ablauf des alkalischen Comet Assays mit zusätzlicher Fpg-Behandlung ist in Abbildung 6-5 dargestellt.

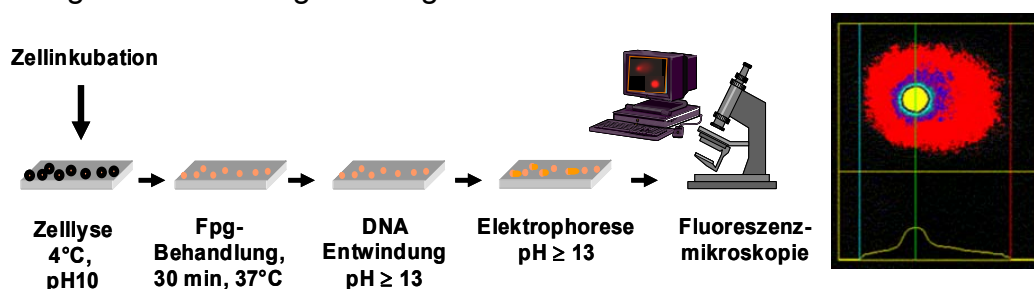


Abbildung 6-5: Versuchsdurchführung des Comet Assays.

Nach der Substanzinkubation erfolgt eine Zellzahl- bzw. Viabilitätsbestimmung. Um Enzymaktivitäten zu minimieren, erfolgt die gesamte Aufarbeitung auf Eis. Die lebenden Zellen werden in LMA („Low Melting Agarose“) aufgenommen, auf Objektträger (OT) fixiert und anschließend lysiert. Während bei der neutralen Variante des Comet Assays im Anschluss die Elektrophorese bei neutralem pH-Wert stattfindet, kann bei der Durchführung im alkalischen Milieu die freigesetzte DNA mit dem Enzym Fpg behandelt werden. Die Auftrennung der doppelsträngigen DNA

erfolgt nach Fixierung im alkalischen Puffer. Die Elektrophorese basiert darauf, dass kleinere DNA-Fragmente, die aus DNA-Strangbrüchen resultieren, im elektrischen Feld weiter migrieren als intakte, hochmolekulare DNA. Nach der Neutralisation wird die DNA mit dem Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid (EtBr) angefärbt und die Auswertung erfolgt am Fluoreszenzmikroskop. Dabei erscheint stark geschädigte DNA als eine Art Kometenschweif (Abbildung 6-6). Die Menge an DNA im Kometenschweif korreliert dabei direkt mit der Menge an DNA-Schäden.

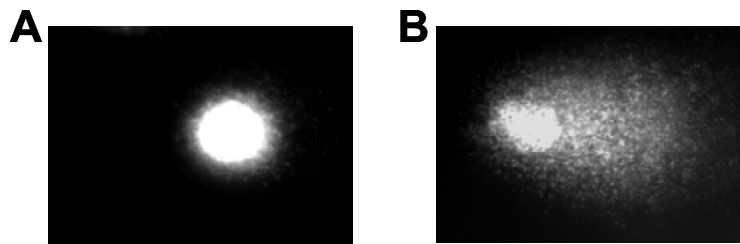


Abbildung 6-6: Mikroskopische Aufnahme (A) intakter und (B) geschädigter DNA.

6.5.1. Neutraler Comet Assay

Der neutrale Comet Assay wurde mit den Zelllinien A431, HCT116, HepG2, HT29 und KYSE510 durchgeführt.

Durchführung:

Vorbereitung der Objektträger

- Verwendet werden einseitig mattierte OT.
- 40 µl der NMA auf die mattierte Seite eines OT pipettieren, mit einem zweiten OT zu einem dünnen Agarosefilm ausstreichen und aushärten lassen.
- 2 x werden 65 µl der NMA auf den Agarosefilm pipettiert und je ein Deckglas möglichst luftblasenfrei darauf gelegt.
- Die entstandenen Gelpads bei 4°C aushärten lassen und bis zum Gebrauch in einer feuchten OT-Box lagern (etwa 4 Tage haltbar).

Inkubation der Zellen

- 3×10^5 A431-, HCT116-, HT29-, HepG2-, KYSE510-Zellen werden in 5 ml des jeweiligen serumhaltigen Mediums für 48 h anwachsen gelassen. Die Inkubation mit den Testsubstanzen erfolgt serumfrei für 1 h.

Zellaufarbeitung

- Das Inkubationsmedium wird verworfen und mit 2 ml PBS gewaschen.
- Die Zellen werden mit 0,5 ml Trypsin für 1,5 min (HT29, HCT116), 2,5 min (HepG2, KYSE510) bzw. 8 min (A431) bei 37°C im Brutschrank behandelt.
- Durch Zugabe von 0,5 ml serumhaltigen Medium wird der Trypsinverdau gestoppt.
- Die Zellen werden durch mehrmaliges Spülen vom Boden gelöst und in ein auf Eis vorgekühltes 2 ml Eppendorfreaktionsgefäß überführt.
- Zur Verdünnung wird mit 0,5 ml serumhaltigen Medium nachgespült.
- Die Zellzahl- und Viabilitätsbestimmung erfolgt mittels Trypanblau-Ausschluß-Verfahren (siehe Abschnitt 6.4.1) aus den erhaltenen Zellsuspensionen. Die Zellviabilität sollte für die weitere Versuchsdurchführung $\geq 80\%$ sein.
- Für jedes vorbereitete Gelpad werden etwa 50.000 Zellen von jeder Probe entnommen und bei 4°C für 10 min bei 425g zentrifugiert und der Überstand anschließend verworfen.
- Die OT werden codiert und die Deckgläser vorsichtig entfernt.
- Die Zellen werden in 65 μ l LMA (3-4 Hübe) resuspendiert und auf die NMA-Gelpads gegeben, luftblasenfrei abgedeckt und bei 4°C aushärten gelassen.

Zellyse

- 100 ml Lysepuffer-Gebrauchslösung in Coplin-Kammer füllen und für mind. 1 h bei 4°C vorkühlen.
- Die Deckgläser werden von den OT entfernt.
- Die OT werden in die vorbereiteten Coplin-Kammer gestellt und die Zellen für mind. 1 h lysiert.

Elektrophorese, Neutralisation und Färbung

- Die OT werden bei 4°C in die Elektrophoresekammer gelegt und fixiert.
- Nach Zugabe von 2 l des Elektrophoresepuffers werden die Proben für 20 min äquilibriert.
- Die Elektrophorese erfolgt bei konstanten 25 V (~40 mA) für 20 min.
- Danach werden die OT für 5 min bei 4°C mit Neutralisationspuffer gewaschen.

- Die Proben werden mit je 40 µl EtBr-Gebrauchslösung pro Gelpad angefärbt und mit einem Deckglas abgedeckt.

Auswertung:

Ausgewertet wird an einem Fluoreszenzmikroskop mit einer Quecksilberdampfampe als Lichtquelle und einem nachgeschalteten CY-3-Filter, um das EtBr anzuregen (Anregung: λ 512 nm; Emission: $\lambda \geq 590$ nm). Das Bild wird mit einer CCD-Kamera aufgenommen, an einen PC weitergeleitet und mit der Software Comet Assay III-System (Perceptive Instruments) ausgewertet. Pro Gelpad werden 50 einzelne, sich nicht überlagernde Zellen ausgezählt. Dabei wird darauf geachtet, dass die Außenränder und Flächen um Luftblasen vermieden werden, da diese Stellen häufig eine anomal hohe Anzahl an DNA-Schäden aufweisen [Collins, 2004]. Als Auswertungsparameter wird die sog. Schweifintensität („Tail-Intensity“) genutzt, welche die Intensität des Kometenschweifes in Prozent mit der Intensität des Kometenkopfes der gleichen Zelle vergleicht. Nach der Auswertung aller OT eines Experimentes erfolgt die Entcodierung.

Verwendete Reagenzien:

PBS für Agarose	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 1,5 mM KH_2PO_4 8,1 mM Na_2HPO_4
NMA	0,5% (w/v) in PBS für Agarose
LMA	0,8% (w/v) in PBS für Agarose
PBS	siehe Abschnitt 6.1.2.5
Trypsin	siehe Abschnitt 6.1.2.5
Kulturmedium	10% FKS, 1% P/S
Trypanblaulösung	siehe Abschnitt 6.1.2.5
Lysepuffer-Stammlösung	2,5 M NaCl 100 mM EDTA 10 mM Tris 1% (w/v) Na-Laurylsarcosylat pH 7,5 einstellen

Lysepuffer-Gebrauchslösung	89% (v/v) Lysepuffer-Stammlsg. 10% (v/v) DMSO (p.a.) 1% (v/v) Triton-X 100
Elektrophoresepuffer	90 mM Tris 90 mM Borsäure 2 mM EDTA pH 7,5 einstellen
Neutralisationspuffer	0,4 M Tris pH 7,5 mit HCl einstellen
EtBr-Lösung	Stammlösung: 10 mg/ml Gebrauchslösung: 20 µg/ml

6.5.2. Alkalischer Comet Assay

Unter alkalischen Bedingungen wurden die Zelllinien A431, HCT116, HEK293-GFP, HEK293-GFP-TDP1^{H263A}, HEK293-GFP-TDP1, HepG2, KYSE510 verwendet.

Durchführung:

Inkubation der Zellen

- 3×10^5 A431-, HCT116-, HT29-, HepG2-, KYSE510-Zellen werden in 5 ml des jeweiligen serumhaltigen Mediums für 48 h anwachsen gelassen und die Inkubation mit den Testsubstanzen erfolgt serumfrei für 1 h.
- Die zu transfizierenden HCT116-Zellen werden in 24-Loch-Platten (20.000 Zellen in 500 µl Kulturmedium pro Loch) für 48 h anwachsen gelassen, transfiziert und 48 h nach der Transfektion mit den Testsubstanzen für 1 h serumfrei inkubiert.
- Die semiadhärenten, transfizierten HEK293-Zelllinien werden nach dem Passagieren ausgezählt und 500.000 Zellen anschließend mit den Testsubstanzen serumfrei für 1 h im Schüttel-wasserbad inkubiert.

Zellaufarbeitung

- Erfolgt bei den adhärennten Zellen wie unter Abschnitt 6.5.1 beschrieben.
- Die Zellzahl- und Viabilitätsbestimmung erfolgt mittels Trypanblau-Ausschluß-Verfahren (siehe Abschnitt 6.4.1) aus den erhaltenen Zellsuspensionen,

während die semiadhärenten HEK293-Zellen direkt nach der Inkubation auf Eis gestellt und ausgezählt werden.

- Für jedes vorbereitete Gelpad werden etwa 50.000 Zellen von jeder Probe entnommen und bei 4°C für 10 min bei 425g zentrifugiert und der Überstand anschließend verworfen.
- Die Einbettung der Zellsuspension erfolgt wie unter 6.5.1 beschrieben.

Zellyse

- Erfolgt wie unter Kapitel 6.5.1 beschrieben mit dem Lysepuffer der alkalischen Variante.

Elektrophorese, Neutralisation und Färbung

- Die OT werden in die auf Eis stehende Elektrophoresekammer gelegt, fixiert und für 20 min im alkalischen Elektrophoresepuffer äquilibriert, um einzelsträngige DNA zu erhalten und alkalilabile Stellen in DNA-Einzelstrangbrüche zu überführen [Liao et al., 2009].
- Die Elektrophorese wird bei konstanten 25 V für 20 min auf Eis durchgeführt und das Einstellen der Stromstärke (300 mA) erfolgt durch Zugabe bzw. Abnahme des entsprechenden Elektrophoresepuffers.
- Die OT werden bei 4°C 3 x 5 min mit Neutralisationspuffer gewaschen.
- Die Anfärbung und Auswertung erfolgt, wie unter Abschnitt 6.5.1 beschrieben.

Verwendete Reagenzien:

Lysepuffer-Stammlösung	2,5 M NaCl 0,1 M EDTA 100 mM Tris 1% (w/v) Na-Laurylsarcosylat pH 10 mit NaOH einstellen
Lysepuffer-Gebrauchslösung	89% (v/v) Lysepuffer-Stammlsg. 10% (v/v) DMSO (p.a.) 1% (v/v) Triton-X 100
Elektrophoresepuffer (alkalisch)	60 ml 10 M NaOH 10 ml 200 mM EDTA
Weitere Reagenzien	siehe Abschnitt 6.5.1.

6.5.3. Formamidopyrimidin-DNA-Glykosylase (Fpg)-Behandlung

Eine zusätzliche Behandlung mit Fpg erfolgte in den Zelllinien A431, HepG2 und KYSE510. Dazu werden aus den unter 6.5.1 beschriebenen Zellsuspensionen zwei weitere Aliquots (50.000 Zellen pro Gelpad) entnommen und bei 4°C für 10 min bei 425g abzentrifugiert. Die OT werden parallel zur Versuchsdurchführung im alkalischen Comet Assay mitgeführt und wie unter 6.5.2 lysiert.

Fpg-Behandlung

- Der 10 x Fpg-Puffer wird mit H₂O_{bidest} auf 1 x verdünnt und auf Eis gestellt.
- Die OT werden mit Fpg-Puffer dreimal 5 min bei 4°C gewaschen.
- Die Fpg-Lösung Aliquots (Verdünnung: 1 : 100) werden mit dem Fpg-Puffer nochmals 30fach verdünnt.
- Die mit Fpg zu behandelnden OT werden mit 50 µl Fpg-Lösung pro Gelpad versetzt, während die restlichen OT mit 50 µl des Fpg-Puffers behandelt werden.
- Die Inkubation erfolgt für 30 min bei 37°C in einer Feuchtekammer.
- Anschließend werden die OT bei 4°C 20 min in der Elektrophoresekammer im alkalischen Puffer äquilibriert.
- Elektrophorese, Neutralisation, Färbung und Detektion erfolgen unter analogen Bedingungen zur alkalischen Variante des Comet Assays.

Verwendete Reagenzien:

Fpg-Puffer 10 x	400 mM HEPES 1 M KCl 5 M EDTA 2 mg/ml BSA pH 8 mit KOH einstellen Lagerung bei -20°C Vor Gebrauch mit H ₂ O _{bidest} verdünnen
Fpg-Lösung	Enzym 1 : 3000 in 1 x Fpg-Puffer

6.6. Untersuchungen zum Einfluss auf humane Topoisomerasen

6.6.1. Dekatenierungsassay

Beim Dekatenierungsassay, beschrieben von Boege [1996], der die katalytische Aktivität der Topoisomerase II prüft, wird als Substrat Kinetoplasten DNA (kDNA) verwendet. Diese aus dem Insekt *Crithidia fasciculata* isolierte DNA-Form besteht aus ineinander verketteter DNA-Zirkeln, welche ein hochmolekulares Netzwerk bilden. Typ II-Topoisomerasen sind in der Lage, transiente DNA-Doppelstrangbrüche zu erzeugen, wodurch einzelne DNA-Minizirkel aus dem Netzwerk herausgelöst werden [Jiménez-Alonso et al., 2008] (Abbildung 6-7).

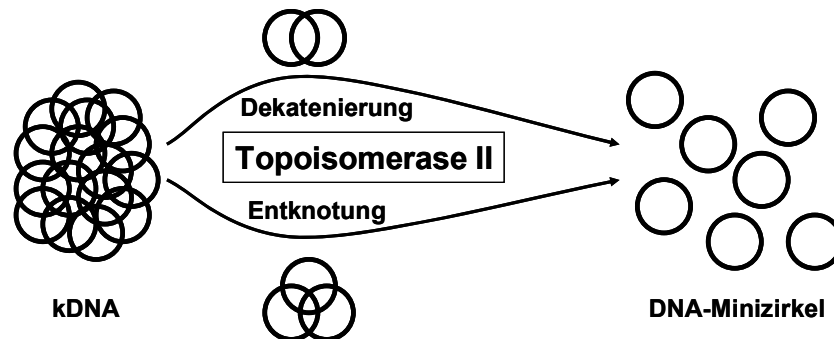


Abbildung 6-7: Prinzip des Dekatenierungsassays [modifiziert nach Boege, 1996].

Jedoch kann aufgrund der komplexen Zusammensetzung der kDNA nicht abgeleitet werden, wie viele DNA-Strangdurchführungen notwendig sind um einen einzelnen DNA Minizirkel herauszulösen [Holden et al., 1990], weshalb die Inkubation auf 1 h festgelegt wurde. Da hochmolekulare kDNA nicht ins Agarosegel wandern kann, verbleibt sie in den Geltaschen, während die niedermolekularen DNA-Minizirkel in der Lage sind, ins Gel zu migrieren (Abbildung 6-8).

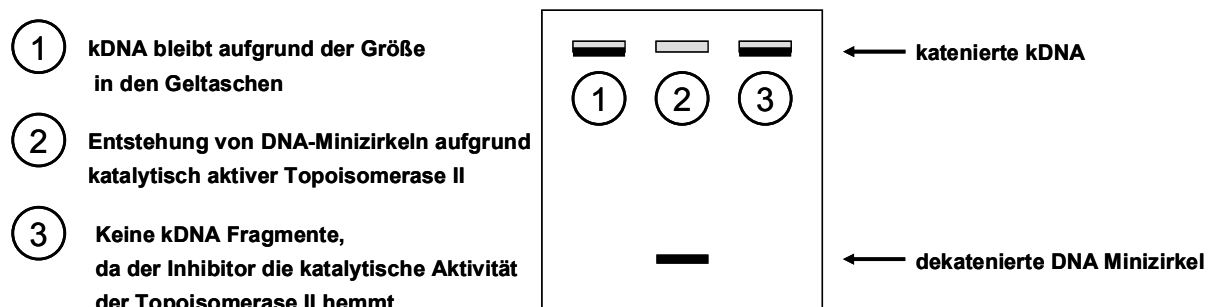


Abbildung 6-8: Schematische Darstellung eines Agarosegels im Dekatenierungsassay.

Die Topoisomerase II-Gifte Doxorubicin und Etoposid dienen als Positivkontrolle.

Durchführung:

- Pipettierschema für den Dekatenierungsassay.

Lösungen	Kontrolle [µl]	Substanz [µl]
H ₂ O _{bidest}	18,95	16,95
KCl-Lösung	3,6	3,6
Salzmix II	3	3
Trispuffer	3	3
kDNA	1,45	1,45
DMSO / Substanzlösung	-	1
Topoisomerase II	-	1

- Inkubation bei 37°C für 60 min.

Proteinase K	3	3
---------------------	---	---

- Inkubation bei 37°C für 30 min.

Ladepuffer	5	5
-------------------	---	---

- 20 µl der Proben werden auf ein Agarosegel aufgetragen.
- Elektrophorese bei 60 V für etwa 3 h in 1x Tris-Acetat-EDTA (TAE) Puffer.
- Färben des Gels im Ethidiumbromidbad für 20 min.
- 5 min waschen im Wasserbad.
- Detektion mittels LAS 3000 über Fluoreszenzmessung bei 560 nm.

Verwendete Reagenzien:

Salzmix II

- 50 mM MgCl₂
- 5 mM Dithiothreitol (DTT)
- 5 mM EDTA
- 0,3 mg/ml BSA
- 10 mM ATP

Material und Methoden

Trispuffer	500 mM Tris/HCl, pH 7,9
KCl-Lösung	1 M KCl in H ₂ O _{bide} st
kDNA	200 ng
Verdünnungslösung für rekombinante	50 mM Tris/HCl, pH 7,5
Topoisomerase II	400 mM NaCl 1 mM DTT 50% Glycerol
Topoisomerase II α / β	40 ng
SDS	10% (w/v) SDS-Lösung
Proteinase K	1 mg/ml 10% (w/v) SDS-Lsg.
Ladepuffer (6 x)	0,25% Bromphenolblau 30% Glycerol
TAE-Puffer (50 x)	242 g Tris Base 57,1 ml Eisessig 100 ml 0,5 M Na ₂ -EDTA, pH 8 pH 8,5 einstellen mit H ₂ O _{bide} st auf 1 l auffüllen
TAE-Puffer (1 x)	1:50 verd. mit H ₂ O _{bide} st
Agarosegel	1% (w/v) Agarose in 1 x TAE-Puffer
EtBr-Bad	1 μ g/ml EtBr in H ₂ O _{bide} st

6.6.2. „Cleavage“-II Assay

Topoisomerasegifte stabilisieren das kovalent gebundene Enzym-DNA-Intermediat im Zustand des DNA-Strangbruches. Wird nun Topoisomerase II durch Proteinase K verdaut, bleibt das als Substrat eingesetzte Plasmid mit einem DNA-Einzelstrangbruch oder DNA-Doppelstrangbruch bestehen. Hierbei entstehen lineare und offen zirkuläre DNA-Formen. Durch eine Agarose-Gelelektrophorese in Anwesenheit von Ethidiumbromid kann nun die lineare von der offen zirkulären, der superspiralisierten und relaxierten Plasmid-DNA separiert werden (Abb. 6-9).

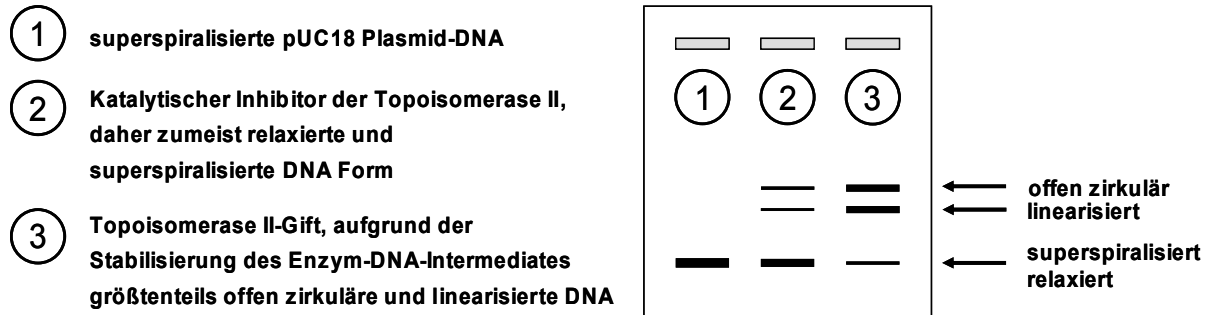


Abbildung 6-9: Prinzip des „Cleavage“-II Assays.

Das Topoisomerase II-Gift Etoposid dient als Positivkontrolle.

Durchführung:

- Pipettierschema für den „Cleavage“-II Assay.

Lösungen	Kontrolle [µl]	Substanz [µl]
1 x Assaypuffer	8	7
1 x Assaypuffer mit ATP	4	4
KCl	1	1
pUC18	3,6	3,6
DMSO / Substanzlösung	-	1
Topoisomerase II α / β	3,4	3,4

- Inkubation bei 37°C für 6 min.

EDTA	1	1
Proteinase K	4	4

- Inkubation bei 45°C für 30 min.

Ladepuffer	2	2
------------	---	---

- 20 µl der Proben werden auf das Agarosegel aufgetragen.
- Elektrophorese bei 60 V für etwa 3 h in 1x TAE-Puffer.
- Detektion mittels LAS 3000 über Fluoreszenzmessung bei 560 nm.

Verwendete Reagenzien:

Assaypuffer 5 x	50 mM Tris/HCl, pH 7,9 250 mM NaCl 0,5 mM EDTA 250 mM MgCl ₂ 12,5% (v/v) Glycerol Lagerung bei 4°C
Assaypuffer 1 x	vor Gebrauch mit H ₂ O _{bidest} verdünnen
ATP Stammlösung	20 mM
Assaypuffer mit ATP	ATP Stammlösung 1:5 mit 1 x Assaypuffer verdünnen
KCl-Lösung	1 M KCl in H ₂ O _{bidest}
pUC18	200 ng
Verdünnungslösung für rekombinante Topoisomerase II	50 mM Tris/HCl, pH 7,5 400 mM NaCl 1 mM DTT 50% Glycerol
Topoisomerase II α / β	1,36 µg
EDTA	375 mM Na ₂ -EDTA, pH 8
SDS	10% (w/v) SDS-Lösung
Proteinase K	1 mg/ml 10% (w/v) SDS-Lsg.
Ladepuffer (6 x)	0,25% Bromphenolblau 30% Glycerol
TAE-Puffer (50 x)	siehe Abschnitt 6.6.1
TAE-Puffer (1 x)	1:50 verd. mit H ₂ O _{bidest}
Agarosegel	1% (w/v) Agarose in 1 x TAE-Puffer mit 0,5 µg/ml EtBr

6.6.3. Immunoband-Depletion Assay

Der Immunoband-Depletion Assay wurde nach der Methode, beschrieben in Christensen et al. [2002], durchgeführt. Das Prinzip der Methode ist in Abbildung 6-10 dargestellt. Bei der Zellinkubation mit Topoisomerasegiften wird das Enzym durch Stabilisierung des kovalenten Topoisomerase-DNA-Intermediates an der DNA „fixiert“. Werden die Zellen lysiert und einer Polyacrylamid-Gelelektrophorese unterzogen, kann die durch das Topoisomerasegift an der DNA gebundene Topoisomerase nicht in das Gel wandern. Unter physiologischen Bedingungen bzw. bei katalytischen Hemmstoffen der Topoisomerase migriert das freie Enzym ins Gel und kann nach Western Blot und anschließender Inkubation mit spezifischen Antikörpern detektiert werden.

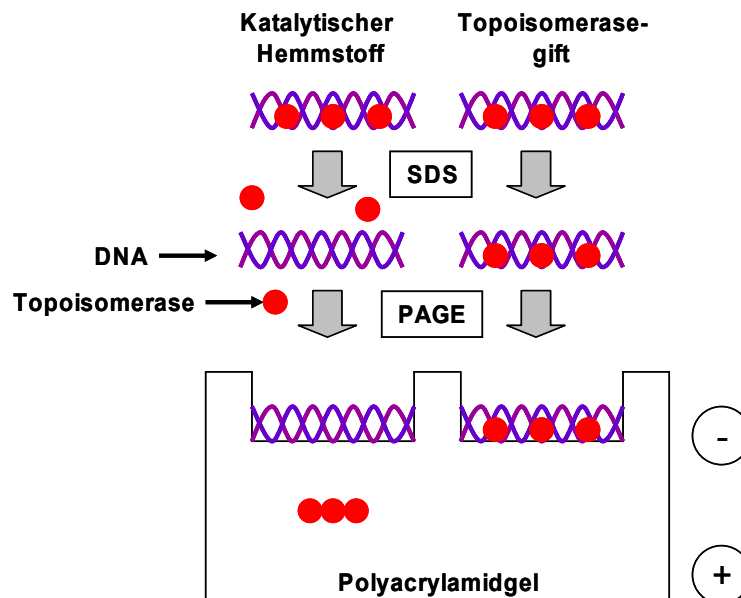


Abbildung 6-10: Prinzip des Immunoband-Depletion Assays. SDS, Natriumdodecylsulfat; PAGE, Polyacrylamid-Gelelektrophorese.

Durchführung:

Kultivierung der Zellen und Inkubation mit den Testsubstanzen

- Aussäen von 3×10^6 A431-Zellen auf mittlere Petrischalen in serumhaltigem MEM und Kultivierung für 48 h bei 37°C , 5% CO_2 und 95% Luftfeuchte.
- Inkubation mit den Testsubstanzen für 1 h in 10 ml serumfreien Medium (Lösungsmittelkonzentration im Endansatz: 1%), wenn eine Zelldichte von 80 - 90% erreicht ist.

Probenaufarbeitung

- 1 x Waschen der Zellen mit 5 ml 1 x PBS.
- Lyse der Zellen durch Zugabe von 1 ml 2 x Laemmli-Puffer.
- Abschaben der Zellsuspension und Überführen in ein, auf Eis gekühltes, 1,5 ml Eppendorfgefäß.
- Behandlung mit dem Ultraschallstab für 10 s.
- Proben 10 min auf 96°C im Thermomixer erhitzen.
- Zugabe von 2 µl 1 M DTT.

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung der Proteine erfolgt mittels SDS-PAGE, wofür die Proteine zunächst denaturiert werden. Das Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) lagert sich mit der hydrophoben Seite in einem Verhältnis von 1,4 g SDS pro 1 g Protein an das Polypeptidrückgrat der Proteine an, wodurch deren Tertiär- und teilweise auch Sekundärstrukturen aufgelöst werden. Die Proteine erhalten dadurch insgesamt eine negative Überschussladung. Dies hat zur Folge, dass sich die Ladungsmenge direkt proportional zur Molekülgröße verhält. Die Wanderungsgeschwindigkeit zeigt sich nun nicht mehr abhängig von der speziellen Proteinladung, sondern korreliert linear zur Molekülgröße. Durch den Zusatz von niedermolekularen Thiolen, wie DTT oder β -Mercaptoethanol und Erhitzen auf 96°C werden die Disulfidbrücken im Protein gespalten und eine vollständige Denaturierung der Proteine erreicht.

Die denaturierten Proteine werden auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen und in ein elektrisches Feld gebracht. Der Grundparameter der gelelektrophoretischen Auftrennung ist die elektrophoretische Mobilität, welche die Wanderungsgeschwindigkeit eines Teilchens während der Elektrophorese beeinflusst. So wird die elektrophoretische Mobilität unter anderem durch die Viskosität, Größe und Ladung bestimmt. Da die Masse eines denaturierten Proteins proportional zu seinem hydrodynamischen Ionenradius ist, haben unterschiedlich große Proteine ungleiche Stoffgeschwindigkeiten und können damit im elektrischen Feld aufgetrennt werden. Dabei bewegen sich kleinere Moleküle schneller durch das Gel und können anhand eines mitgeführten Molekulargewichtstandards identifiziert werden [Cammann, 2001]. Bei der hier angewandten diskontinuierlichen Gelelektrophorese durchlaufen die Proben zunächst ein weitporiges Sammelgel (4% Acrylamidgel). Durch den pH-Wert des Sammelgels (pH 6,8) liegen die im Puffer enthaltenen Glycinat-Anionen

protoniert vor, wodurch der Ladungstransport nur über die Proteine und Chlorid-Ionen stattfindet. Beim Eintritt in das Trenngel ändert sich neben der kleineren Porengröße auch der pH-Wert auf 8,8, wodurch das Glycin nun deprotoniert vorliegt und den Ladungstransport übernimmt. Dies hat zur Folge, dass die Proteine langsamer werden und an der Grenzfläche eine Schärfung der Banden stattfindet.

Gießen der Trenn- und Sammelgele

Die SDS-PAGE wird in einem Vertikalsystem (Abbildung 6-11) durchgeführt, wobei für die Topoisomeraseproteine ein 10%-iges Trenngel und für die Beladungskontrolle Tubulin ein 12%-iges Trenngel verwendet werden.

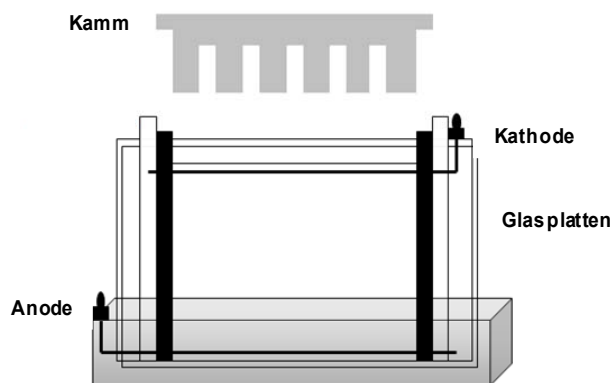


Abbildung 6-11: Darstellung des verwendeten Vertikalsystems.

Neben H_2O_{bidest} , Tris-Lösung, Acrylamid (Rotiphorese (37,5:1)-Lösung) und 10%-iger SDS-Lösung werden zum Gießen der Gele Ammoniumperoxodisulfat (APS) als Radikalstarter und N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED) als Stabilisator benötigt. Die Pipettierschemata für die Trenngele sind in Tabelle 6-2 dargestellt.

Tabelle 6-2: Pipettierschema für die eingesetzten Trenngele (1 x).

Komponenten	Polyacrylamidanteil im Trenngel	
	10%	12%
H_2O_{bidest}	2,05 ml	1,72 ml
Tris/HCl (1,5 M; pH 8,8)	1,23 ml	1,23 ml
Acrylamid	1,65 ml	1,97 ml
10%-ige SDS-Lösung	49,2 μ l	49,2 μ l
APS-Lösung	24,6 μ l	24,6 μ l
TEMED	2,46 μ l	2,46 μ l

Das Trenngel wird bis auf eine Höhe von etwas 5 cm (~ 3,5 ml) zwischen die beiden Glasplatten pipettiert und zum Ausschluss von Luftsauerstoff mit n-Butanol überschichtet. Nach vollständiger Polymerisierung des Gels (ca. 25 min bei RT bzw. über Nacht bei 4°C) wird das n-Butanol entfernt.

Tabelle 6-3: Pipettierschema für das Sammelgel (1 x).

Komponenten	Polyacrylamidanteil im Sammelgel (4%)
H ₂ O _{bidest}	1,2 ml
Tris/HCl (0,5 M; pH 6,8)	1,23 ml
Acrylamid	1,15 ml
10%-ige SDS-Lösung	49,2 µl
APS-Lösung	24,6 µl
TEMED	2,46 µl

Nach Polymerisation des Sammelgels (Tabelle 6-3) wird der Kamm vorsichtig entfernt und die Probenaschen mit H₂O_{bidest} gespült. 20-30 µl der aufgearbeiteten Probe werden pro Tasche beladen. 5 µl des Proteinmolekulargewichtstandards „SeeBlue“ Plus2 (Tabelle 6-4) wird in die äußere Reihe gegeben.

Tabelle 6-4: Molekulargewichtstandard „SeeBlue“ Plus2.

Protein	Molekulargewicht [kDa]
Myosin	250
Phosphorylase	148
BSA	98
Glutamindehydrogenase	64
Alkoholdehydrogenase	50
Carboanhydrase	36
Myoglobin Red	22
Lysozym	16
Aprotinin	6
Insulin, B-Kette	4

Die Elektrophoresekammer wird mit 1 x SDS-Laufpuffer aufgefüllt und die Elektrophorese bei einer Spannung von $U = 100 \text{ V}$ gestartet. Nach 30 min wird die Spannung für weitere 30 min auf $U = 120 \text{ V}$ erhöht und schließlich für 2 h bei $U = 140 \text{ V}$ belassen.

Western Blot Analyse

Da die Proteine im Polyacrylamidgel nicht immunologisch detektiert werden können, erfolgt der Transfer der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran mittels „semi-dry Blot“. Die Membran besitzt Poren, die kleine Moleküle passieren lassen, große Moleküle wie Proteine hingegen werden durch hydrophobe Wechselwirkungen zurückgehalten. Dazu werden das Gel und die Membran „sandwichartig“ zwischen mehreren pufferdurchtränkten Filterpapieren angeordnet (Abbildung 6-12). Dabei ist darauf zu achten, dass sich keine Luftblasen zwischen den Schichten bilden, da dadurch der Proteintransfer verhindert wird.

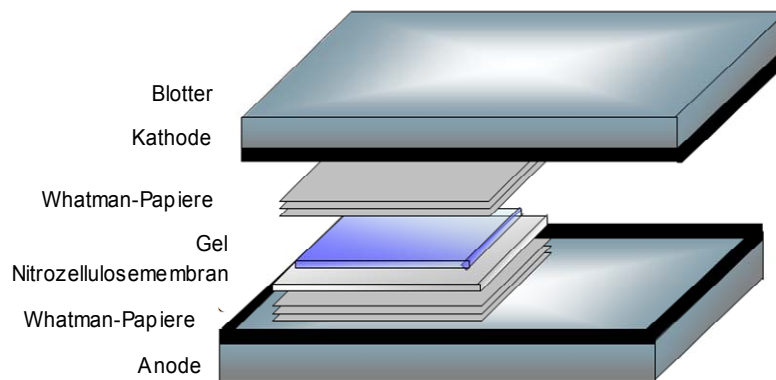


Abbildung 6-12: Anordnung für die Durchführung eines Western Blots.

Durch Anlegen einer konstanten Stromstärke von $I = 70 \text{ mA}$ pro kleinem Gel werden die Proteine auf die Membran übertragen. Im Anschluss werden die Membranen in Blockierungsreagenz geschwenkt, um die unspezifischen Bindungsstellen zu blockieren [Towbin et al., 1979].

Die Detektion der Proteine erfolgt immunologisch. Dabei bindet zunächst ein Antikörper an das Zielprotein, der spezifisch gegen dieses gerichtet ist. Im darauf folgenden Schritt erfolgt die Bindung eines Sekundärantikörpers, welcher gegen den ersten gerichtet ist und an den das Enzym Meerrettichperoxidase (HRP, „Horseradish“ Peroxidase) gekoppelt ist. Dieses Enzym oxidiert Luminol mit H_2O_2 und ruft somit eine Chemolumineszenz hervor, welche gemessen werden kann (Abbildung 6-13) [Leong et al., 1986].

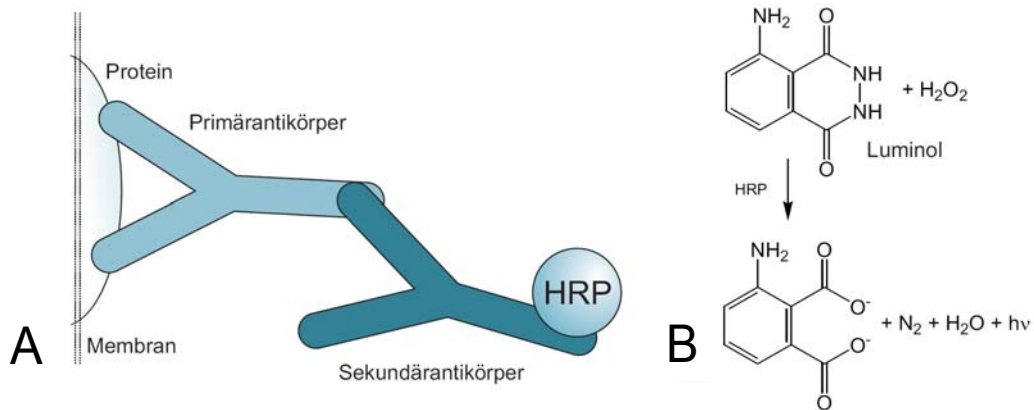


Abbildung 6-13: (A) Modell der Antikörperbindung an das Zielprotein. (B) Chemolumineszenzreaktion von Luminol. HRP, „Horseradish“ Peroxidase.

- Pro Gel 6 Whatman-Papiere und eine Nitrozellulosemembran bei 4°C in 1 x Blottingpuffer äquilibrieren.
- 3 Whatman-Papiere, die Nitrozellulosemembran und das Gel auf den Blotter schichten und mit drei weiteren Whatman-Papieren abdecken.
- Stromstärke von 70 mA anlegen und 75 min blotten.
- Membranen 1 h bei RT oder über Nacht bei 4°C in Blockierungslösung schwenken.
- Inkubation mit Erstantikörperlösung: 2 h bei RT oder über Nacht bei 4°C.
- 3 x 5 min in Waschpuffer waschen.
- Inkubation mit Zweitantikörperlösung: 1 h bei RT.
- 3 x 5 min in Waschpuffer waschen.
- Einminütige Inkubation mit LumiGlo®-Lösung.
- Detektion und Auswertung erfolgt mittels LAS3000 mit der Aida Image Analyser-Software Version 3.52 (Fuji/Raytest, Deutschland).

Die semiquantitative Auswertung der Proben erfolgt in Bezug zur Lösungsmittelkontrolle als T/C [%].

Verwendete Reagenzien:

Laemmli-Puffer Stammlösung (4 x)

0,5 M Tris/HCl, pH 6,8

8% (w/v) SDS

0,08% (w/v) Bromphenolblau

8% (v/v) Glycerol

Material und Methoden

Laemmli-Puffer Gebrauchslösung (2 x)	500 µl 4 x Laemmli-Puffer 20 mM DTT 20 mM EDTA 2 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) 2,5 M Harnstoff mit H ₂ O _{bidest} auf 1 ml auffüllen
Ammoniumperoxodisulfat Lösung	10% (w/v) APS in H ₂ O _{bidest}
Laufpuffer (10 x)	2 M Glycin 250 mM Tris/HCl, pH 8,3 1% (w/v) SDS
Blotting-Puffer (2 x)	78 mM Glycin 96 mM Tris 0,074% (w/v) SDS 40% (v/v) Methanol
TBS (20 x)	2,6 M NaCl 0,4 M Tris/HCl, pH 7,6
Blockierungslösung	1 x TBS 5% (w/v) Milchpulver 0,1% (v/v) Tween-20
Waschlösung	1 x TBS 0,3% (v/v) Tween-20
Erstantikörperlösung (Santa Cruz): Anti-Topoisomerase I („mouse“) Anti-Topoisomerase IIα („rabbit“) Anti-Topoisomerase IIβ („rabbit“)	1 : 500 in Blockierreagenz
Zweitantikörperlösung (Santa Cruz): Anti-„mouse“ HRP-IgG-konjugiert Anti-„rabbit“ HRP-IgG-konjugiert	1 : 2000 in Blockierreagenz
LumiGLO[®]-Detektionslösung	200 µl 20 x LumiGLO [®] 200 µl 20 x Peroxid 2600 µl H ₂ O _{bidest}

6.6.4. „*In vivo* Complex of Enzyme“ (ICE) Assay

Der „*in vivo* Complex of Enzyme“ (ICE) Assay ermöglicht den Nachweis von kovalenten Topoisomerase-DNA-Komplexen. Somit kann mithilfe dieses Assays zwischen katalytischen Topoisomerasehemmstoffen und Topoisomerasegiften differenziert werden. Die behandelten Zellen werden lysiert und die Zelllysate im CsCl-Dichtegradienten zentrifugiert, wobei nicht-kovalente Protein-DNA-Wechselwirkungen dissoziieren. Darüber hinaus wird durch Ultrazentrifugation die DNA von den leichteren Zellbestandteilen, zu denen auch die freien Enzyme zählen, getrennt. Nach Fraktionierung des Gradienten werden die Zellbestandteile mittels Slot-Blot-Methode auf eine Nitrozellulosemembran übertragen (Abbildung 6-14). Anschließend können die Topoisomerasen immunochemisch detektiert werden [Subramanian et al., 2001]. Als Positivkontrollen dienen das Topoisomerase I-Gift Camptothecin und das Topoisomerase II-Gift Etoposid.

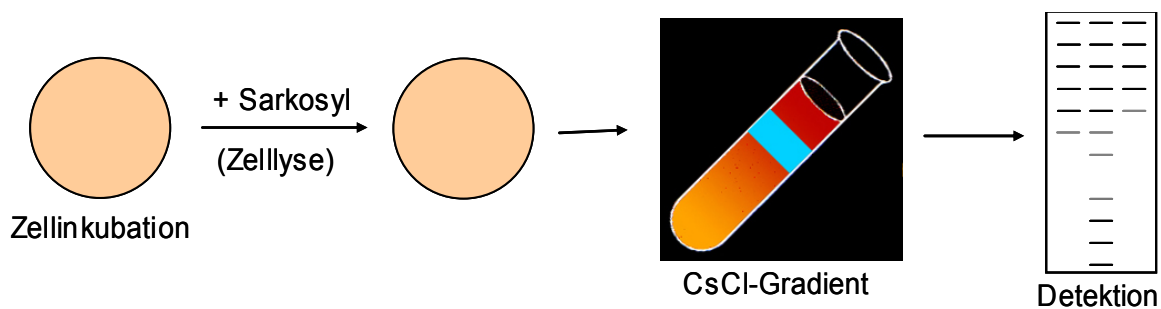


Abbildung 6-14: Schematische Darstellung des ICE-Assays.

Durchführung:

Kultivierung der Zellen und Inkubation mit den Testsubstanzen

- Aussäen von 3×10^6 A431-Zellen auf große Petrischalen in serumhaltigem MEM und Kultivierung für 72 h bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchte.
- Inkubation mit den Testsubstanzen für 1 h in 10 ml serumfreien Medium (Lösungsmittelkonzentration im Endansatz: 1%), wenn eine Zelldichte von 80 - 90% erreicht ist.

Probenaufarbeitung und Ultrazentrifugation

- 2 x Waschen der Zellen mit je 4 ml 1 x PBS.
- Lyse der Zellen durch Zugabe von 6 ml Lysepuffer.
- Abschaben der Zellsuspension und Überführen in 15 ml-Röhrchen.
- Scheren der viskosen Probelösung durch eine 0,9 mm Kanüle (20 Gauge).

- Herstellung des CsCl-Gradienten: je 2 ml der Lösungen A-D werden vorsichtig übereinander geschichtet.
- Aufgeben von 4 ml der Zellsuspension auf den CsCl-Gradienten (alternativ können die Proben bei -80°C im Biofreezer gelagert werden).
- Überschichten der Lösungen mit Mineralöl zum Luftausschluss und Austarieren der Polyallomerröhrchen.
- Die Ultrazentrifugation wird mit dem Schwingrotor TST 41.14 über einen Zeitraum von 21-24 h bei $100.000g$ und 20°C durchgeführt, wobei die Topoisomerase-DNA-Komplexe aufgrund ihrer höheren Dichte von den freien Enzymen getrennt werden.

Fraktionierung, Blotten und Blockieren

- Äquilibrieren der Whatman-Papiere (2 pro Membran) und der Nitrozellulosemembranen in 25 mM Phosphatpuffer bei 4°C .
- Anstechen der Polyallomerröhrchen von der Unterseite mit einer Kanüle und Fraktionierung des Gradienten unter Zuhilfenahme von Insulinspritzen (20 Fraktionen á $300\ \mu\text{l}$).
- Überführen von je $300\ \mu\text{l}$ der Fraktionen in $300\ \mu\text{l}$ vorgelegten 25 mM Phosphatpuffer; vortexen.
- Aufbringen von $200\ \mu\text{l}$ der Lösungen auf eine Nitrozellulosemembran unter Zuhilfenahme einer Slot-Blot-Apparatur (Abbildung 6-15), wodurch die enthaltenen Zellbestandteile durch ein mit einer Wasserstrahlpumpe erzeugtes Vakuum auf die Membran geblottet werden.

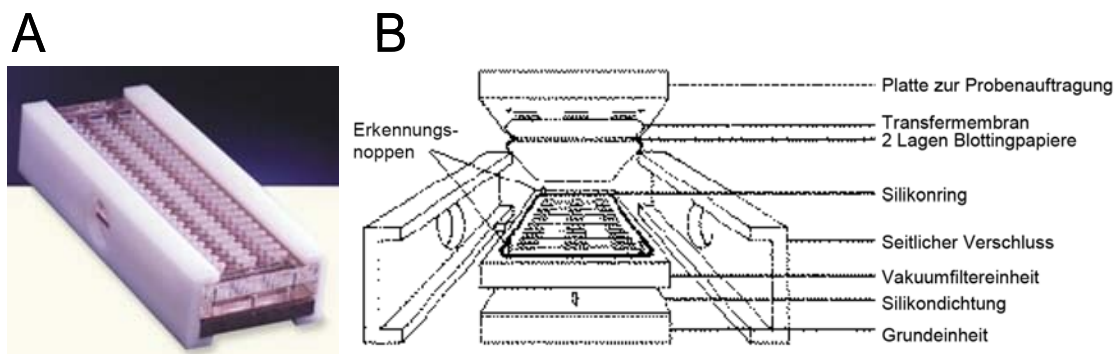


Abbildung 6-15: (A) Slot-Blot-Apparatur. (B) Aufbau einer Slot-Blot-Apparatur.

- Äquilibrieren der Membran für 10 min in 1x TBST-Puffer.
- Die Membranen werden im Folgenden für 2 h 30 min in Blockierreagenz bei Raumtemperatur (RT) geschwenkt, wodurch die für die Antikörper unspezifischen Bindungsstellen blockiert werden.

Antikörperinkubation und Detektion

- Inkubation mit dem Primärantikörper über Nacht bei 4°C.
- 3 x Waschen für 5 min in 1 x TBST-Puffer.
- Inkubation mit dem Sekundärantikörper für 2 h bei RT.
- 3 x Waschen mit 1 x TBST für jeweils 5 min.
- 1 min in LumiGLO[®]-Reagenz schwenken; durch die Zugabe von H₂O₂ und Luminol wird die Chemolumineszenzreaktion gestartet.
- Detektion der Chemolumineszenz mittels LAS-3000 (Image Reader, Fujifilm).

Bestimmung des DNA-Gehaltes

Durch Messung der Absorption der Proben bei einer Wellenlänge von $\lambda=260$ nm mit Hilfe eines Nanodrop[®]-Spektrophotometers wird die DNA-Konzentration bestimmt (siehe Kapitel 6.2). Aufgrund der Ultrazentrifugation im Dichtegradienten und der anschließend durchgeführten Fraktionierung sollte die DNA aufgrund ihrer hohen Dichte in den ersten Fraktionen enthalten sein.

- 1 μ l H₂O_{bidest} auf das Gerät aufgeben, als „Blank“ messen.
- 1 μ l Probe aufgeben und messen.

Auswertung:

Die DNA-reichen Fraktionen der Negativkontrolle (DMSO) werden ermittelt. Die entsprechenden, gemessenen Chemolumineszenzwerte werden summiert und auf den DNA-Gehalt dieser Fraktionen bezogen. Das Ergebnis entspricht dem Kontrollwert (100% = keine Giftung). Die Chemolumineszenzwerte der Substanzen für die DNA-reichen Fraktionen werden ebenfalls summiert, auf den DNA-Gehalt normiert und in Bezug zur Negativkontrolle gesetzt.

Verwendete Reagenzien:

TE-Puffer	10 mM Tris/HCl 1 mM EDTA pH 8 einstellen, mit H ₂ O _{bidest} auf 2 l auffüllen
Lysepuffer	1% (w/v) Sarkosylat in TE-Puffer
CsCl-Lösung	120 g CsCl in 70 ml TE-Puffer lösen
CsCl-Gradienten:	A: 1850 µl CsCl + 150 µl TE-Puffer B: 1600 µl CsCl + 400 µl TE-Puffer C: 1100 µl CsCl + 900 µl TE-Puffer D: 900 µl CsCl + 1100 µl TE-Puffer
Natriumhydrogenphosphat-Puffer	1 M Na ₂ HPO ₄ (einbasisch)
Natriumdihydrogenphosphat-Puffer	1 M NaH ₂ PO ₄ (zweibasisch)
1 M Phosphatpuffer	1 : 1 Mischung aus einbasischem und zweibasischem Phosphatpuffer
25 mM Phosphatpuffer	1 : 40 verdünnen
TBST-Puffer (10 x)	200 mM Tris 1,37 M NaCl 1% (v/v) Tween-20 pH-Wert 7,5 einstellen, mit H ₂ O _{bidest} auf 2 l auffüllen
Blockierreagenz	5% (w/v) Milchpulver in 1 x TBST
Erstantikörperlösung: siehe 6.6.3	1 : 500 in Blockierreagenz
Zweitantikörperlösung: siehe 6.6.3	1 : 2000 in Blockierreagenz
LumiGLO[®]-Detektionslösung	siehe Abschnitt 6.6.3

6.7. Untersuchungen zum Einfluss auf den zellulären Redoxstatus

6.7.1. Dichlorofluorescein (DCF) Assay

Die Verwendung von 2',7'-Dichlorofluorescein-Diacetat (DCFH-DA) als Nachweis für H_2O_2 in Gegenwart von Peroxidase wurde erstmals von Keston und Brandt [1965] beschrieben. Die Methode stellt eine Möglichkeit zur Quantifizierung von oxidativem Stress in Zellen dar [Wang und Joseph, 1999]. In intakten Zellen passiert DCFH-DA die Zellmembran und wird enzymatisch durch eine intrazelluläre Esterase zu nicht fluoreszierendem 2',7'-Dichlorofluorescein (DCFH) deacetyliert (Abbildung 6-16). In Gegenwart reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) und reaktiver Stickstoffspezies [Kooy et al., 1997], wird DCFH schnell zum fluoreszierenden 2',7'-Dichlorofluorescein (DCF) oxidiert [Myhre et al., 2003].

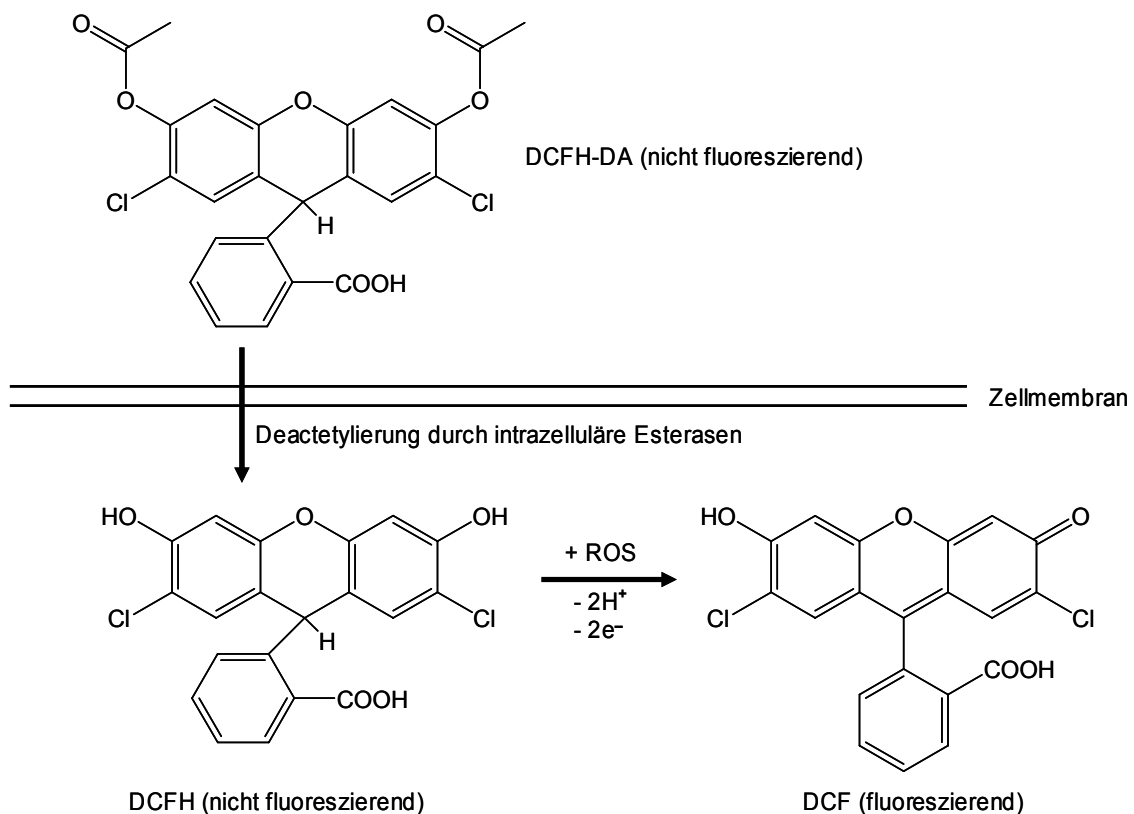


Abbildung 6-16: Prinzip des Dichlorofluorescein (DCF) Assay. DCF, 2',7'-Dichlorofluorescein; DCFH, 2',7'-Dichlorofluorescein; DCFH-DA, 2',7'-Dichlorofluorescein-Diacetat; ROS, reaktive Sauerstoffspezies [modifiziert nach Marchesi et al., 1999].

Durchführung:

- Je nach Zelllinie werden pro Well einer schwarzen 96-Loch-Platte in 200 μ l Medium 30.000 KYSE510-Zellen, 60.000 HT29-Zellen bzw. 100.000 HepG2-Zellen ausgestreut und für 48 h bei 37°C, 5% CO₂ und 95% relativer Luftfeuchte anwachsen gelassen.
- Das Medium wird mit einer Kanüle vorsichtig abgesaugt, wobei die äußersten Löcher nicht abgesaugt werden.
- Die Platte wird mit 100 μ l PBS gewaschen und mit 100 μ l DCFH-DA-Lösung für 30 min inkubiert.
- Waschen der Zellen mit 100 μ l PBS, anschließend Inkubation der Testsubstanzen in farblosem DMEM, da der Farbstoff Phenolrot die Fluoreszenzmessung stört.
- Sofortige Messung der Platte mit einem Mikrotiterplattenlesegerät bei $\lambda = 530$ nm („Blindwert der Fluoreszenz“).
- Die Zellen werden für die gewünschte Zeit inkubiert und anschließend erneut die Fluoreszenz gemessen.

Auswertung:

Die emittierte Fluoreszenz ist der Menge an ROS, direkt proportional und kann so der Quantifizierung von oxidativem Stress in der Zelle dienen (Wang und Joseph, 1999). Nach Normierung auf die Lösungsmittelkontrolle kann so eine Veränderung von oxidativem Stress in der Zelle, verursacht durch die Testsubstanzen, festgestellt werden.

Verwendete Reagenzien:

PBS	siehe 6.1.2.5
DCFH-DA Stammlösung	10 mM DCFH-DA in DMSO
DCFH-DA Gebrauchslösung	50 μ M DCFH-DA Stammlsg. in PBS frisch ansetzen (vor Licht schützen)
Inkubationsmedium	DMEM (farblos)

6.7.2. Bestimmung des nukleären Gehaltes von Nrf2 mittels Western Blot Analyse

Western Blot bezeichnet den Transfer von Proteinen auf eine Trägermembran. Hierzu werden die zu untersuchenden Proteine zuvor mittels SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Die Detektion der Proteine erfolgt durch eine immunologische Reaktion mit Hilfe von spezifischen Antikörpern.

Durchführung:

- Aussäen von $4,5 \times 10^6$ HT29-Zellen auf große Petrischalen in serumhaltigem DMEM und Kultivierung für 72 h bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchte.
- Inkubation mit den Testsubstanzen für 20 min, 1 h bzw. 3 h in 10 ml serumfreien Medium.
- Inkubationslösungen verwerfen.
- HT29-Zellen 2 x mit je 5 ml eiskaltem 1 x PBS waschen; durch Schrägstellen der Petrischalen können die noch vorhandenen PBS-Reste mit einer Pipette entfernt werden.
- Zellen mit 700 µl 1 x PBS abschaben und die Zellsuspension in ein eisgekühltes Eppendorf-Gefäß überführen.
- Zentrifugation für 3 min bei 800g und 4°C.
- Überstand verwerfen und Zellpellet in 200 µl eiskaltem Lysepuffer A resuspendieren; 15 min inkubieren.
- 17 µl Nonidet[®] P40 10%-ig zugeben und anschließend vortexen.
- Zentrifugation für 3 min bei 4°C und 800g.
- Der Überstand enthält die zytosolische Fraktion und wird in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt.
- Zellpellet in 65 µl Lysepuffer B resuspendieren und 15 min inkubieren, währenddessen alle 2 min vortexen.
- Zentrifugation für 5 min bei 15 000g und 4°C.
- Der Überstand enthält die Kernfraktion und wird in ein neues, eisgekühltes Eppendorf-Gefäß überführt. Das Zellpellet wird verworfen.

- Mittels der Methode nach Bradford (siehe Kapitel 6.3.1) wird von den isolierten Zellfraktionen der Proteingehalt bestimmt.
- Der Proteingehalt der Proben wird auf 2 mg/ml eingestellt.
- Die Proben werden mit 6 x SDS-Probenpuffer versetzt, im Thermocycler bei 95°C 5 min denaturiert und anschließend zur gelelektrophoretischen Trennung eingesetzt.
- Die SDS-PAGE, der anschließende Proteintransfer mittels Western Blot und die abschließende Detektion erfolgen analog wie unter Kapitel 6.6.3 beschrieben.

Verwendete Reagenzien:

Lysepuffer A

10 mM Hepes
10 mM KCl
0,1 mM EDTA
0,1 mM EGTA
pH 7,9 einstellen,
mit H₂O_{bidest} auf 100 ml auffüllen;
Lagerung bei 4°C
vor Gebrauch pro ml angesetzttem
Puffer frisch hinzugeben:
40 µl Proteaseinhibitormix
10 µl DTT

Lysepuffer B

20 mM HEPES
0,4 M NaCl
1 mM EDTA
1 mM EGTA
pH 7,9 einstellen
mit H₂O_{bidest} auf 100 ml auffüllen;
Lagerung bei 4°C
vor Gebrauch pro ml angesetzttem
Puffer frisch hinzugeben:
40 µl Proteaseinhibitormix
10 µl DTT

SDS-Lösung	10% (w/v) SDS in H ₂ O _{bidest}
6 x SDS-Probenpuffer (für 100 ml)	50 ml 0,5 M Tris/HCl, pH 6,8 40 ml Glycerol 1,24 g SDS 0,16 g Bromphenolblau 5% (v/v) β-Mercaptoethanol, vor Gebrauch frisch hinzugeben
Erstantikörperlösung (Santa Cruz):	
anti-Nrf2 („rabbit“)	1:100 bis 1:300 in Blockierreagenz
anti-Tubulin („mouse“):	1:5000 in Blockierreagenz
Zweitantikörperlösung (Santa Cruz):	
anti-„rabbit“ HRP-IgG-konjugiert	1:2000 in Blockierreagenz
anti-„mouse“ HRP-IgG-konjugiert	1:2000 in Blockierreagenz
Weitere Reagenzien	siehe Kapitel 6.6.3

6.7.3. Bestimmung von Glutathion nach Tietze

Die Messung des intrazellulären Gehaltes an Glutathion (GSH) beruht auf einer Methode, die von Ellman et al. [1959] publiziert wurde. Dabei reagiert die freie Thiolgruppe des GSH in einer nukleophilen Substitutionsreaktion mit der Disulfidbrücke des 5,5'-Dithiobis(2-Nitrobenzoesäure) (DTNB). Es kommt zur Bildung eines gemischten Disulfids und zur Freisetzung von 5-Thio-2-Nitrobenzoat (TNB), welches aufgrund seiner Absorption bei $\lambda = 412$ nm photometrisch bestimmt werden kann. Da die Reaktion stöchiometrisch verläuft, lässt sich durch Messung der Extinktionszunahme direkt der GSH-Gehalt bestimmen. Die Reaktionsgleichung ist in Abbildung 6.17 dargestellt.

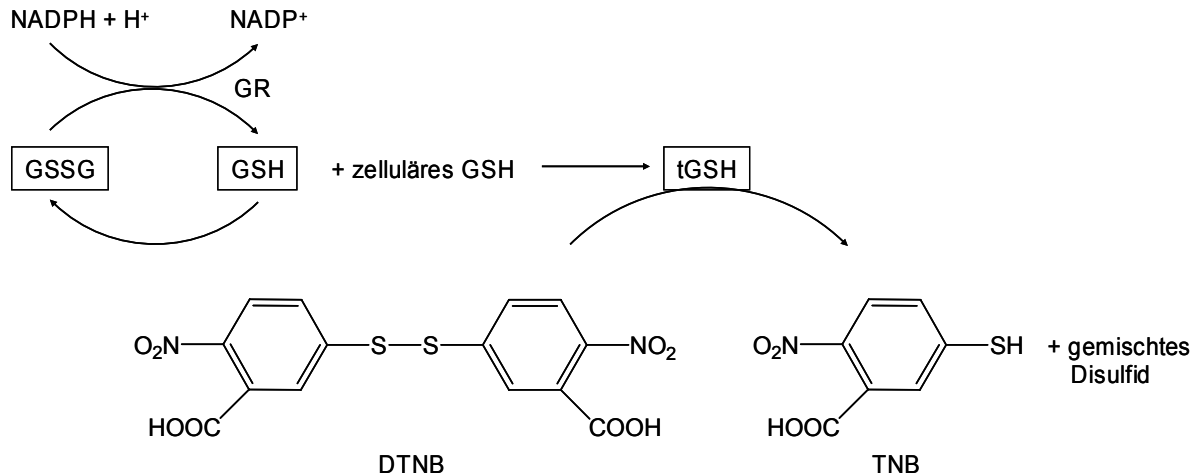


Abbildung 6-17: Schematische Darstellung der Bestimmung des Gehaltes an tGSH. DTNB, 5,5'-Dithiobis(2-Nitrobenzoesäure); GR, Glutathionreduktase; GSH, reduziertes Glutathion; GSSG, oxidiertes Glutathion; tGSH, „total“ GSH; TNB, 5-Thio-2-Nitrobenzoat.

Die Weiterentwicklung durch Tietze et al. [1969] ermöglicht zudem die Messung von intrazellulärem oxidierten Glutathion (GSSG). Dabei wird das gesamte GSSG mittels der Glutathionreduktase (GR) reduziert und anschließend die Summe aus reduziertem und oxidierten GSH, das Gesamt-GSH („total“ GSH, tGSH) mit DTNB umgesetzt. Die zeitliche Extinktionszunahme in einer bestimmten Zeit ist proportional zum tGSH-Gehalt, da alle Reaktionspartner deutlich im Überschuss vorliegen. Die Berechnung des tGSH-Gehaltes ergibt sich durch Vergleich mit Standardlösungen.

Da eine Messung von GSSG, aufgrund des sehr niedrigen zellulären Gehaltes und des starken Überschusses an GSH, schwierig ist, wird 2-Vinylpyrimidin (2-VP) eingesetzt um GSH abzufangen, wie Abbildung 6-18 zeigt.

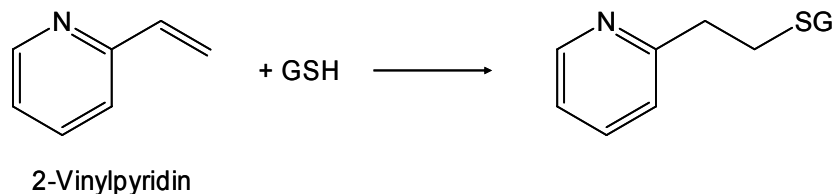


Abbildung 6-18: Reaktion von 2- Vinylpyrimidin mit Glutathion.

Nach Eliminierung des GSH wird GSSG mittels GR wieder zu GSH reduziert und direkt mit DTNB umgesetzt. Dieser GSH-Gehalt ist proportional zum GSSG-Gehalt, wobei zu beachten ist, dass aus einem GSSG zwei Äquivalente GSH entstehen.

Durchführung:

Kultivierung der Zellen und Inkubation mit den Testsubstanzen

- Aussäen von $2,5 \times 10^6$ (im Coexperiment mit dem GST Assay), bzw. $1,2 \times 10^6$ HT29-Zellen auf mittlere Petrischalen in serumhaltigem DMEM und Kultivierung für 48 h bei 37°C , 5% CO_2 und 95% Luftfeuchte.
- Inkubation mit den Testsubstanzen für 1 h in 10 ml serumfreien Medium, bzw. für 24 h in serumhaltigen Medium.

Probenaufarbeitung

- Das Medium wird entfernt und die Zellen mit 5 ml eiskaltem PBS gewaschen.
- Inkubation der Zellen mit 1 ml Trypsin für 2 min bei 37°C im Brutschrank.
- Durch Zugabe von 2 ml serumhaltigen Medium wird der Trypsinverdau gestoppt.
- Die Zellen werden durch mehrmaliges Spülen oder mithilfe eines Zellschabers vom Boden gelöst und die Zellsuspension wird in ein auf Eis vorgekühltes 15 ml Tube überführt.
- Nachspülen mit 1 ml serumhaltigen Medium.
- Die Viabilitätsbestimmung erfolgt mittels Trypanblau-Ausschluß-Verfahren (siehe Kapitel 6.4.1), wobei die Zellviabilität für eine weitere Versuchsdurchführung $\geq 80\%$ sein sollte.
- 2 ml der Zellsuspension wird in ein Eppendorfreaktionsgefäß überführt und bei 4°C für 10 min bei 500g zentrifugiert.
- Der Überstand wird verworfen und das Zellpellet in 1 ml eiskaltem Puffer A/B resuspendiert und bei 4°C für 10 min bei 500g zentrifugiert.
- Der Überstand wird verworfen und das Zellpellet mit 370 μl Puffer A/B versetzt und gut durchmischt.
- Von dieser Zellsuspension werden zweimal 10 μl für die BCA-Proteinbestimmung (siehe Kapitel 6.3.2) entnommen und in den 90 μl vorgelegten Puffer A/B überführt.
- Die restliche Zellsuspension wird mit 350 μl 10% Sulfosalicylsäure (SSS) versetzt, gevortext und für 15 min auf Eis stehen gelassen.
- Die dadurch ausgefällten Proteine werden bei 4°C für 10 min bei 20.000g zentrifugiert.

Messung von tGSH

- 10 µl des Überstandes sowie 10 µl der GSH-Standards und des Blindwertes (5%-ige SSS) werden in eine 96-Lochplatte pipettiert (Doppelbestimmung) und mit 190 µl tGSH-Reagenzmix versetzt.
- Die Messung erfolgt sofort photometrisch ($\lambda = 405 \text{ nm}$) mittels Mikrotiterplattenlesegerät.
- Zur Bestimmung der Extinktionszunahme pro Zeiteinheit erfolgt eine zweite Messung der Absorption nach 2 min.

Messung von GSSG

- Zur Inaktivierung des zellulären GSH werden 500 µl des Überstandes mit 20 µl 2-VP und 100 µl 50%-igem Triethanolamin (TEA) versetzt und im Thermomixer bei 26°C für 1 h umgesetzt.
- 20 µl des Überstandes sowie 20 µl der GSSG-Standards und des Blindwertes (5%-ige SSS) werden in eine 96-Lochplatte pipettiert (Doppelbestimmung) und mit 180 µl GSSG-Reagenzmix versetzt.
- Die Messung erfolgt sofort photometrisch ($\lambda = 405 \text{ nm}$) mittels Mikrotiterplattenlesegerät.
- Zur Bestimmung der Extinktionszunahme pro Zeiteinheit erfolgt eine zweite Messung der Absorption nach 10 min.

Auswertung:

Die Messwerte der Doppelbestimmung werden gemittelt. Die gemittelten ersten Extinktionswerte werden von den zweiten Extinktionswerten abgezogen und durch die Minutenzahl geteilt. Aus den Extinktionszunahmen pro min der Standardlösungen wird eine Standardreihe erstellt, aus der mittels linearer Regression eine Geradengleichung erhalten wird. Durch Umstellen der Gleichung kann aus den gemessenen Extinktionen der Proben der dazugehörige tGSH-Gehalt bzw. GSSG-Gehalt ermittelt werden. Der tGSH-Gehalt und GSSG-Gehalt wird auf die Proteinmenge der Probe bezogen und in nmol GSH / mg Protein angegeben.

Material und Methoden

Verwendete Reagenzien:

Puffer A	125 mM KH_2PO_4 8 mM EDTA in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ lösen, Lagerung bei 4°C
Puffer B	125 mM K_2HPO_4 8 mM EDTA in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ lösen, Lagerung bei 4°C
Puffer A/B	15 ml Puffer A 85 ml Puffer B
SSS-Lsg.	5% (w/v) SSS 10% (w/v) SSS
GSH-Stammlösung	1 mM GSH in 5%-iger SSS Lagerung bei -80°C
GSH-Standards	5 μM - 200 μM in 5%-iger SSS
GSSG-Stammlösung	1 mM GSSG in 5%-iger SSS Lagerung bei -80°C
GSSG-Standards	5 μM - 200 μM in 5%-iger SSS
DTNB-Lösung	6 mM (w/v) DTNB in Puffer A/B lösen mit Puffer A/B auf 50 U/ml verdünnen
Glutathionreduktase (GR)-Lösung	
NaHCO_3-Lösung	0,5% (w/v) NaHCO_3 , Lagerung bei 4°C
NADPH-Lösung	20 mM (w/v) in 0,5% NaHCO_3 -Lsg.
TEA	50% (v/v) Lagerung bei 4°C
tGSH-Reagenzmix	164 μl Puffer A/B 20 μl DTNB-Lösung 4 μl NADPH-Lösung 2 μl GR-Lösung
GSSG-Reagenzmix	154 μl Puffer A/B 20 μl DTNB-Lösung 4 μl NADPH-Lösung 2 μl GR-Lösung

6.7.4. Bestimmung der Glutathion-S-Transferase Aktivität

Enzyme der Klasse Glutathion-S-Transferasen (GSTs) katalysieren die Übertragung von GSH auf elektrophile Substanzen. Daher ist die Aktivität dieser essentiellen Enzyme ein wichtiger Hinweis auf eine mögliche Metabolisierung relevanter Fremdstoffe. Die Methode nach Habig et al. [1974] benutzt 1-Chlor-2,4-Dinitrobenzol (CDNB) als ein Substrat, das von nahezu allen GSTs mit hoher katalytischer Aktivität zu 2,4-Dinitrobenzyl-GSH umgesetzt wird, welches photometrisch nachweisbar ist. Die Reaktionsgleichung ist in Abbildung 6-19 dargestellt.

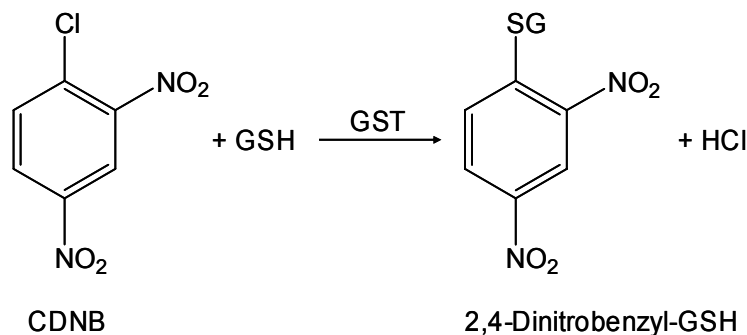


Abbildung 6-19: Reaktionsgleichung der von GST katalysierten Umsetzung von CDNB. CDNB, 1-Chlor-2,4-Dinitrobenzol; GSH, Glutathion; GST, Glutathion-S-Transferase.

Die Bestimmung dient somit als Maß der Gesamtaktivität aller im Zytosol enthaltenen GST-Isoformen.

Durchführung:

Kultivierung der Zellen und Inkubation mit den Testsubstanzen

- Aussäen von $2,5 \times 10^6$ (im Coexperiment mit dem GSH Assay), bzw. $1,2 \times 10^6$ HT29-Zellen auf mittlere Petrischalen in serumhaltigem DMEM und Kultivierung für 48 h bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchte.
- Inkubation mit den Testsubstanzen für 1 h in 10 ml serumfreien Medium, bzw. für 24 h in serumhaltigen Medium.

Probenaufarbeitung

- Das Medium wird entfernt und die Zellen mit 5 ml eiskaltem PBS gewaschen.
- Inkubation der Zellen mit 1 ml Trypsin für 2 min bei 37°C im Brutschrank.

- Durch Zugabe von 2 ml serumhaltigen Medium wird der Trypsinverdau gestoppt.
- Die Zellen werden durch mehrmaliges Spülen vom Boden gelöst und die Zellsuspension wird in ein auf Eis vorgekühltes 15 ml Tube überführt.
- Nachspülen mit 1 ml serumhaltigen Medium.
- 2 ml der Zellsuspension wird in ein auf Eis vorgekühltes Eppendorfreaktionsgefäß überführt und bei 4°C für 10 min bei 500g zentrifugiert.
- Der Überstand wird verworfen und das Zellpellet mit 1 ml PBS gewaschen und bei 4°C für 10 min bei 500g zentrifugiert.
- Der Überstand wird abgesaugt und für mind. 3 h bei -80°C in den Biofreezer zur Lyse gestellt.
- Das Pellet wird auf Eis aufgetaut, in 500 µl Kaliumphosphatpuffer aufgenommen und bei 4°C für 10 min bei 1000g zentrifugiert.

Umsetzung von CDNB

- 660 µl Kaliumphosphatpuffer, 40 µl GSH-Lösung und 80 µl des Überstandes werden in ein 2 ml Eppendorfreaktionsgefäß gegeben und gut gemischt.
- Inkubation des Reaktionsansatzes für 5 min bei 37°C im Thermomixer.
- Durch Zugabe von 20 µl CDNB-Lösung wird die Reaktion gestartet.
- 200 µl der Proben (maximal 4) werden in eine 96-Lochplatte pipettiert und im Mikrotiterplattenlesegerät bei 340 nm photometrisch vermessen.
- Alle weiteren 20 s erfolgt eine Messung (Insgesamt 25 Messungen).
- Jede Probe wird mind. zweifach bestimmt.
- Die Proteinbestimmung erfolgt aus dem Überstand mit der Methode nach Bradford (siehe Kapitel 6.3.1).

Auswertung:

Für die Auswertung werden die ersten 20 Messwerte genommen, da die Reaktion bereits im gesättigten Bereich startet und es zu einer schnellen Substratumsetzung kommt. Daher ist der lineare Bereich nach relativ kurzer Zeit nicht mehr gewährleistet. Die Steigung im linearen Bereich der ermittelten Kurve entspricht der Extinktionsdifferenz = $\Delta E / \text{min}$. Mit Hilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes wird die Enzymaktivität berechnet und in $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ Protein angegeben. Der Extinktionskoeffizient für das GSH-Konjugat beträgt $\epsilon = 9,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Verwendete Reagenzien:

PBS	siehe 6.1.2.5
Trypsin	siehe 6.1.2.5
Kaliumphosphatpuffer	1:1 Mischung aus KHPO_4 (10 mM) und K_2HPO_4 (10 mM), pH 7,4
GSH-Lösung	20 mM GSH in Kaliumphosphatpuffer
CDNB-Lösung	80 mM CDNB in EtOH frisch ansetzen (vor Licht schützen)

6.8. Bestimmung der Cytochrom-P450 abhängigen Monooxygenase (CYP) 1A1-Aktivität

Der EROD-Assay dient der Bestimmung von Cytochrom-P450 abhängiger Monooxygenase (CYP) 1A1-Aktivität in intakten Zellen. Die Methode basiert auf der spezifischen Dealkylierung von 7-Ethoxyresorufin zum fluoreszierenden Resorufin durch CYP 1A1 (Abbildung 6-20). Dabei wird das gebildete Resorufin von der Zelle an das Kulturmedium abgegeben. Die Zugabe von Dicumarol verhindert den weiteren Metabolismus des Resorufins durch das zytosolische Enzym Diaphorase [Lubet et al., 1985]. Die Fluoreszenzintensität des Mediums wird am Mikroplatten-reader vermessen und die Menge an gebildetem Resorufin mittels einer Resorufin-Standardgeraden quantifiziert [Donato et al., 1993].

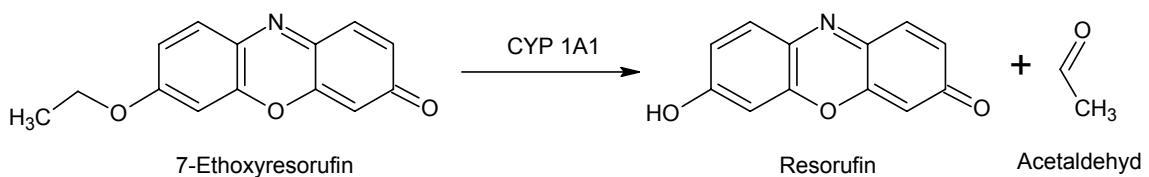


Abbildung 6-20: Dealkylierung von 7-Ethoxyresorufin zu Resorufin durch CYP1A1. CYP, Cytochrom-P450 abhängige Monooxygenase.

Parallel wird der Proteingehalt nach der Methode von Bradford als Bezugspunkt bestimmt (siehe Kapitel 6.3.1).

Kultivierung der Zellen und Inkubation mit den Testsubstanzen

- Aussäen von 100.000 HepG2-, 100.000 HT29- und 70.000 KYSE510-Zellen in 1 ml Kulturmedium pro Loch einer 24-Loch-Platte und Kultivierung für 48 h bei 37°C, 5% CO₂ und 95% relativer Luftfeuchte.
- Inkubation der Testsubstanzen für 1 h, 3 h, 6 h in 500 µl serumfreien Medium, bzw. für 24 h in serumhaltigen Kulturmedium.

Durchführung:

- Nach Absaugen des Inkubationsmediums erfolgt eine 30 minütige Inkubation mit 500 µl frisch hergestelltem EROD-Medium / Loch der 24-Loch-Platte.
- In eine 96-Loch-Platte werden 200 µl Ethanol / Loch vorgelegt.
- Es werden je 4 Templates zu je 75 µl des Überstandes der 24-Loch-Platte in je ein Loch der 96-Loch-Platte pipettiert.
- Die 96-Loch-Platte wird bei 1400g, 20°C, für 10 min zentrifugiert und sofort am Mikroplattenreader vermessen (Absorption: 535 nm; Emission: 595 nm).
- Die Proteine werden in 200 µl Kaliumphosphat-Puffer aufgenommen und nach der Methode von Bradford (siehe Abschnitt 6.3.1) bestimmt.

Auswertung:

Die jeweils gebildete Menge an Resorufin wird mittels der Resorufin-Standardreihe (0,1 pM- 0,5 nM) quantifiziert. Die Proteinmenge der jeweiligen Proben wird mit Hilfe linearer Regression über die mitgeführte BSA-Standardreihe ermittelt. Die CYP1A1-Aktivität wird in pmol Resorufin / min * mg Protein angegeben, weshalb wegen der Inkubationszeit mit EROD-Medium von 30 min durch 30 geteilt wird.

Verwendete Reagenzien:

PBS	siehe Kapitel 6.1.2.5
EROD-Medium	10 ml Kulturmedium 10 µl 10 mM Dicumarol 10 µl 10 mM 7-Etoxyresorufin
Ethanol	p.a.
Resorufin-Standardlösung	10 µM in Ethanol
Kaliumphosphatpuffer 100 mM	siehe Kapitel 6.7.4

6.9. Untersuchungen zur Gentranskription mittels Real Time PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde 1984 von Kary Mullis erfunden [Saiki et al., 1985] und stellt heutzutage eine molekularbiologische Standardmethode zur Vervielfältigung von Nucleinsäuren dar [Deepak et al., 2007]. Die Weiterentwicklung der konventionellen PCR zur Real Time PCR ermöglicht es die Amplifikation von Nucleinsäuren in Echtzeit zu verfolgen [Higuchi et al., 1992]. Damit wird die Detektion der Amplifikate während der exponentiellen Phase ermöglicht, was eine Quantifizierung der Transkriptmenge erlaubt [Smith und Osborn, 2009].

Die Untersuchungen werden basierend auf der Reversen Transkription PCR (RT-PCR) durchgeführt, die eine sensitive Methode für die Erfassung geringer mRNA Mengen darstellt [Bustin, 2000]. Die Detektion und Quantifizierung der Proben erfolgt unter Verwendung des Fluoreszenzfarbstoffes SYBR® Green (Abbildung 6-21) mittels Real Time PCR.

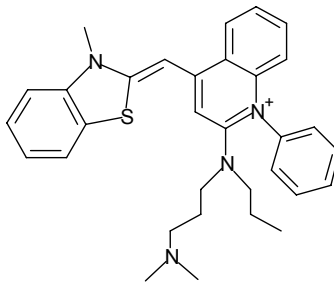


Abbildung 6-21: Struktur des Fluoreszenzfarbstoffes SYBR® Green.

Kultivierung der Zellen und Inkubation mit den Testsubstanzen

- Aussäen von 500.000 HepG2-, HT29- und KYSE510-Zellen in kleine Petrischalen in serumhaltigem Medium und Kultivierung für 48 h bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchte.
- Inkubation der Testsubstanzen für 24 h in 5 ml serumhaltigen Medium.

RNA Isolierung

Die RNA-Isolierung erfolgt mit dem RNeasy® Mini Kit (QIAGEN) gemäß dem Handbuch des Herstellers. Dabei wird nach Zelllyse in einem RNaseinhibitor-haltigen Extraktionspuffer und Scheren der Nucleinsäuren die Gesamt-RNA in Anwesenheit von Ethanol an die „RNeasy silica Membran“ gebunden. Nach dem Waschen mit

Puffern unterschiedlicher Salzkonzentration wird die RNA in RNase-freiem Wasser von der RNeasy Mini Spin Säule eluiert (Abbildung 6-22).

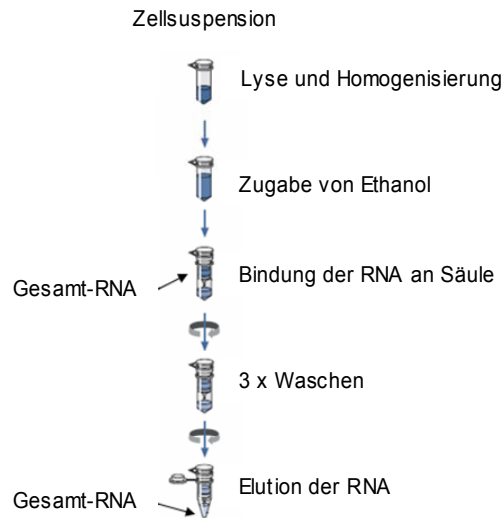


Abbildung 6-22: RNeasy® Mini Verfahren (QIAGEN) [modifiziert nach QIAGEN Handbuch].

Durchführung

- Absaugen des Mediums und Spülen mit 2 ml eiskaltem PBS-Puffer.
- Lyse der Zellen mit 350 µl RLT-Puffer, dem unmittelbar vor Verwendung 10 µl β-Mercaptoethanol pro 1 ml Pufferlösung zugesetzt wird.
- Abschaben der Zellen mit einem sterilen Einweg-Schaber und Überführen des Zelllysats in ein steriles Eppendorfgefäß.
- Homogenisieren des Zelllysats und Scheren der Nukleinsäuren durch 5 x Ziehen durch eine 0,9 mm Kanüle (20 Gauge).
- Resuspension nach Zugabe von 350 µl Ethanol (70%) und Aufgabe der Zellsuspension auf die sterile Silika-Membran.
- Zentrifugieren für 30 s mit 10.000g (RT).
- Durchfluss verwerfen und Aufgabe von 700 µl RW1-Puffer auf die Säule.
- Zentrifugieren mit 10.000g für 15 s (RT) und Verwerfen des Durchflusses.
- Aufgabe von 500 µl RPE-Puffer auf die Säule und Zentrifugieren für 15 s bei 10.000g (RT) und Verwerfen des Durchflusses.
- Wiederholte Aufgabe von 500 µl RPE-Puffer auf die Säule und Zentrifugieren bei 10.000g für 2 min (RT).
- Aufsetzen der Säule auf ein RNase-freies Eppendorfgefäß und Aufgabe von 30-50 µl RNase-freiem Wasser direkt auf die Membran.

- Zentrifugieren für 1,5 min bei 10.000g (RT) und nach Beenden direkte Lagerung der isolierten RNA auf Eis.

Verwendete Reagenzien:

PBS	siehe Kapitel 6.1.2.5
Lysepuffer	RLT-Puffer
Lysepuffer Gebrauchslösung	1% β -Mercaptoethanol in RLT Puffer
ETOH	70% p.a.
Waschpuffer A	RW1-Puffer
Waschpuffer B	RPE-Puffer
Elutionsmittel	RNase freies H ₂ O

Reverse Transkription

Die Taq-DNA-Polymerase der PCR vervielfältigt ausschließlich DNA, weshalb isolierte RNA für die PCR durch virale Enzyme, so genannte Reversen Transkriptasen in komplementäre DNA („complementary“, cDNA) umgeschrieben werden muss. Bei der Reversen Transkription der RNA binden Oligo-dT-Primer an die Poly-A-Region am 3'-Ende des Transkripts (Abb. 6-23, A) und setzen somit den Startpunkt für die Reverse Transkriptase, die nachfolgend den komplementären DNA-Strang von 5'→3' synthetisiert (Abb. 6-23, B und C). Nach Abschluss der Synthese des ersten cDNA-Stranges wird der mRNA-Strang von der Reversen Transkriptase abgebaut und gleichzeitig durch einen zweiten cDNA-Strang ersetzt. Das Resultat ist ein cDNA-Doppelstrang (Abb. 6-23, D). Für die Reverse Transkription wird der „QuantiTect® Reverse Transcription“-Kit (QIAGEN) verwendet. Vor der eigentlichen Reversen Transkription findet hier ein Abbau von genomischer DNA (gDNA) statt, um in der nachfolgenden PCR fehlerhafte Ergebnisse durch die mögliche Amplifikation von gDNA zu vermeiden. Es wird je Reaktion 500 ng Gesamt-RNA in cDNA umgeschrieben.

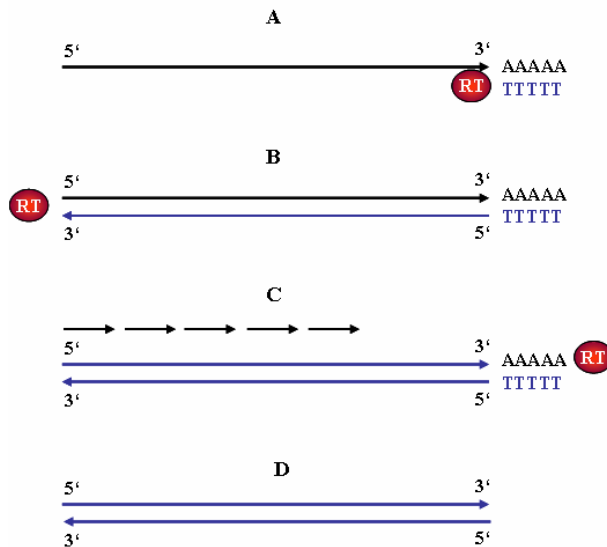


Abbildung 6-23: Schematische Darstellung der Reversen Transkription. RT, Reverse Transkriptase.

Durchführung:

- Verdünnung der isolierten RNA auf 500 ng mit H₂O_{bidest} auf ein Volumen von 6 µl und Zugabe von 1 µl gDNA Wipe-out Puffer (auf Eis).
- Inkubation der Probe bei 42°C für 2 min.
- Zugabe von 3 µl RT-Mastermix, bestehend aus 2 µl 5 x RT-Puffer, 0,5 µl Primer Mix und 0,5 µl Reverse Transkriptase (auf Eis).
- Inkubation bei 42°C für 15 min und nachfolgend bei 95°C für 3 min.

Nachfolgend wird die cDNA auf Eis gestellt oder bei -20°C im Eisschrank (maximal 2 Monate) gelagert.

Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Mittels PCR kann DNA genspezifisch mithilfe einer hitzeresistenten DNA-Polymerase vervielfältigt werden. Diese so genannte Taq-Polymerase stammt ursprünglich aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus*. Für die PCR werden die zu amplifizierenden DNA-Matrizen, genspezifische Primer (QuantiTect® Primer Assays), HotStarTaq-DNA-Polymerase, QuantiTect® SYBR Green PCR Puffer und SYBR Green I von QIAGEN eingesetzt. Die verwendeten Primer sind so gewählt, dass sie eine Exon/Exon-Grenze überspannen [QuantiTect® Primer Assay Handbuch]. Darüber hinaus muss vor Beginn der PCR die HotStarTaq-DNA-Polymerase durch Erhitzen auf 95°C aktiviert werden.

Die PCR läuft in einer zyklischen Abfolge von drei Schritten ab, die bis zu 40 x hintereinander wiederholt werden. Bei der Denaturierung wird der PCR-Ansatz für 15 s auf 95°C erhitzt, um die cDNA-Matrize (Template) und die Primer durch Brechung der Wasserstoffbrückenbindungen in ihre Einzelstränge aufzuschmelzen (Abb. 6-24, A). Nachfolgend wird die Temperatur für 20 - 30 s auf 50 - 60°C erniedrigt. Bei dieser sog. Primerhybridisierung können sich die Primer spezifisch an die entsprechenden DNA-Sequenzen anlagern. Weiterhin beginnt die Taq-DNA-Polymerase durch Bindung an das Primer-Template-Hybrid mit der Verlängerung der DNA-Sequenz unter Verbrauch von dNTPs (Abb. 6-24, B). Bei der Elongation wird die Temperatur für 10 - 30 s auf 72°C erhöht, da die HotStarTaq-Polymerase bei dieser Temperatur die höchste Aktivität besitzt und so den komplementären DNA-Strang bis zum Ende der Sequenz vervollständigen kann (Abb. 6-24, C). Für die Durchführung der Real Time PCR wird der „QuantiTect® SYBR Green PCR“-Kit (QIAGEN) verwendet.

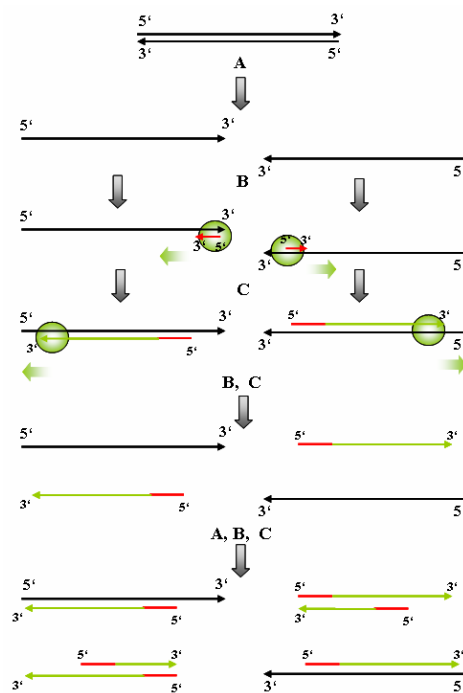


Abbildung 6-24: Mechanismus der PCR.

Durchführung:

- Vorlegen von 10 µl QuantiTect® SYBR Green PCR Master Mix (2 x) pro Loch in eine 96-Loch Platte (Hard Shell WHT/WHT, BIO-RAD).
- Zugabe von 2 µl QuantiTect® SYBR Green Primer Assay (10 x) und 1 µl cDNA-Template (entspricht 50 ng RNA-Äquivalent) als Duplikat.

- Mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ auf ein Gesamtvolumen von 20 μl pro Loch auffüllen und mit einer Folie (Microseal 'B' Film, BIO-RAD) versiegeln.
- Einstellen in den Thermocycler (PTC-200, MJ Research mit optischer Messeinheit Chrom4™, BIO-RAD) mit folgendem PCR-Programm:
 1. Inkubation bei 95°C für 15 min.
 2. Inkubation bei 94°C für 15 s.
 3. Inkubation bei 55°C für 30 s.
 4. Inkubation für 72°C für 30 s.
 5. Detektion der Fluoreszenz.
 6. 39 x Wiederholen der Schritte 2 - 5.
 7. Bestimmung der Schmelzkurven von 40°C - 60 C in Schritten von 1°C.

Die Amplifikation der DNA wird bei der Real Time PCR in Echtzeit nach jedem Zyklus gemessen [Kubista et al., 2006]. Dies wird durch den Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green I ermöglicht. Dieser Farbstoff interkaliert in doppelsträngige DNA und der dabei gebildete Komplex absorbiert blaues ($\lambda_{\text{max}} = 488 \text{ nm}$) und emittiert grünes Licht ($\lambda_{\text{max}} = 524 \text{ nm}$), wobei die Zunahme der Fluoreszenz gemessen werden kann. Um sicherzustellen, dass die Sequenz des untersuchten Gens spezifisch amplifiziert wurde, wird im Anschluss an die PCR eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Eine spezifisch abgelaufene PCR-Reaktion sollte einen einzelnen Peak in der Schmelzkurvenanalyse aufweisen.

Die relative Quantifizierung der Menge an Transkripten erfolgt mit der $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode. Dabei wird der Schwellenwert in den exponentiellen Bereich der Amplifikationskurven gelegt. So kann jeder Amplifikationskurve ein PCR-Zyklus-Wert („threshold cycle“, CT-Wert) zugeordnet werden, bei dem das Fluoreszenzsignal über diesem Threshold liegt. Die Normalisierung der Daten erfolgt auf ein Kontrollgen („housekeeping gene“) das durch die zu untersuchenden Substanzen nicht moduliert wird, hier β -Aktin. Die Berechnung der relativen Transkription (rT) erfolgt nach den folgenden Formeln:

$$\Delta\text{CT} = \text{CT}_{\text{Gen}} - \text{CT}_{\beta\text{-Aktin}}$$

$$\Delta\Delta\text{CT} = \Delta\text{CT}_{\text{Probe}} - \Delta\text{CT}_{\text{Kontrolle}}$$

$$\text{rT} = 2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$$

6.10. Materialverzeichnis

Allgemeine Chemikalien

Agarose:	- peqGOLD Universal Agarose	Peqlab
	- "low melting agarose"	Biorad
	- "normal meltin agarose"	Biorad
Adenosintriphosphat (ATP)		Sigma Aldrich
Ammoniumperoxodisulfat (APS)		Roth
Bicinchoninsäure (BCA)		Sigma Aldrich
Rinderserumalbumin (BSA)		Roth
Bromphenolblau		Serva
1-Butanol		Roth
Cäsiumchlorid (CsCl)		Roth
Coomassie® Brilliantblau G250		Roth
DAPI / Sulforhodamin (SR) 101		Partec
2',7'-Dichlorfluorescein-Diacetat (DCFH-DA)		Sigma Aldrich
Dicumarol		Sigma Aldrich
DMSO für Molekularbiologie		Roth
DMSO p. a.		Roth
5,5'-Dithiobis(2-Nitrobenzoesäure) (DTNB)		Sigma Aldrich
Dithiothreitol (DTT)		Roth
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)		Roth
Essigsäure (Hac)		Roth
Ethanol (EtOH)		Roth
Ethidiumbromid (EtBr)		Roth
Fetales Kälberserum (FKS)		Invitrogen
Glycerol		Roth
Glycin		Roth
Harnstoff		Roth
HEPES		Roth
Isopropanol		Roth
Kalbsthymus-DNA		Fluka
Kaliumacetat		Roth
Kaliumchlorid (KCl)		Merck
Kaliumhydroxid (KOH)		J. T. Baker
Kinetoplasten-DNA (kDNA)		Topogen
Kupfersulfat (CuSO ₄)		Merck
Lumiglo®		Cell Signaling Techn.
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)		Merck
β-Mercaptoethanol		Roth
Methanol (MeOH)		Roth
Milchpulver		Roth
Mineralöl		Roth
Natriumacetat (NaOAc)		Roth
Natriumchlorid (NaCl)		Roth
Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄)		Roth
di-Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)		Roth
Nariumhydroxid (NaOH)		Roth

Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma Aldrich
N-Lauroylsarkosylat	Sigma Aldrich
Nonidet® P40	AppliChem
Penicillin / Streptomycin	Invitrogen
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Alexis
Phosphorsäure	Roth
Protease Inhibitor Mix	Roche
Puromycin	Sigma Aldrich
Resorufin	Sigma Aldrich
Rotiphorese 30	Roth
Salzsäure (HCl)	Roth
SeeBlue Plus2	Invitrogen
Sulforhodamin B (SRB)	Sigma Aldrich
N,N,N',N'-Tetramethylendiamin (TEMED)	Roth
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	Roth
TRIS Base	Roche
Trichloressigsäure (TCA)	Roth
Triton X-100	Roth
Trypanblau	Sigma Aldrich
Trypsin	Serva
Tween-20	Sigma Aldrich

Testsubstanzen

Altenuen (ALT)	AK Podlech, Karlsruhe
Alternariol (AOH)	AK Podlech, Karlsruhe
	Sigma Aldrich
	Dr. Merz, Kaiserslautern
Alternariolmonomethylether (AME)	Sigma Aldrich
	Dr. Merz, Kaiserslautern

Positivkontrollen

Aroclor (ARO)	AK Metzler, Karlsruhe
L-Buthioninsulfoximin (BSO)	Sigma Aldrich
<i>tert</i> -Butylhydrochinon (tBHQ)	Sigma Aldrich
Camptothecin (CPT)	Sigma Aldrich
Doxorubicin (DOX)	Sigma Aldrich
Etoposid (ETO)	Sigma Aldrich
Menadion (MEN)	Sigma Aldrich

Antikörper

anti-Kaninchen HRP-IgG-konjugiert	Santa Cruz
anti-Maus HRP-IgG-konjugiert	Santa Cruz
anti-Nrf2 (Kaninchen)	Santa Cruz
anti-Topoisomerase I (Maus)	Santa Cruz
anti-Topoisomerase II α (Kaninchen)	Santa Cruz
anti-Topoisomerase II α (Kaninchen)	Santa Cruz
anti-Tubulin (Maus)	Santa Cruz

Kulturmedien

„Minimum Essential Medium“ (MEM)	Sigma Aldrich
„Rosswell Park Memorial Institute“ (RPMI)	Invitrogen
„Dulbecco´s Modified Eagle´s Medium“ (DMEM)	Invitrogen
DMEM (farblos)	Sigma Aldrich

Kits / Handbücher

Cytotoxicity Detection Kit [LDH]	Roche
QuantiTect® Reverse Transcription	QIAGEN
QuantiTect® SYBR Green PCR-Kit	QIAGEN
RNeasy Mini Kit	QIAGEN

Gebrauchs- und Bedarfsgegenstände

Blottingpapiere (1,5 mm, 0,5 mm)	VWR
Deckgläser	VWR
Eppendorfpipetten research (2,5 µl; 10 µl; 20 µl; 100 µl; 200 µl; 1000 µl; 5000 µl)	Eppendorf
Eppendorfreaktionsgefäße (1,5 ml; 2 ml)	Roth,
Glaspipetten (5, 10, 20 ml)	VWR
Kanülen (0,9 x 40 mm, Neolus 100)	VWR
Kulturflaschen	Sarstedt
24-Lochplatte (steril)	Greiner
96-Lochplatte (steril, unsteril)	Greiner
Multipette	Eppendorf
Multipettenaufsätze (1 ml; 5 ml; 10 ml)	Eppendorf
Neubauer-Zählkammer	Roth
Objektträger einseitig aufgeraut	Menzel-Gläser
Objektträger „Superfrost“	Roth
Objektträgerbox	Roth
Pasteurpipetten	Roth
Petrischalen (ø 5 cm, 10 cm, 15 cm)	Sarstedt
Pipettenspitzen (2,5 µl; 10 µl; 20 µl-200 µl; 1000 µl; 5000 µl)	Sarstedt, VWR
Polyallomerzentrifugengefäße (13 ml)	Beckmann Coulter
Spritzen (1 ml, Syringe)	VWR
Whatman Nitrozellulose Transfer Membran	VWR
Zellkulturflaschen	Sarstedt
Zellschaber	Nunc

Material und Methoden

Gerät	Name/Modell	Hersteller
Biofreezer		New Brunswick Scientific
CO ₂ -Brutschrank	CB210	Binder
CCD-Kamera	LAS-3000	Fujifilm, Raytest
Elektrophorese-Kammer	Perfect Blue™, Vertical Electrophorese System	Peqlab
Feinwaage	Sartorius handy	Sartorius
Grobwaage	Sartorius excellence	Sartorius
Magnetrührer	IKA RH basic 2	IKA-Werke
Mikroskop	Axiovert 40 C	Zeiss
Mikrotiterplattenlesegerät	Victor ³ V Wallac 1420	PerkinElmer
Nanodrop®	ND-1000, Software ND-1000 V 3.2.1	NanoDrop Technologies
pH-Meter	CG817	Schott Geräte
Pipettus		Hirschmann Laborgeräte
Power Station	Consort E835	Consort
Reinraumwerkbank	KR-170 BW	KOJAIR
Slot-Blot-Apparatur	MINIFOLD®II Slot Blot System, Item 104H7800	Schleicher & Schuell
Thermocycler	TS-100 Thriller	Peqlab Peqlab
Ultrazentrifuge	Centrikon T-1080	Kontron Instruments
Überkopfschüttler	Roto-Shake Genie	Scientific Industries
Vortexer	Vortex Genie 2	Scientific Industries
Wasserbad		Memmert
Zentrifugen	5417R 5415	Eppendorf Eppendorf

7. Literaturverzeichnis

A

- Abe T. (1999)** Infantile leukemia and soybeans - a hypothesis. *Leukemia*. 13(3), 317-320.
- Aboussekhra A. und Wood R. D. (1995)** Detection of nucleotide excision repair incisions in human fibroblasts by immunostaining for PCNA. *Exp. Cell Res.* 221(2), 326-332.
- Adachi N., Suzuki H., Iizumi S. und Koyama H. (2003)** Hypersensitivity of nonhomologous DNA end-joining mutants to VP-16 and ICRF-193: implications for the repair of topoisomerase II-mediated DNA damage. *J. Biol. Chem.* 278(38), 35897-35902.
- Adachi N., Iizumi S., So S. und Koyama H. (2004)** Genetic evidence for involvement of two distinct nonhomologous end-joining pathways in repair of topoisomerase II-mediated DNA damage. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 318(4), 856-861.
- Agostinho M., Santos V., Ferreira F., Costa R., Cardoso J., Pinheiro I., Rino J., Jaffray E., Hay R. T. und Ferreira J. (2008)** Conjugation of human topoisomerase 2 alpha with small ubiquitin-like modifiers 2/3 in response to topoisomerase inhibitors: cell cycle stage and chromosome domain specificity. *Cancer Res.* 68(7), 2409-2418.
- Aka P., Mateuca R., Buchet J. P., Thierens H. und Kirsch-Volders M. (2004)** Are genetic polymorphisms in OGG1, XRCC1 and XRCC3 genes predictive for the DNA strand break repair phenotype and genotoxicity in workers exposed to low dose ionising radiations? *Mutat. Res.* 556(1-2), 169-181.
- Alsner J., Svejstrup J. Q., Kjeldseng E., Sørensen B. S. und Westergaard O. (1992)** Identification of an N-terminal domain of eukaryotic DNA topoisomerase I dispensable for catalytic activity but essential for *in vivo* function. *J. Biol. Chem.* 267(18), 12408-12411.
- Aly A. H., Edrada-Ebel R., Indriani I. D., Wray V., Müller W. E. G., Totzke F., Zirrgiebel U., Schächtele C., Kubbutat M. H. G., Lin W. H., Proksch P. und Ebel R. (2008)** Cytotoxic metabolites from the fungal endophyte *Alternaria sp.* and their subsequent detection in its host plant *Polygonum senegalense*. *J. Nat. Prod.* 71(6), 972-980.
- An Y., Zhao T., Miao J., Liu G., Zheng Y., Xu Y. und Van Etten R. L. (1989)** Isolation, identification, and mutagenicity of alternariol monomethyl ether. *J. Agric. Food Chem.* 37(5), 1341-1343.

- Andoh T.** und Ishida R. (1998) Catalytic inhibitors of DNA topoisomerase II. *Biochim. Biophys. Acta.* 1400(1-3), 155-171.
- Antony S.**, Marchand C., Stephen A. G., Thibaut L., Agama K. K., Fisher R. J. und Pommier Y. (2007) Novel high-throughput electrochemiluminescent assay for identification of human tyrosyl-DNA phosphodiesterase (Tdp1) inhibitors and characterization of furamide (NSC 305831) as an inhibitor of Tdp1. *Nucleic Acids Res.* 35(13), 4474-4484.
- Auclair C.** (1987) Multimodal action of antitumor agents on DNA: the ellipticine series. *Arch. Biochem. Biophys.* 259(1), 1-14.
- Austin C. A.**, Sng J. H., Patel S. und Fisher L. M. (1993) Novel HeLa topoisomerase II is the II beta isoform: complete coding sequence and homology with other type II topoisomerases. *Biochim. Biophys. Acta.* 1172(3), 283-291.
- Austin C. A.**, Marsh K. L., Wasserman R. A., Willmore E., Sayer P. J., Wang J. C. und Fisher L. M. (1995) Expression, domain structure, and enzymatic properties of an active recombinant human DNA topoisomerase II beta. *J. Biol. Chem.* 270(26), 15739-15746.
- Austin C. A.** und Marsh K. L. (1998) Eukaryotic DNA topoisomerase II beta. *Bioessays.* 20(3), 215-226.
- Azarova A. M.**, Lyu Y. L., Lin C. P., Tsai Y. C., Lau J. Y. N., Wang J. C. und Liu L. F. (2007) Roles of DNA topoisomerase II isozymes in chemotherapy and secondary malignancies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104(26), 11014-11019.

B

- Bae S. I.**, Zhao R. und Snapka R. M. (2008) PCNA damage caused by antineoplastic drugs. *Biochem. Pharmacol.* 76(12), 1653-1668.
- Bächler S.** (2008) Isoenzympezifität der Topoisomerasegiftung im ICE-Assay und Einfluss von *Alternaria*-Toxinen auf die Translokation von Nrf2. Wissenschaftliche Abschlussarbeit, Institut für Angewandte Biowissenschaften, Abteilung Lebensmitteltoxikologie, Universität Karlsruhe (TH).
- Baker R. K.**, Kurz E. U., Pyatt D. W., Irons R. D. und Kroll D. J. (2001) Benzene metabolites antagonize etoposide-stabilized cleavable complexes of DNA topoisomerase IIalpha. *Blood.* 98(3), 830-833.
- Baker S. D.**, Wadkins R. M., Stewart C. F., Beck W. T. und Danks M. K. (1995) Cell cycle analysis of amount and distribution of nuclear DNA topoisomerase I as determined by fluorescence digital imaging microscopy. *Cytometry.* 19(2), 134-145.

- Ban ath J. P.** und Olive P. L. (2003) Expression of phosphorylated histone H2AX as a surrogate of cell killing by drugs that create DNA double-strand breaks. *Cancer Res.* 63(15), 4347-4350.
- Bandeled O. J.** und Osheroff N. (2008a) (-)-Epigallocatechin gallate, a major constituent of green tea, poisons human type II topoisomerases. *Chem. Res. Toxicol.* 21(4), 936-943.
- Bandeled O. J.** und Osheroff N. (2008b) The efficacy of topoisomerase II-targeted anticancer agents reflects the persistence of drug-induced cleavage complexes in cells. *Biochemistry.* 47(45), 11900-11908.
- Bandeled O. J.**, Clawson S. J. und Osheroff N. (2008) Dietary polyphenols as topoisomerase II poisons: B ring and C ring substituents determine the mechanism of enzyme-mediated DNA cleavage enhancement. *Chem. Res. Toxicol.* 21(6), 1253-1260.
- Banfi G.**, Iorio E. L. und Corsi M. M. (2008) Oxidative stress, free radicals and bone remodeling. *Clin. Chem. Lab. Med.* 46(11), 1550-1555.
- Barkai-Golan R.** (2008) *Alternaria* Mycotoxins. *Alternaria Mycotoxins. Mycotoxins in Fruits and Vegetables, Elsevier Science & Technology Books*, 185-203.
- Barthelmes H. U.**, Niederberger E., Roth T., Schulte K., Tang W. C., Boege F., Fiebig H. H., Eisenbrand G. und Marko D. (2001) Lycobetaine acts as a selective topoisomerase II beta poison and inhibits the growth of human tumour cells. *Br. J. Cancer.* 85(10), 1585-1591.
- Barthelmes H. U.**, Habermeyer M., Christensen M. O., Mielke C., Interthal H., Pouliot J. J., Boege F. und Marko D. (2004) TDP1 overexpression in human cells counteracts DNA damage mediated by topoisomerases I and II. *J. Biol. Chem.* 279(53), 55618-55625.
- Beaumont P. O.**, Moore M. J., Ahmad K., Payne M. M., Lee C. und Riddick D. S. (1998) Role of glutathione S-transferases in the resistance of human colon cancer cell lines to doxorubicin. *Cancer Res.* 58(5), 947-955.
- Beillerot A.**, Domínguez J. C. R., Kirsch G. und Bagrel D. (2008) Synthesis and protective effects of coumarin derivatives against oxidative stress induced by doxorubicin. *Bioorg. Med. Lett.* 18(3), 1102-1105.
- Bender R. P.**, Lindsey R. H., Burden D. A. und Osheroff N. (2004) N-acetyl-p-benzoquinone imine, the toxic metabolite of acetaminophen, is a topoisomerase II poison. *Biochemistry.* 43(12), 3731-3739.
- Bender R. P.**, Lehmler H. J., Robertson L. W., Ludewig G. und Osheroff N. (2006) Polychlorinated biphenyl quinone metabolites poison human topoisomerase IIalpha: altering enzyme function by blocking the N-terminal protein gate. *Biochemistry.* 45(33), 10140-10152.

- Bender R. P.**, Ham A. J. L. und Osheroff N. (2007) Quinone-induced enhancement of DNA cleavage by human topoisomerase II α : adduction of cysteine residues 392 and 405. *Biochemistry*. 46(10), 2856-2864.
- Bender R. P.** und Osheroff N. (2007) Mutation of cysteine residue 455 to alanine in human topoisomerase II α confers hypersensitivity to quinones: enhancing DNA scission by closing the N-terminal protein gate. *Chem. Res. Toxicol.* 20(6), 975-981.
- Bennett J. W.** und Klich M. (2003) Mycotoxins. *Clin. Microbiol. Rev.* 16(3), 497-516.
- Berger J. M.**, Gamblin S. J., Harrison S. C. und Wang J. C. (1996) Structure and mechanism of DNA topoisomerase II. *Nature*. 379(6562), 225-232.
- Berger J. M.** (1998) Structure of DNA topoisomerases. *Biochim. Biophys. Acta*. 1400(1-3), 3-18.
- Bergink S.** und Jentsch S. (2009) Principles of ubiquitin and SUMO modifications in DNA repair. *Nature*. 458(7237), 461-467.
- Besterman J. M.**, Elwell L. P., Cragoe E. J., Andrews C. W. und Cory M. (1989) DNA intercalation and inhibition of topoisomerase II. Structure-activity relationships for a series of amiloride analogs. *J. Biol. Chem.* 264(4), 2324-2330.
- Biersack H.**, Jensen S., Gromova I., Nielsen I. S., Westergaard O. und Andersen A. H. (1996) Active heterodimers are formed from human DNA topoisomerase II α and II β isoforms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93(16), 8288-8293.
- Bock K. W.** und Köhle C. (2006) Ah receptor: dioxin-mediated toxic responses as hints to deregulated physiologic functions. *Biochem. Pharmacol.* 72(4), 393-404.
- Bodley A. L.** und Liu L. F. (1988) Topoisomerases as Novel Targets for Cancer Chemotherapy. *Bio/Technology*. 6, 1315-1319.
- Boege F.** (1996) Analysis of eukaryotic DNA topoisomerases and topoisomerase-directed drug effects. *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 34(11), 873-888.
- Boiteux S.** (1993) Properties and biological functions of the NTH and FPG proteins of *Escherichia coli*: two DNA glycosylases that repair oxidative damage in DNA. *J. Photochem. Photobiol. B.* 19(2), 87-96.
- Boldogh I.**, Roy G., Lee M. S., Bacsi A., Hazra T. K., Bhakat K. K., Das G. C. und Mitra S. (2003) Reduced DNA double strand breaks in chlorambucil resistant cells are related to high DNA-PKcs activity and low oxidative stress. *Toxicology*. 193(1-2), 137-152.
- Bozko P.**, Larsen A. K., Raymond E. und Skladanowski A. (2002) Influence of G2 arrest on the cytotoxicity of DNA topoisomerase inhibitors toward human carcinoma cells with different p53 status. *Acta. Biochim. Pol.* 49(1), 109-119.

- Bradford M. M. (1976)** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Brill S. J., DiNardo S., Voelkel-Meiman K. und Sternglanz R. (1987)** Need for DNA topoisomerase activity as a swivel for DNA replication for transcription of ribosomal RNA. *Nature.* 326(6111), 414-416.
- Broggi L. E., González H. H. L., Resnik S. L. und Pacin A. (2007)** *Alternaria alternata* prevalence in cereal grains and soybean seeds from Entre Ríos, Argentina. *Rev. Iberoam. Micol.* 24(1), 47-51.
- Brugger E. M., Wagner J., Schumacher D. M., Koch K., Podlech J., Metzler M. und Lehmann L. (2006)** Mutagenicity of the mycotoxin alternariol in cultured mammalian cells. *Toxicol. Lett.* 164(3), 221-230.
- Budde J. (2009)** Interaktion der *Alternaria* Mykotoxine Alternariol und Alternariolmonomethylether mit dem Arylhydrocarbon Rezeptor Signalweg. Diplomarbeit, Institut für Toxikologie und Genetik, Universität Karlsruhe (TH).
- Bundesamt für Risikobewertung (BfR) Stellungnahme vom 30. Juli 2003:** *Alternaria*-Toxine in Lebensmitteln.
- Bunin G. R. (2004)** Nongenetic causes of childhood cancers: evidence from international variation, time trends, and risk factor studies. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 199(2), 91-103.
- Burden D. A. und Osheroff N. (1998)** Mechanism of action of eukaryotic topoisomerase II and drugs targeted to the enzyme. *Biochim. Biophys. Acta.* 1400(1-3), 139-154.
- Burkart J. (2009)** Untersuchungen zum toxischen Potential von Alternariol und Alternariolmonomethylether in humanen Karzinomzellen der Speiseröhre und der Leber. Wissenschaftliche Abschlussarbeit, Institut für Angewandte Biowissenschaften, Abteilung Lebensmitteltoxikologie, Universität Karlsruhe (TH).
- Burkhardt B., Pfeiffer E. und Metzler M. (2009)** Absorption and metabolism of the mycotoxins alternariol and alternariol-9-methyl ether in Caco-2 cells *in vitro*. *Mycotox. Res.* 25, 149-157.
- Burkitt M. J. und Wardman (2001)** Cytochrome C is a potent catalyst of dichlorofluorescein oxidation: implications for the role of reactive oxygen species in apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 282(1), 329-333.
- Burma S., Chen B. P. C. und Chen D. J. (2006)** Role of non-homologous end joining (NHEJ) in maintaining genomic integrity. *DNA Repair (Amst).* 5(9-10), 1042-1048.

Burnette W. (1981) "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal. Biochem.* 112, 195-203.

Burroughs R., Seitz L. M., Sauer D. B. und Mohr H. E. (1976) Effect of substrate on metabolite production of *Alternaria alternata*. *Appl. Environ. Microbiol.* 31(5), 685-690.

Bush R. K. und Prochnau J. J. (2004) *Alternaria*-induced asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 113(2), 227-234.

Bustin S. A. (2000) Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J. Mol. Endocrinol.* 25(2), 169-193.

C

Cai Y. J., Lu J. J., Zhu H., Xie H., Huang M., Lin L. P., Zhang X. W. und Ding J. (2008) Salvicine triggers DNA double-strand breaks and apoptosis by GSH-depletion-driven H₂O₂ generation and topoisomerase II inhibition. *Free Radic. Biol. Med.* 45(5), 627-635.

Caldecott K., Banks G. und Jeggo P. (1990) DNA double-strand break repair pathways and cellular tolerance to inhibitors of topoisomerase II. *Cancer Res.* 50(18), 5778-5783.

Cammann K. (2001) Instrumentelle Analytische Chemie, 1. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg Berlin.

Campbell K. J., O'Shea J. M. und Perkins N. D. (2006) Differential regulation of NF- κ B activation and function by topoisomerase II inhibitors. *BMC Cancer.* 6, 101.

Campisi J. und Vijg J. (2009) Does damage to DNA and other macromolecules play a role in aging? If so, how? *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 64(2), 175-178.

Capranico G., Zunino F., Kohn K. W. und Pommier Y. (1990) Sequence-selective topoisomerase II inhibition by anthracycline derivatives in SV40 DNA: relationship with DNA binding affinity and cytotoxicity. *Biochemistry.* 29(2), 562-569.

Capranico G. und Binaschi M. (1998) DNA sequence selectivity of topoisomerases and topoisomerase poisons. *Biochim. Biophys. Acta.* 1400(1-3), 185-194.

Carey J. F., Schultz S. J., Sisson L., Fazzio T. G. und Champoux J. J. (2003) DNA relaxation by human topoisomerase I occurs in the closed clamp conformation of the protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100(10), 5640-5645.

- Celis J. E.** und Nielsen S. (1986) Proliferation-sensitive nuclear phosphoprotein "dividin" is synthesized almost exclusively during S phase of the cell cycle in human AMA cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83(21), 8187-8190.
- Centeno S.**, und Calvo M. A. (2002) Mycotoxin produced by fungi isolated from wine cork stoppers. *J. Nutr.* 6, 267-269.
- Chaly N.**, Chen X., Dentry J. und Brown D. L. (1996) Organization of DNA topoisomerase II isotypes during the cell cycle of human lymphocytes and HeLa cells. *Chromosome Res.* 4(6), 457-466.
- Champoux J. J.** (2001) DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism. *Annu. Rev. Biochem.* 70, 369-413.
- Chang C. Y.** und Puga A. (1998) Constitutive activation of the aromatic hydrocarbon receptor. *Mol. Cell Biol.* 18(1), 525-535.
- Chatterjee S.**, Cheng M. F., Berger S. J. und Berger N. A. (1994) Induction of M(r) 78,000 glucose-regulated stress protein in poly(adenosine diphosphate-ribose) polymerase- and nicotinamide adenine dinucleotide-deficient V79 cell lines and its relation to resistance to the topoisomerase II inhibitor etoposide. *Cancer Res.* 54(16), 4405-4411.
- Chen A. Y.**, Yu C., Gatto B. und Liu L. F. (1993) DNA minor groove-binding ligands: A different class of mammalian DNA topoisomerase I inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 8131-8135.
- Chen G. L.**, Yang L., Rowe T. C., Halligan B. D., Tewey K. M. und Liu L. F. (1984) Nonintercalative antitumor drugs interfere with the breakage-reunion reaction of mammalian DNA topoisomerase II. *J. Biol. Chem.* 259(21), 13560-13566.
- Chiou T. J.** und Tzeng W. F. (2000) The roles of glutathione and antioxidant enzymes in menadione-induced oxidative stress. *Toxicology.* 154(1-3), 75-84.
- Chow K. C.** und Ross W. E. (1987) Topoisomerase-specific drug sensitivity in relation to cell cycle progression. *Mol. Cell Biol.* 7(9), 3119-3123.
- Christensen M. O.**, Larsen M. K., Barthelmes H. U., Hock R., Andersen C. L., Kjeldsen E., Knudsen B. R., Westergaard O., Boege F. und Mielke C. (2002) Dynamics of human DNA topoisomerases IIalpha and IIbeta in living cells. *J. Cell Biol.* 157(1), 31-44.
- Christias C.**, Hatzipapas P., Dara A., Kaliafas A. und Chrysanthis G. (2001) *Alternaria alternata*, a new pathotype pathogenic to aphids. *BioControl.* 46, 105-124.
- Christmann M.**, Tomicic M. T., Roos W. P. und Kaina B. (2003) Mechanisms of human DNA repair: an update. *Toxicology.* 193(1-2), 3-34.

- Christmann M.**, Tomicic M. T., Gestrich C., Roos W. P., Bohr V. A. und Kaina B. (2008) WRN protects against topo I but not topo II inhibitors by preventing DNA break formation. *DNA Repair (Amst)*. 7(12), 1999-2009.
- Chu Y.** und Hsu M. T. (1992) Ellipticine increases the superhelical density of intracellular SV40 DNA by intercalation. *Nucleic Acids Res.* 20(15), 4033-4038.
- Chudziak D.** (2008) Einfluss verschiedener Arylhydrocarbon-Rezeptor-Liganden auf die Expression von DNA-Reparaturgenen und das zelluläre Überleben. Diplomarbeit, Institut für Toxikologie und Genetik, Universität Karlsruhe (TH).
- Circu M. L.** und Aw T. Y. (2008) Glutathione and apoptosis. *Free Radic. Res.* 42(8), 689-706.
- Clifford B.**, Beljin M., Stark G. R. und Taylor W. R. (2003) G2 arrest in response to topoisomerase II inhibitors: the role of p53. *Cancer Res.* 63(14), 4074-4081.
- Cline S. D.** und Osheroff N. (1999) Cytosine arabinoside lesions are position-specific topoisomerase II poisons and stimulate DNA cleavage mediated by the human type II enzymes. *J. Biol. Chem.* 274(42), 29740-29743.
- Cline S. D.**, Jones W. R., Stone M. P. und Osheroff N. (1999) DNA abasic lesions in a different light: solution structure of an endogenous topoisomerase II poison. *Biochemistry.* 38(47), 15500-15507.
- Collins A. R.** und Horváthová E. (2001) Oxidative DNA damage, antioxidants and DNA repair: applications of the comet assay. *Biochem. Soc. Trans.* 29(Pt2), 337-341.
- Collins A. R.** (2004) The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Mol. Biotechnol.* 26(3), 249-261.
- Collins A. R.**, Oscoz A. A., Brunborg G., Gaivão I., Giovannelli L., Kruszewski M., Smith C. C. und Štětina R. (2008) The comet assay: topical issues. *Mutagenesis.* 23(3), 143-151.
- Collins A. R.** (2009) Investigating oxidative DNA damage and its repair using the comet assay. *Mutat. Res.* 681(1), 24-32.
- Colofiore J. R.**, Ara G., Berry D. und Belli J. A. (1982) Enhanced survival of adriamycin-treated Chinese hamster cells by 2-deoxy-D-glucose and 2,4-dinitrophenol. *Cancer Res.* 42(10), 3934-3940.
- Congdon L. M.**, Pourpak A., Escalante A. M., Dorr R. T. und Landowski T. H. (2008) Proteasomal inhibition stabilizes topoisomerase II α protein and reverses resistance to the topoisomerase II poison etoposide (AMP-53, 6-ethoxyetoposide). *Biochem. Pharmacol.* 75(4), 883-890.
- Connelly J. C.** und Leach D. R. F. (2004) Repair of DNA covalently linked to protein. *Mol. Cell.* 13(3), 307-316.

- Cook P. R.** und Brazell I. A. (1976) Conformational constraints in nuclear DNA. *J. Cell Sci.* 22, 287-302.
- Corbett A. H.**, Hong D. und Osheroff N. (1993) Exploiting Mechanistic Differences between Drug Classes to Define Functional Drug Interaction Domains on Topoisomerase II. *J. Biol. Chem.* 268(19), 14394-14398.
- Cortés F.** und Piñero J. (1994) Synergistic effect of inhibitors of topoisomerase I and II on chromosome damage and cell killing in cultured Chinese hamster ovary cells. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 34(5), 411-415.
- Cortés F.** und Pastor N. (2003) Induction of endoreduplication by topoisomerase II catalytic inhibitors. *Mutagenesis.* 18(2), 105-112.
- Cosimi S.**, Orta L., Mateo S. und Cortés F. (2009) The mycotoxin ochratoxin A inhibits DNA topoisomerase II and induces polyploidy in cultured CHO cells. *Toxicol. In Vitro.* 23(6), 1110-1115.
- Costa R. M. A.**, Chiganças V., da Silva Galhardo R., Carvalho H. und Menck C. F. M. (2003) The eukaryotic nucleotide excision repair pathway. *Biochimie.* 85(11), 1083-1099.
- Coste F.**, Ober M., Carell T., Boiteux S., Zelwer C. und Castaing B. (2004) Structural basis for the recognition of the FapydG lesion (2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidine) by formamidopyrimidine-DNA glycosylase. *J. Biol. Chem.* 9(42), 44074-44083.
- Coulombe R. A.** (1993) Biological action of mycotoxins. *J. Dairy Sci.* 76(3), 880-891.
- Cummings J.**, Boyd G., Ethell B. T., Macpherson J. S., Burchell B., Smyth J. F. und Jodrell D. I. (2002) Enhanced clearance of topoisomerase I inhibitors from human colon cancer cells by glucuronidation. *Biochem. Pharmacol.* 63(4), 607-613.
- Cummings J.**, Ethell B. T., Jardine L., Boyd G., Macpherson J. S., Burchell B., Smyth J. F. und Jodrell D. I. (2003) Glucuronidation as a mechanism of intrinsic drug resistance in human colon cancer: reversal of resistance by food additives. *Cancer Res.* 63(23), 8443-8450.
- Cuvier O.**, Stanojcic S., Lemaitre J. M. und Mechali M. (2008) A topoisomerase II-dependent mechanism for resetting replicons at the S-M-phase transition. *Genes Dev.* 22(7), 860-865.

D

- D'Arpa P.** und Liu L. F. (1989) Topoisomerase-targeting antitumor drugs. *Biochim. Biophys. Acta.* 989(2), 163-177.

- D'Arpa P.**, Beardmore C. und Liu L. F. (1990) Involvement of nucleic acid synthesis in cell killing mechanisms of topoisomerase poisons. *Cancer Res.* 50(21), 6919-6924.
- Da Motta S. D.** und Valente Soares L. M. (2001) Survey of Brazilian tomato products for alternariol, alternariol monomethyl ether, tenuazonic acid and cyclopiazonic acid. *Food Addit. Contam.* 18(7), 630-634.
- Danks M. K.**, Qiu J., Catapano C. V., Schmidt C. A., Beck W. T. und Fernandes D. J. (1994) Subcellular distribution of the alpha and beta topoisomerase II-DNA complexes stabilized by VM-26. *Biochem. Pharmacol.* 48(9), 1785-1795.
- Darcy I. K.**, Scharein R. G. und Stasiak A. (2008) 3D visualization software to analyze topological outcomes of topoisomerase reactions. *Nucleic Acids Res.* 36(11), 3515-3521.
- Daroui P.**, Desai S. D., Li T. K., Liu A. A. und Liu L. F. (2004) Hydrogen peroxide induces topoisomerase I-mediated DNA damage and cell death. *J. Biol. Chem.* 279(15), 14587-14594.
- Das C. M.**, Aguilera D., Vasquez H., Prasad P., Zhang M., Wolff J. E. und Gopalakrishnan V. (2007) Valproic acid induces p21 and topoisomerase-II (alpha/beta) expression and synergistically enhances etoposide cytotoxicity in human glioblastoma cell lines. *J. Neurooncol.* 85(2), 159-170.
- Davies D. R.**, Interthal H., Champoux J. J. und Hol W. G. J. (2004) The crystal structure of human tyrosyl-DNA phosphodiesterase, Tdp1. *Structure* 10(2), 237-248.
- Davis V. M.** und Stack M. E. (1994) Evaluation of alternariol and alternariol methyl ether for mutagenic activity in *Salmonella typhimurium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 60(10), 3901-3902.
- De Lucio V. B.**, Marina V. M. und Rodríguez R. B. (2002) The molecular biology of topoisomerase II α and its importance in the acquisition of multidrug resistance in cancer. *Rev. Oncol.* 4(4), 170-178.
- De Vries H. E.**, Witte M., Hondius D., Rozemuller A. J. M., Drukarch B., Hoozemans J. und van Horssen J. (2008) Nrf2-induced antioxidant protection: a promising target to counteract ROS-mediated damage in neurodegenerative disease? *Free Radic. Biol. Med.* 45(10), 1375-1383.
- DeMarini D. M.** und Lawrence B. K. (1992) Prophage induction by DNA topoisomerase II poisons and reactive-oxygen species: role of DNA breaks. *Mutat. Res.* 267(1), 1-17.
- Debéthune L.**, Kohlhagen G., Grandas A. und Pommier Y. (2002) Processing of nucleopeptides mimicking the topoisomerase I-DNA covalent complex by tyrosyl-DNA phosphodiesterase. *Nucleic Acids Res.* 30(5), 1198-1204.

- Deepak S. A.**, Kottapalli K. R., Rakwal R., Oros G., Rangappa K. S., Iwahashi H., Masuo Y. und Agrawal G. K. (2007) Real-Time PCR: Revolutionizing Detection and Expression Analysis of Genes. *Curr. Genomics*. 8(4), 234-251.
- Delescluse C.**, Lemaire G., de Sousa G. und Rahmani R. (2000) Is Cyp1A1 induction always related to AHR signaling pathway? *Toxicology*. 153, 73-82.
- Demple B.** und Harrison L. (1994) Repair of oxidative damage to DNA: enzymology and biology. *Annu. Rev. Biochem.* 63, 915-948.
- Deng C.**, Brown J. A., You D. und Brown J. M. (2005) Multiple endonucleases function to repair covalent topoisomerase I complexes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. 170(2), 591-600.
- Denison M. S.**, Pandini A., Nagy S. R., Baldwin E. S. und Bonati L. (2002) Ligand binding and activation of the Ah receptor. *Chem. Biol. Interact.* 141, 3-24.
- Denny W. A.** und Baguley B. C. (2003) Dual topoisomerase I/II inhibitors in cancer therapy. *Curr. Top. Med. Chem.* 3(3), 339-353.
- Desai S. D.**, Liu L. F., Vasquez-Abad D. und D'Arpa P. (1997) Ubiquitin-dependent destruction of topoisomerase I is stimulated by the antitumor drug camptothecin. *J. Biol. Chem.* 272(39), 24159-24164.
- Desmond O. J.**, Manners J. M., Stephens A. E., Maclean D. J., Schenk P. M., Gardiner D. M., Munn A. L. und Kazan K. (2008) The Fusarium mycotoxin deoxynivalenol elicits hydrogen peroxide production, programmed cell death and defence responses in wheat. *Mol. Plant Pathol.* 9(4), 435-445.
- Deweese J. E.** und Osheroff N. (2009) The DNA cleavage reaction of topoisomerase II: wolf in sheep's clothing. *Nucleic Acids Res.* 37(3), 738-748.
- Dianova I. I.**, Bohr V. A. und Dianov G. L. (2001) Interaction of human AP endonuclease 1 with flap endonuclease 1 and proliferating cell nuclear antigen involved in long-patch base excision repair. *Biochemistry*. 40(42), 12639-12644.
- DiBiase S. J.**, Zeng Z. C., Chen R., Hyslop T., Curran W. J. und Iliakis G. (2000) DNA-dependent protein kinase stimulates an independently active, nonhomologous, end-joining apparatus. *Cancer Res.* 60(5), 1245-1253.
- DiCosmo F.** und Straus N. A. (1985) Alternariol, a dibenzopyrone mycotoxin of *Alternaria spp.*, is a new photosensitizing and DNA cross-linking agent. *Experientia*. 41(9), 1188-1190.
- Dickey J. S.** und Osheroff N. (2005) DNA-dependent protein kinase stimulates an independently active, nonhomologous, end-joining apparatus. *Cancer Res.* 60(5), 1245-1253.

- Ding X.** und Kaminsky L. S. (2003) Human extrahepatic cytochromes P450: function in xenobiotic metabolism and tissue-selective chemical toxicity in the respiratory and gastrointestinal tracts. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 43, 149-173.
- Donato M. T.**, Gómez-Lechón M. J. und Castell J. V. (1993) A microassay for measuring cytochrome P450IA1 and P450IIB1 activities in intact human and rat hepatocytes cultured on 96-well plates. *Anal. Biochem.* 213(1), 29-33.
- Dong Z.**, Liu G., Dong Z., Qian Y., An Y., Miao J. und Zhen Y. (1987) Induction of mutagenesis and transformation by the extract of *Alternaria alternata* isolated from grains in Linxian, China. *Carcinogenesis.* 8(7), 989-991.
- Drake F. H.**, Hofman G. A., Bartus H. F., Mattern M. R., Crooke S. T. und Mirabelli C. K. (1989) Biochemical and pharmacological properties of p170 and p180 forms of topoisomerase II. *Biochemistry.* 28(20), 8154-8160.
- Dronkert M. L. G.**, Beverloo H. B., Johnson R. D., Hoeijmakers J. H. J. Jasin M. und Kanaar R. (2000) Mouse RAD54 affects DNA double-strand break repair and sister chromatid exchange. *Mol. Cell Biol.* 20(9), 3147-3156.
- Duca M.**, Guianvarc'h D., Oussedik K., Halby L., Garbesi A., Dauzonne D., Monneret C., Osheroff N., Giovannangeli C. und Arimondo P. B. (2006) Molecular basis of the targeting of topoisomerase II-mediated DNA cleavage by VP16 derivatives conjugated to triplex-forming oligonucleotides. *Nucleic Acids Res.* 34(6), 1900-1911.
- Dynan W. S.** und Yoo S. (1998) Interaction of Ku protein and DNA-dependent protein kinase catalytic subunit with nucleic acids. *Nucleic Acids Res.* 26(7), 1551-1559.
- E**
- Earnshaw W. C.** und Mackay A. M. (1994) Role of nonhistone proteins in the chromosomal events of mitosis. *FASEB J.* 8(12), 947-956.
- Ebert M. N.**, Klinder A., Peters W. H. M., Schäferhenrich A., Sendt W. Scheele J. und Pool-Zobel L. (2003) Expression of glutathione S-transferases (GSTs) in human colon cells and inducibility of GSTM2 by butyrate. *Carcinogenesis.* 24(10), 1637-1644.
- Eder J. P.**, Chan V. T. W., Niemierko E., Teicher B. A. und Schnipper L. E. (1993) Conditional expression of wild-type topoisomerase II complements a mutant enzyme in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* 268(19), 13844-13849.
- Eisenbrand G.** und Metzler M. (2002) Toxikologie, 2. Auflage, Wiley-VCH-Verlag.

- EI Golli Bennour E.**, Bouaziz C., Ladjimi M., Renaud F. und Bacha H. (2009) Comparative mechanisms of zearalenone and ochratoxin A toxicities on cultured HepG2 cells: Is oxidative stress a common process? *Environ. Toxicol.* 24(6), 538-548.
- EI-Khamisy S. F.** und Caldecott K. W. (2006) TDP1-dependent DNA single-strand break repair and neurodegeneration. *Mutagenesis.* 21(4), 219-224.
- EI-Khamisy S. F.** und Caldecott K. W. (2007) DNA single-strand break repair and spinocerebellar ataxia with axonal neuropathy-1. *Neuroscience.* 145(4), 1260-1266.
- EI-Khamisy S. F.**, Hartsuiker E. und Caldecott K. W. (2007) TDP1 facilitates repair of ionizing radiation-induced DNA single-strand breaks. *DNA Repair (Amst).* 6(10), 1485-1495.
- Ellman G. L.** (1959) Tissue sulfhydryl groups *Arch. Biochem. Biophys.* 82(1), 70-77.
- Errington F.**, Willmore E., Tilby M. J., Li L., Li G., Li W., Baguley B. C. und Austin C. A. (1999) Murine transgenic cells lacking DNA topoisomerase IIbeta are resistant to acridines and mitoxantrone: analysis of cytotoxicity and cleavable complex formation. *Mol. Pharmacol.* 56(6), 1309-1316.
- Esselen M.**, Fritz J., Hutter M. und Marko D. (2009) Delphinidin Modulates the DNA-Damaging Properties of Topoisomerase II Poisons. *Chem. Res. Toxicol.* im Druck.
- Essers J.**, Theil A. F., Baldeyron C., van Cappellen W. A., Houtsmuller A. B., Kanaar R. und Vermeulen W. (2005) Nuclear dynamics of PCNA in DNA replication and repair. *Mol. Cell Biol.* 25(21), 9350-9359.
- Estey E.**, Adlakha R. C., Hittelman W. N. und Zweling L. A. (1987) Cell cycle stage dependent variations in drug-induced topoisomerase II mediated DNA cleavage and cytotoxicity. *Biochemistry.* 26(14), 4338-4344.
- F**
- Falaschi A.**, Abdurashidova G., Sandoval O., Radulescu S., Biamonti G. und Riva S. (2007) Molecular and structural transactions at human DNA replication origins. *Cell Cycle.* 6(14), 1705-1712.
- Fehr M.** (2006) Mechanismen der DNA-schädigenden Wirkung von Alternariol. Wissenschaftliche Abschlussarbeit, Institut für Angewandte Biowissenschaften, Abteilung Lebensmitteltoxikologie, Universität Karlsruhe (TH).
- Fehr M.**, Pahlke G., Fritz J., Christensen M. O., Boege F., Altemöller M., Podlech J. und Marko D. (2009) Alternariol acts as a topoisomerase poison, preferentially affecting the IIalpha isoform. *Mol. Nutr. Food Res.* 53, 441-451.

- Felix C. A. (1998)** Secondary leukemias induced by topoisomerase-targeted drugs. *Biochim. Biophys. Acta.* 1400(1-3), 233-255.
- Felix C. A. und Lange B. J. (1999)** Leukemia in infants. *Oncologist.* 4(3), 225-240.
- Felix C. A., Lange B. J. und Chessells J. M. (2000)** Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia: Challenges and Controversies in 2000. *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program.* 2000, 285-302.
- Felix C. A. (2001)** Leukemias related to treatment with DNA topoisomerase II inhibitors. *Med. Pediatr. Oncol.* 36(5), 525-535.
- Ferguson L. R. und Denny W. A. (2007)** Genotoxicity of non-covalent interactions: DNA intercalators. *Mutat. Res.* 623(1-2), 14-23.
- Filajdić N. und Sutton T. B. (1992)** Influence of temperature and wetness duration on infection of apple leaves and virulence of different isolates of *Alternaria mali*. *Ecology and Epidemiology.* 82(11), 1279-1283.
- Fink-Gremmels J. (2009)** The role of mycotoxins in the health and performance of dairy cows. *Vet. J.* 176, 84-92.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) (2003)** Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003.
- Forman H. J., Zhang H. und Rinna A. (2009)** Glutathione: overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. *Mol. Aspects Med.* 30(1-2), 1-12.
- Forterre P., Gribaldo S., Gadelle D. und Serre M. C. (2007)** Origin and evolution of DNA topoisomerases. *Biochimie.* 89(4), 427-446.
- Foyer C. H. und Noctor G. (2005)** Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. *Plant Cell.* 17(7), 1866-1875.
- Frank J., Pompella A. und Biesalski H. K. (2000)** Histochemical visualization of oxidant stress. *Free Radic. Biol. Med.* 29(11), 1096-1105.
- Frankenberg-Schwager M., Becker M., Garg I., Pralle E., Wolf H. und Frankenberg D. (2008)** The role of nonhomologous DNA end joining, conservative homologous recombination, and single-strand annealing in the cell cycle-dependent repair of DNA double-strand breaks induced by H₂O₂ in mammalian cells. *Radiat. Res.* 170(6), 784-793.
- Frantz C. E., Chen H. und Eastmond D. A. (1996)** Inhibition of human topoisomerase II *in vitro* by bioactive benzene metabolites. *Environ. Health Perspect.* 104 Suppl 6, 1319-1323.
- Froelich-Ammon S. J. und Osheroff N. (1995)** Topoisomerase poisons: harnessing the dark side of enzyme mechanism. *J. Biol. Chem.* 270(37), 21429-21432.

Froelich-Ammon S. J., Burden D. A., Patchan M. W., Elsea S. H., Thompson R. B. und Osheroff N. (1995) Increased drug affinity as the mechanistic basis for drug hypersensitivity of a mutant type II topoisomerase. *J. Biol. Chem.* 270(47), 28018-28021.

Frosina G. (2006) Prophylaxis of oxidative DNA damage by formamidopyrimidine-DNA glycosylase. *Int. J. Cancer.* 119(1), 1-7.

Frova C. (2006) Glutathione transferases in the genomics era: new insights and perspectives. *Biomol. Eng.* 23(4), 149-169.

Fujii-Kuriyama Y. und Mimura J. (2005) Molecular mechanisms of AhR functions in the regulation of cytochrome P450 genes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 338, 311-317.

G

Ganapathi R., Vaziri S. A. J., Tabata M., Takigawa N., Grabowski D. R., Bukowski R. M. und Ganapathi M. K. (2002) Inhibition of NF-kappaB and proteasome activity in tumors: can we improve the therapeutic potential of topoisomerase I and topoisomerase II poisons. *Curr. Pharm. Des.* 8(22), 1945-1958.

Gantchev T. G. und Hunting D. J. (1998) The ortho-quinone metabolite of the anticancer drug etoposide (VP-16) is a potent inhibitor of the topoisomerase II/DNA cleavable complex. *Mol. Pharmacol.* 53(3), 422-428.

Gao H., Huang K. C., Yamasaki E. F., Chan K. K., Chohan L. und Snapka R. M. (1999) XK469, a selective topoisomerase IIbeta poison. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96(21), 12168-12173.

Gao R., Zhang Y., Dedkova L., Choudhury A. K., Rahier N. J. und Hecht S. M. (2006) Effects of modification of the active site tyrosine of human DNA topoisomerase I. *Biochemistry.* 45(27), 8402-8410.

Gasiewicz T. A., Kende A. S., Rucci G., Whitney B. und Wiley J. J. (1996) Analysis of structural requirements for Ah receptor antagonist activity: ellipticines, flavones, and related compounds. *Biochem. Pharmacol.* 52(11), 1787-1803.

Giard D. J., Aaronson S. A., Todaro G. J., Arnstein P., Kersey J. H., Dosik H. und Parks W. P. (1973) *In vitro* cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J. Natl. Cancer Inst.* 51(5), 1417-1423.

Giudice A. und Montella M. (2006) Activation of the Nrf2-ARE signaling pathway: a promising strategy in cancer prevention. *Bioessays.* 28(2), 169-181.

Godard T., Deslandes E., Sichel F., Poul J. M. und Gauduchon P. (2002) Detection of topoisomerase inhibitor-induced DNA strand breaks and apoptosis by the alkaline comet assay. *Mutat. Res.* 520(1-2), 47-56.

- Goergen J. L.**, Marc A. und Engasser J. M. (1993) Determination of cell lysis and death kinetics in continuous hybridoma cultures from the measurement of lactate dehydrogenase release. *Cytotechnology*. 11(3), 189-195.
- Gong Y.**, Firestone G. L. und Bjeldanes L. F. (2006) 3,3'-diindolylmethane is a novel topoisomerase II α catalytic inhibitor that induces S-phase retardation and mitotic delay in human hepatoma HepG2 cells. *Mol. Pharmacol.* 69(4), 1320-1327.
- Goodel J. R.**, Ougolkov A. V., Hiasa H., Kaur H., Remmel R., Billadeau D. D. und Ferguson D. M. (2008) Acridine-based agents with topoisomerase II activity inhibit pancreatic cancer cell proliferation and induce apoptosis. *J. Med. Chem.* 51(2), 179-182.
- Gorczyca W.**, Melamed M. R. und Darzynkiewicz Z. (1993) Apoptosis of S-phase HL-60 cells induced by DNA topoisomerase inhibitors: detection of DNA strand breaks by flow cytometry using the in situ nick translation assay. *Toxicol. Lett.* 67(1-3), 249-258.
- Goswami P. C.**, Roti Roti J. L. und Hunt C. R. (1996) The cell cycle-coupled expression of topoisomerase II α during S phase is regulated by mRNA stability and is disrupted by heat shock or ionizing radiation. *Mol. Cell. Biol.* 16(4), 1500-1508.
- Graham F. L.**, Smiley J., Russell W. C. und Nairn R. (1977) Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J. Gen. Virol.* 36(1), 59-74.
- Grant C. E.**, Valdimarsson G., Hipfner D. R., Almquist K. C., Cole S. P. C. und Deeley R. G. (1994) Overexpression of multidrug resistance-associated protein (MRP) increases resistance to natural product drugs. *Cancer Res.* 54(2), 357-361.
- Green R. M.**, Hodges N. J., Chipman J. K., O'Donovan M. R. und Graham M. (2008) Reactive oxygen species from the uncoupling of human cytochrome P450 1B1 may contribute to the carcinogenicity of dioxin-like polychlorinated biphenyls. *Mutagenesis*. 23(6), 457-463.
- Griffin G. F.** und Chu F. S. (1983) Toxicity of the *Alternaria* Metabolites Alternariol, Alternariol Methyl Ether, Altenuene, and Tenuazonic Acid in the Chicken Embryo Assay. *Appl. Environ. Microbiol.* 46(6), 1420-1422.
- Griffith O. W.** und Meister A. (1979) Potent and specific inhibition of glutathione synthesis by buthionine sulfoximine (S-n-butyl homocysteine sulfoximine). *J. Biol. Chem.* 254(16), 7558-7560.
- Grollman A. P.** und Moriya M. (1993) Mutagenesis by 8-oxoguanine: an enemy within. *Trends Genet.* 9(7), 246-249.

- Gros P.**, Neriah Y. B., Croop J. M. und Housman D. E. (1986) Isolation and expression of a complementary DNA that confers multidrug resistance. *Nature*. 323(6090), 728-731.
- Guengerich F. P.** und Shimada T. (1991) Oxidation of toxic and carcinogenic chemicals by human cytochrome P-450 enzymes. *Chem. Res. Toxicol.* 4(4), 391-407.
- Guengerich F. P.** (2008) Cytochrome p450 and chemical toxicology. *Chem. Res. Toxicol.* 21(1), 70-83.
- Guigal N.**, Seree E., Bourgarel-Rey V. und Barra Y. (2000) Induction of CYP1A1 by serum independent of AhR pathway. *Biochem. Biophys. Commun.* 267(2), 572-576.
- Guillem V.** und Tormo M. (2008) Influence of DNA damage and repair upon the risk of treatment related leukemia. *Leuk. Lymphoma.* 49(2), 204-217.
- Gulbis J. M.**, Kelman Z., Hurwitz J., O'Donnell M. und Kuriyan J. (1996) Structure of the C-terminal region of p21(WAF1/CIP1) complexed with human PCNA. *Cell.* 87(2), 297-306.
- Guo L.**, Liu X., Nishikawa K. und Plunkett W. (2007) Inhibition of topoisomerase IIalpha and G2 cell cycle arrest by NK314, a novel benzo[c]phenanthridine currently in clinical trials. *Mol. Cancer Ther.* 6(5), 1501-1508.
- H**
- Habig W. H.**, Pabst M. J. und Jakoby W. B. (1974) Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 249(22), 7130-7139.
- Haegglom P.** und Unestam T. (1979) Blue Light inhibits Mycotoxin Production and Increases Total Lipids and Pigmentation in *Alternaria alternata*. *Appl. Environ. Microbiol.* 38(6), 1074-1077.
- Haim N.**, Roman J., Nemeč J. und Sinha B. K. (1986) Peroxidative free radical formation and O-demethylation of etoposide(VP-16) and teniposide(VM-26). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 135(1), 215-220.
- Hajji N.**, Pastor N., Mateos S., Domínguez I. und Cortés F. (2003) DNA strand breaks induced by the anti-topoisomerase II bis-dioxopiperazine ICRF-193. *Mutat. Res.* 530(1-2), 35-46.
- Halliwell B.** (2002) Effect of diet on cancer development: is oxidative DNA damage a biomarker? *Free Radic. Biol. Med.* 32(10), 968-974.

- Halliwell B.** und Whiteman M. (2004) Measuring reactive species and oxidative damage *in vivo* and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br. J. Pharmacol.* 142(2), 231-255.
- Halliwell B.** (2006) Reactive species and Antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol.* 141(2), 312-322.
- Hamada Y.**, Fujii H. und Fukagawa M. (2009) Role of oxidative stress in diabetic bone disorder. *Bone.* 45, 35-38.
- Hancock J. T.**, Desikan R. und Neill S. J. (2001) Role of reactive oxygen species in cell signalling pathways. *Biochem. Soc. Trans.* 29(Pt 2), 345-350.
- Hande K. R.** (1998) Etoposide: four decades of development of a topoisomerase II inhibitor. *Eur. J. Cancer.* 34(10), 1514-1521.
- Hankinson O.** (1995) The aryl hydrocarbon receptor complex. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 35, 307-340.
- Hardy C. D.**, Crisona N. J., Stone M. D. und Cozzarelli N. R. (2004) Disentangling DNA during replication: a tale of two strands. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* 359, 39-47.
- Harvey C. J.**, Thimmulappa R. K., Singh A., Blake D. J., Ling G., Wakabayashi N., Fujii J., Myers A. und Biswal S. (2009) Nrf2-regulated glutathione recycling independent of biosynthesis is critical for cell survival during oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* 46(4), 443-453.
- Harwig J.**, Scott P. M., Stoltz D. G. und Blanchfield B. J. (1979) Toxins of molds from decaying tomato fruit. *Appl. Environ. Microbiol.* 38(2), 267-274.
- Hasan H. A. H.** (1995) *Alternaria* mycotoxins in black rot lesion of tomato fruit: conditions and regulation of their production. *Mycopathologia.* 130, 171-177.
- Hasinoff B. B.**, Kuschak T. I., Yalowich J. C. und Creighton A. M. (1995) A QSAR study comparing the cytotoxicity and DNA topoisomerase II inhibitory effects of bisdioxopiperazine analogs of ICRF-187 (dexrazoxane). *Biochem. Pharmacol.* 50(7), 953-958.
- Hasinoff B. B.**, Wu X., Begleiter A., Guziec L. J., Guziec F., Giorgianni A., Yang S., Jiang Y. und Yalowich J. C. (2006) Structure-activity study of the interaction of bioreductive benzoquinone alkylating agents with DNA topoisomerase II. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 57(2), 221-233.
- Hayes J. D.** und Strange R. C. (1995) Potential contribution of the glutathione S-transferase supergene family to resistance to oxidative stress. *Free Radic. Res.* 22(3), 193-207.

- Hayes J. D.** und McLellan L. I. (1999) Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a co-ordinately regulated defence against oxidative stress. *Free Radic. Res.* 31(4), 273-300.
- Hayes J. D.**, Flanagan J. U. und Jowsey I. R. (2005) Glutathione transferases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 45, 51-88.
- He X.**, van Waardenburg R. C. A. M., Babaoglu K., Price A. C., Nitiss K. C., Nitiss J. L., Bjornsti M. A. und White S. W. (2007) Mutation of a conserved active site residue converts tyrosyl-DNA phosphodiesterase I into a DNA topoisomerase I-dependent poison. *J. Mol. Biol.* 372(4), 1070-1081.
- Heck M. M. S.** und Earnshaw W. C. (1986) Topoisomerase II: A specific marker for cell proliferation. *J. Cell Biol.* 103(6 Pt 2), 2569-2581.
- Heck M. M. S.**, Hittelman W. N. und Earnshaw (1988) Differential expression of DNA topoisomerases I and II during the eukaryotic cell cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A.* 85(4), 1086-1090.
- Hendry L. B.**, Mahesh V. B., Bransome E. D. und Ewing D. E. (2007) Small molecule intercalation with double stranded DNA: implications for normal gene regulation and for predicting the biological efficacy and genotoxicity of drugs and other chemicals. *Mutat. Res.* 623(1-2), 53-71.
- Henning W.** und Stürzbecher H. W. (2003) Homologous recombination and cell cycle checkpoints: Rad51 in tumour progression and therapy resistance. *Toxicology.* 193(1-2), 91-109.
- Hernández-Martínez N.**, Caballero-Ortega H., Dorado-González V., Labra-Ruiz N., Espinosa-Aguirre J. J., Gómez-Garduño J. und Vences-Mejía A. (2007) Tissue-specific induction of the carcinogen-inducible cytochrome P450 isoforms in the gastrointestinal tract. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 24(3), 297-303.
- Higuchi R.**, Dollinger G., Walsh P. S. und Griffith (1992) Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (NY).* 10(4), 413-417.
- Hines R. N.**, Mathis J. M. und Jacob C. S. (1988) Identification of multiple regulatory elements on the human cytochrome P450IA1 gene. *Carcinogenesis.* 9(9), 1599-605.
- Hochhauser D.**, Valkov N. I., Gump J. L., Wei I., O'Hare C., Hartley J., Fan J., Bertino J. R., Banerjee D. und Sullivan D. M. (1999) Effects of wild-type p53 expression on the quantity and activity of topoisomerase IIalpha and beta in various human cancer cell lines. *J. Cell Biochem.* 75(2), 245-257.
- Hochster H.**, Liebes L., Wadler S., Oratz R., Wernz J. C., Meyers M., Green M., Blum R. H. und Speyer J. L. (1992) Pharmacokinetics of the cardioprotector ADR-529 (ICRF-187) in escalating doses combined with fixed-dose doxorubicin. *J. Natl. Cancer Inst.* 84(22), 1725-1730.

- Hoege C.**, Pfander B., Moldovan G. L., Pyrowolakis G. und Jentsch S. (2002) RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO. *Nature*. 419(6903), 135-141.
- Holden J. A.**, Rolfson D. H. und Wittwer G. T. (1990) Human DNA topoisomerase II: evaluation of enzyme activity in normal and neoplastic tissues. *Biochemistry*. 29(8), 2127-2134.
- Hong G.** und Kreuzer K. N. (2003) Endonuclease cleavage of blocked replication forks: An indirect pathway of DNA damage from antitumor drug-topoisomerase complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100(9), 5046-5051.
- Hou D. X.**, Ose T., Lin S., Harazoro K., Imamura I., Kubo M., Uto T., Terahara N., Yoshimoto M. und Jujii M. (2003) Anthocyanidins induce apoptosis in human promyelocytic leukemia cells: structure-activity relationship and mechanisms involved. *Int. J. Oncol.* 23(3), 705-712.
- Hsiang Y. H.**, Hertzberg R., Hecht S. und Liu L. F. (1985) Camptothecin induces protein-linked DNA breaks via mammalian DNA topoisomerase I. *J. Biol. Chem.* 260(27), 14873-14878.
- Hsiang Y. H.**, Wu H. Y. und Liu L. F. (1988) Proliferation-dependent regulation of DNA topoisomerase II in cultured human cells. *Cancer Res.* 48(11), 3230-3235.
- Hsiang Y. H.** und Liu L. F. (1989) Evidence for the reversibility of cellular DNA lesion induced by mammalian topoisomerase II poisons. *J. Biol. Chem.* 264(17), 9713-9715.
- Hsiang Y. H.**, Lihou M. G. und Liu L. F. (1989b) Arrest of replication forks by drug-stabilized topoisomerase I-DNA cleavable complexes as a mechanism of cell killing by camptothecin. *Cancer Res.* 49(18), 5077-5082.
- Huang C. P.**, Fang W. H., Lin L. I., Chiou R. Y., Kan L. S., Chi N. H., Chen Y. R., Lin T. Y. und Lin S. B. (2008) Anticancer activity of botanical alkyl hydroquinones attributed to topoisomerase II poisoning. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 227(3), 331-338.
- Huang H. C.**, Nguyen T. und Pickett C. B. (2002) Phosphorylation of Nrf2 at Ser-40 by Protein Kinase C regulates Antioxidant Response Element-mediated Transcription. *J. Biol. Chem.* 277(45), 42769-42774.
- Huang K. C.**, Gao H., Yamasaki E. F., Grabowski D. R., Liu S., Shen L. L., Chan K. K., Ganapathi R. und Snapka R. M. (2001) Topoisomerase II poisoning by ICRF-193. *J. Biol. Chem.* 276(48), 44488-44494.
- Huang Y.**, Deverall B. J., Tang W. H., Wang W. und Wu F. W. (2000) Foliar Application of Acibenzolar-S-Methyl and Protection of Postharvest Rock Melons and Hami Melons from Disease. *Eur. J. Plant Pathol.* 106(7), 651-656.

Hughes C. S., Shen J. W. und Subjeck J. R. (1989) Resistance to etoposide induced by three glucose-regulated stresses in Chinese hamster ovary cells. *Cancer Res.* 49(16), 4452-4454.

Humpherson-Jones F. M. (1985) The incidence of *Alternaria spp.* and *Leptosphaeria maculans* in commercial brassica seed in the United Kingdom. *Plant Pathol.* 34(3), 385-390.

I

Iliakis G. (1991) The role of DNA double strand breaks in ionizing radiation-induced killing of eukaryotic cells. *Bioessays.* 13(12), 641-648.

Inamdar K. V., Pouliot J. J., Zhou T., Lees-Miller S. P., Rasouli-Nia A. und Povirk L. F. (2002) Conversion of phosphoglycolate to phosphate termini on 3' overhangs of DNA double strand breaks by the human tyrosyl-DNA phosphodiesterase hTdp1. *J. Biol. Chem.* 277(30), 27162-27168.

Interthal H., Pouliot J. J. und Champoux J. J. (2001) The tyrosyl-DNA phosphodiesterase Tdp1 is a member of the phospholipase D superfamily. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98(21), 12009-12014.

Interthal H., Quigley P. M., Hol W. G. J. und Champoux J. J. (2004). The Role of Lysine 532 in the Catalytic Mechanism of Human Topoisomerase I. *J. Biol. Chem.* 279(4), 2984-2992.

Interthal H., Chen H. J., Kehl-Fie T. E., Zotzmann J., Leppard J. B. und Champoux J. J. (2005a) SCAN1 mutant Tdp1 accumulates the enzyme--DNA intermediate and causes camptothecin hypersensitivity. *EMBO J.* 24(12), 2224-2233.

Interthal H., Chen H. J. und Champoux J. J. (2005b) Human Tdp1 cleaves a broad spectrum of substrates, including phosphoamide linkages. *J. Biol. Chem.* 280(43), 36518-36528.

Isaacs R. J., Harris A. L. und Hickson I. D. (1996) Regulation of the human topoisomerase IIalpha gene promoter in confluence-arrested cells. *J. Biol. Chem.* 271(28), 16741-16747.

Isaacs R. J., Davies S. L., Sandri I., Redwood C., Wells N. J. und Hickson I. D. (1998) Physiological regulation of eukaryotic topoisomerase II. *Biochim. Biophys. Acta.* 1400(1-3), 121-137.

Ishida R., Iwai M., Hara A. und Andoh T. (1996) The combination of different types of antitumor topoisomerase II inhibitors, ICRF-193 and VP-16, has synergistic and antagonistic effects on cell survival, depending on treatment schedule. *Anticancer Res.* 16 (5A), 2735-2740.

Izumi T., Wiederhold L. R., Roy G., Roy R., Jaiswal A., Bhakat K. K., Mitra S. und Hazra T. K. (2003) Mammalian DNA base excision repair proteins: their interactions and role in repair of oxidative DNA damage. *Toxicology*. 193(1-2), 43-65.

J

Jackson S. P. (2002) Sensing and repairing DNA double-strand breaks. *Carcinogenesis*. 23(5), 687-696.

Jakobsson P. J., Morgenstern R., Mancini J., Ford-Hutchinson A. und Persson B. (1999) Identification of human prostaglandin E synthase: a microsomal, glutathione-dependent, inducible enzyme, constituting a potential novel drug target. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96(13), 7220-7225.

Jakubowski W. und Bartosz G. (2000) 2,7-dichlorofluorescein oxidation and reactive oxygen species: what does it measure? *Cell Biol. Int.* 24(10), 757-760.

Juan C. C., Hwang J. L., Liu A. A., Whang-Peng J., Knutsen T., Huebner K., Croce C. M., Zhang H., Wang J. C. und Liu L. F. (1988) Human DNA topoisomerase I is encoded by a single-copy gene that maps to chromosome region 20q12-13.2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85(23), 8910-8913.

Jeggo P. A., Caldecott K., Pidsley S. und Banks G. R. (1989) Sensitivity of Chinese hamster ovary mutants defective in DNA double strand break repair to topoisomerase II inhibitors. *Cancer Res.* 49(24 Pt 1), 7057-7063.

Jenkins J. R., Ayton P., Jones T., Davies S. L., Simmons D. L., Harris A. L., Sheer D. und Hickson I. D. (1992) Isolation of cDNA clones encoding the beta isozyme of human DNA topoisomerase II and localisation of the gene to chromosome 3p24. *Nucleic Acids Res.* 20(21), 5587-5592.

Jensen L. H., Nitiss K. C., Rose A., Dong J., Zhou J., Hu T., Osheroff N., Jensen P. B., Sehested M. und Nitiss J. L. (2000) A novel mechanism of cell killing by anti-topoisomerase II bisdioxopiperazines. *J. Biol. Chem.* 275(3), 2137-2146.

Jiménez-Alonso S., Orellana H. C., Estévez-Braun A., Ravelo A. G., Pérez-Sacau E. und Machín F. (2008) Design and synthesis of a novel series of pyranonaphthoquinones as topoisomerase II catalytic inhibitors. *J. Med. Chem.* 51(21), 6761-6772.

Johnson A. W. und Demple B. (1988) Yeast DNA diesterase for 3'-fragments of deoxyribose: purification and physical properties of a repair enzyme for oxidative DNA damage. *J. Biol. Chem.* 263(34), 18009-18016.

Johnson R. E., Kovvali G. K., Guzder S. N., Amin N. S., Holm C., Habraken Y., Sung P., Prakash L. und Prakash S. (1996) Evidence for involvement of yeast proliferating cell nuclear antigen in DNA mismatch repair. *J. Biol. Chem.* 271(45), 27987-27990.

Juan C. C., Hwang J., Liu A. A., Whang-Peng J., Knutsen T., Huebner K., Croce C. M., Zhang H., Wang J. C. und Liu L. F. (1988) Human DNA topoisomerase I is encoded by a single-copy gene that maps to chromosome region 20q12-13.2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85(23), 8910-8913.

K

Kabak B., Dobson A. D. W. und Var I. (2006) Strategies to prevent mycotoxin contamination of food and animal feed: a review. *Crit. Rev. Food Nutr.* 46(8), 593-619.

Kabler S. L., Seidel A., Jacob J., Doehmer J., Morrow C. S. und Townsend A. J. (2009) Differential protection by human glutathione S-transferase P1 against cytotoxicity of benzo[a]pyrene, dibenzo[a,l]pyrene, or their dihydrodiol metabolites, in bi-transgenic cell lines that co-express rat versus human cytochrome P4501A1. *Chem. Biol. Interact.* 179(2-3), 240-246.

Kagan V. E., Kuzmenko A. I., Taurina Y. Y., Shvedova A. A., Matura T. und Yalowich J. C. (2001) Pro-oxidant and antioxidant mechanisms of etoposide in HL-60 cells: role of myeloperoxidase. *Cancer Res.* 61(21), 7777-7784.

Kalmar B. und Greensmith L. (2009) Induction of heat shock proteins for protection against oxidative stress. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 61(4), 310-318.

Kalyanaraman B., Premovic P. I. und Sealy R. C. (1987) Semiquinone anion radicals from addition of amino acids, peptides, and proteins to quinones derived from oxidation of catechols and catecholamines. An ESR spin stabilization study. *J. Biol. Chem.* 262(23), 11080-11087.

Kamata H. und Hirata H. (1999) Redox regulation of cellular signalling. *Cell Signal.* 11(1), 1-14.

Kang M. R. und Chung I. K. (2002) Down-regulation of DNA topoisomerase IIalpha in human colorectal carcinoma cells resistant to a protoberberine alkaloid, berberrubine. *Mol. Pharmacol.* 61(4), 879-884.

Kang M. I., Kobayashi A., Wakabayashi N., Kim S.G. und Yamamoto, M. (2004) Scaffolding of Keap1 to the actin cytoskeleton controls the function of Nrf2 as key regulator of cytoprotective phase 2 genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101(7), 2046-2051.

Karpinich N. O., Tafani M., Rothman R. J., Russo M. A. und Farber J. L. (2002) The course of etoposide-induced apoptosis from damage to DNA and p53 activation to mitochondrial release of cytochrome c. *J. Biol. Chem.* 277(19), 16547-16552.

Kawajiri K. und Fujii-Kuriyama Y. (2007) Cytochrome P450 gene regulation and physiological functions mediated by the aryl hydrocarbon receptor. *Arch. Biochem. Biophys.* 464(2), 207-212.

- Kawiak A.**, Piosik J., Stasiłojc G., Gwizdek-Wisniewska A., Marczak L., Stobiecki M., Bigda J. und Lojkowska E. (2007) Induction of apoptosis by plumbagin through reactive oxygen species-mediated inhibition of topoisomerase II. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 223(3), 267-276.
- Ke S.**, Rabson A. B., Germino J. F., Gallo A. und Tian Y. (2001) Mechanism of Suppression of Cytochrome P-450 1A1 Expression by Tumor Necrosis Factor- α and Lipopolysaccharide. *J. Biol. Chem.* 276(43), 39638-39644.
- Kelman Z.** (1997) PCNA: structure, functions and interactions. *Oncogene.* 14(6), 629-640.
- Kensler T. W.**, Wakabayashi N. und Biswal S. (2007) Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 47, 89-116.
- Keston A. S.** und Brandt R. (1965) The fluorometric analysis of ultramicro quantities of hydrogen peroxide. *Anal. Biochem.* 11, 1-5.
- Khopde S.**, Roy R. und Simmons D. T. (2008) The binding of topoisomerase I to T antigen enhances the synthesis of RNA-DNA primers during simian virus 40 DNA replication. *Biochemistry.* 47(36), 9653-9660.
- Kim H. D.**, Tomida A., Ogiso Y. und Tsuruo T. (1999) Glucose-regulated stresses cause degradation of DNA topoisomerase II α by inducing nuclear proteasome during G1 cell cycle arrest in cancer cells. *J. Cell Physiol.* 180(1), 97-104.
- Kimura K.**, Saijo M., Ui M. und Enomoto T. (1994) Growth state- and cell cycle-dependent fluctuation in the expression of two forms of DNA topoisomerase II and possible specific modification of the higher molecular weight form in the M phase. *J. Biol. Chem.* 269(2), 1173-1176.
- Kimura K.**, Nozaki N., Enomoto T., Tanaka M. und Kikuchi A. (1996) Analysis of M phase-specific phosphorylation of DNA topoisomerase II. *J. Biol. Chem.* 271(35), 21439-21445.
- Kingma P. S.**, Corbett A. H., Burcham P. C., Marnett L. J. und Osheroff N. (1995) Abasic sites stimulate double-stranded DNA cleavage mediated by topoisomerase II. DNA lesions as endogenous topoisomerase II poisons. *J. Biol. Chem.* 270(37), 21441-21444.
- Kingma P. S.** und Osheroff N. (1997a) Apurinic sites are position-specific topoisomerase II poisons. *J. Biol. Chem.* 272(2), 1148-1155.
- Kingma P. S.** und Osheroff N. (1997b) Spontaneous DNA damage stimulates topoisomerase II-mediated DNA cleavage. *J. Biol. Chem.* 272(11), 7488-7493.

- Kingma P. S.**, Greider C. A. und Osheroff N. (1997) Spontaneous DNA lesions poison human topoisomerase I α and stimulate cleavage proximal to leukemic 11q23 chromosomal breakpoints. *Biochemistry*. 36(20), 5934-5939.
- Kluck R. M.**, Bossy-Wetzel E., Green D. R. und Newmeyer D. D. (1997) The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science*. 275(5303), 1132-1136.
- Kobayashi A.**, Kang M. I., Watai Y., Tong K. I., Shibata T., Uchida K. und Yamamoto M. (2006) Oxidative and Electrophilic Stresses Activate Nrf2 through Inhibition of Ubiquitination Activity of Keap1. *Mol. Cell. Biol.* 26(1), 221-229.
- Köhle C.** und Bock K. W. (2007) Coordinate regulation of Phase I and II xenobiotic metabolisms by the Ah receptor and Nrf2. *Biochem. Pharmacol.* 73(12), 1853-1862.
- Koh K. H.**, Kang H. J., Li L. S., Kim N. G., You K. T., Yang E., Kim H., Kim H. J., Yun C. O., Kim K. S. und Kim H. (2005) Impaired nonhomologous end-joining in mismatch repair-deficient colon carcinomas. *Lab. Invest.* 85(9), 1130-1138.
- Kooy N. W.**, Royall J. A. und Ischiropoulos H. (1997) Oxidation of 2',7'-dichlorofluorescein by peroxynitrite. *Free Radic. Res.* 27, 245-254.
- Kosiak B.**, Torp M., Skjerve E. und Andersen B. (2004) *Alternaria* and *Fusarium* in Norwegian grains of reduced quality--a matched pair sample study. *Int. J. Food Microbiol.* 93(1), 51-62.
- Krishna T. S. R.**, Kong X. P., Gary S., Burgers P. M. und Kuriyan J. (1994) Crystal structure of the eukaryotic DNA polymerase processivity factor PCNA. *Cell*. 79(7), 1233-1243.
- Krishnamurthy N.**, Haraguchi K., Greenberg M. M. und David S. S. (2008) Efficient removal of formamidopyrimidines by 8-oxoguanine glycosylases. *Biochemistry*. 47(3), 1043-1050.
- Kropat C.** (2008) Wirkmechanistische Untersuchungen zur Genotoxizität von Alternariol. Wissenschaftliche Abschlussarbeit, Institut für Angewandte Biowissenschaften, Abteilung Lebensmitteltoxikologie, Universität Karlsruhe (TH).
- Kubista M.**, Andrade J. M., Bengtsson M., Forootan A., Jonák J., Lind K., Sindelka R., Sjöback R., Sjögreen B., Strömbom L., Ståhlberg A. und Zoric N. (2006) The real-time polymerase chain reaction. *Mol. Aspects Med.* 27(2-3), 95-125.
- Kulling S. E.** und Metzler M. (1997) Induction of micronuclei, DNA strand breaks and HPRT mutations in cultured Chinese hamster V79 cells by the phytoestrogen coumestrol. *Food Chem. Toxicol.* 35(6), 605-613.

L

- Lansiaux A.**, Laine W., Baldeyrou B., Mahieu C., Wattez N., Vezin H., Martinez F. J., Piñeyro A. und Bailly C. (2001) DNA topoisomerase II inhibition by peroxisomicine A(1) and its radical metabolite induces apoptotic cell death of HL-60 and HL-60/MX2 human leukemia cells. *Chem. Res. Toxicol.* 14(1), 16-24.
- Larsen A. K.**, Escargueil A. E. und Skladanowski A. (2003a) Catalytic topoisomerase II inhibitors in cancer therapy. *Pharmacol. Ther.* 99(2), 167-181.
- Larsen A. K.**, Escargueil A. E. und Skladanowski A. (2003b) From DNA damage to G2 arrest: the many roles of topoisomerase II. *Prog. Cell Cycle Res.* 5, 295-300.
- Lau A.**, Villeneuve N. F., Sun Z., Wong P. K. und Zhang D. D. (2008) Dual roles of Nrf2 in cancer. *Pharmacol. Res.* 58(5-6), 262-270.
- LeBel C. P.**, Ischiropoulos H. und Bondy S. C. (1992) Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chem. Res. Toxicol.* 5(2), 227-231.
- Lechevrel M.**, Casson A. G., Wolf C. R., Hardie L. J., Flinterman M. B., Montesano R. und Wild C. P. (1999) Characterization of cytochrome P450 expression in human oesophageal mucosa. *Carcinogenesis.* 20(2), 243-248.
- Lee J. M.** und Johnson J. A. (2004) An important role of Nrf2 -ARE pathway in the cellular defense mechanism. *J. Biochem. Mol. Biol.* 37(2), 139-143.
- Lee U. S.**, Jang H. S., Tanaka T., Toyasaki N., Sugiura Y., Oh Y. J., Cho C. M. und Ueno Y. (1986) Mycological survey of Korean cereals and production of mycotoxins by *Fusarium* isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* 52(6), 1258-1260.
- Lehmann L.**, Wagner J. und Metzler M. (2006) Estrogenic and clastogenic potential of the mycotoxin alternariol in cultured mammalian cells. *Food Chem. Toxicol.* 44(3), 398-408.
- Leonardi E.**, Girlando S., Serio G., Mauri F. A., Perrone G., Scampini S., Dalla Palma P. und Barbareschi M. (1992) PCNA and Ki67 expression in breast carcinoma: correlations with clinical and biological variables. *J. Clin. Pathol.* 45(5), 416-419.
- Leong M.**, Milstein C. und Pannell R. (1986) Luminescent detection method for immunodot, Western, and Southern blots. *J. Histochem. Cytochem.* 34, 1645-1650.
- Leppard J. B.** und Champoux J. J. (2005) Human DNA topoisomerase I: relaxation, roles, and damage control. *Chromosoma.* 114(2), 75-85.

- Lewis D. F. V.**, Ioannides C. und Parke D. V. (1994) Molecular modelling of cytochrome CYP1A1: a putative access channel explains differences in induction potency between the isomers benzo(a)pyrene and benzo(e)pyrene, and 2- and 4-acetylaminofluorene. *Toxicol. Lett.* 71(3), 235-243.
- Li T. K.**, Chen A. Y., Yu C., Mao Y., Wang H. und Liu L. F. (1999) Activation of topoisomerase II-mediated excision of chromosomal DNA loops during oxidative stress. *Genes Dev.* 13(12), 1553-1560.
- Li T. K.** und Liu L. F. (2001) Tumor cell death induced by topoisomerase-targeting drugs. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 41, 53-77.
- Li F. Q.** und Yoshizawa T. (2000) *Alternaria* Mycotoxins in Wheathered Wheat from China. *J. Agric. Food Chem.* 48, 2920-2924.
- Liao W.**, McNutt M. und Zhu W. G. (2009) The comet assay: a sensitive method for detecting DNA damage in individual cells. *Methods.* 48(1), 46-53.
- Liao Z.**, Thibaut L., Jobson A. und Pommier Y. (2006) Inhibition of human tyrosyl-DNA phosphodiesterase by aminoglycoside antibiotics and ribosome inhibitors. *Mol. Pharmacol.* 70(1), 366-372.
- Lieber M. R.** (1999) The biochemistry and biological significance of nonhomologous DNA end joining: an essential repair process in multicellular eukaryotes. *Genes Cells.* 4(2), 77-85.
- Lieber M. R.**, Ma Y., Pannicke U. und Schwarz K. (2003) Mechanism and regulation of human non-homologous DNA end-joining. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4(9), 712-720.
- Lindl T.** (2000) Zell- und Gewebekultur. Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg Berlin, 4 Auflage.
- Lindsey R. H.**, Bromberg K. D., Felix C. A. und Osheroff N. (2004) 1,4-Benzoquinone is a topoisomerase II poison. *Biochemistry.* 43(23), 7563-7574.
- Lindsey R. H.**, Bender R. P. und Osheroff N. (2005) Stimulation of topoisomerase II-mediated DNA cleavage by benzene metabolites. *Chem. Biol. Interact.* 153-154, 197-205.
- Linka R. M.**, Porter A. C. G., Volkov A., Mielke C., Boege F. und Christensen M. O. (2007) C-terminal regions of topoisomerase IIalpha and IIbeta determine isoform-specific functioning of the enzymes *in vivo*. *Nucleic Acids Res.* 35(11), 3810-3822.
- Liochev S. I.** und Fridovich I. (1994) The role of O₂⁻ in the production of HO₂·: *in vitro* and *in vivo*. *Free Radic. Biol. Med.* 16(1), 29-33.
- Lips J.** und Kaina B. (2001) DNA double-strand breaks trigger apoptosis in p53-deficient fibroblasts. *Carcinogenesis.* 22(4), 579-585.

- Liu B. H.**, Wu T. S., Yu F. Y. und Su C. C. (2007) Induction of oxidative stress response by the mycotoxin patulin in mammalian cells. *Toxicol. Sci.* 95(2), 340-347.
- Liu C.**, Pouliot J. J. und Nash H. A. (2002) Repair of topoisomerase I covalent complexes in the absence of the tyrosyl-DNA phosphodiesterase Tdp1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99(23), 14970-14975.
- Liu C.**, Zhou S., Begum S., Sidransky D., Westra W. H., Brock M. und Califano J. A. (2007) Increased expression and activity of repair genes TDP1 and XPF in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer.* 55(3), 303-311.
- Liu G. T.**, Qian Y. Z., Zhang P., Dong Z. M., Shi Z. Y., Zhen Y. Z., Miao J. und Xu Y.M. (1991) Relationships between *Alternaria alternata* and oesophageal cancer. *IARC Sci. Publ.* 105, 258-262.
- Liu G. T.**, Qian Y. Z., Zhang P., Dong W. H., Qi Y. M. und Guo H. T. (1992) Etiological role of *Alternaria alternata* in human esophageal cancer. *Chin. Med. J.* 105(5), 394-400.
- Liu H.**, Colavitti R., Rovira I. I. und Finkel T. (2005) Redox-dependent transcriptional regulation. *Circulation Res.* 97, 9677-974.
- Lo H. W.** und Ali-Osman F. (2007) Genetic polymorphism and function of glutathione S-transferases in tumor drug resistance. *Curr. Opin. Pharmacol.* 7(4), 367-374.
- Logrieco A.**, Bottalico A., Mulé G., Moretti A. und Perrone G. (2003) Epidemiology of Toxicogenic Fungi and their Associated Mycotoxins for Some Mediterranean Crops. *Eur. J. Plant Pathol.* 109(7), 645-667.
- López-Lázaro M.**, Willmore E. und Austin C. A. (2007) Cells lacking DNA topoisomerase II beta are resistant to genistein. *J. Nat. Prod.* 70(5), 763-767.
- Lu H. R.**, Zhu H., Huang M., Chen Y., Cai Y. J., Miao Z. H., Zhang J. S. und Ding J. (2005) Reactive oxygen species elicit apoptosis by concurrently disrupting topoisomerase II and DNA-dependent protein kinase. *Mol. Pharmacol.* 68(4), 983-994.
- Lubet R. A.**, Nims R. W., Mayer R. T., Cameron J. W. und Schechtman L. M. (1985) Measurement of cytochrome P-450 dependent dealkylation of alkoxyphenoxazones in hepatic S9s and hepatocyte homogenates: effects of dicumarol. *Mutat. Res.* 142(3), 127-131.
- Lynch A.**, Harvey J., Aylott M., Nicholas E., Burman M., Siddiqui A., Walker S. und Rees R. (2003) Investigations into the concept of a threshold for topoisomerase inhibitor-induced clastogenicity. *Mutagenesis.* 18(4), 345-353.

Lyu Y. L., Kerrigan J. E., Lin C. P., Azarova A. M., Tsai Y. C., Ban Y. und Liu L. F. (2007) Topoisomerase IIbeta mediated DNA double-strand breaks: implications in doxorubicin cardiotoxicity and prevention by dexrazoxane. *Cancer Res.* 67(18), 8839-8846.

M

Ma Q. und Baldwin K. T. (2000) 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-p-diowin-induced Degradation of Aryl Hydrocarbon Receptor (AhR) by the Ubiquitin-Proteasome Pathway. *J. Biol. Chem.* 275(12), 8432-8438.

Magan N., Cayley G. R. und Lacey J. (1984) Effect of water activity and temperature on mycotoxin production by *Alternaria alternata* in culture and on wheat grain. *Appl. Environ. Microbiol.* 47(5), 1113-1117.

Magnani R. F., De Souza G. D. und Rodrigues-Filho E. (2007) Analysis of alternariol and alternariol monomethyl ether on flavedo and albedo tissues of tangerines (*Citrus reticulata*) with symptoms of *alternaria* brown spot. *J. Agric. Food Chem.* 55(13), 4980-4986.

Makun H. A., Gbodi T. A., Akanya O. H., Salako E. A. und Ogbadu G. H. (2007) Fungi and some mycotoxins contaminating rice (*Oryza Sativa*) In Niger State, Nigeria. *Afr. J. Biotechnol.* 6(2), 99-108.

Malik M. und Nitiss J. L. (2004) DNA repair functions that control sensitivity to topoisomerase-targeting drugs. *Eukaryot. Cell.* 3(1), 82-90.

Mans D. R. A., Lafleur M. V. M., Westmijze E. J., van Maanen J. M. S., van Schaik M. A., Lankelma J. und Retél J. (1991) Formation of different reaction products with single- and double-stranded DNA by the ortho-quinone and the semi-quinone free radical of etoposide (VP-16-213). *Biochem. Pharmacol.* 42(11), 2131-2139.

Mans D. R. A., Lafleur M. V. M., Westmijze E. J., Horn I. R., Bets D., Schuurhuis G. J., Lankelma J. und Retél J. (1992) Reactions of glutathione with the catechol, the ortho-quinone and the semi-quinone free radical of etoposide. Consequences for DNA inactivation. *Biochem. Pharmacol.* 43(8), 1761-1768.

Mao Y., Sun M., Desai S. D. und Liu L. F. (2000a) SUMO-1 conjugation to topoisomerase I: A possible repair response to topoisomerase-mediated DNA damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97(8), 4046-4051.

Mao Y., Desai S. D. und Liu L. F. (2000b) SUMO-1 conjugation to human DNA topoisomerase II isozymes. *J. Biol. Chem.* 275(34), 26066-26073

Marchesi E., Rota C., Fann Y. C., Chignell C. F. und Mason R. P. (1999) Photoreduction of the fluorescent dye 2'-7'-dichlorofluorescein: a spin trapping and direct electron spin resonance study with implications for oxidative stress measurements. *Free Radic. Biol. Med.* 26(1-2), 148-161.

- Marko D.**, Puppel N., Tjaden Z., Jakobs S. und Pahlke G. (2004) The substitution pattern of anthocyanidins affects different cellular signaling cascades regulating cell proliferation. *Mol. Nutr. Food Res.* 48, 318-325.
- Markovits J.**, Junqua S., Goldwasser F., Venuat A. M., Luccioni C., Beaumatin J., Saucier J. M., Bernheim A. und Jacquemin-Sablon A. (1995) Genistein resistance in human leukaemic CCRF-CEM cells: selection of a diploid cell line with reduced DNA topoisomerase II beta isoform. *Biochem. Pharmacol.* 50(2), 177-186.
- Marnett L. J.**, Riggins J. N. und West J. D. (2003) Endogenous generation of reactive oxidants and electrophiles and their reactions with DNA and protein. *J. Clin. Invest.* 111(5), 583-593.
- Marsh K.**, Willmore E., Tinelli S., Cornarotti M., Meczes E. L., Capranico G., Fisher M. und Austin C. A. (1996) Amsacrine-promoted DNA cleavage site determinants for the two human DNA topoisomerase II isoforms alpha and beta. *Biochem. Pharmacol.* 52(11), 1675-1685.
- Maynard S.**, Schurman S. H., Harboe C., de Souza-Pinto N. C. und Bohr V. A. (2009) Base excision repair of oxidative DNA damage and association with cancer and aging. *Carcinogenesis.* 30(1), 2-10.
- McClendon A. K.** und Osheroff N. (2007) DNA topoisomerase II, genotoxicity, and cancer. *Mutat. Res.* 623(1-2), 83-97.
- McKay J. S.**, Cox C. L. und Foster A. P. (2001) Cutaneous alternariosis in a cat. *J. Small Anim. Pract.* 42(2), 75-78.
- McKinnon P. J.** und Caldecott K. W. (2007) DNA strand break repair and human genetic disease. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 8, 37-55.
- McMahon M.**, Thomas N., Itoh K., Yamamoto M. und Hayes J.D. (2004) Redox-regulated Turnover of Nrf2 Is Determined by at Least Two Separate Protein Domains, the Redox-sensitive Neh2 Degron and the Redox-insensitive Neh6 Degron. *J. Biol. Chem.* 279(30), 31556-31567.
- Meczes E. L.**, Marsh K. L., Fisher L. M., Rogers M. P. und Austin C. A. (1997) Complementation of temperature-sensitive topoisomerase II mutations in *Saccharomyces cerevisiae* by a human TOP2 beta construct allows the study of topoisomerase II beta inhibitors in yeast. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 39(4), 367-375.
- Meczes E. L.**, Gilroy K. L., West K. L. und Austin C. A. (2008) The impact of the human DNA topoisomerase II C-terminal domain on activity. *PLoS ONE.* 3(3), e1754.

- Medina A.**, Valle-Algarra F. M., Mateo R., Gimeno-Adelantado J. V., Mateo F. und Jiménez M. (2006) Survey of the mycobiota of Spanish malting barley and evaluation of the mycotoxin producing potential of species of *Alternaria*, *Aspergillus* and *Fusarium*. *Int. J. Food Microbiol.* 108(2), 196-203.
- Meister P.**, Poidevin M., Francesconi S., Tratner I., Zarzov P. und Baldacci G. (2003) Nuclear factories for signalling and repairing DNA double strand breaks in living fission yeast. *Nucleic Acids Res.* 31(17), 5064-5073.
- Meng L. H.**, Liao Z. Y. und Pommier Y. (2003) Non-camptothecin DNA topoisomerase I inhibitors in cancer therapy. *Curr. Top. Med. Chem.* 3(3), 305-320.
- Mensah-Osman E. J.**, Al-Katib A. M., Wu H. Y., Osman N. I. und Mohammad R. M. (2002) 2-[4-(7-chloro-2-quinoxalinyloxyphenoxy)-propionic acid (XK469), an inhibitor of topoisomerase (Topo) IIbeta, up-regulates Topo IIalpha and enhances Topo IIalpha-mediated cytotoxicity. *Mol. Cancer Ther.* 1(14), 1321-1326.
- Meyer A. J.** (2008) The integration of glutathione homeostasis and redox signaling. *J. Plant Physiol.* 165(13), 1390-1403.
- Meyer K. N.**, Kjeldsen E., Straub T., Knudsen B. R., Hickson I. D., Kikuchi A., Kreipe H. und Boege F. (1997) Cell cycle-coupled relocation of types I and II topoisomerases and modulation of catalytic enzyme activities. *J. Cell Biol.* 136(4), 775-788.
- Miao W.**, Hu L., Scrivens P. J. und Batist G. (2005) Transcriptional regulation of NF-E2 p45-related factor (NRF2) expression by the aryl hydrocarbon receptor-xenobiotic response element signaling pathway: direct cross-talk between phase I and II drug-metabolizing enzymes. *J. Biol. Chem.* 280(21), 20340-20348.
- Miao Z. H.**, Agama K., Sordet O., Povirk L., Kohn K. W. und Pommier Y. (2006) Hereditary ataxia SCAN1 cells are defective for the repair of transcription-dependent topoisomerase I cleavage complexes. *DNA Repair (Amst).* 5(12), 1489-1494.
- Mielke C.**, Kalfalah F. M., Christensen M. O. und Boege F. (2007) Rapid and prolonged stalling of human DNA topoisomerase I in UVA-irradiated genomic areas. *DNA Repair (Amst).* 6(12), 1757-1763.
- Mimura J.** und Fujii-Kuriyama Y. (2003) Functional role of AhR in expression of toxic effects by TCDD. *Biochim. Biophys. Acta.* 1619, 263-268.
- Mizutani H.**, Tada-Oikawa S., Hiraku Y., Oikawa S., Kojima M. und Kawanishi S. (2002) Mechanism of apoptosis induced by a new topoisomerase inhibitor through the generation of hydrogen peroxide. *J. Biol. Chem.* 277(34), 30684-30689.

- Mizutani H.**, Tada-Oikawa S., Hiraku Y., Kojima M. und Kawanishi S. (2005) Mechanism of apoptosis induced by doxorubicin through the generation of hydrogen peroxide. *Life Sci.* 76(13), 1439-1453.
- Moi P.**, Chan K., Asunis I., Cao A. und Kan Y. W. (1994) Isolation of NF-E2-related factor 2 (Nrf2), a NF-E2-like basic leucine zipper transcriptional activator that binds to the tandem NF-E2/AP1 repeat of the beta-globin locus control region. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91(21), 9926-9930.
- Moldovan G. L.**, Pfander B. und Jentsch S. (2007) PCNA, the maestro of the replication fork. *Cell.* 129(4), 665-679.
- Monaghan P.**, Metcalfe N. B. und Torres R. (2009) Oxidative stress as a mediator of life history trade-offs: mechanisms, measurements and interpretation. *Ecol. Lett.* 12(1), 75-92.
- Mondal N.** und Parvin J. D. (2001) DNA topoisomerase IIalpha is required for RNA polymerase II transcription on chromatin templates. *Nature.* 413(6854), 435-438.
- Monks T. J.**, Hanzlik R. P., Cohen G. M., Ross D. und Graham D. G. (1992) Quinone chemistry and toxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 112(1), 2-16.
- Monneret C.** (2001) Recent developments in the field of antitumour anthracyclines. *Eur. J. Med. Chem.* 36(6), 483-493.
- Monnot M.**, Mauffret O., Simon V., Lescot E., Psaume B., Saucier J. M., Charra M., Belehradek J. und Femandjian S. (1991) DNA-drug recognition and effects on topoisomerase II-mediated cytotoxicity. A three-mode binding model for ellipticine derivatives. *J. Biol. Chem.* 266(3), 1820-1829.
- Montaudon D.**, Palle K., Rivory L. P., Robert J., Douat-Casassus C., Quideau S., Bjornsti M. A. und Pourquier P. (2007) Inhibition of topoisomerase I cleavage activity by thiol-reactive compounds: importance of vicinal cysteines 504 and 505. *J. Biol. Chem.* 282(19), 14403-14412.
- Montecucco A.** und Biamonti G. (2007) Cellular response to etoposide treatment. *Cancer Lett.* 252(1), 9-18.
- Morita S.**, Yano M., Shiozaki H., Tsujinaka T., Ebisui C., Morimoto T., Kishibuti M., Fujita J., Ogawa A., Taniguchi M., Inoue M., Tamura S., Yamazaki K., Kikkawa N., Mizunoya S. und Monden M. (1997) CYP1A1, CYP2E1 and GSTM1 polymorphisms are not associated with susceptibility to squamous-cell carcinoma of the esophagus. *Int. J. Cancer.* 71(2), 192-195.
- Morris E. J.** und Geller H. M. (1996) Induction of neuronal apoptosis by camptothecin, an inhibitor of DNA topoisomerase-I: evidence for cell cycle-independent toxicity. *J. Cell Biol.* 134(3), 757-770.

- Morris S. K.**, Baird C. L. und Lindsley J. E. (2000) Steady-state and rapid kinetic analysis of topoisomerase II trapped as the closed-clamp intermediate by ICRF-193. *J. Biol. Chem.* 275(4), 2613-2618.
- Morland I.**, Rolseth V., Luna L., Rognes T., Bjørås M. und Seeberg E. (2002) Human DNA glycosylases of the bacterial Fpg/MutM superfamily: an alternative pathway for the repair of 8-oxoguanine and other oxidation products in DNA. *Nucleic Acids Res.* 30(22), 4926-4936.
- Møller P.** (2006) The alkaline comet assay: towards validation in biomonitoring of DNA damaging exposures. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 98(4), 336-345.
- Müller-Planitz F.** und Herschlag D. (2008) Coupling between ATP Binding and DNA Cleavage by DNA topoisomerase II: a unifying kinetic and structural mechanism. *J. Biol. Chem.* 238(25), 17463-17476.
- Münzel P. A.**, Schmohl S., Heel H., Kälberer K., Bock-Hennig B. S. und Bock K. W. (1999) Induction of human UDP glucuronosyltransferases (UGT1A6, UGT1A9, and UGT2B7) by t-butylhydroquinone and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in Caco-2 cells. *Drug Metab. Dispos.* 27(5), 569-573.
- Murphy M. P.** (2009) How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem. J.* 417(1), 1-13.
- Murray G. I.**, Shaw D., Weaver R. J., McKay J. A., Ewen S. W. B., Melvin W. T. und Burke M. D. (1994) Cytochrome P450 expression in oesophageal cancer. *Gut.* 35(5), 599-603.
- Myhre O.**, Andersen J. M., Aarnes H. und Fonnum F. (2003) Evaluation of the probes 2',7'-dichlorofluorescein diacetate, luminol, and lucigenin as indicators of reactive species formation. *Biochem. Pharmacol.* 65(10), 1575-1582.
- N**
- Nakada S.**, Katsuki Y., Imoto I., Yokoyama T., Nagasawa M., Inazawa J. und Mizutani S. (2006) Early G2/M checkpoint failure as a molecular mechanism underlying etoposide-induced chromosomal aberrations. *J. Clin. Invest.* 116(1), 80-89.
- Nakajima T.**, Kimura M., Kuroda K., Tanaka M., Kikuchi A., Seino H., Yamao F. und Oda K. (1997) Induction of ubiquitin conjugating enzyme activity for degradation of topoisomerase II alpha during adenovirus E1A-induced apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 239(3), 823-829.
- Nebert D. W.**, Roe A. L., Dieter M. Z., Solis W. A., Yang Y. und Dalton, T. P. (2000) Role of the Aromatic Hydrocarbon Receptor and [Ah] Gene Battery in the Oxidative Stress Response, Cell Cycle Control, and Apoptosis. *Biochem. Pharmacol.* 59(1), 65-85.

- Nelson W. G.** und Kastan M. (1994) DNA strand breaks: the DNA template alterations that trigger p53-dependent DNA damage response pathways. *Mol. Cell Biol.* 14(3), 1815-1823.
- N'Guyen Q. B.**, Fallone F., Seree E., Fina F., Villard P. H., Guigal N., De Meo M., Lacarelle B., Martin P. M. und Barra Y. (2002) Serum increases CYP1A1 induction by 3-methylcholanthrene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 297(2), 249-254.
- Nguyen L. P.** und Bradfield C. A. (2008) The search for endogenous activators of the aryl hydrocarbon receptor. *Chem. Res. Toxicol.* 21(1), 102-116.
- Nguyen T.**, Sherratt P. J., Nioi P., Yang C. S. und Pickett C. B. (2005) Nrf2 controls constitutive and inducible expression of ARE-driven genes through a dynamic pathway involving nucleocytoplasmic shuttling by Keap1. *J. Biol. Chem.* 280(37), 32485-32492.
- Nichols A. F.** und Sancar A. (1992) Purification of PCNA as a nucleotide excision repair protein. *Nucleic Acids Res.* 20(13), 2441-2446.
- Nitiss J.** und Wang J. C. (1988) DNA topoisomerase-targeting antitumor drugs can be studied in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85(20), 7501-7505.
- Nitiss J. L.** (1998) Investigating the biological functions of DNA topoisomerases in eukaryotic cells. *Biochim. Biophys. Acta.* 1400(1-3), 63-81.
- Nitiss K. C.**, Malik M., He X., White S. W. und Nitiss J. L. (2006) Tyrosyl-DNA phosphodiesterase (Tdp1) participates in the repair of Top2-mediated DNA damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103(24), 8953-8958.
- Nouspikel T.** (2009) DNA repair in mammalian cells : Nucleotide excision repair: variations on versatility. *Cell Mol. Life Sci.* 66(6), 994-1009.
- O**
- Östling O.** und Johanson K. J. (1984) Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 123(1), 291-298.
- Olive P. L.**, Wlodek D. und Banáth J. P. (1991) DNA double-strand breaks measured in individual cells subjected to gel electrophoresis. *Cancer Res.* 51(17), 4671-4676.
- Olsen M.** und Visconti A. (1988) Metabolism of alternariol monomethyl ether by porcine liver and intestinal mucosa *in vitro*. *Toxicol. In Vitro.* 2(1), 27-29.

Onda T., Toyoda E., Miyazaki O., Seno C., Kagaya S., Okamoto K. und Nishikawa K. (2008) NK314, a novel topoisomerase II inhibitor, induces rapid DNA double-strand breaks and exhibits superior antitumor effects against tumors resistant to other topoisomerase II inhibitors. *Cancer Lett.* 259(1), 99-110.

Osburn W. O. und Kensler T. W. (2008) Nrf2 signaling: an adaptive response pathway for protection against environmental toxic insults. *Mutat Res.* 659(1-2), 31-39.

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

Ozcelik S., Ozcelik N. und Beuchat L. R. (1990) Toxin production by *Alternaria alternata* in tomatoes and apples stored under various conditions and quantitation of the toxins by high-performance liquid chromatography. *Int. J. Food Microbiol.* 11(3-4), 187-194.

P

Pallardó F. V., Markovic J., García J. L. und Viña J. (2009) Role of nuclear glutathione as a key regulator of cell proliferation. *Mol. Aspects Med.* 30(1-2), 77-85.

Palma N., Cinelli S., Saporita O., Wilson S. H. und Dogliotti E. (2007) Ochratoxin A-induced mutagenesis in mammalian cells is consistent with the production of oxidative stress. *Chem. Res. Toxicol.* 20(7), 1031-1037.

Park E. M., Shigenaga M. K., Degan P., Korn T. S. Kitzler J. W., Wehr C. M., Kolachana P. und Ames B. N. (1992) Assay of excised oxidative DNA lesions: isolation of 8-oxoguanine and its nucleoside derivatives from biological fluids with a monoclonal antibody column. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89(8), 3375-3379.

Park S. Y. und Cheng Y. C. (2005) Poly(ADP-ribose) polymerase-1 could facilitate the religation of topoisomerase I-linked DNA inhibited by camptothecin. *Cancer Res.* 65(9), 3894-3902.

Parsons R., Li G. M., Longley M. J., Fang W. H., Papadopoulos N., Jen J., de la Chapelle A., Kinzler K. W., Vogelstein B. und Modrich P. (1993) Hypermutability and mismatch repair deficiency in RER+ tumor cells. *Cell.* 75(6), 1227-1236.

Pastink A., Eeken J. C. J. und Lohman P. H. M. (2001) Genomic integrity and the repair of double-strand DNA breaks. *Mutat. Res.* 480-481, 37-50.

Paunesku T., Mittal S., Protić M., Oryhon J., Korolev S. V., Joachimiak A. und Woloschak G. E. (2001) Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): ringmaster of the genome. *Int. J. Radiat. Biol.* 77(10), 1007-1021.

- Paz-Elizur T.**, Sevilya Z., Leitner-Dagan Y., Elinger D., Roisman L. C. und Livneh Z. (2008) DNA repair of oxidative DNA damage in human carcinogenesis: potential application for cancer risk assessment and prevention. *Cancer Lett.* 266(1), 60-72.
- Pero R. W.**, Posner H., Blois M., Harvan D. und Spalding J. W. (1973) Toxicity of metabolites produced by the *Alternaria*. *Environ. Health Perspect.* 4, 87-94.
- Peters W. H. M.**, Kock L., Nagengast F. M. und Kremers P. G. (1991) Biotransformation enzymes in human intestine: critical low levels in the colon? *Gut.* 32(4), 408-412.
- Peters W. H. M.**, Wobbes T., Roelofs H. M. J. und Jansen J. B. M. J. (1993) Glutathione S-transferases in esophageal cancer. *Carcinogenesis.* 14(7), 1377-1380.
- Pfeiffer E.**, Eschbach S. und Metzler M. (2007a) *Alternaria* toxins: DNA strand-breaking activity in mammalian cells *in vitro*. *Mycotox. Res.* 23(3), 152-157.
- Pfeiffer E.**, Schebb N. H., Podlech J. und Metzler M. (2007b) Novel oxidative *in vitro* metabolites of the mycotoxins alternariol and alternariol methyl ether. *Mol. Nutr. Food Res.* 51(3), 307-316.
- Pfeiffer E.**, Burkhardt B., Altemöller M., Podlech J. und Metzler M. (2008a) Activities of human recombinant cytochrome P450 isoforms and human hepatic microsomes for the hydroxylation of *Alternaria* toxins. *Mycotox. Res.* 24(3), 117-123.
- Pfeiffer E.**, Schmit C., Burkhardt B., Altemöller M., Podlech J. und Metzler M. (2008b) Glucuronidation of the mycotoxins alternariol and alternariol-9-methyl ether *in vitro*: chemical structures of glucuronides and activities of human UDP-glucuronosyltransferase isoforms. *Mycotox. Res.* 25(1), 3-10.
- Pfeiffer E.**, Herrmann C., Altemöller M., Podlech J. und Metzler M. (2009) Oxidative *in vitro* metabolism of the *Alternaria* toxins altenuene and isoaltenuene. *Mol. Nutr. Food Res.* 53(4), 452-459.
- Pi J.**, Qu W., Reece J. M., Kumagai Y. und Waalkes M. P. (2003) Transcription factor Nrf2 activation by inorganic arsenic in cultured keratinocytes: involvement of hydrogen peroxide. *Exp. Cell Res.* 290(2), 234-245.
- Pi J.**, Bai Y., Reece J. M., Williams J., Liu D., Freeman M. L., Fahl W. E., Shugar D., Liu J., Qu W., Collins S. und Waalkes M. P. (2007) Molecular mechanism of human Nrf2 activation and degradation: role of sequential phosphorylation by protein kinase CK2. *Free Radic. Biol. Med.* 42(12), 1797-1806.

- Pilch D. S.**, Yu C., Makhey D., LaVoie E. J., Srinivasan A. R., Olson W. K., Sauers R. R., Breslauer K. J. Geacintov N. E. und Liu L. F. (1997) Minor groove-directed and intercalative ligand-DNA interactions in the poisoning of human DNA topoisomerase I by protoberberine analogs. *Biochemistry*. 36(41), 12542-12553.
- Plo I.**, Liao Z. Y., Barceló J. M., Kohlhagen G., Caldecott K. W., Weinfeld M. und Pommier Y. (2003) Association of XRCC1 and tyrosyl DNA phosphodiesterase (Tdp1) for the repair of topoisomerase I-mediated DNA lesions. *DNA Repair (Amst)*. 2(10), 1087-1100.
- Pindur U.**, Jansen M. und Lemster T. (2005) Advances in DNA-ligands with groove binding, intercalating and/or alkylating activity: chemistry, DNA-binding and biology. *Curr. Med. Chem.* 12(24), 2805-2847.
- Pinkus R.**, Weiner L. M. und Daniel V. (1996) Role of Oxidants and Antioxidants in the Induction of AP-1, NF-kB, and Glutathione S-Transferase Gene Expression. *J. Biol. Chem.* 271(23), 13422-13429.
- Pobst L. J.** und Ames M. M. (2006) CYP1A1 activation of aminoflavone leads to DNA damage in human tumor cell lines. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 57(5), 569-576.
- Poland A.** und Glover E. (1976) Stereospecific, High Affinity Binding of 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-p-dioxin by Hepatic Cytosol. *J. Biol. Chem.* 251(16), 4936-4946.
- Poljaková J.**, Forsterová K., Šulc M., Frei E. und Stiborová M. (2005) Oxidation of an antitumor drug ellipticine by peroxidases. *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky. Olomouc. Czech. Repub.* 149(2), 449-453.
- Poljaková J.**, Eckschlager T., Hraběta J., Hřebačková J., Smutný S., Frei E., Martínek V., Kizek R. und Stiborová M. (2009) The mechanism of cytotoxicity and DNA adduct formation by the anticancer drug ellipticine in human neuroblastoma cells. *Biochem. Pharmacol.* 77(9), 1466-1479.
- Pollock G. A.**, DiSabatino C. E., Heimsch R. C. und Hilbelink D. R. (1982a) The subchronic toxicity and teratogenicity of alternariol monomethyl ether produced by *Alternaria solani*. *Food Chem. Toxicol.* 20(6), 899-902.
- Pollock G. A.**, DiSabatino C. E., Heimsch R. C. und Coulombe R. A. (1982b) The distribution, elimination, and metabolism of 14C-alternariol monomethyl ether. *J. Environ. Sci. Health. B.* 17(2), 109-124.
- Pommier Y.** (1993) DNA topoisomerase I and II in cancer chemotherapy: update and perspectives. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 32(2), 103-108.
- Pommier Y.**, Pourquier P., Fan Y. und Strumberg D. (1998) Mechanism of action of eukaryotic DNA topoisomerase I and drugs targeted to the enzyme. *Biochim. Biophys. Acta.* 1400(1-3), 83-105.

- Pommier Y.**, Kohlhagen G., Pourquier P., Sayer J. M., Kroth H. und Jerina D. M. (2000) Benzo[a]pyrene diol epoxide adducts in DNA are potent suppressors of a normal topoisomerase I cleavage site and powerful inducers of other topoisomerase I cleavages. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97(5), 2040-2045.
- Pommier Y.**, Redon C., Rao V. A., Seiler J. A., Sordet O., Takemura H., Antony S., Meng L. H., Liao Z. Y., Kohlhagen G., Zhang H. L. und Kohn K. W. (2003) Repair of and checkpoint response to topoisomerase I-mediated DNA damage. *Mutat. Res.* 532(1-2), 173-203.
- Pommier Y.** (2004) Camptothecins and topoisomerase I: a foot in the door. Targeting the genome beyond topoisomerase I with camptothecins and novel anticancer drugs: importance of DNA replication, repair and cell cycle checkpoints. *Curr. Med. Chem. Anticancer Agents.* 4(5), 429-434.
- Pommier Y.** und Marchand C. (2005) Interfacial inhibitors of protein-nucleic acid interactions. *Curr. Med. Chem. Anticancer Agents.* 5(4), 421-429.
- Pool-Zobel B.**, Veeriah S. und Böhmer F. D. (2005) Modulation of xenobiotic metabolising enzymes by anticarcinogens -- focus on glutathione S-transferases and their role as targets of dietary chemoprevention in colorectal carcinogenesis. *Mutat. Res.* 591(1-2), 74-92.
- Pouliot J. J.**, Robertson C. A. und Nash H. A. (2001) Pathways for repair of topoisomerase I covalent complexes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Cells.* 6(8), 677-687.
- Pourquier P.**, Ueng L. M., Kohlhagen G., Mazumder A., Gupta M., Kohn K. W. und Pommier Y. (1997a) Effects of uracil incorporation, DNA mismatches, and abasic sites on cleavage and religation activities of mammalian topoisomerase I. *J. Biol. Chem.* 272(12), 7792-7796.
- Pourquier P.**, Pilon A. A., Kohlhagen G., Mazumder A., Sharma A. und Pommier Y. (1997b) Trapping of mammalian topoisomerase I and recombinations induced by damaged DNA containing nicks or gaps. Importance of DNA end phosphorylation and camptothecin effects. *J. Biol. Chem.* 272(42), 26441-26447.
- Pourquier P.**, Ueng L. M., Fertala J., Wang D., Park H. J., Essigmann J. M., Bjornsti M. A. und Pommier Y. (1999) Induction of reversible complexes between eukaryotic DNA topoisomerase I and DNA-containing oxidative base damages. 7, 8-dihydro-8-oxoguanine and 5-hydroxycytosine. *J. Biol. Chem.* 274(13), 8516-8523.
- Potmesil M.**, Hsiang Y. H., Liu L. F., Bank B., Grossberg H., Kirschenbaum S., Forlenzar T. J., Penziner A., Kanganis D., Knowles D., Traganos F. und Silber R. (1988) Resistance of human leukemic and normal lymphocytes to drug-induced DNA cleavage and low levels of DNA topoisomerase II. *Cancer Res.* 48(12), 3537-3543.

Prusky D., Shalom Y., Kobiler I., Akerman M. und Fuchs Y. (2002) The level of quiescent infection of *Alternaria alternata* in mango fruits at harvest determines the postharvest treatment applied for the control of rots during storage. *Postharvest Biol. Technol.* 25(3), 339-347.

Purdom-Dickinson S. E., Sheveleva E. V., Sun H. und Chen Q. M. (2007) Translational control of nrf2 protein in activation of antioxidant response by oxidants. *Mol. Pharmacol.* 72(4), 1074-1081.

R

Rallabhandi P., Hashimoto K., Mo Y. Y., Beck W. T., Moitra P. K. und D'Arpa P. (2002) Sumoylation of topoisomerase I is involved in its partitioning between nucleoli and nucleoplasm and its clearing from nucleoli in response to camptothecin. *J. Biol. Chem.* 277(42), 40020-40026.

Rao V. G. (1965) *Alternaria* leaf spot of rose from India. *Mycopathol. Mycol. Appl.* 27(1), 129-133.

Raymond A. C., Rideout M. C., Staker B., Hjerrild K. und Burgin A. B. (2004) Analysis of Human Tyrosyl-DNA Phosphodiesterase I Catalytic Residues. *J. Mol. Biol.* 338, 895-906.

Reardon J. T., Bessho T., Kung H. C., Bolton P. H. und Sancar A. (1997) *In vitro* repair of oxidative DNA damage by human nucleotide excision repair system: possible explanation for neurodegeneration in xeroderma pigmentosum patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94(17), 9463-9468.

Rebrin I. und Sohal R. S. (2008) Pro-oxidant shift in glutathione redox state during aging. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 60(13-14), 1545-1552.

Reiß J. (1983) *Alternaria* Mycotoxins in Grains and Bread. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 176, 36-39.

Ren P., Ahearn D. G. und Crow S. A. (1998) Mycotoxins of *Alternaria alternata* produced on ceiling tiles. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 20(1), 53-54.

Rich T., Allen R. L. und Wyllie A. H. (2000) Defying death after DNA damage. *Nature.* 407(6805), 777-783.

Riou J. F., Fossé P., Nguyen C. H., Larsen A. K., Bissery M. C., Grondard L., Daucier J. M., Bisogni E. und Lavelle F. (1993) Intopicine (RP 60475) and its derivatives, a new class of antitumor agents inhibiting both topoisomerase I and II activities. *Cancer Res.* 53(24), 5987-5993.

Roberts C. K. und Sindhu K. K. (2009) Oxidative stress and metabolic syndrome. *Life Sci.* 84(21-22), 705-712.

- Robiglio A. L.** und Lopez S. E. (1995). Mycotoxin production by *Alternaria alternata* strains isolated from red delicious apples in Argentina. *Int. J. Food Microbiol.* 24(3), 413-417.
- Robinson M. J.** und Osheroff N. (1991) Effects of antineoplastic drugs on the post-strand-passage DNA cleavage/religation equilibrium of topoisomerase II. *Biochemistry.* 30(7), 1807-1813.
- Roca J.,** Ishida R., Berger J. M., Andoh T. und Wang J. C. (1994) Antitumor bisdioxopiperazines inhibit yeast DNA topoisomerase II by trapping the enzyme in the form of a closed protein clamp. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91(5), 1781-1785.
- Roca J.** (1995) The mechanisms of DNA topoisomerases. *Trends Biochem. Sci.* 20(4), 156-160.
- Rogakou E. P.,** Pilch D. R., Orr A. H., Ivanova V. S. und Bonner W. M. (1998) DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J. Biol. Chem.* 273(10), 5858-5868.
- Rogalska A.,** Koceva-Chyla A. und Józwiak Z. (2008) Aclarubicin-induced ROS generation and collapse of mitochondrial membrane potential in human cancer cell lines. *Chem. Biol. Interact.* 176(1), 58-70.
- Ross J. A.,** Potter J. D., Reaman G. H., Pendergrass T. W. und Robison L. L. (1996) Maternal exposure to potential inhibitors of DNA topoisomerase II and infant leukemia (United States): a report from the Children's Cancer Group. *Cancer Causes Control.* 7(6), 581-590.
- Ross J. A.** (2000) Dietary flavonoids and the MLL gene: A pathway to infant leukemia? *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97(9), 4411-4413.
- Rota C.,** Fann Y. C. und Mason R. P. (1999) Phenoxy free radical formation during the oxidation of the fluorescent dye 2',7'-dichlorofluorescein by horseradish peroxidase. Possible consequences for oxidative stress measurements. *J. Biol. Chem.* 274(40), 28161-28168.
- Roth L.,** Frank H. und Kormann K. (1990) Giftpilze Pilzgifte. Nikol Verlagsgesellschaft mbH & Co. KG, Hamburg.
- Rothkamm K.,** Krüger I., Thompson L. H. und Löbrich M. (2003) Pathways of DNA double-strand break repair during the mammalian cell cycle. *Mol. Cell Biol.* 23(16), 5706-5715.
- Royall J. A.** und Ischiropoulos H. (1993) Evaluation of 2',7'-dichlorofluorescein and dihydrorhodamine 123 as fluorescent probes for intracellular H₂O₂ in cultured endothelial cells. *Arch. Biochem. Biophys.* 302(2), 348-355.

Ruelas C., Tiznado-Hernández M. E., Sánchez-Estrada A., Robles-Burgueño und Troncoso-Rojas R. (2006) Changes in Phenolic Acid Content During *Alternaria alternata* Infection in Tomato Fruit. *J. Phytopathol.* 154(4), 236-244.

S

Sabourin M. und Osheroff N. (2000) Sensitivity of human type II topoisomerases to DNA damage: stimulation of enzyme-mediated DNA cleavage by abasic, oxidized and alkylated lesions. *Nucleic Acids Res.* 28(9), 1947-1954.

Saiki R. K., Scharf S., Faloona F., Mullis K. B., Horn G. T. Erlich H. A. und Arnheim N. (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science.* 230(4732), 1350-1354.

Sakaguchi A. und Kikuchi A. (2004) Functional compatibility between isoform alpha and beta of type II DNA topoisomerase. *J. Cell Sci.* 117(Pt 7), 1047-1054.

Salmena L., Lam V., McPherson J. P. und Goldenberg G. J. (2001) Role of proteasomal degradation in the cell cycle-dependent regulation of DNA topoisomerase IIalpha expression. *Biochem. Pharmacol.* 61(7), 795-802.

Salti G. I., Das Gupta T. K. und Constantinou A. I. (2000) A novel use for the comet assay: detection of topoisomerase II inhibitors. *Anticancer Res.* 20(5A), 3189-3193.

Samejima K., Svingen P. A., Basi G. S., Kottke T., Wesner P. W., Stewart L., Durrieu F., Poirier G. G., Alnemri E. S., Champoux J. J., Kaufmann S. H. und Earnshaw W. C. (1999) Caspase-mediated cleavage of DNA topoisomerase I at unconventional sites during apoptosis. *J. Biol. Chem.* 274(7), 4335-4340.

Sanchez H. und Bush R. K. (2001) A review of *Alternaria alternata* sensitivity. *Rev. Iberoam Micol.* 18(2), 56-59.

Sauer D. B., Seitz L. M., Burroughs R., Mohr H. E., West J. L., Milleret R. J. und Anthony H. D. (1978) Toxicity of *Alternaria* metabolites found in weathered sorghum grain at harvest. *J. Agric. Food Chem.* 26(6), 1380-1393.

Sayre L. M., Perry G. und Smith M. A. (2008) Oxidative stress and neurotoxicity. *Chem. Res. Toxicol.* 21(1), 172-188.

Scandalios J. G. (2005) Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 38(7), 995-1014.

Schafer F. Q. und Buettner G. R. (2001) Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic. Biol. Med.* 30(11), 1191-1212.

- Schlegel H. G. (1992)** Allgemeine Mikrobiologie, 7. Auflage, Georg Thieme Verlag Stuttgart New York.
- Schneider B. L.** und Kulesz-Martin M. (2004) Destructive cycles: the role of genomic instability and adaptation in carcinogenesis. *Carcinogenesis*. 25(11), 2033-2044.
- Schrader T. J.**, Cherry W., Soper K., Langlois I. und Vijay H. M. (2001) Examination of *Alternaria alternata* mutagenicity and effects of nitrosylation using the ames Salmonella test. *Teratog. Carcinog. Mutagen.* 21(4), 261-274.
- Schrader T. J.**, Cherry W., Soper K. und Langlois I. (2006) Further examination of the effects of nitrosylation on *Alternaria alternata* mycotoxin mutagenicity *in vitro*. *Mutat. Res.* 606(1-2), 61-71.
- Schwarz C. (2008)** Analyse und Genotoxizität komplexer *Alternaria*-Toxingemische. Wissenschaftliche Abschlussarbeit, Institut für Angewandte Biowissenschaften, Abteilung Lebensmitteltoxikologie, Universität Karlsruhe (TH).
- Scott P. M.**, Vanwalbe W., Kennedy B. und Anyeti D. (1972) Mycotoxins (ochratoxin A, citrinin, and sterigmatocystin) and toxigenic fungi in grains and other agricultural products. *J. Agric. Food Chem.* 20(6), 1103-1109.
- Scott P. M.** und Stoltz D. R. (1980) Mutagens produced by *Alternaria alternata*. *Mutat. Res.* 78(1), 33-40.
- Scott P. M.**, Lawrence G. A. und Lau B. P. Y. (2006) Analysis of wines, grape juices and cranberry juices for *Alternaria* toxins. *Mycotox. Res.* 22, 142-147.
- Scott S. P.** und Pandita T. K. (2006) The cellular control of DNA double-strand breaks. *J. Cell Biochem.* 99(6), 1463-1475.
- Scripture C. D.**, Sparreboom A. und Figg W. D. (2005) Modulation of cytochrome P450 activity: implications for cancer therapy. *Lancet. Oncol.* 6(10), 780-789.
- Sehested M.** und Jensen P. B. (1996) Mapping of DNA topoisomerase II poisons (etoposide, clerocidin) and catalytic inhibitors (aclerubicin, ICRF-187) to four distinct steps in the topoisomerase II catalytic cycle. *Biochem. Pharmacol.* 51(7), 879-886.
- Seitz L. M.**, Sauer D. B., Mohr H. E., Burroughs R. und Paukstelis J. V. (1975) Metabolites of *Alternaria* in grain sorghum. Compounds which could be mistaken for zearalenone and aflatoxin. *J. Agric. Food Chem.* 123(1), 1-4.
- Seliskar M.** und Rozman D. (2007) Mammalian cytochrom P450-Importance of tissue specificity. *Biochem. Biophys. Acta.* 1770, 458-466.
- Shaposhnikov S. A.**, Salenko V. B., Brunborg G., Nygren J. und Collins A. R. (2008) Single-cell gel electrophoresis (the comet assay): loops or fragments? *Electrophoresis.* 29(14), 3005-3012.

- Sheenan D.**, Meade G., Foley V. M. und Dowd C. A. (2001) Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochem. J.* 360(Pt 1), 1-16.
- Shen J.**, Hughes C., Chao C., Cai J., Bartels C., Gessner T. und Subject J. (1987) Coinduction of glucose-regulated proteins and doxorubicin resistance in Chinese hamster cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84(10), 3278-3282.
- Shen J.**, Subject J. R., Lock R. B. und Ross W. E. (1989) Depletion of topoisomerase II in isolated nuclei during a glucose-regulated stress response. *Mol. Cell Biol.* 9(8), 3284-3291.
- Shephard G. S.** (2007) Committee on Natural Toxins and Food Allergens. General referee reports: *J. AOAC Int.* 91(1), 1B-16B.
- Shimada T.**, Inoue K., Suzuki Y., Kawai T., Azuma E., Nakajima T., Shindo M., Kurose K., Sugie A., Yamagishi Y., Fujii-Kriyama Y. und Hashimoto M. (2002) Arylhydrocarbon receptor-dependent induction of liver and lung cytochromes P450 1A1, 1A2, 1B1 by polycyclic aromatic hydrocarbons and polychlorinated biphenyls in genetically engineered C57BL/6J mice. *Carcinogenesis.* 23(7), 1199-1207.
- Shin S.**, Wakabayashi N., Misra V. Biswal S., Lee G. H., Agoston E. S., Yamamoto M. und Kensler, T. (2007) NRF2 Modulates Aryl Hydrocarbon Receptor Signaling: Influence on Adipogenesis. *Mol. Cell Biol.* 27(20), 7188-7197.
- Sidorenko V. S.** und Zharkov D. O. (2008) Correlated cleavage of damaged DNA by bacterial and human 8-oxoguanine-DNA glycosylases. *Biochemistry.* 47(34), 8970-8976.
- Singh A.**, Misra V., Thimmulappa R. K., Lee H., Ames S., Hoque M. O., Herman J. G., Baylin S. B., Sidransky D., Gabrielson E., Brock M. V. und Biswal S. (2006) Dysfunctional KEAP1-NRF2 interaction in non-small-cell lung cancer. *PLoS Med.* 3(10), 1865-1876.
- Singh N. P.**, McCoy M. T., Tice R. R. und Schneider E. L. (1988) A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* 175(1), 185-191.
- Skehan P.**, Storeng R., Scudiero D., Monks A., McMahon J., Vistica D., Warren J. T., Bokesch H., Kenney S. und Boyd M. R. (1990) New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J. Natl. Cancer Inst.* 82(13), 1107-1112.
- Skladanowski A.**, Côme M. G., Sabisz M., Escargueil A. E. und Larsen A. K. (2005) Down-regulation of DNA topoisomerase IIalpha leads to prolonged cell cycle transit in G2 and early M phases and increased survival to microtubule-interacting agents. *Mol. Pharmacol.* 68(3), 625-634.

- Slifkin M. K.**, Ottolenghi A. und Brown H. (1973) Influence of fungicides on mycotoxin production by *Alternaria mali*. *Mycopathol. Mycol. Appl.* 50(3), 241-248.
- Smart D. J.**, Halicka H. D., Schmuck G., Traganos F., Darzynkiewicz Z. und Williams G. M. (2008) Assessment of DNA double-strand breaks and gammaH2AX induced by the topoisomerase II poisons etoposide and mitoxantrone. *Mutat. Res.* 641(1-2), 43-47.
- Smith C. C.**, O'Donovan M. R. und Martin E. A. (2006) hOGG1 recognizes oxidative damage using the comet assay with greater specificity than FPG or ENDOIII. *Mutagenesis.* 21(3), 185-190.
- Smith C. J.** und Osborn A. M. (2009) Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology. *FEMS Microbiol. Ecol.* 67(1), 6-20.
- Smith G. C. M.** und Jackson S. P. (1999) The DNA-dependent protein kinase. *Genes Dev.* 13(8), 916-934.
- Smith P. K.**, Krohn R. I., Hermanson G. T., Mallia A. K., Gartner F. H., Provenzano M. D., Fujimoto E. K., Goeke N. M., Olson B. J. und Klenk, D. C. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150(1), 76-85.
- Snapka R. M.**, Gao H., Grabowski D. R., Brill D., Chan K. K., Li L., Li G. C. und Ganapathi R. (2001) Cytotoxic mechanism of XK469: resistance of topoisomerase IIbeta knockout cells and inhibition of topoisomerase I. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 280(4), 1155-1160.
- Sohal R. S.**, Mockett R. J. und Orr W. C. (2002) Mechanisms of aging: an appraisal of the oxidative stress hypothesis. *Free Radic. Biol Med.* 33(5), 575-586.
- Solfrizzo M.**, De Girolamo A., Vitti C. und Visconti A. (2004) Liquid Chromatographic Determination of *Alternaria* Toxins in Carrots. *J. AOAC Int.* 87(1), 101-106.
- Sommer N. F.** (1985) Role of controlled environments in suppression of postharvest diseases. *Can. J. Plant Pathol.* 7, 331-339.
- Sonoda E.**, Sasaki M. S., Buerstedde J. M., Bezzubova O., Shinohara A., Ogawa H., Takata M., Yamaguchi-Iwai Y. und Takeda S. (1998) Rad51-deficient vertebrate cells accumulate chromosomal breaks prior to cell death. *EMBO J.* 17(2), 598-608.
- Sordet O.**, Khan Q. A., Plo I., Pourquier P., Urasaki Y., Yoshida A., Antony S., Kohlhagen G., Solary E., Sapparbaev M., Laval J. und Pommier Y. (2004) Apoptotic topoisomerase I-DNA complexes induced by staurosporine-mediated oxygen radicals. *J. Biol. Chem.* 279(48), 50499-50504.

- Sordet O.**, Goldman A., Redon C., Solier S., Rao V. A. und Pommier Y. (2008) Topoisomerase I requirement for death receptor-induced apoptotic nuclear fission. *J. Biol. Chem.* 283(34), 23200-23208.
- Spector L. G.**, Xie Y., Robison L. L., Heerema N. A., Hilden J. M., Lange B., Felix C. A., Davies S. M., Slavin J., Potter J. D., Blair C. K., Reaman G. H. und Ross J. A. (2005) Maternal diet and infant leukemia: the DNA topoisomerase II inhibitor hypothesis: a report from the children's oncology group. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 14(3), 651-655.
- Speit G.**, Schütz P., Bonzheim I., Trenz K. und Hoffman H. (2004) Sensitivity of the FPG protein towards alkylation damage in the comet assay. *Toxicol. Lett.* 146(2), 151-158.
- Spivak G.**, Cox R. A. und Hanawalt P. C. (2009) New applications of the Comet assay: Comet-FISH and transcription-coupled DNA repair. *Mutat. Res.* 681(1), 44-50.
- Srinivasan A.**, Robertson L. W. und Ludewig G. (2002) Sulfhydryl binding and topoisomerase inhibition by PCB metabolites. *Chem. Res. Toxicol.* 15(4), 497-505.
- Stevenson D.**, Wokosin D., Girkin J. und Grant M. H. (2002) Measurement of the intracellular distribution of reduced glutathione in cultured rat hepatocytes using monochlorobimane and confocal laser scanning microscopy. *Toxicol. In Vitro.* 16(5), 609-619.
- Stevnsner T.** und Bohr V. A. (1993) Studies on the role of topoisomerases in general, gene- and strand-specific DNA repair. *Carcinogenesis.* 14(9), 1841-1850.
- Stewart A. F.** und Schütz G. (1987) Camptothecin-induced *in vivo* topoisomerase I cleavages in the transcriptionally active tyrosine aminotransferase gene. *Cell.* 50(7), 1109-1117.
- Stewart L.**, Redinbo M. R., Qiu X., Hol W. G. und Champoux J. J. (1998) A model for the mechanism of human topoisomerase I. *Science.* 279(5356), 1534-1540.
- Stiborová M.**, Bieler C. A., Wiessler M. und Frei E. (2001) The anticancer agent ellipticine on activation by cytochrome P450 forms covalent DNA adducts. *Biochem. Pharmacol.* 62(12), 1675-1684.
- Stinson E. E.**, Bills D. D., Osman S. F., Siciliano J., Ceponis M. J. und Heisler E. G. (1980) Mycotoxin production by *Alternaria* species grown on apples, tomatoes, and blueberries. *J. Agric. Food Chem.* 28(5), 960-963.
- Stinson E. E.**, Osman S. F., Heisler E. G., Siciliano J. und Bills D. D. (1981) Mycotoxin production in whole tomatoes, apples, oranges, and lemons. *J. Agric. Food Chem.* 29, 790-792.

- Stockmann-Juvala H.**, Mikkola J., Naarala J., Loikkanen J., Elovaara E. und Savolainen K. (2004) Oxidative stress induced by fumonisin B1 in continuous human and rodent neural cell cultures. *Free Radic. Res.* 38(9), 933-942.
- Strick R.**, Strissel P. L., Borgers S., Smith S. L. und Rowley J. D. (2000) Dietary bioflavonoids induce cleavage in the MLL gene and may contribute to infant leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97(9), 4790-4795.
- Subramanian D.**, Furbee C. S. und Muller M. T. (2001) ICE bioassay. Isolating *in vivo* complexes of enzyme to DNA. *Methods Mol. Biol.* 95, 137-147.
- Sugimoto Y.**, Tsukahara S., O'hara T., Isoe T. und Tsuruo T. (1990) Decreased expression of DNA topoisomerase I in camptothecin-resistant tumor cell lines as determined by a monoclonal antibody. *Cancer Res.* 50(21), 6925-6930.
- Sullivan D. M.**, Glisson B. S., Hodges P. K., Smallwood-Kentro S. und Ross W. E. (1986) Proliferation dependence of topoisomerase II mediated drug action. *Biochemistry.* 25(8), 2248-2256.
- Sunda W.**, Kieber D. J., Keine R. P. und Huntsman S. (2002) An antioxidant function for DMSP and DMS in marine algae. *Nature.* 418(6895), 317-320.
- Sung P. A.**, Libura J. und Richardson C. (2006) Etoposide and illegitimate DNA double-strand break repair in the generation of MLL translocations: new insights and new questions. *DNA Repair (Amst).* 5(9-10), 1109-1118.
- Surh Y. J.**, Kundu J. K. und Na H. K. (2008) Nrf2 as a master redox switch in turning on the cellular signaling involved in the induction of cytoprotective genes by some chemopreventive phytochemicals. *Planta. Med.* 74(13), 1526-1539.
- Susnow N.**, Zeng L., Margineantu D. und Hockenbery D. M. (2009) Bcl-2 family proteins as regulators of oxidative stress. *Semin. Cancer Biol.* 19(1), 42-49.
- Suzuka I.**, Daidoji H., Matsuoka M., Kadowaki K. I., Takasaki Y., Nakane P. K. und Moriuchi T. (1989) Gene for proliferating-cell nuclear antigen (DNA polymerase delta auxiliary protein) is present in both mammalian and higher plant genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86(9), 3189-3193.

T

- Takahashi A.** und Ohnishi T. (2005) Does gammaH2AX foci formation depend on the presence of DNA double strand breaks? *Cancer Lett.* 229(2), 171-179.
- Takano H.**, Kohno K., Matsuo K., Matsuda T. und Kuwano M. (1992) DNA topoisomerase-targeting antitumor agents and drug resistance. *Anticancer Drugs.* 3(4), 323-330.
- Takasaki Y.**, Deng J. S. und Tan E. M. (1981) A nuclear antigen associated with cell proliferation and blast transformation. *J. Exp. Med.* 154(6), 1899-1909.

- Takashima H.**, Boerkoel C. F., John J., Saifi G. M., Salih M. A. M., Armstrong D., Mao Y., Quioco F. A., Roa B. B., Nakagawa M., Stockton D. W. und Lupski J. R. (2002) Mutation of TDP1, encoding a topoisomerase I-dependent DNA damage repair enzyme, in spinocerebellar ataxia with axonal neuropathy. *Nat. Genet.* 32(2), 267-272.
- Takemura G.** und Fujiwara H. (2007) Doxorubicin-induced cardiomyopathy from the cardiotoxic mechanisms to management. *Prog. Cardiovasc. Dis.* 49(5), 330-352.
- Tchou J.**, Kasai H., Shibutani S., Chung M. H., Laval J., Grollman A. P. und Nishimura S. (1991) 8-oxoguanine (8-hydroxyguanine) DNA glycosylase and its substrate specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88(11), 4690-4694.
- Tchou J.**, Bodepudi V., Shibutani S., Antoshechkin I., Miller J., Grollman A. P. und Johnson F. (1994) Substrate specificity of Fpg protein. Recognition and cleavage of oxidatively damaged DNA. *J. Biol. Chem.* 269(21), 15318-15324.
- Temple M. D.**, Perrone G. G. und Dawes I. W. (2005) Complex cellular responses to reactive oxygen species. *Trends Cell Biol.* 15(6), 319-326.
- Tice R. R.**, Agurell E., Anderson D., Burlinson B., Hartmann A., Kobayashi H., Miyamae Y., Rojas E., Ryu J. C. und Sasaki Y. F. (2000) Single cell gel/comet assay: guidelines for *in vitro* und *in vivo* genetic toxicology testing. *Environ. Mol. Mutagen.* 35(3), 206-221.
- Tiemann U.**, Tomek W., Schneider F., Müller M., Pöhland R. und Vanselow J. (2009) The mycotoxins alternariol and alternariol methyl ether negatively affect progesterone synthesis in porcine granulosa cells *in vitro*. *Toxicol. Lett.* 186(2), 139-145.
- Tietze F.** (1969) Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. *Anal. Biochem.* 27(3), 502-522.
- Tompkins L. M.** und Wallace A. D. (2007) Mechanisms of cytochrome P450 induction. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 21(4), 176-181.
- Torres A.**, Chulze S., Varsavasky E. und Rodriguez M. (1993) *Alternaria* metabolites in sunflower seeds. *Mycopathologia.* 121, 17-20.
- Touelle M.** und Hübscher U. (2004) Regulation of the DNA replication fork: a way to fight genomic instability. *Chromosoma.* 113(3), 113-125.
- Towbin H.**, Staehelin T. und Gordon J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76, 4350-4354.

Toyoda E., Kagaya S., Cowell I. G., Kurosawa A., Kamoshita K., Nishikawa K., Iizumi S., Koyama H., Austin C. A. und Adachi N. (2008) NK314, a topoisomerase II inhibitor that specifically targets the alpha isoform. *J. Biol. Chem.* 283(35), 23711-23720.

Toyokuni S. und Akatsuka S. (2007) Pathological investigation of oxidative stress in the postgenomic era. *Pathol. Int.* 57, 461-473.

Tsai-Pflugfelder M., Liu L. F., Liu A. A., Tewey K. M., Whang-Peng J., Knutsen T., Huebner K., Croce C. M. und Wang J. C. (1988) Cloning and Sequencing of cDNA Encoding Human DNA Topoisomerase II and Localisation of the Gen to Chromosome Region 17q21-22. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85, 7177-7181.

Tsuchida Y. und Shitara T. (2005) Topotecan and Irinotecan in the Treatment of Pediatric Solid Tumors. *Current Pediatric Reviews* 1, 55-61.

Tsutsui K., Tsutsui K., Sano K., Kikuchi A. und Tokunaga A. (2001) Involvement of DNA topoisomerase IIbeta in neuronal differentiation. *J. Biol. Chem.* 276(8), 5769-5778.

U

Ublacker G. A., Johnson J. A., Siegel F. L. und Mulcahy R. T. (1991) Influence of glutathione S-transferases on cellular glutathione determination by flow cytometry using monochlorobimane. *Cancer Res.* 51(7), 1783-1788.

Uemura T., Ohkura H., Adachi Y., Morino K., Shiozaki K. und Yanagida M. (1987) DNA topoisomerase II is required for condensation and separation of mitotic chromosomes in *S. pombe*. *Cell.* 150(6), 917-925.

Umemura K., Yanase K., Suzuki M., Okutani K., Yamori T. und Andoh T. (2003) Inhibition of DNA topoisomerases I and II, and growth inhibition of human cancer cell lines by a marine microalgal polysaccharide. *Biochem. Pharmacol.* 66(3), 481-487.

V

Van Dyck E., Stasiak A. Z., Stasiak A. und West S. C. (2001) Visualization of recombination intermediates produced by RAD52-mediated single-strand annealing. *EMBO Rep.* 2(10), 905-909.

Van Hoffen A., Balajee A. S., van Zeeland A. A. und Mullenders L. H. F. (2003) Nucleotide excision repair and its interplay with transcription. *Toxicology.* 193(1-2), 79-90.

Van Maanen J. M. S., de Vries J., Pappie D., van den Akker E., Lafleur M. V. M., Retèl J., van der Greef und Pinedo H. M. (1987) Cytochrome P-450-mediated O-demethylation: a route in the metabolic activation of etoposide (VP-16-213). *Cancer Res.* 47(17), 4658-4662.

Vance J. R. und Wilson T. E. (2001) Repair of DNA strand breaks by the overlapping functions of lesion-specific and non-lesion-specific DNA 3' phosphatases. *Mol. Cell Biol.* 21(21), 7191-7198.

Vélez-Cruz R., Riggins J. N., Daniels J. S., Cai H., Guengerich F. P., Marnett L. J. und Osheroff N. (2005) Exocyclic DNA lesions stimulate DNA cleavage mediated by human topoisomerase II alpha *in vitro* and in cultured cells. *Biochemistry.* 44(10), 3972-3981.

Vieira R., Veloso J., Afonso A. und Rodrigues A. (2006) Cutaneous alternariosis in a liver transplant recipient. *Rev. Iberoam. Micol.* 23(2), 107-109.

W

Waga S., Hannon G. J., Beach D. und Stillman B. (1994) The p21 inhibitor of cyclin-dependent kinases controls DNA replication by interaction with PCNA. *Nature.* 369(6481), 574-578.

Walker J. R., Corpina R. A. und Goldberg J. (2001) Structure of the Ku heterodimer bound to DNA and its implications for double-strand break repair. *Nature.* 412(6847), 607-614.

Walker J. V. und Nitiss J. L. (2002) DNA topoisomerase II as a target for cancer chemotherapy. *Cancer Invest.* 20(4), 570-589.

Wallace S. S. (1998) Enzymatic processing of radiation-induced free radical damage in DNA. *Radiat. Res.* 150(5 Suppl), 60-79.

Wang G., Gong Y., Burczynski F. J. und Hasinoff B. (2008) Cell lysis with dimethyl sulphoxide produces stable homogeneous solutions in the dichlorofluorescein oxidative stress assay. *Free Radic. Res.* 42(5), 435-441.

Wang H. und Joseph J. A. (1999) Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. *Free Radic. Biol. Med.* 27(5-6), 612-616.

Wang H., Mao Y., Chen A. Y., Zhou N., LaVoie E. J. und Liu L. F. (2001) Stimulation of topoisomerase II-mediated DNA damage via a mechanism involving protein thiolation. *Biochemistry.* 40(11), 3316-3323.

Wang J. C. (1987) DNA topoisomerases: from a laboratory curiosity to a subject in cancer chemotherapy. *NCI Monogr.* 4, 3-6.

Wang J. C. (1996) DNA topoisomerases. *Annu. Rev. Biochem.* 65, 635-692.

- Wang J. C. (2002)** Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3(6), 430-440.
- Wang J. S.** und Groopman J. D. (1999) DNA damage by mycotoxins. *Mutat. Res.* 424(1-2), 167-181.
- Wang X. J.,** Sun Z., Villeneuve N. F., Zhang S., Zhao F., Li Y., Chen W., Yi X., Zheng W., Wondrak G. T., Wong P. K. und Zhang D. D. (2008) Nrf2 enhances resistance of cancer cells to chemotherapeutic drugs, the dark side of Nrf2. *Carcinogenesis.* 29(6), 1235-1243.
- Wang Y. (2007)** Bulky DNA lesions induced by reactive oxygen species. *Chem. Res. Toxicol.* 21(2), 276-281.
- Wang Y. H.,** Takanashi M., Tsuji K., Tanaka N., Shiseki M., Mori N. und Motoji T. (2009) Level of DNA topoisomerase IIalpha mRNA predicts the treatment response of relapsed acute leukemic patients. *Leuk. Res.* 33(7), 902-907.
- Wardman P.,** Burkitt M. J., Patel K. B., Lawrence A., Jones C. M., Everett S. A. und Vojnovic B. (2002) Pitfalls in the Use of Common Luminescent Probes for Oxidative and Nitrosative Stress. *J. Fluoresc.* 12(1), 65-68.
- Whitlock J. P. (1999)** Induction of cytochrome P4501A1. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 39, 103-125.
- Whitmore G. F.,** Varghese A. J. und Gulyas S. (1989) Cell cycle responses of two X-ray sensitive mutants defective in DNA repair. *Int. J. Radiat. Biol.* 56(5), 657-665.
- Wiechelman K. J.,** Braun R. D. und Fitzpatrick J. D. (1988) Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: identification of the groups responsible for color formation. *Anal. Biochem.* 175(1), 231-237.
- Williams A. O.,** Isaacs R. J. und Stowell K. M. (2007) Down-regulation of human topoisomerase IIalpha expression correlates with relative amounts of specificity factors Sp1 and Sp3 bound at proximal and distal promoter regions. *BMC Mol. Biol.* 8, 36.
- Willmore E.,** Frank A. J., Padget K., Tilby M. J. und Austin C. A. (1998) Etoposide targets topoisomerase IIalpha and IIbeta in leukemic cells: isoform-specific cleavable complexes visualized and quantified in situ by a novel immunofluorescence technique. *Mol. Pharmacol.* 54(1), 78-85.
- Wilstermann A. M.** und Osheroff N. (2003) Stabilization of eukaryotic topoisomerase II- DNA cleavage complexes. *Curr. Top. Med. Chem.* 3(3), 321-338.
- Woessner R. D.,** Mattern M. R., Mirabelli C. K., Johnson R. K. und Drake F. H. (1991) Proliferation- and cell cycle-dependent differences in expression of the 170 kilodalton and 180 kilodalton forms of topoisomerase II in NIH-3T3 cells. *Cell Growth Differ.* 2(4), 209-214.

- Wojewódzka M.**, Buraczewska I. und Kruszewski M. (2002) A modified neutral comet assay: elimination of lysis at high temperature and validation of the assay with anti-single-stranded DNA antibody. *Mutat Res.* 2518(1), 9-20.
- Wollenhaupt K.**, Schneider F. und Tiemann U. (2008) Influence of alternariol (AOH) on regulator proteins of cap-dependent translation in porcine endometrial cells. *Toxicol. Lett.* 182(1-3), 57-62.
- Woo M. H.**, Losasso C., Guo H., Pattarello L., Benedetti P. und Bjornsti M. A. (2003) Locking the DNA topoisomerase I protein clamp inhibits DNA rotation and induces cell lethality. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100(24), 13767-13772.
- Wood R. D.** (1997) Nucleotide excision repair in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* 272(38), 23465-23468.
- Woynarowski J. M.**, Sigmund R. D. und Beerman T. A. (1989) DNA minor groove binding agents interfere with topoisomerase II mediated lesions induced by epipodophyllotoxin derivative VM-26 and acridine derivative m-AMSA in nuclei from L1210 cells. *Biochemistry.* 28(9), 3850-3855.
- Wu J.** und Liu L. F. (1997) Processing of topoisomerase I cleavable complexes into DNA damage by transcription. *Nucleic Acids Res.* 25(21), 4181-4186.
- Wu X.**, Liang H., O'Hara K. A., Yalowich J. C. und Hasinoff B. B. (2008) Thiol-modulated mechanisms of the cytotoxicity of thimerosal and inhibition of DNA topoisomerase II alpha. *Chem. Res. Toxicol.* 21(2), 483-493.

X

- Xiong Y.**, Zhang H. und Beach D. (1992) D type cyclins associate with multiple protein kinases and the DNA replication and repair factor PCNA. *Cell.* 71(3), 505-514.

Y

- Yamashita Y.**, Kawada S. Z., Jujii N. und Nakano H. (1991) Induction of mammalian DNA topoisomerase I and II mediated DNA cleavage by saintopin, a new antitumor agent from fungus. *Biochemistry.* 30(24), 5838-3845.
- Yamauchi T.**, Raffin T. A., Yang P. und Sikic B. I. (1987) Differential protective effects of varying degrees of hypoxia on the cytotoxicities of etoposide and bleomycin. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 119(4), 282-286.
- Yang S. W.**, Burgin A. B., Huizenga B. N., Robertson C. A., Yao K. C. und Nash H. A. (1996) A eukaryotic enzyme that can disjoin dead-end covalent complexes between DNA and type I topoisomerases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93(21), 11534-11539.

Yang X., Li W., Prescott E. D., Burden S. J. und Wang (2000) DNA topoisomerase IIbeta and neural development. *Science*. 287(5450), 131-134.

Yee K. S. und Vousden K. H. (2005) Complicating the complexity of p53. *Carcinogenesis*. 26(8), 1317-1322.

Yekeler H., Bitmis K., Ozcelik N., Doymaz M. Z. und Calta M. (2001) Analysis of toxic effects of *Alternaria* toxins on esophagus of mice by light and electron microscopy. *Toxicol. Pathol.* 29(4), 492-497.

Yu R., Tan T. H. und Kong A. N. T. (1997) Butylated Hydroxyanisole and its Metabolite tert-Butylhydroquinone Differentially Regulate Mitogen-activated Protein Kinases. *J. Biol. Chem.* 272(46), 28962-28970.

Yuan L. und Kaplowitz N. (2009) Glutathione in liver diseases and hepatotoxicity. *Mol. Aspects Med.* 30(1-2), 29-41.

Z

Zaman G. J. R., Flens M. J., Van Leusden M. R., De Haas M., Mulder H. S., Lankelma J., Pinedo H. M., Scheper R. J., Baas F., Broxterman H. J. und Borst P. (1994) The human multidrug resistance-associated protein MRP is a plasma membrane drug-efflux pump. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91(19), 8822-8826.

Zanger U. M., Turpeinen M., Klein K. und Schwab M. (2008) Functional pharmacogenetics/genomics of human cytochromes P450 involved in drug biotransformation. *Anal. Bioanal. Chem.* 392(6), 1093-1108.

Zechiedrich E. L. und Osheroff N. (1990) Eukaryotic topoisomerases recognize nucleic acid topology by preferentially interacting with DNA crossovers. *EMBO J.* 9(13), 4555-4562.

Zhang A., Lyu Y. L., Lin C. P., Zhou N., Azarova A. M., Wood L. M. und Liu L. F. (2006) A protease pathway for the repair of topoisomerase II-DNA covalent complexes. *J. Biol. Chem.* 281(47), 35997-36003.

Zhang H., Wang J. C. und Liu L. F. (1988) Involvement of DNA topoisomerase I in transcription of human ribosomal RNA genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85(4), 1060-1064.

Zhang N., Lu X. und Legerski R. J. (2003) Partial reconstitution of human interstrand cross-link repair *in vitro*: characterization of the roles of RPA and PCNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 309(1), 71-78.

Zhao X. und Blobel G. (2005) A SUMO ligase is part of a nuclear multiprotein complex that affects DNA repair and chromosomal organization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102(13), 4777-4782.

- Zhen Y. Z.**, Xu Y. M., Liu G. T., Miao J., Xing Y. D., Zheng Q. L., Ma Y. F., Su T., Wang X. L. und Ruan L. R. (1991) Mutagenicity of *Alternaria alternata* and *Penicillium cyclopium* isolated from grains in an area of high incidence of oesophageal cancer-Linxian, China. *IARC Sci. Publ.* 105, 253-257.
- Zhou Q.**, Zhang L., Zuniga M. A., Tombes R. M. und Stewart J. K. (2008) Mixed inhibition of P450 3A4 as a chemoprotective mechanism against aflatoxin B1-induced cytotoxicity with cis-terpenones. *Chem. Res. Toxicol.* 3, 732-738.
- Zhou W. L.**, Zhang Y. S., Wang Y., Zhuo X. L., Zhu B., Cai L. und Chen Z. T. (2009) Association studies of CYP1A1 and GSTM1 polymorphisms with esophageal cancer risk: evidence-based meta-analyses. *Arch. Med. Res.* 40(3), 169-179.
- Zwelling L. A.**, Estey E., Silberman L., Doyle S. und Hittelman W. (1987) Effect of cell proliferation and chromatin conformation on intercalator-induced, protein-associated DNA cleavage in human brain tumor cells and human fibroblasts. *Cancer Res.* 47(1), 251-257.
- Zwelling L. A.**, Mayes J., Hinds M., Chan D., Altschuler E., Carrol B., Parker E., Deisseroth K., Radcliffe A., Seligman M., Li L. und Farquhar D. (1991) Cross-resistance of an amsacrine-resistant human leukemia line to topoisomerase II reactive DNA intercalating agents. Evidence for two topoisomerase II directed drug actions. *Biochemistry.* 30(16), 4048-4055.

Verwendete Internetadresse:

www.mycology.adelaide.edu

8. Anhang

8.1. Formeln

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

y-Achsenabschnitt (A):

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

Steigung (B):

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

Nenner (N):

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

Fehler der Steigung (m_B):

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

Fehler des y-Achsenabschnittes (m_A):

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

Fehlerquadratsumme (S):

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

IC₅₀-Wert:

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

Fehler des IC₅₀-Wertes (m_{IC50}):

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

Arithmetischer Mittelwert (\bar{x}):

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

Standardabweichung (σ_{n-1}):

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

Ausreißertest nach Nalimov (r):

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

8.2. Publikationsliste

Veröffentlichungen:

Fehr M., Pahlke G., Fritz J., Christensen M. O., Boege F., Altemöller M., Podlech J. und Marko D. (2009) Alternariol acts as a topoisomerase poison, preferentially affecting the IIalpha isoform. *Molecular Nutrition and Food Research* 53, 441-451.

Fehr M., Pahlke G., Baechler S., Kropat C., Esselen M., Marko D. TDP1 modulates the DNA damaging properties of the topoisomerase poison alternariol (eingereicht).

Kropat C., **Fehr M.**, Pahlke G., Marko D. Repair of alternariol induced DNA damage is dependent on a variety of pathways (in Bearbeitung).

Fehr M., Baechler S., Burkart J., Kropat C., Pahlke G., Marko D. Induction of oxidative stress by *Alternaria* toxins (in Bearbeitung).

Baechler S., **Fehr M.**, Habermeyer M., Hofman A., Merz K. H., Eisenbrand G. und Marko D. Synthesis, topoisomerase-targeting activity and growth inhibition of novel lycobetaine analogues (in Bearbeitung).

Fehr M., Burkart J., Baechler S., Pahlke G., Marko D. Toxicity of alternariol and alternariol monomethyl ether in human tumor cells of different origin (in Bearbeitung).

Roth M., Maser E., Fromm M., Kammerer D., **Fehr M.**, Carle R., Marko D. Protective properties of apple extracts against menadione-induced oxidative stress and genotoxicity in human colon carcinoma cells (in Bearbeitung).

Tagungsbeiträge:

Fehr M., Pahlke G., Fritz J., Marko D. Alternariol acts as a topoisomerase poison. 29. Mycotoxin Workshop, Posterbeitrag, 14.-16. Mai 2007, Fellbach.

Fehr M., Pahlke G., Fritz J., Marko D. Mechanism of the genotoxic effect of *Alternaria* toxins. Baden Württemberger Toxikologen Treffen (BW-ToxNet), Vortrag, 10. Juli 2007, Karlsruhe.

Fehr M., Pahlke G., Fritz J., Marko D. Alternariol wirkt als Topoisomerasegift. 36. Deutscher Lebensmittelchemikertag, Posterbeitrag, 10.-12. September 2007, Nürnberg-Erlangen.

Marko D., Pahlke G., **Fehr M.** Alternariol acts as a topoisomerase poison. 44. Kongress der Europäischen Gesellschaft der Toxikologie, Posterbeitrag, 07.-10. Oktober 2007, Amsterdam, Niederlande.
Veröffentlicht in *Toxicol. Lett.* 172(1), 50.

Fehr M., Pahlke G., Fritz J., Marko D. Alternariol acts as a topoisomerase poison. Schwerpunkt Lebensmittel und Gesundheit, Posterbeitrag, 15.-16. Oktober 2007, Karlsruhe.

Fehr M., Pahlke G., Fritz J., Marko D. Genotoxic properties of *Alternaria* toxins. Schwerpunkt Lebensmittel und Gesundheit, Posterbeitrag, 15.-16. Oktober 2007, Karlsruhe.

Schwarz C., Pahlke G., **Fehr M.**, Marko D. Analysis of the mycotoxin profile of different *Alternaria* spp. Schwerpunkt Lebensmittel und Gesundheit, Posterbeitrag, 15.-16. Oktober 2007, Karlsruhe.

Pahlke G., **Fehr M.**, Marko D. Impact of Alternariol on DNA-Integrity. Schwerpunkt Lebensmittel und Gesundheit, Posterbeitrag, 15.-16. Oktober 2007, Karlsruhe.

Fehr M., Pahlke G., Fritz J., Christensen M. O., Boege F., Altemöller M., Podlech J., Marko D. The mycotoxin alternariol acts as a topoisomerase poison, preferentially affecting the II α isoform. 49. Jahrestagung DGPT, Posterbeitrag, 11.-13. März 2008, Mainz.

Veröffentlicht in *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. 377(1), 79.

Fehr M., Boettler U., Volz N., Kropat C., Pahlke G., Esselen M., Marko D. Induction of oxidative stress by *Alternaria* toxins. 30. Mycotoxin Workshop, Posterbeitrag, 28.-30. April 2008, Utrecht, Niederlande.

Schwarz C., **Fehr M.**, Pahlke G. und Marko D. DNA damaging properties of complex *Alternaria alternata* extracts in HT29 cells. Baden Württemberger Toxikologen Treffen (BW-ToxNet), Posterbeitrag, 23. Juli 2008, Tübingen.

Fehr M., Bächler S., Pahlke G., Marko D. Alternariol wirkt nicht nur im zellfreien System sondern auch in intakten Zellen als Topoisomerasegift. 37. Deutscher Lebensmittelchemikertag, Posterbeitrag, 08.-10. September 2008, Kaiserslautern.

Boettler U., **Fehr M.**, Pahlke G., Volz N., Kropat C., Marko D. Induktion von oxidativem Stress durch das Mykotoxin Alternariol. 37. Deutscher Lebensmittelchemikertag, Posterbeitrag, 08.-10. September 2008, Kaiserslautern.

Kropat C., **Fehr M.**, Pahlke G., Marko D. Bedeutung der Tyrosyl-DNA-Phosphodiesterase 1 für die DNA-schädigende Wirkung des Mykotoxins Alternariol. 37. Deutscher Lebensmittelchemikertag, Posterbeitrag, 08.-10. September 2008, Kaiserslautern.

Pahlke G., Kropat C., **Fehr M.**, Marko D. Untersuchungen zur Rolle von Ku70 und PCNA für die Reparatur Alternariol-vermittelter DNA-Schäden mittels siRNA. 37. Deutscher Lebensmittelchemikertag, Posterbeitrag, 08.-10. September 2008, Kaiserslautern.

Schwarz C., **Fehr M.**, Pahlke G., Marko D. Induktion von DNA-Strangbrüchen durch komplexe *Alternaria alternata* Extrakte in humanen Kolonkarzinomzellen. 37. Deutscher Lebensmittelchemikertag, Posterbeitrag, 08.-10. September 2008, Kaiserslautern.

Fehr M., Pahlke G., Grigo N. Impact of oxidative stress on alternariol- and alternariol monomethyl ether-induced genotoxicity. Kompetenzbereichstreffen des Kompetenzbereichs "Applied Life Sciences", Posterbeitrag, 10. Oktober 2008, Karlsruhe.

Fehr M., Burkart J., Baechler S., Pahlke G., Marko D. Induction of oxidative stress by *Alternaria* toxins. 50. Jahrestagung DGPT, Posterbeitrag, 10.-12. März 2009, Mainz.

Veröffentlicht in *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. 379(1), 84-85.

Schwarz C., **Fehr M.**, Pahlke G., Marko D. DNA damaging properties of complex *Alternaria alternata* extracts in HT29 cells. 50. Jahrestagung DGPT, Posterbeitrag, 10.-12. März 2009, Mainz.

Veröffentlicht in *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. 379(1), 89-90.

Burkart J., **Fehr M.**, Pahlke G., Marko D. Comparative study on the toxicity of alternariol and alternariol monomethyl ether in human tumour cells of different origin. 6. Symposium der DFG-Senatskommission für Lebensmittelsicherheit SKLM, Posterbeitrag, 30. März-01. April 2009, Kaiserslautern.

Fehr M., Burkart J., Pahlke G., Marko D. Impact of oxidative stress on alternariol- and alternariol monomethyl ether-induced toxicity in human tumour cells of different origin. 31. Mycotoxin Workshop, Posterbeitrag, 15.-17. Juni 2009, Münster.

Baechler S., **Fehr M.**, Pahlke G., Marko D. Impact of alternariol and alternariol monomethyl ether on Nrf2 translocation in human tumour cells. 31. Mycotoxin Workshop, Posterbeitrag, 15.-17. Juni 2009, Münster.

Schwarz C., **Fehr M.**, Kreutzer M., Pahlke G., Marko D. DNA damaging properties of complex *Alternaria alternata* extracts in HT29 cells. 31. Mycotoxin Workshop, Posterbeitrag, 15.-17. Juni 2009, Münster.

Marko D., Baechler S., Pahlke G., **Fehr M.** Tdp1 modulates the DNA damaging properties of the topoisomerase poison Alternariol. 31. Mycotoxin Workshop, Posterbeitrag, 15.-17. Juni 2009, Münster.

Fehr M., Budde J., Burkart J., Schreck I., Pahlke G., Grigo N. Impact of oxidative stress on alternariol- and alternariol monomethyl ether-induced genotoxicity. Kompetenzbereichstreffen des Kompetenzbereichs "Applied Life Sciences", Posterbeitrag, 28. Juli 2009, Karlsruhe.

Schwarz C., **Fehr M.**, Kreutzer M., Pahlke G., Marko D. DNA-schädigende Wirkung komplexer *Alternaria alternata*-Extrakte in HT29-Zellen. 38. Deutscher Lebensmittelchemikertag, Posterbeitrag, 14.-16. September 2009, Berlin.

Bächler S., **Fehr M.**, Burkart J., Marko D. Toxisches Potential der Mykotoxine Alternariol und Alternariolmonomethylether in humanen Karzinomzellen. 38. Deutscher Lebensmittelchemikertag, Posterbeitrag, 14.-16. September 2009, Berlin.

Baechler S., **Fehr M.**, Boettler U., Marko D. Impact of oxidative stress on alternariol- and alternariol monomethyl ether- induced toxicity in human colon carcinoma cells. 6. Wissenschaftliches Symposium der Österreichischen Gesellschaft für Toxikologie, Posterbeitrag, 22.-23. Februar 2010, Wien, Österreich.

Preise:

Fehr M., Pahlke G., Fritz J., Marko D. Alternariol wirkt als Topoisomerasegift. Posterpreis beim 36. Deutschen Lebensmittelchemikertag, 10.-12. September 2007, Nürnberg-Erlangen.

Fehr M., Boettler U., Volz N., Kropat C., Pahlke G., Esselen M., Marko D. Induction of oxidative stress by *Alternaria* toxins. Posterpreis beim 30. Mycotoxin Workshop, 28.-30. April 2008, Utrecht, Niederlande.

Sonstiges:

Fortbildung zum Fachtoxikologen in der Gesellschaft für Toxikologie in der DGPT:

Fremdstoffmetabolismus / Toxikokinetik, 27.-31. August 2007, Zürich, Schweiz.

Grundlagen der Ökotoxikologie, 25.-28. September 2007, Frankfurt am Main.

Versuchstierkunde I / Biostatistik, 13.-17. Oktober 2008, Erfurt.

Molekulare Zelltoxikologie, 02.-06. Februar 2009, München.

Lebensmitteltoxikologie, 05.-08. Oktober 2009, Kaiserslautern.

Projektkoordinator im Rahmen des Zukunftskonzeptes der Exzellenzinitiative an der Universität Karlsruhe (TH) im Kompetenzbereich „Applied Life Sciences“ mit dem Projekttitel: „Impact of oxidative stress on alternariol- and alternariol monomethyl ether-induced genotoxicity“

8.3. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Markus Fehr
Wohnort: Kriegstrasse 4
76287 Rheinstetten-Mörsch
Geburtsdatum: 19.02.1978
Geburtsort: Schwäbisch Gmünd
Staatsangehörigkeit: deutsch

Ausbildung und wissenschaftlicher Werdegang

Schulen: 1984-1988 Klösterleschule (Grundschule) in Schwäbisch Gmünd
1988-1992 Parler Gymnasium in Schwäbisch Gmünd
1992-1995 Schiller-Realschule in Schwäbisch Gmünd
1995-1998 Agnes-von-Hohenstaufen-Schule in Schwäbisch Gmünd

Zivildienstleistender bei Malteser Hilfsdienst in Schwäbisch Gmünd (1998-1999)

Studium: 2000-2003 Fakultät Chemie und Biowissenschaften der Universität
Karlsruhe (TH); (Vordiplom 04/2003)
2003-2006 Institut für Angewandte Biowissenschaften, Abteilung
Lebensmittelchemie der Universität Karlsruhe (TH)
(Abschluss als Diplom Lebensmittelchemiker (sehr gut))
2006-2009 Promotionsstudium am Institut für Angewandte
Biowissenschaften, Abteilung Lebensmitteltoxikologie der
Universität Karlsruhe (TH)