

**Untersuchungen zum Einfluss von
Glucosinolat-Hydrolyseprodukten auf die Genexpression in
HCT 116-Zellen mittels *high-throughput* RT-qPCR**

Zur Erlangung des akademischen Grades eines

DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. nat.)

Fakultät für Chemie und Biowissenschaften

Karlsruher Institut für Technologie (KIT) - Universitätsbereich

genehmigte

DISSERTATION

von

Diplom-Lebensmittelchemiker

Daniel Neumann

aus

Ilmenau

Dekan: Prof. Dr. Peter Roesky

Referent: Prof. Dr. Andrea Hartwig

Korreferent: Prof. Dr. Mirko Bunzel

Tag der mündlichen Prüfung: 24.10.2014

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung.....	1
2. Einleitung.....	3
2.1 Glucosinolate.....	3
2.1.1 Glucosinolat-Spektrum in Brokkoli (<i>Brassica oleracea</i> var. <i>italica</i> Plenck)	4
2.1.2 Resorption, Distribution, Metabolismus und Exkretion von indolischen Glucosinolaten.....	5
2.1.3 Antikanzero gene Wirkung von indolischen Glucosinolaten.....	7
2.1.4 Toxikologische Betrachtung von indolischen Glucosinolaten	9
2.2 Genexpression und ihre Regulation	10
2.2.1 Transkriptionelle Regulation	12
2.2.1.1 Transkriptionsfaktoren	12
2.2.2 Posttranskriptionelle Regulation.....	13
2.2.2.1 Prozessierung der prä-mRNA	13
2.2.2.2 mRNA-Stabilität und -Abbau	13
2.2.3 Translationsregulation und posttranslationelle Regulation.....	14
2.3 Polymerasekettenreaktion	15
2.3.1 Prinzip.....	15
2.3.2 Real-Time PCR	16
2.3.3 Relative Quantifizierung.....	18
2.3.4 Normalisierung mittels Referenzgen.....	19
2.4 Das BioMark high-throughput RT-qPCR-System.....	21
3. Fragestellung.....	23
4. Ergebnisse und Diskussion.....	25
4.1 Etablierung der high-throughput RT-qPCR-Methode.....	25
4.1.1 Auswahl des Gensets	25
4.1.2 Bestimmung der RNA-Integrität.....	27
4.2 Zytotoxizität.....	29
4.2.1 Einfluss von Indol-3-Carbinol und 3,3'-Diindolylmethan auf die Viabilität von HCT 116-Zellen	29
4.3 Beeinflussung der Genexpression	31
4.3.1 Konzentrationsabhängiger Einfluss von Indol-3-Carbinol	32
4.3.1.1 Einfluss auf Gene, die mit der zellulären Redox-Regulation assoziiert sind.....	32
4.3.1.2 Einfluss auf Gene, die mit Fremdstoffmetabolismus assoziiert sind.....	33
4.3.1.3 Einfluss auf Gene, die mit dem Zellzyklus assoziiert sind	34
4.3.2 Zeitabhängiger Einfluss von Glucosinolat-Hydrolyseprodukten	36
4.3.2.1 Einfluss auf Gene, die mit der zellulären Redox-Regulation assoziiert sind.....	36
4.3.2.2 Einfluss auf Gene, die mit Fremdstoffmetabolismus assoziiert sind.....	41
4.3.2.3 Einfluss auf Gene, die mit dem Zellzyklus assoziiert sind.....	45
4.3.2.4 Einfluss auf Gene, die für Transkriptionsfaktoren kodieren.....	47
4.3.2.5 Einfluss auf Gene, die mit der DNA-Reparatur assoziiert sind	50
4.4 Beeinflussung von Enzymaktivitäten	54
4.4.1 Einfluss von Indol-3-Carbinol auf die Cytochrom-P450-Aktivität.....	55

4.4.2	Einfluss von Glucosinolat-Hydrolyseprodukten auf die Thioredoxinreduktase-Aktivität	56
4.5	Beeinflussung der Proteinexpression	58
4.5.1	Einfluss von Glucosinolat-Hydrolyseprodukten auf den Proteingehalt ausgewählter Proteine	59
4.6	Beeinflussung der Zellzyklusregulation	62
4.6.1	Einfluss von Glucosinolat-Hydrolyseprodukten auf die Zellzyklusverteilung.....	62
5.	Zusammenfassende Diskussion.....	66
6.	Material und Methoden	72
6.1	Zellkultur.....	72
6.1.1	Zelllinie und Kultivierungsbedingungen	72
6.1.2	Inkubation der Zellen	72
6.1.3	Koloniebildungsfähigkeit.....	73
6.2	Genexpressionsuntersuchungen	73
6.3	Enzymaktivitäten	79
6.3.1	Bestimmung der EROD-Aktivität.....	79
6.3.2	Bestimmung der Thioredoxinreduktase-Aktivität.....	80
6.4	Zellzyklusuntersuchungen	82
6.5	Immunologischer Nachweis zellulärer Proteine	83
6.6	Hydrolyse des Gesamtglucosinolat-Extrakts aus Brokkoli	85
7.	Literaturverzeichnis	86
8.	Anhang.....	94
8.1	Abkürzungsverzeichnis	94
8.2	Verwendete Chemikalien	96
8.3	Verwendete Antikörper.....	98
8.4	Lösungen und Puffer.....	99
8.5	Verbrauchsmaterialien	102
8.6	Verwendete Geräte	103
8.7	Ergänzende Daten	105
8.7.1	Gesamtglucosinolat-Extrakt aus Brokkoli.....	105
8.7.1.1	Zytotoxizität des Myrosinase-hydrolysierten Gesamtglucosinolat-Extrakts aus Brokkoli....	105
8.7.1.2	Glucosinolatprofil	105
8.7.2	Genexpression.....	106
8.7.2.1	Untersuchte Gene	106
8.7.2.2	Parameter für das Primer-Design	113
8.7.2.3	Primersequenzen.....	114
8.7.2.4	Primer-Etablierung	118
8.7.2.5	Weitere Genexpressionsprofile.....	118
8.7.3	Zellzyklusuntersuchungen	123
8.7.3.1	Gating-Prozedur	123
8.7.4	Bestimmung der EROD-Aktivität.....	124
8.7.4.1	HPLC-Analyse.....	124
8.7.4.2	Externe Kalibrierung.....	125

9. Publikationsliste	126
10. Danksagung.....	129

1. Zusammenfassung

Vor allem den in Brokkoli enthaltenen Glucosinolaten werden auf Grund von epidemiologischen Studien antikanzerogene Eigenschaften zugesprochen. In diesem Kontext werden die Induktion von Fremdstoff-metabolisierenden Phase-II-Enzymen durch Aktivierung des Keap1-Nrf2-Signalwegs und die Apoptoseinduktion als mögliche protektive Mechanismen angesehen. Da zum Teil jedoch sehr hohe Verzehrsmengen von glucosinolatreichem Gemüse erforderlich sind, um eine gesundheitsfördernde Wirkungen zu erzielen, sind zunehmend Nahrungsergänzungsmittel und funktionelle Lebensmittel auf Basis von Brokkoli-Extrakten und synthetisierten Verbindungen wie Sulforaphan und Indol-3-Carbinol verfügbar. In den meisten Fällen mangelt es jedoch an validen Studien, um eine Risikobewertung und toxikologische Beurteilung vornehmen zu können, so dass bei Einnahme von hochdosierten Präparaten unter Umständen mit adversen Effekten zu rechnen ist.

Ein wichtiger Beitrag zur Klärung dieses Sachverhaltes wurde mit der vorliegenden Arbeit geleistet. Im Rahmen der Untersuchungen ging es zunächst darum, eine Hochdurchsatz-Genexpressionsmethode zu etablieren, mit der die Aufnahme von zeit- und konzentrationsabhängigen Genexpressionsprofilen ermöglicht wurde. Dabei wurde die These verfolgt, dass Verbindungen mit unterschiedlichen molekularen Wirkmechanismen auch ein individuelles Genexpressionsmuster in behandelten Zellen induzieren. Zu Beginn der Arbeiten musste zunächst die Auswahl eines geeigneten Analysesystems und eines individuellen Gensets erfolgen. Im weiteren Verlauf wurden empirische Daten generiert und eine passende Analysensoftware ausgewählt. Nach einer ausreichenden Testphase und eingehenden Prüfungen wurden Genexpressionsmuster nach Behandlung von humanen Kolonkarzinomzellen mit verschiedenen Glucosinolat-Hydrolyseprodukten aufgenommen.

Neben der in Brokkoli am häufigsten vorkommenden Verbindung Sulforaphan wurde Indol-3-Carbinol für die Genexpressionsuntersuchungen gewählt. Da sich beide Verbindungen sowohl in ihren strukturellen Merkmalen als auch in ihren molekularen Wirkmechanismen unterschieden, wurde davon ausgegangen, dass ein individuelles Expressionsmuster in den Zellen induziert wird. Diese These wurde durch die aufgenommenen Genexpressionsprofile bestätigt. Abgesehen von divergenten Effekten auf die Expression von oxidativen Stressgenen, wurden substanzspezifische Effekte auf die Expression von Genen, die in Verbindung mit dem Fremdstoffmetabolismus stehen, beobachtet. So induzierte Indol-3-Carbinol als einzige Verbindung bereits im niedrigen Konzentrationsbereich signifikant die Transkriptmenge von *CYP1A1*. Zudem wurden auf Grund der genotoxischen Wirkung der Verbindung selektiv DNA-Reparatur- und Zellzyklusarrestgene aktiviert. Die Genexpressionsprofile beider Substanzen zeigten sowohl Hinweise auf einen prooxidativen Mechanismus als auch die Induktion von genotoxischem Stress. Vor allem anhand der signifikanten

Aktivierung von Markergenen wie *HMOX1* und *CDKN1A* konnte die Induktion von reaktiven Sauerstoffspezies und eine mögliche Beeinflussung der genomischen Stabilität abgeleitet werden. Weiterhin war es von wissenschaftlichem Interesse, ob sich einzelne synthetische Verbindungen in ihrer Wirkungsweise von einem isolierten Gesamtglucosinolat-Extrakt aus Brokkoli unterschieden. Resultierend aus dem heterogenen Glucosinolatspektrum und dem Auftreten von synergistischen Effekten einzelner Glucosinolat-Hydrolyseprodukte wurde ein teilweise abweichendes Genexpressionsmuster detektiert. Da im Extrakt das Isothiocyanat Sulforaphan dominierte, waren die Effekte auf Expressionsebene vergleichbar mit der Reinsubstanz.

Die auf Transkriptionsebene erhaltenen Effekte konnten in anschließenden Versuchen auf Proteinebene überwiegend verifiziert werden. So wurde eine deutliche Induktion der Cytochrom-P450-Enzymaktivität nach Behandlung mit Indol-3-Carbinol detektiert. Ebenso führte eine Behandlung mit Ausnahme von Sulforaphan zu einer signifikanten Steigerung der Thioredoxinreduktase-Aktivität. Ferner konnte anhand der Zellzyklusanalysen und der ausgeprägten Arretierung der Zellen in der G₀/G₁-Phase ein Einfluss auf die Zellzyklusverteilung beobachtet werden. Weniger aussagekräftig waren hingegen die Ergebnisse aus den Western Blot-Analysen. Bis auf veränderte Proteinnengen von p21 und NQO1 wurden keine signifikanten Unterschiede festgestellt.

Anhand der hier präsentierten Daten wird deutlich, dass sowohl die Einnahme von synthetischen Verbindungen wie Sulforaphan und Indol-3-Carbinol als auch die Supplementierung mit einem hochdosierten Gesamtglucosinolat-Extrakt aus Brokkoli kritisch zu betrachten ist. So lieferten die Untersuchungen Hinweise darauf, dass mit steigender Konzentration prooxidative und genotoxische Prozesse induziert werden können. Insofern ist die Supplementierung mit Brokkoli-basierten Nahrungsergänzungsmitteln im Hinblick auf die erhaltenen Ergebnisse kritisch zu hinterfragen.

2. Einleitung

2.1 Glucosinolate

In den letzten Jahren sind zunehmend sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe in den Fokus der Forschung gerückt. Von der Pflanze primär zum Schutz vor Fraßfeinden und dem Befall von Pathogenen gebildet, zeigen zahlreiche epidemiologische Studien ernährungsphysiologische Relevanzen auf. Neben Carotinoiden, Flavonoiden und Phytosterinen werden vor allem den nur in *Brassicales* vorkommenden Glucosinolaten protektive Effekte zugeschrieben (zusammengefasst in Miller und Snyder, 2012). So zeigte eine Metaanalyse von 7 Kohorten- und 87 Fall-Kontroll-Studien eine inverse Korrelation zwischen dem *Brassica*-Gemüseverzehr und der Krebsinzidenz in mehreren Zielorganen (zusammengefasst in Verhoeven et al., 1996). Bisher konnten in zahlreichen Pflanzenfamilien 120 verschiedene Glucosinolate identifiziert werden. Zum Verzehr sind jedoch lediglich Gemüsepflanzen aus der Familie *Brassicaceae* wie z.B. Blumenkohl, Senf, Kresse und Brokkoli geeignet. Strukturell handelt es sich dabei um β -Thioglucosid-*N*-Hydroxysulfate mit einer Schwefel-gebundenen β -D-Glucopyranose und einem variablen Rest, der im Sekundärstoffwechsel der Pflanze aus einer von acht Aminosäuren synthetisiert wird (zusammenfasst in Fahey et al., 2001; Halkier und Gershenzon, 2006). Werden die Zellwände durch äußere Einflüsse beschädigt, kommen die Glucosinolate mit Myrosinase, einer β -Thioglucosidase aus speziellen Myrosinzellen, in Kontakt und werden zu bioaktiven Verbindungen wie Isothiocyanaten, Thiocyanaten und Nitrilen hydrolysiert. Das Glucosinolat-Profil kann durch die Anwesenheit von Metallionen, durch zahlreiche Proteine wie das Epithiospecifizier Protein (ESP) oder das Myrosinase-assoziierte Protein (MyAP) sowie durch den pH-Wert gezielt modifiziert werden (zusammengefasst in Kissen et al., 2009; Bones und Rossiter, 2006). In Humanstudien und *in vitro*-Versuchen konnte zudem gezeigt werden, dass die intestinale Mikrobiota ebenso in der Lage ist, Glucosinolate zu hydrolysieren (Cheng et al., 2004; Fuller et al., 2007). Auf molekularer Ebene werden multiple, protektive Mechanismen diskutiert. So werden die Reduktion von oxidativem Stress durch Induktion zellulärer antioxidativer Proteine, die Steigerung detoxifizierender Mechanismen durch Induktion von Phase-II- und Repression von Phase-I-Enzymen und die Unterdrückung der klonalen Expansion von initiierten, transformierten Zellen durch Inhibition der Zellproliferation als chemopräventive Mechanismen angesehen (zusammengefasst in Zhang, 2004).

2.1.1 Glucosinolat-Spektrum in Brokkoli (*Brassica oleracea* var. *italica* Plenck)

Das Glucosinolat-Spektrum in *Brassica*-Arten ist zwar genetisch determiniert, unterliegt jedoch in Abhängigkeit vom Reifegrad und von äußeren Einflüssen großen individuellen Schwankungen. So können physikalische, chemische und biologische Elicitoren und Elicitorkombinationen zu einer spezifischen Induktion des Sekundärmetabolismus und damit zur gesteigerten Glucosinolat-Synthese führen (Schreiner, 2005). Neben diesen äußeren Umweltfaktoren besitzt der Erntezeitpunkt einen entscheidenden Einfluss auf das enthaltene Glucosinolat-Spektrum (Fahey et al., 1997). So kann das Spektrum in adultem Brokkoli im Vergleich zu Brokkoli-Samen und –Keimlingen erheblich variieren. In Brokkoli, botanisch *Brassica oleracea* var. *italica* Plenck, kommt neben dem aliphatischen Glucosinolat Glucoraphanin mit 0,8-21,7 $\mu\text{mol/g}$ TM das Indol-Glucosinolat Glucobrassicin mit 0,1-2,8 $\mu\text{mol/g}$ TM mengenmäßig am häufigsten vor (Kushad et al., 1999). Im Vergleich zu anderen Gemüsepflanzen aus der Familie *Brassicaceae* ist damit der sehr hohe Gehalt an Glucoraphanin besonders charakteristisch für Brokkoli. Teilweise macht Glucoraphanin über 50 % des Gesamtglucosinolat-Gehaltes und mehr als 90 % der aliphatischen Glucosinolate aus. Daneben repräsentiert das Glucosinolat Glucobrassicin ca. 60 % der Indol-Glucosinolate und besitzt einen Anteil von 10% am Gesamtglucosinolat-Gehalt. Bei neutralem pH-Wert entsteht nach enzymatischer Hydrolyse, anders als bei den nicht Indol-enthaltenden Glucosinolaten, aus dem 3-Indolylmethyl-Glucosinolat, Glucobrassicin, nicht das stabile Isothiocyanat, sondern das Zerfallsprodukt Indol-3-Carbinol (Abbildung 1) (Agerbirk et al., 1998). Im sauren Milieu des Magens ist Indol-3-Carbinol besonders anfällig gegenüber Oligomerisierungsreaktionen und es entstehen über 18 verschiedene indolische Verbindungen, von denen unter anderem das Dimer, 3,3'-Diindolylmethan, das dominierende Produkt darstellt, dem weitere physiologische Effekte zugeschrieben werden (zusammengefasst in Higdon et al., 2007).

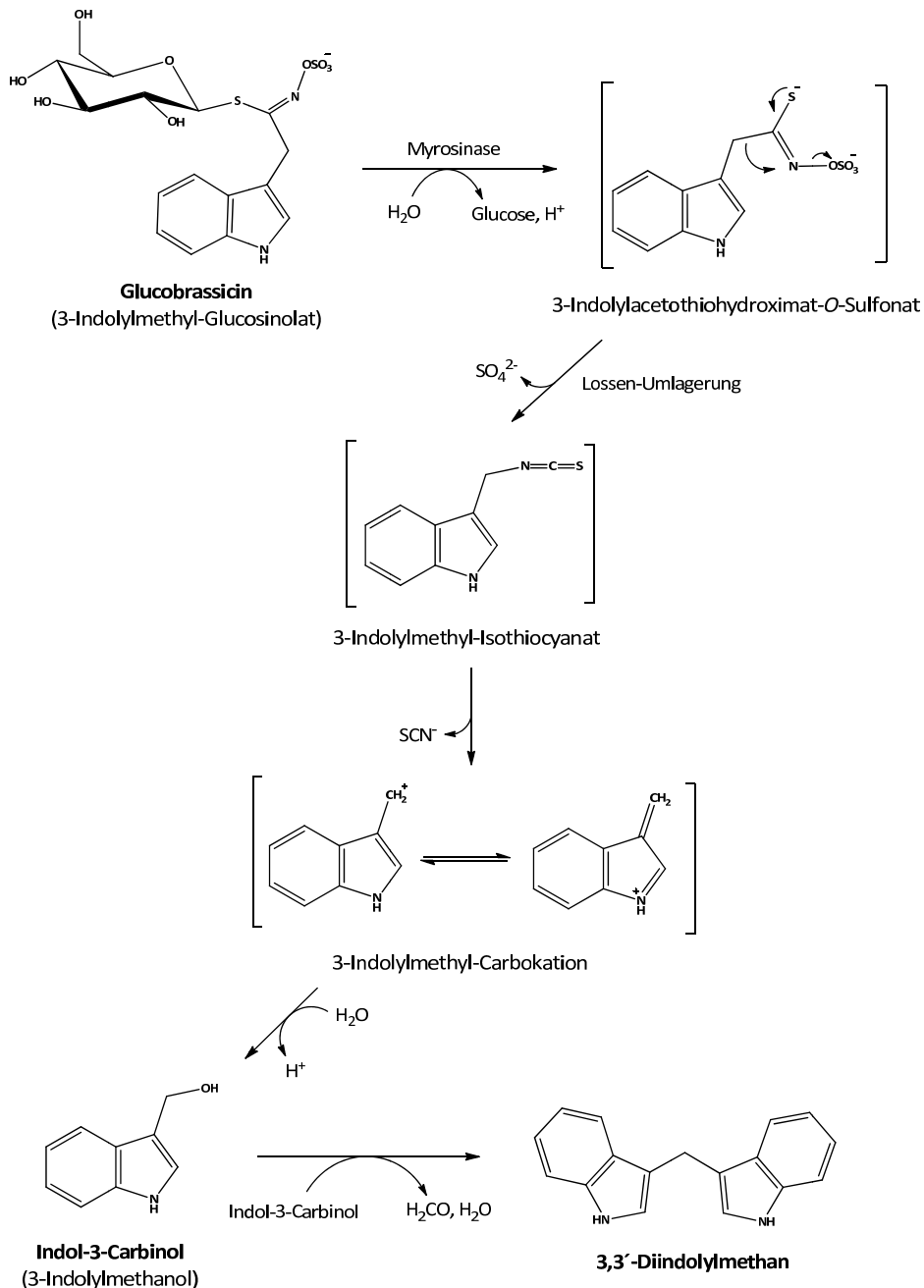


Abbildung 1: Enzymatische Hydrolyse von Glucobrassicin mittels Myrosinase zu Indol-3-Carbinol und anschließende Dimerisierung zu 3,3'-Diindolylmethan im sauren Milieu (modifiziert nach Agerbirk et al., 1998)

2.1.2 Resorption, Distribution, Metabolismus und Exkretion von indolischen Glucosinolaten

Das nach der Hydrolyse von Glucobrassicin entstehende Indol-3-Carbinol besitzt im Gegensatz zu den meisten anderen Glucosinolaten zwar keine Isothiocyanat-Struktur mehr, jedoch bleibt die Reaktivität gegenüber Verbindungen mit Thiol-Gruppen wie Glutathion oder Cysteinseitenketten von Proteinen über eine nicht-enzymatische Konjugation erhalten (Staub et al., 2002). *In vivo*-Studien an Mäusen zeigten, dass Indol-3-Carbinol nach oraler Gabe nur bis zu 1 h nach Verabreichung im Plasma

detektiert werden konnte und ein Großteil der Substanz im Magen bereits zu 3,3'-Diindolylmethan dimerisierte (Anderton et al., 2004b). Zu einem ähnlichen Ergebnis kam eine klinische Phase-I-Studie, in der Probandinnen in einer Einmal- bzw. Mehrfachgabe Indol-3-Carbinol verabreicht wurde. Lediglich innerhalb der ersten Stunde konnte Indol-3-Carbinol im Plasma detektiert werden, während eine maximale Plasmakonzentration für 3,3'-Diindolylmethan in Abhängigkeit von der Dosis in den ersten Stunden messbar war (Reed et al., 2006). Im Gegensatz zu Indol-3-Carbinol und Isothiocyanaten besitzt 3,3'-Diindolylmethan keine Thiol-Reaktivität mehr, wodurch die Resorption und Biotransformation nicht mehr von Konjugationsreaktionen mit reaktiven Thiolen geprägt ist. Nach bisherigem Stand wird davon ausgegangen, dass beide Substanzen über passive Diffusion in den Enterozyten aufgenommen werden. Der anschließende Efflux wird aktiv über Transporter vermittelt, wobei es in Abhängigkeit von der Konzentration zur Sättigung der Transporter kommen kann und die Blutplasmakonzentration infolge dessen ansteigt (Reed et al., 2006). Ferner zeigten *in vitro*- und *in vivo*-Studien, dass Indol-3-Carbinol den Efflux von Xenobiotika über die direkte Interaktion mit dem *multidrug-resistance-protein 1* (MDR1) reduziert und auf diese Weise auch den eigenen Efflux aus der Zelle verringern kann (Christensen und LeBlanc, 1996; Arora et al., 2005). Studien mit 10 µM radioaktiv markiertem Indol-3-Carbinol in der humanen Brustkrebszelllinie MCF-7 zeigten, dass die Substanz mit einer Halbwertszeit von 40 h im Medium relativ inert gegenüber der Metabolisierung war (Staub et al., 2002). Maximal 2,1 % der Ausgangskonzentration wurden über passive Diffusion in die Zelle aufgenommen, wobei Indol-3-Carbinol zu 55 % gebunden an freie Thiol-Gruppen und zu maximal 17 % gebunden an Glutathion vorlag. Simultan stieg die Konzentration von 3,3'-Diindolylmethan zeitabhängig in der nukleären Fraktion um 40 % nach 72 h an. In subzellulären Testsystemen wurde zudem die Metabolisierung durch isolierte Enzyme getestet. Weder Peroxidasen, *N*-Acetyltransferasen noch Glutathion-*S*-Transferasen zeigten eine nennenswerte Affinität zum Substrat Indol-3-Carbinol (Staub et al., 2002).

Untersuchungen mit 1 µM radioaktiv markiertem 3,3'-Diindolylmethan in humanen MCF-7 Zellen zeigten hingegen, dass die Substanz bereits 2 h nach der Behandlung innerhalb der nukleären Membran zu 35-40% akkumulierte und nur 10 % im Zytosol lokalisiert waren. Zu keinem Zeitpunkt der Behandlung war die Konzentration im Medium kleiner als 45% der Ausgangskonzentration (Staub et al., 2006). Nach der Aufnahme ins Darmepithel werden Indol-3-Carbinol und 3,3'-Diindolylmethan über das Plasma im gesamten Organismus verteilt und erreichen so jedes Gewebe und Organ. Vor allem in der Leber kommt es jedoch zur Akkumulation größerer Mengen beider Verbindungen (Anderton et al., 2004a). Die Biotransformation erfolgt hauptsächlich über Cytochrom-P450-Monooxygenasen und führt nach einer Epoxidierung zum 2-Hydroxy-Diindolylmethan, das anschließend über Sulfotransferasen (SULT) mit einem Sulfatrest konjugiert

wird (Abbildung 2). Die Hauptelimination findet überwiegend biliär und nur zu einem geringen Maße renal statt (Stresser et al., 1995).

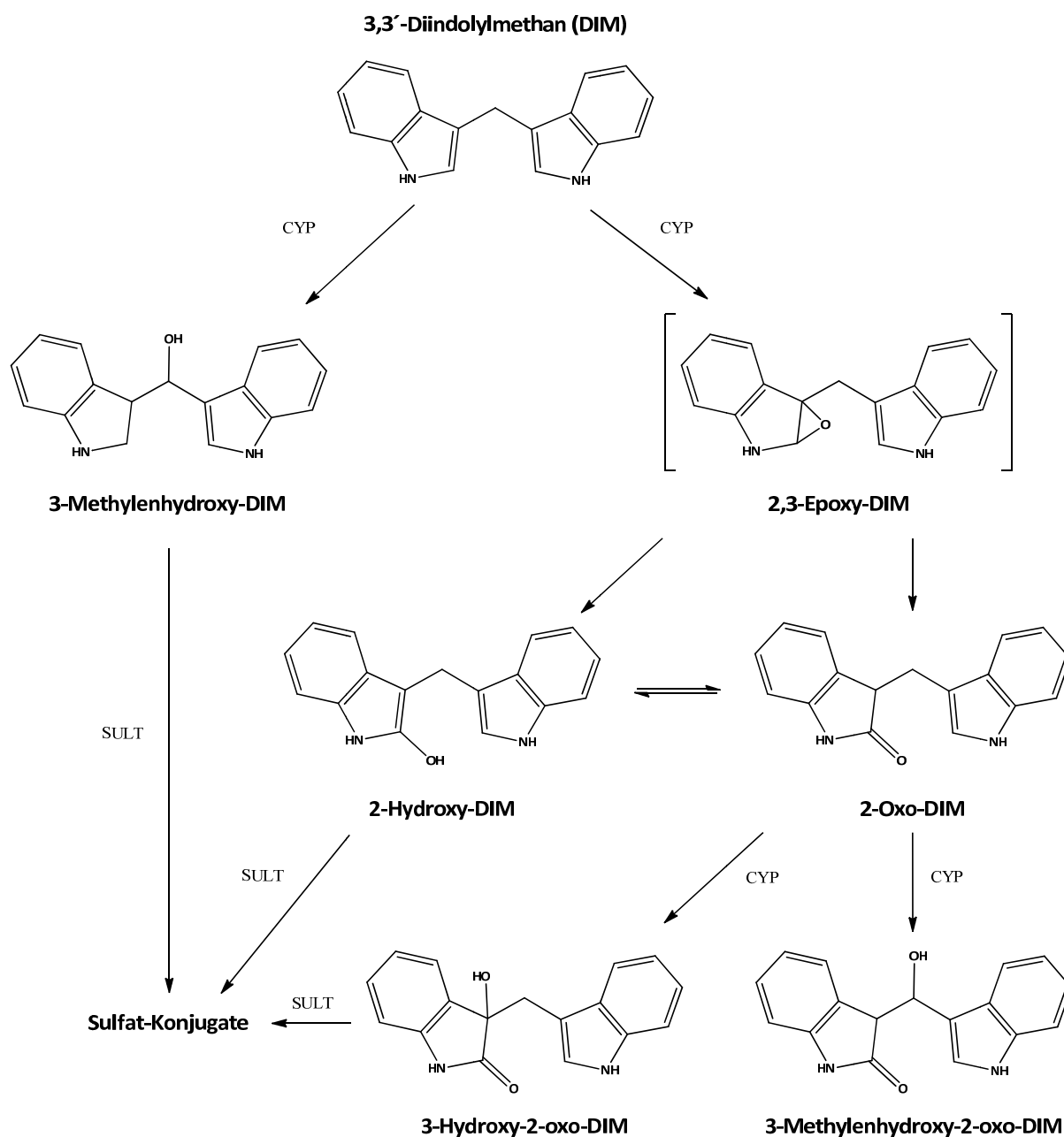


Abbildung 2: Biotransformation von 3,3'-Diindolylmethan (modifiziert nach Staub et al., 2006) (SULT= Sulfo-transferase; CYP=Cytochrom-P450-Monooxygenase)

2.1.3 Antikancerogene Wirkung von indolischen Glucosinolaten

Der Beweis, dass Indol-3-Carbinol und 3,3'-Diindolylmethan chemopräventiv wirken können, kommt vor allem aus *in vivo*-Studien, in denen die Gabe während der Initiations- und Promotionsphase die Entstehung von Tumoren im chemisch-induzierten Tumormodell reduzierte (zusammengefasst in

Verhoeven et al., 1997). Vor allem die positive Modulation Fremdstoff-metabolisierender Enzyme wird als primärer, protektiver Mechanismus postuliert, über den die Substanzen die Tumorgenese selektiv inhibieren können. Im Gegensatz zu Sulforaphan induzieren Indol-Glucosinolate nicht nur Phase-II-, sondern auch Phase-I-Enzyme (zusammengefasst in Hayes et al., 2008). In Studien konnte gezeigt werden, dass neben Indol-3-Carbinol vor allem 3,3'-Diindolylmethan eine hohe Affinität zum *aryl-hydrocarbon-receptor* (AhR) besitzt und so den ligandenabhängigen Transkriptionsfaktor aktivieren kann (Bjeldanes et al., 1991; Jellinck et al., 1993). Dieser bindet nach erfolgreicher Aktivierung an Promotorregionen mit einem *xenobiotic response element* (XRE) und reguliert damit maßgeblich die Expression zahlreicher Cytochrom-P450-Isoformen. Dies kann in Abhängigkeit vom Xenobiotikum dazu führen, dass entweder geringere Mengen toxischer Metabolite gebildet werden oder die beschleunigte Biotransformation zum ultimativen Kanzerogen initiiert wird. Weiterhin ist Indol-3-Carbinol, wenn auch weniger potent als Sulforaphan, in der Lage, den Transkriptionsfaktor *nuclear factor-E2-related factor 2* (Nrf2) zu aktivieren und die Transkription von Nrf2-regulierten Genen zu induzieren (McMahon et al., 2001; Jeong et al., 2005). Nrf2 bindet an Promotorregionen mit einem *antioxidant response element* (ARE) und vermittelt so primär die Expression von Genen wie NAD(P)H-Chinonoxido-reduktase-1 (*NQO1*), Glutathion-S-Transferase (*GST*) und Thioredoxin-reduktase (*TXNRD*), die für detoxifizierende und antioxidativ-wirkende Proteine codieren (zusammengefasst in Jung und Kwak, 2010). Zudem besitzt sowohl Indol-3-Carbinol als auch 3,3'-Diindolylmethan eine Affinität zum Estrogen-Rezeptor (ER). Angenommen wird, dass durch die Bindung dieser Verbindungen an den ER der Metabolismus von Estrogenen selektiv moduliert werden kann. Ein weiterer in diesem Kontext postulierter Mechanismus beruht auf der bereits beschriebenen Induktion von Cytochrom-P450-Isoformen. So wird davon ausgegangen, dass durch die Induktion von CYP1A1 der Metabolismus von 17- β -Estradiol zu 2-Hydroxyestradiol im Gegensatz zu 16- α -Hydroxyestradiol begünstigt wird. Da 2-Hydroxyestradiol im Unterschied zu 16- α -Hydroxyestradiol einen deutlich schwächeren Estrogen-Rezeptor-Agonist darstellt, zeigte Indol-3-Carbinol in hormonabhängigen Geweben einen reduzierten Estrogen-vermittelten Wachstumsstimulus und antiproliferative Eigenschaften (zusammengefasst in Kim und Milner, 2005, Weng et al., 2008). Ferner könnten die postulierten antikanzerogenen Effekte darauf beruhen, dass sowohl Indol-3-Carbinol als auch 3,3'-Diindolylmethan zahlreiche Signalwege wie Zellzyklus, Angiogenese und Apoptose beeinflussen und so beispielsweise die Proliferation von Brust-, Prostata- und Darmkrebszellen unterdrücken (zusammengefasst in Aggarwal und Ichikawa, 2005; Rogan, 2006).

2.1.4 Toxikologische Betrachtung von indolischen Glucosinolaten

Mittlerweile werden von vielen Herstellern Nahrungsergänzungsmittel auf Indol-3-Carbinol- und 3,3'-Diindolylmethan-Basis angeboten. Vermarktet werden diese Präparate vor allem mit ihren antikanzerogenen Eigenschaften ohne darauf hinzuweisen, dass eine Supplementierung dieser Substanzen im hohen Dosierungsbereich zu adversen Effekten führen könnte. Eine verringerte Tumorentstehung im chemisch-induzierten Kanzerogenese-Modell im Tier konnte zwar beobachtet werden, jedoch zeigten weitere *in vivo*-Studien, dass die Tumorentstehung vom Expositionsprotokoll, vom eingesetzten Kanzerogen und von der Spezies abhängig war. Wenn Indol-3-Carbinol bzw. 3,3'-Diindolylmethan während der Initiations- und Promotionsphase der Kanzerogenese verabreicht wurde, wurde die Tumorentstehung häufig begünstigt und beide Substanzen wirkten tumorpromovierend (zusammengefasst in Dashwood, 1998). Zudem wird oft nicht berücksichtigt, dass auch die Modulation des Estrogen-Metabolismus unter Umständen zu adversen Effekten führen kann. Zwar wird durch Indol-3-Carbinol vor allem die Expression von *CYP1A1* induziert, jedoch in geringerem Umfang auch die Expression von *CYP1B1*. Daher kommt es neben der Bildung von 2-Hydroxyestradiol aus 17- β -Estradiol simultan zur Bildung von 4-Hydroxyestradiol, einem ausgewiesenen Kanzerogen (zusammengefasst in Bradlow, 2008).

Weiterhin deuteten erst Studien mit Brokkoli-Extrakt und später mit reinen Glucosinolaten darauf hin, dass nach Hydrolyse einzelner Glucosinolate durch Myrosinase eine DNA-Adduktbildung im zellfreien System stattfand (Baasanjav-Gerber et al., 2011a). Um die Verbindungen weiter zu charakterisieren, wurden das mutagene Potential verschiedener Glucosinolate im Ames-Test und die DNA-Adduktbildung mittels ^{32}P -Postlabeling-Methode nach Hydrolyse untersucht. Neben Glucobrassicin zeigten Neoglucobrassicin und Sinalbin eine erhöhte Mutationsrate im verwendeten *Salmonella*-Typhimurium-Stamm. Von den getesteten Glucosinolaten wies Glucobrassicin die höchste DNA-Adduktbildungsrate auf. Nur hydrolysiertes Brokkoli-Extrakt war potenter, DNA-Addukte zu erzeugen (Baasanjav-Gerber et al., 2011b). Aufgeklärt wurde der Mechanismus der DNA- und Protein-Adduktbildung in Studien mit Neoglucobrassicin und 3-Methylindol (Skordos et al., 1998; Glatt et al., 2011; Barknowitz et al., 2014). Dabei wurde angenommen, dass die Adduktbildung über ein reaktives Carbokation verläuft, das an zelluläre Nukleophile wie Proteine oder die DNA binden kann (Abbildung 3). Der Vergleich zwischen dem *Salmonella*-Typhimurium-Stamm TA100 und TA100-hSULT1A1, der die humane Sulfotransferase 1A1 exprimiert, zeigte, dass Sulfotransferasen einen entscheidenden Einfluss auf die metabolische Aktivierung und die DNA-Addukt-Bildungsrate besaßen (Glatt et al., 2011). Darüber hinaus konnte die DNA-Adduktbildung in Fütterungsstudien mit Neoglucobrassicin und dem Hydrolyseprodukt 1-Methoxyindol-3-Carbinol an Mäusen belegt werden.

Die höchsten Adduktbildungsraten wurden in den Dickdarmabschnitten Caecum und Colon 8 h nach der Behandlung beobachtet (Schumacher et al., 2014).

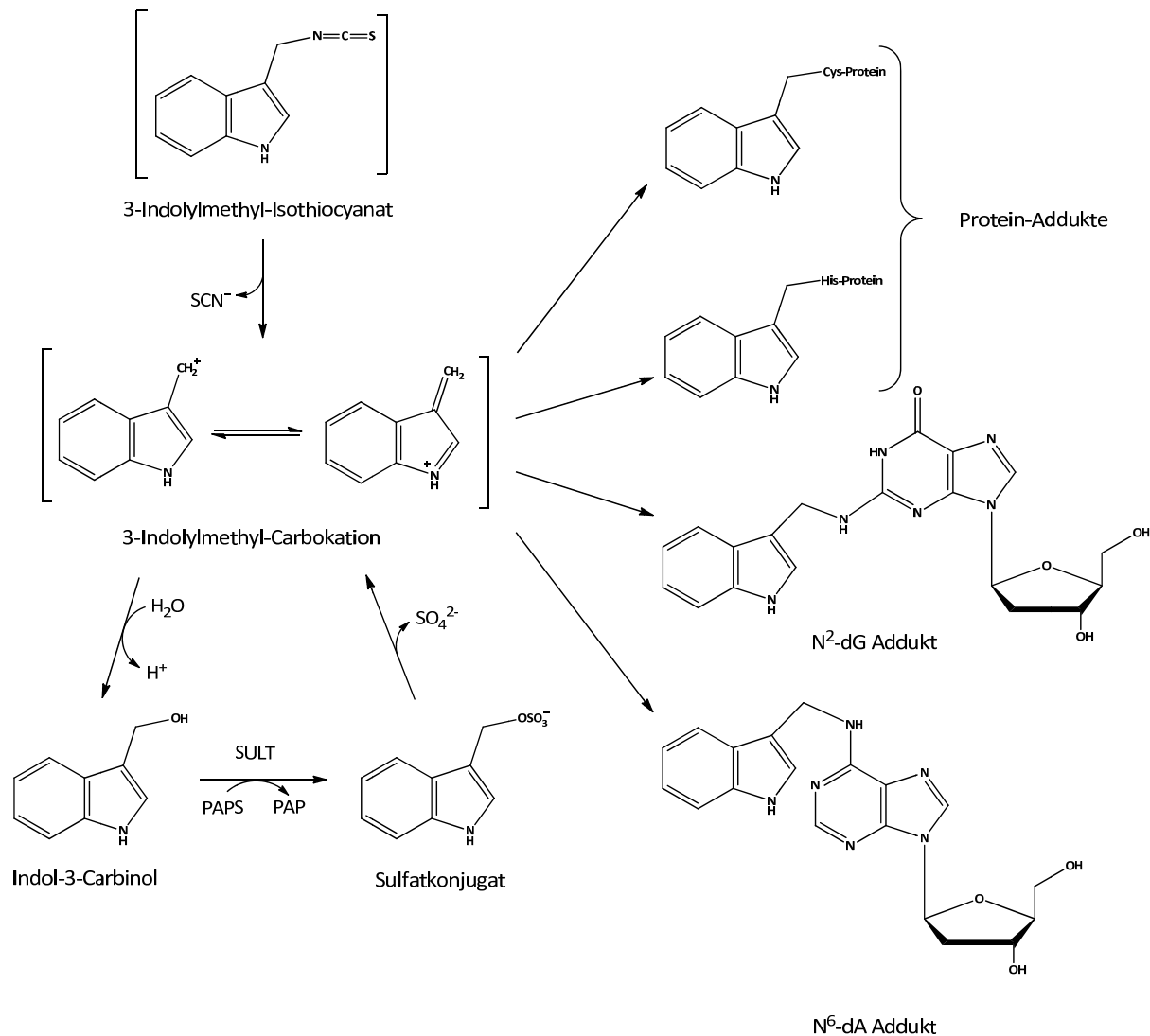


Abbildung 3: DNA- und Protein-Adduktbildung durch Indol-3-Carbinol (modifiziert nach Staub et al., 2002; Glatt et al., 2011; Barknowitz et al., 2014) (SULT=Sulfotransferase; PAPS=3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat; PAP=3'-Phosphoadenosin-5'-phosphat)

2.2 Genexpression und ihre Regulation

Die DNA ist Trägerin der genetischen Erbinformationen und jede Zelle des Körpers, mit Ausnahme der Erythrozyten, besitzt einen Zellkern mit einer Kopie der genetischen Informationen. 2010 waren ca. 22.500 Gene bekannt, die in der humanen DNA codieren (Perteau und Salzberg, 2010). Während einige dieser Gene konstitutiv exprimiert werden, werden andere nur in spezifischen Zellen und zeitlich strikt reguliert transkribiert. Die Biosynthese dieser funktionellen und intakten Genprodukte in Form von RNA (primäres Genprodukt) oder eines Proteins (sekundäres Genprodukt) aus den

genetischen Informationen wird als Genexpression bezeichnet (Deckwer et al., 1999). Um das Ablesen der DNA und gleichzeitige Umschreiben in die komplementäre RNA überhaupt zu ermöglichen, muss in einem ersten Schritt zunächst die Auflockerung der Chromatinstruktur erfolgen. Auf diese Weise wird der Zugang von RNA-Polymerasen zur DNA ermöglicht und die Transkription eingeleitet. Im Verlauf der Transkription entstehen so die drei RNA-Transkriptvarianten *transfer*-RNA (tRNA), *ribosomal*-RNA (rRNA) und *messenger*-RNA (mRNA). Im Anschluss erfolgt die Umschreibung der reifen mRNA-Sequenz in das funktionale Protein, das je nach zellulären Gegebenheiten noch posttranslational modifiziert werden kann (Krebs et al., 2011). Die Regulation des genetischen Informationsflusses kann an jedem dieser Punkte erfolgen. Somit wird der Zelle die Kontrolle über zelluläre Differentiation, Morphogenese und die Anpassungsfähigkeit gegeben, auf Umwelteinflüsse adäquat zu reagieren (Abbildung 4).

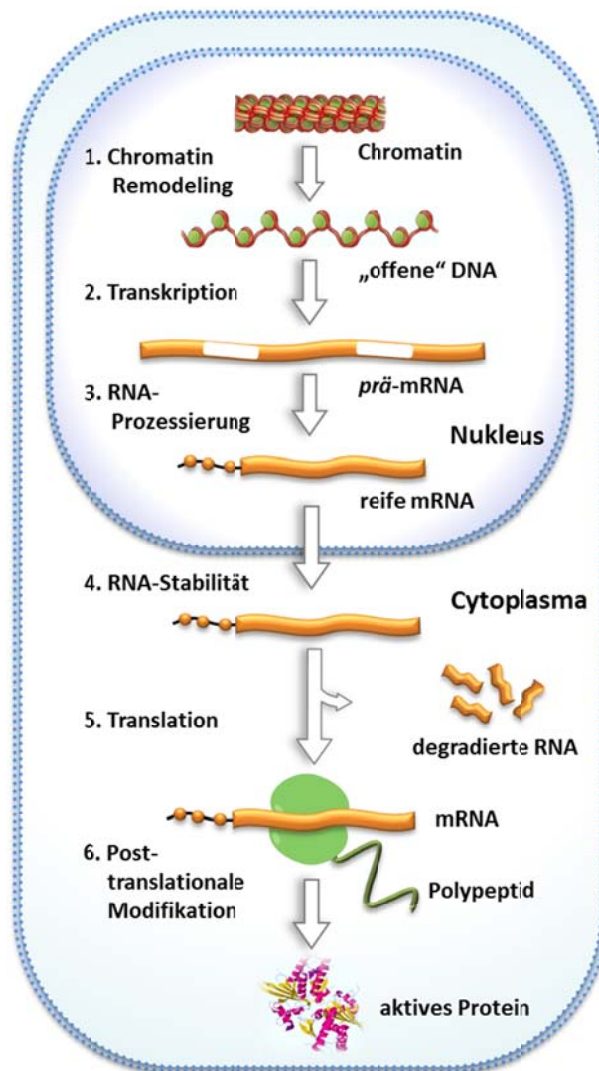


Abbildung 4: Schematische Darstellung des genetischen Informationsflusses innerhalb einer Zelle (modifiziert nach Freeman, 2010)

2.2.1 Transkriptionelle Regulation

Die Regulation der Transkription in Eukaryonten ist mit Abstand die wichtigste Möglichkeit zur Kontrolle der Genexpression (Voet et al., 2010). So kann die Transkription von Genen auf zwei Ebenen reguliert werden: Zum einen existiert die epigenetische Regulation auf Chromatin-Ebene, die die DNA durch Methylierung und Histonmodifikationen für Transkriptionsfaktoren zugänglicher macht. Zum anderen kann die Genaktivierung über eine kombinatorische Wechselwirkungen von *cis*- (Promoter, Silencer, Enhancer) und *trans*-Elementen (Transkriptionsfaktoren) gezielt reguliert werden. *Cis*-Kontrollelemente wirken nur, wenn sie sich auf dem gleichen DNA-Abschnitt wie das zu regulierende Gen befinden, während *trans*-Elemente zwischen verschiedenen DNA-Abschnitten wirken können. Erst die Interaktion dieser Steuerelemente entscheidet darüber, ob und wie häufig ein Gen abgelesen wird. Somit hängt die Transkription von der Anwesenheit einer Regulatorsequenz (*cis*-Element), eines Transkriptionsfaktors (*trans*-Element), der diese Regulatorsequenz erkennt, und von der Zugänglichkeit dieser Regulatorsequenz für den Transkriptionsfaktor ab (Watson et al., 2011).

2.2.1.1 Transkriptionsfaktoren

Etwas fünf bis zehn Prozent der Gene in eukaryotische Zellen kodieren für Transkriptionsfaktoren, was die große Bedeutung der genetischen Regulation widerspiegelt (Vaquerizas et al., 2009). Generell können Transkriptionsfaktoren die Ablesehäufigkeit eines Gens in zwei Richtungen beeinflussen, in dem sie die Expression entweder induzieren oder reprimieren. Nach ihrer Funktion können Transkriptionsfaktoren in allgemeine (basale) und spezifische Transkriptionsfaktoren eingeteilt werden (Blackburn et al., 2006). Basale Transkriptionsfaktoren sind häufig Bestandteil des Präinitiations-RNA-Polymerasekomplexes und binden an allgemeine DNA-Motive bzw. Promotorelemente, wie zum Beispiel der TATA-Box. Spezifische Transkriptionsfaktoren werden nur gewebe- und zellspezifisch exprimiert und bestehen typischerweise aus einer DNA-Binde-, einer Signalempfangs- und einer transaktivierenden Domäne (Blackburn et al., 2006). Welches Gen aktiviert oder reprimiert werden soll, wird der Polymerase durch Bindung an das jeweilige *cis*-Element vermittelt. Zu dem besitzen einige Transkriptionsfaktoren die Möglichkeit, neben Homo- auch Heterodimere auszubilden, was gleichzeitig zu verschiedenen Varianten von Transkriptionsfaktoren führt. Die selektive Induktion oder Repression eines Gens wird erst durch diese kombinatorische Zusammensetzung, sowie durch Wechselwirkung mit weiteren Kofaktoren ermöglicht.

2.2.2 Posttranskriptionelle Regulation

Nachdem die DNA in die mRNA transkribiert wurde, wird im Prozess der posttranskriptionellen Regulation die anschließende Proteinbiosynthese über unterschiedliche Regulationsmechanismen gesteuert. Neben der Prozessierung der *prä*-mRNA können die zelluläre Lokalisation der mRNA, die mRNA-Stabilität und die Translationseffizienz beeinflusst werden (Janning und Knust, 2008). Mit Hilfe der posttranskriptionellen Regulation verfügt die Zelle über die Möglichkeit, adäquat und unmittelbar auf Stresssituationen und veränderte physiologische Bedingungen zu reagieren.

2.2.2.1 Prozessierung der *prä*-mRNA

Bereits während der Transkription beginnt die Prozessierung der *prä*-mRNA, indem die Vorgänge *splicing*, *capping* und *tailing* co-transkriptionell ablaufen. Allen drei Mechanismen ist gemein, dass sie untereinander gekoppelt ablaufen und sich wechselseitig sowohl in Spezifität als auch in der Effektivität beeinflussen. Beim sogenannten *capping* wird an das 5'-Ende der *prä*-mRNA eine Modifikation aus methyliertem Guanosin angefügt, was sowohl für die Ausschleusung aus dem Kern essentiell ist als auch die mRNA vor einem cytosolischen Exonukleaseverdau schützt. Die überwiegende Anzahl der Gene ist durch einen alternierenden Wechsel aus kodierenden Exon- und nichtkodierenden Intron-Sequenzen gekennzeichnet. Im simultan ablaufenden Spleißvorgang (*splicing*) werden die Introns durch das Spleißosom aus der *prä*-mRNA entfernt und die Exons anschließend wieder verknüpft. Flankierende regulatorische Elemente können die Rekrutierung von Spleißosom-Komponenten fördern oder unterdrücken und bilden damit die Grundlage für alternatives Spleißen, so dass aus ein und derselben *prä*-mRNA verschiedene Isoformen des transkribierten Proteins hervorgehen können. Schließlich endet die Transkription mit dem gleichzeitigen Anhängen einer Polyadenylierungssequenz, die der Poly-A-Polymerase das Signal zum Anknüpfen eines Poly(A)-Schwanzes gibt. Ähnlich wie beim *capping* liegt die Funktion beim *tailing* darin, die mRNA zu stabilisieren und den nukleocytoplasmatischen Transport zu unterstützen (Watson et al., 2011).

2.2.2.2 mRNA-Stabilität und -Abbau

Die mRNA-Stabilität bietet eine weitere Option, in den genetischen Informationsfluss gezielt einzugreifen. Allgemein unterliegen mRNAs einer hohen Umsatzrate (Rate aus Synthese und Abbau), wobei sich die Halbwertszeit für einzelne Transkripte im Bereich von einigen Minuten bis mehreren Stunden bewegen kann. Gene, die auf einem hohen Niveau exprimiert werden, haben in der Regel eine hohe Halbwertszeit und ermöglichen ein breites Zeitfenster für die Translation. Damit kann die

steady state-Menge der mRNA jedoch nicht innerhalb kurzer Zeit signifikant geändert werden. Im Gegensatz dazu besitzen mRNAs mit einer niedrigen Halbwertszeit den Vorzug, dass die Proteinexpression auf Grund von wechselnden physiologischen Bedingungen sofort angepasst werden kann. Zum Beispiel besitzen mRNAs, die für Cytokine, Wachstumsfaktoren oder Proto-Onkogene kodieren, kurze Halbwertszeiten und die Genexpression wird zum überwiegenden Teil über die Modulation der mRNA-Stabilität vermittelt. Einige mRNAs werden jedoch gezielt abgebaut, weil sie entweder einen Defekt aufweisen oder die Transkripte eine regulatorische Sequenz enthalten, die über mRNA-Abbau die Expression des jeweiligen Gens dämpft. Im Wesentlichen wird die mRNA jedoch durch die modifizierten 5'- und 3'-Enden vor einem cytosolischen Exonukleaseverdau geschützt. Vor allem der Poly(A)-Schwanz trägt maßgeblich zum Schutz der mRNA bei und fördert zudem die Translation. Kommt es zu einer exonukleolytischen Verkürzung des Poly(A)-Schwanzes durch eine Exonuklease-vermittelte Deadenylierung, wird die Degradation der betroffenen mRNA eingeleitet (zusammengefasst in Guhaniyogi und Brewer, 2001).

2.2.3 Translationsregulation und posttranslationelle Regulation

Die direkte Regulation der Translation ist im Vergleich zur Transkriptionsregulation und mRNA-Stabilität von geringer Relevanz. Die an den Ribosomen stattfindende Translation lässt sich in die drei Phasen Initiation, Elongation und Termination einteilen. Vieles spricht dafür, dass die Initiation den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt darstellt und die Regulation vor allem in dieser Phase stattfindet (zusammengefasst in Sonenberg und Hinnebusch, 2009). Häufig werden innerhalb der Translationsregulation die Translationseffizienz und die Affinität von Translationsinitiationsfaktoren beeinflusst. Die meisten mRNAs besitzen charakteristische Struktur- und Sequenzmerkmale wie die Kappenstruktur, Poly(A)-Schwanz, untranslatierte Bereiche und offene Leseraster, um mit Faktoren der Translationsmaschinerie zu interagieren. Generell wird zwischen einer globalen und einer spezifischen Regulation unterschieden (zusammengefasst in Preiss und W. Hentze, 2003). Die globale Regulation basiert vornehmlich auf der Modifikation einzelner, genereller Translationsinitiationsfaktoren oder der Ribosomen, während die spezifische Regulation vor allem über Regulatorproteinkomplexe wie miRNAs und mRNA-bindende Proteine induziert wird. Ist die mRNA schließlich translatiert, können die synthetisierten Proteine vielfältigen Modifikationen unterliegen. Unter anderem können Ubiquitinierung, Phosphorylierung, Hydroxylierung, Glykosylierung, proteolytische Spaltung und das Anhängen von Fettsäuren ein Protein posttranslational verändern. Auch durch Anlagerung und Dissoziation von weiteren Faktoren kann die Aktivität und Stabilität eines Proteins selektiv reversibel oder irreversibel modifiziert werden.

2.3 Polymerasekettenreaktion

2.3.1 Prinzip

Die Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction* - PCR) gehört mittlerweile zu den Standardmethoden in der Molekularbiologie, um Genexpressionsuntersuchungen durchzuführen. Ziel ist es dabei, eine ausgewählte DNA- bzw. RNA-Sequenz, auch Template genannt, mittels spezifischer Oligonukleotide, sogenannten Primern, in zyklischen Reaktionen mit Hilfe von DNA-Polymerasen zu vervielfältigen (Mullis und Faloona, 1987). Um RNA quantifizieren zu können, muss diese vor dem Einsatz in der PCR erst noch mittels reverser Transkriptase in die komplementäre cDNA umgeschrieben werden (RT-PCR). Als Primer für die reverse Transkription können Oligo-dT-, Random Hexamer- oder spezifische Primer eingesetzt werden. Der Ablauf eines PCR-Zyklus lässt sich prinzipiell in drei Schritte unterteilen (Abbildung 5). Im ersten Schritt, der Denaturierung bei 92-95 °C, entsteht aus doppelsträngigen DNA-Molekülen (dsDNA) einzelsträngige Matrizen-DNA (ssDNA). Im weiteren Verlauf wird der Reaktionsansatz auf ein bestimmtes Temperaturniveau, das von der Schmelztemperatur der Primer abhängig ist, heruntergekühlt, so dass sich die Primer spezifisch am Template anlagern können (Annealing). Mittels anschließender Temperaturerhöhung auf 72 °C werden die Primer von einer DNA-abhängigen DNA-Polymerase in Anwesenheit freier Desoxynukleosid-Triphosphaten (dNTPs) und Magnesium-Ionen verlängert (Elongation). Die nach jedem PCR-Zyklus entstandenen Produkte (Amplifikate) dienen in dem nachfolgenden Zyklen wieder als Template, wobei es theoretisch zu einer Verdopplung der Template-Menge nach jedem PCR-Zyklus kommt. In der Regel werden zwischen 20-40 Zyklen pro PCR-Ansatz durchgeführt.

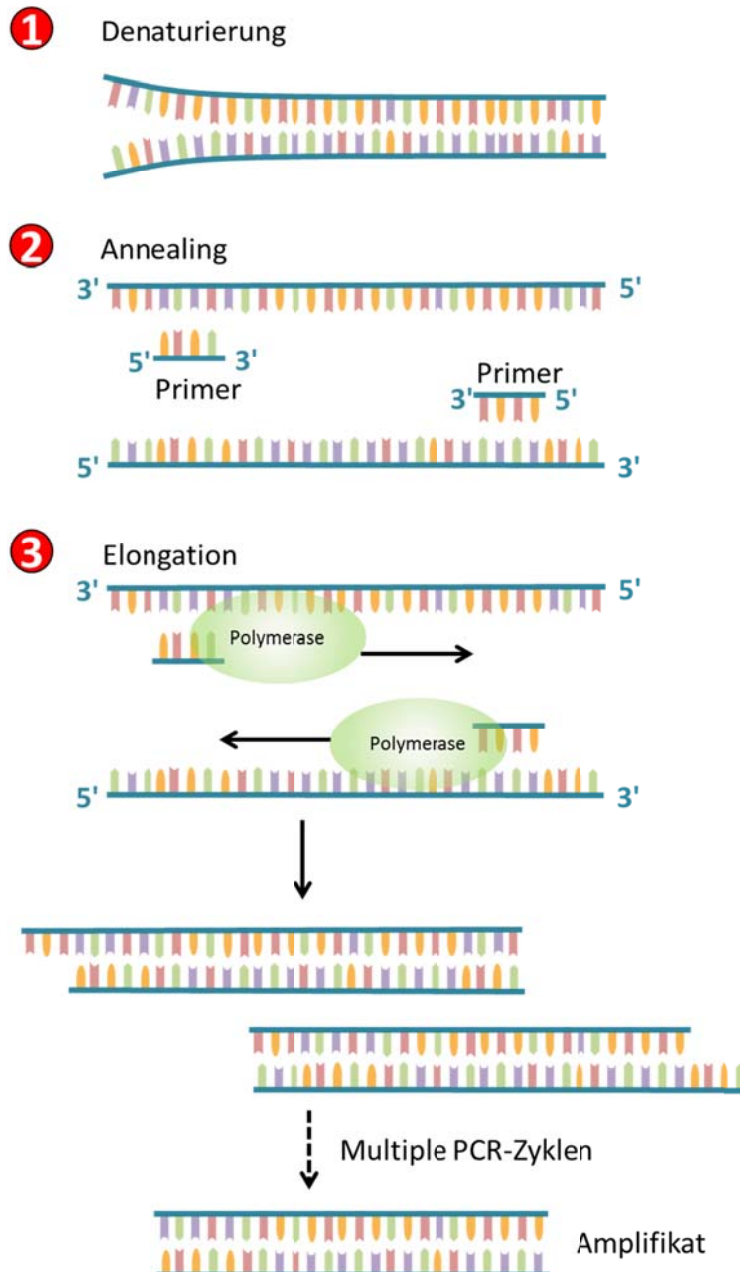


Abbildung 5: Schematischer Ablauf der Polymerasekettenreaktion

2.3.2 Real-Time PCR

Die Real-Time PCR, auch *quantitative* PCR (qPCR) genannt, stellt eine Weiterentwicklung der konventionellen PCR dar. Das Hauptunterscheidungskriterium ist, dass die amplifizierte DNA direkt nach jedem Zyklus mittels Fluoreszenzemission über eine CCD-Kamera detektiert wird. Zum einen kann dsDNA mit Hilfe von interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffen detektiert werden (Higuchi et al., 1993), zum anderen können Fluorophor-getaggte, sequenzspezifische Oligonukleotide (Sonden) eingesetzt werden (Saiki et al., 1985). Ein Vorteil von Sonden ist ihre Spezifität, da ein Fluoreszenzsignal nur gemessen werden kann, wenn die Sonde durch die 5'-3'-Exonukleaseaktivität

der Polymerase hydrolysiert wird, so dass Reporterfarbstoff und Quencher nicht mehr in unmittelbarer Nachbarschaft zu einander liegen. Wird ein interkalierender Farbstoff zur Detektion eingesetzt, muss am Ende der qPCR eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt werden, um sicherzustellen, dass nur die Zielsequenz und keine Artefakte wie Primer-Dimere amplifiziert wurden. Der Kurvenverlauf einer PCR lässt sich in vier Phasen einteilen (Abbildung 6).

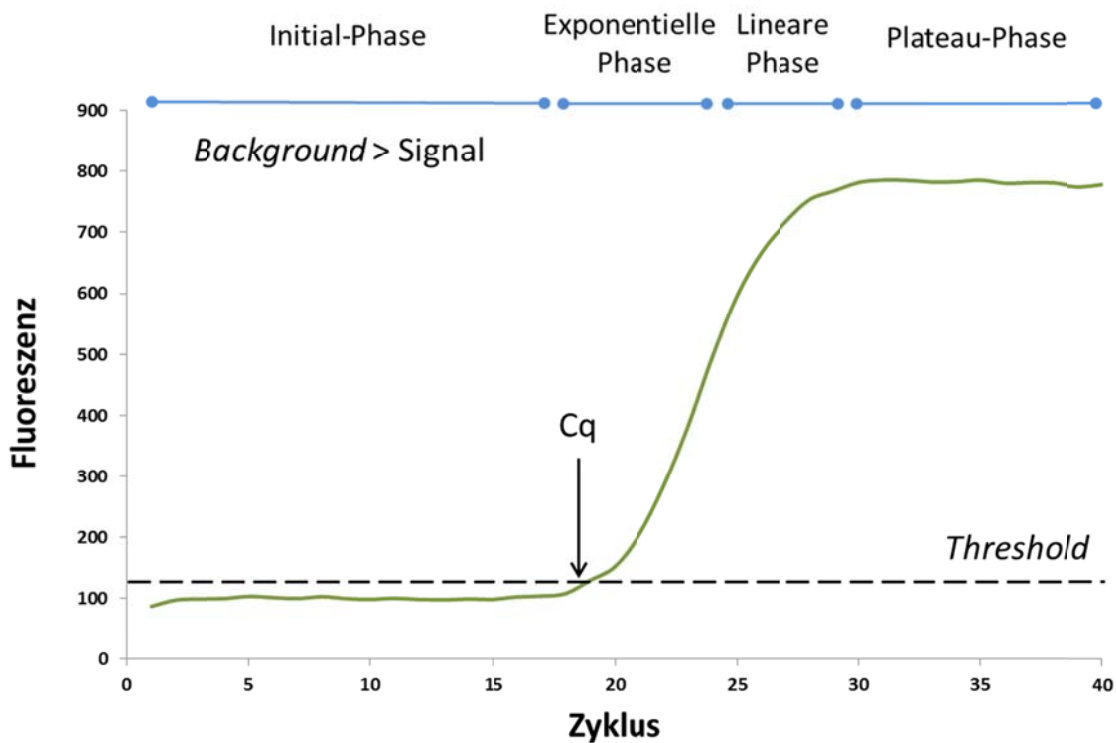


Abbildung 6: Schematische Darstellung einer Amplifikationskurve in der RT-qPCR (modifiziert nach Kubista et al., 2006)

Während der Initial-Phase ist das Fluoreszenzsignal noch zu schwach, um eindeutig vom Hintergrund unterschieden werden zu können. Erst mit zunehmender Akkumulation von Amplifikaten kommt es zur exponentiellen Signalentwicklung. Nur in dieser exponentiellen Phase, die wenige Zyklen in einem Lauf dauert, ist die korrekte Quantifizierung möglich, da während dieser Phase die optimalen Reaktionsbedingungen herrschen. Die Festlegung eines Threshold in Verbindung mit einem *quantification cycle* (Cq) ist grundsätzlich willkürlich, jedoch muss er so gewählt werden, dass er sich innerhalb eines Versuchs und Gens in der exponentiellen Phase befindet. Zwar verändert eine Verschiebung innerhalb der exponentiellen Phase die absoluten Cq-Werte, jedoch bleibt die Differenz zwischen zwei Cq-Werten konstant. Schließlich flacht die Amplifikationskurve mit zunehmender Zyklenzahl allmählich ab und es kommt zum Übergang in eine lineare und später in eine Plateau-Phase. Die Ursachen hierfür können vielschichtig sein. Neben den limitierenden

Faktoren wie Primer, dNTPs und Anzahl an Polymerase-Molekülen können entstehendes Pyrophosphat und die synthetisierten Amplifikationsprodukte zunehmend die Polymerase hemmen (Kainz, 2000).

2.3.3 Relative Quantifizierung

Die RT-qPCR zählt mittlerweile auf Grund der Sensitivität, Genauigkeit und des breiten dynamischen Bereichs zu der am meisten angewandten Methode, wenn es um die Quantifizierung von mRNA-Transkripten geht (Bustin, 2002). Generell stehen zwei Quantifizierungsstrategien in der RT-qPCR zur Auswahl. Die Quantifizierung kann zum einen, basierend auf einer Verdünnungsreihe von Plasmid DNA, RT-PCR-Produkten oder synthetisierter DNA, absolut erfolgen. Zum anderen kann die Quantifizierung eines Zielgens relativ durchgeführt werden (Bustin, 2004). Dabei wird die Genexpression des Zielgens auf ein weiteres ubiquitär und homogen exprimiertes Referenzgen bezogen. Durch die in der Praxis vorkommenden natürlichen Expressionsschwankungen einzelner Referenzgene sollten mehrere Referenzgene in Transkriptanalysen, zusammengefasst in einem Referenzgen-Index, verwendet werden, um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten (Vandesompele et al., 2002; Pfaffl et al., 2004). Dieser Vorgang wird auch als Normalisierung der Expressionsergebnisse bezeichnet. Durch Einbeziehung der PCR-Effizienzen lässt sich die relative Quantifizierung noch weiter optimieren und stellt in dieser Form die bis dato genaueste Form der mRNA-Quantifizierung dar (Pfaffl, 2001). Der Vorteil dieser Form der Normalisierung liegt in der Reduzierung der Varianz der Expressionsergebnisse, da Gewebe- und Matrixeffekte, unterschiedliche RNA-Extraktionseffizienzen sowie Fehler bei der reversen Transkription innerhalb einer Probe das Zielgen und Referenzgen gleichermaßen betreffen. Als Maß für die Quantifizierung der Startmenge wird der Cq-Wert herangezogen. Die Autoren der MIQE Guidelines schlagen auf Grund der uneinheitlichen Nomenklatur dieser Quantifizierungszyklen (*threshold cycle* (Ct), *crossing point* (Cp)) die einheitliche Schreibweise Cq vor (Bustin et al., 2009). Er entspricht der Anzahl an PCR Zyklen, die nötig sind, um ein definiertes Fluoreszenzniveau (*threshold*), das sich signifikant vom Hintergrund unterscheidet, zu erreichen (Kubista et al., 2006). Die Berechnung des *thresholds* basiert auf herstellerspezifischen Algorithmen, jedoch kann dessen Lage durch den Anwender manuell justiert werden. Die Expressionsunterschiede können anschließend auf der Grundlage dieser Cq-Werte mit Hilfe der sog. $2^{-\Delta\Delta Cq}$ -Methode berechnet werden (Livak und Schmittgen, 2001). Zunächst wird der Cq-Wert des Referenzgens vom Cq-Wert des zu untersuchenden Gens innerhalb einer Probe subtrahiert (Gleichung 1.1). Anschließend wird die Differenz aus dem ΔCq -Wert der Kontrolle und dem ΔCq -Wert der Behandlung gebildet (Gleichung 1.2). Der relative Expressionsunterschied einer

Probe zwischen der Behandlung und der Kontrolle (Ratio), normalisiert zum Referenzgen und bezogen auf eine Standardprobe, ergibt sich aus der arithmetischen Formel $2^{-\Delta\Delta Cq}$ (Gleichung 1.3).

$$\Delta Cq = Cq_{\text{Zielgen}} - Cq_{\text{Referenzgen}} \quad (\text{Gl. 1.1})$$

$$\Delta\Delta Cq = \Delta Cq_{\text{Behandlung}} - \Delta Cq_{\text{Kontrolle}} \quad (\text{Gl. 1.2})$$

$$\text{Ratio} = 2^{-\Delta\Delta Cq} \quad (\text{Gl. 1.3})$$

Allerdings beruht diese Methode auf einer idealen Amplifikationseffizienz mit einer Verdopplung der Produkte in jedem Zyklus. In der Praxis liegt die PCR-Effizienz jedoch unter optimierten Bedingungen durchschnittlich zwischen 1,6-1,7 (Mülhardt, 2009). Ausgehend von der $2^{-\Delta\Delta Cq}$ -Methode wurde das Effizienz-korrigierte relative Quantifizierungsmodell entwickelt (Pfaffl, 2001). Darin wird der Quotient aus dem berechneten Expressionsunterschied zwischen Behandlung und Kontrolle im Zielgen und dem berechneten Expressionsunterschied zwischen Behandlung und Kontrolle im Referenzgen ermittelt (Gleichung 2.1). Idealerweise ist das Referenzgen nicht reguliert und sowohl in Kontrolle als auch in der Behandlung sind die Cq-Werte identisch (Gleichung 2.2). Somit wird der Nenner 1 und fällt aus der Berechnung heraus (Gleichung 2.3).

$$\text{Ratio} = \frac{(E_{\text{Zielgen}})^{\Delta Cq_{\text{Zielgen}}(\text{Kontrolle}-\text{Behandlung})}}{(E_{\text{Referenzgen}})^{\Delta Cq_{\text{Referenzgen}}(\text{Kontrolle}-\text{Behandlung})}} \quad (\text{Gl. 2.1})$$

$$\text{Ratio} = \frac{(E_{\text{Zielgen}})^{\Delta Cq_{\text{Zielgen}}(\text{Kontrolle}-\text{Behandlung})}}{(E_{\text{Referenzgen}})^0} \quad (\text{Gl. 2.2})$$

$$\text{Ratio} = (E_{\text{Zielgen}})^{\Delta Cq_{\text{Zielgen}}(\text{Kontrolle}-\text{Behandlung})} \quad (\text{Gl. 2.3})$$

2.3.4 Normalisierung mittels Referenzgen

Die Normierung ist ein essentieller Bestandteil von soliden qPCR-Versuchen, da innerhalb dieses Prozesses Schwankungen in der mRNA-Extraktion, reversen Transkription und Amplifikationseffizienz ausgeglichen werden. Normiert werden kann über viele Parameter und zu verschiedenen Zeitpunkten innerhalb einer Analyse. Die Verwendung von Referenzgenen als interne Kontrolle ist die häufigste Methode und der goldene Standard, wenn es um die Normalisierung von Genexpressionsergebnissen geht (Logan et al., 2009). Durch diese Form der Normierung können unterschiedliche RNA-Isolierungseffizienzen, Interferenzen während der cDNA-Synthese und Matrix-

spezifische Effekte ausgeglichen werden, da sowohl Referenz- als auch Zielgen gleichermaßen betroffen sind. Voraussetzung für die Verwendung eines Referenzgens ist dessen konstitutive Expression unter wechselnden physiologischen Bedingungen und äußeren Einflüssen. In diesem Zusammenhang ist zu beachten, dass in transformierten Zellen unter Umständen eine Regulation dieser Gene stattfindet und dass kein universelles Referenzgen existiert, das in verschiedenen Geweben unter wechselnden Bedingungen konstitutiv exprimiert wird (Bustin, 2002). Die am häufigsten verwendeten Programme zur Selektion von Referenzgenen sind *geNorm* und *NormFinder*. Beide Programme folgen der Empfehlung, dass aufgrund der beträchtlichen Schwankungen der Expressionsniveaus von Referenzgenen nicht nur auf einzelne Referenzgene normalisiert werden sollte (Bustin et al., 2009). Vielmehr soll durch den Einsatz mehrerer Referenzgene eine zuverlässigere Normalisierung erreicht werden. Die Software *NormFinder* berücksichtigt zunächst die Einteilung der Proben in Gruppen und errechnet aus dem untersuchten Panel von Referenzgenen automatisch Stabilitätswerte. Hierbei werden die Intra- und Inter-Gruppenvariationen der Genexpression getrennt betrachtet. Der berechnete Stabilitätswert ist der geschätzte Fehler für jedes Referenzgen, der durch die Normierung eines Zielgens entstehen würde. Im Ergebnis werden die Kandidatengene in absteigender Reihenfolge nach ihrer Stabilität sortiert und es wird sowohl das stabilste Gen als auch die beste Kombination zweier Gene, die meist noch einen geringeren Stabilitätswert als das einzelne Gen aufweisen, angegeben (Andersen et al., 2004). Im Unterschied zu *NormFinder* werden über *geNorm* die Expressionsverhältnisse von mehreren potentiellen Referenzgenen miteinander verglichen. Aus dem Pool werden dann die am stabilsten exprimierten Gene zur Errechnung eines Normalisierungsfaktors herangezogen. Zudem wird ein Gen-Stabilitätswert, der die durchschnittliche paarweise Abweichung eines Referenzgens zu allen anderen Referenzgenen beinhaltet, ermittelt. Referenzgene mit dem höchsten Stabilitätswert weisen die instabilste Expression auf und werden aus den weiteren Berechnungen ausgeschlossen. Dieser Vorgang wird schrittweise wiederholt, indem erneut ein Stabilitätswert berechnet und das jeweils instabilste Gen eliminiert wird. Daraus resultieren ein stabilitätsabhängiges Ranking der Referenzgene sowie die Berechnung eines Expressionsnormalisierungsfaktors, basierend auf dem geometrischen Mittelwert. Ferner bietet das Programm die Möglichkeit, die optimale Anzahl von Referenzgenen zu ermitteln, mit denen eine noch höhere Stabilität zur Normalisierung erreicht werden kann (Vandesompele et al., 2002).

2.4 Das BioMark high-throughput RT-qPCR-System

Von besonderer Bedeutung für die Generierung der experimentellen Daten war die Verwendung des BioMark-HD-Systems von Fluidigm. Dabei ist das dynamische BioMark-Verfahren auf gebündelte Genexpressionsanalysen zugeschnitten und ermöglicht simultan 9216 separate PCR-Reaktionen im Nanolitermaßstab durchzuführen, wobei für den Reagenz- und Flüssigkeitstransfer wesentlich weniger Schritte erforderlich sind als bei herkömmlichen Formaten. Kernstück des Systems sind die nanofluidischen „dynamic arrays“ mit einem *integrated fluidic circuit* (IFC), auf dem die einzelnen PCR-Reaktionskammern über *Interface*-Ventile gezielt gefüllt und voneinander separiert werden (Abbildung 7).

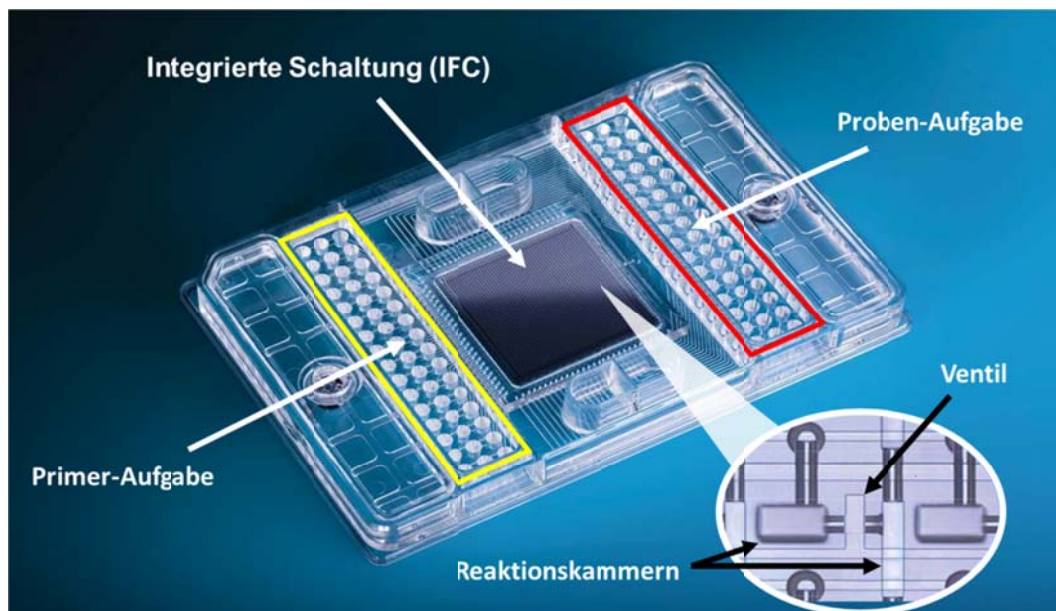


Abbildung 7: Schematischer Aufbau eines nanofluidischen „dynamic arrays“

Ein entscheidendes Argument für die Bevorzugung des Systems gegenüber Microarrays war das Potential, zeit- und konzentrationsabhängige Genexpressionsprofile detektieren zu können sowie reproduzierbare Messungen durchzuführen. Weitere Vorteile des Systems waren die niedrigen Kosten pro Datenpunkt, der weite dynamische Bereich sowie der hohe Probendurchsatz.

Der schematische Arbeitsablauf einer Genexpressionsanalyse ist in Abbildung 8 dargestellt. Nach erfolgter RNA-Isolierung und Umschreiben der mRNA in die komplementäre cDNA wird in einem anschließenden Prä-Amplifikationsschritt die Ausgangskonzentration jeder einzelnen Zielsequenz zunächst erhöht. In einem nächsten Schritt erfolgt das *primen* des Chips im IFC-Controller, indem die Akkumulatoren des *dynamic arrays* mit einem Fluid gefüllt werden. Erst im Anschluss werden je 5 µl der vorbereiteten Primer- und Probenlösung in die entsprechen Assay- und Proben-Inlets pipettiert und der Chip im IFC-Controller erneut geprimt, so dass letztendlich alle Reaktionskammern mit je 9 nl

der Probe und 1 nl Primer-Paar gefüllt sind. Nachdem der Chip im BioMark platziert wurde, wird über einen integrierten Thermocycler das notwendige Temperaturprogramm gesteuert und die Fluoreszenz nach jedem PCR-Zyklus über eine CCD-Kamera detektiert. Über die umfangreiche Real-Time PCR-Analysesoftware werden im weiteren Verlauf die Amplifikationskurven analysiert und die Spezifität jedes Amplifikats über eine Schmelzkurvenanalyse ermittelt.

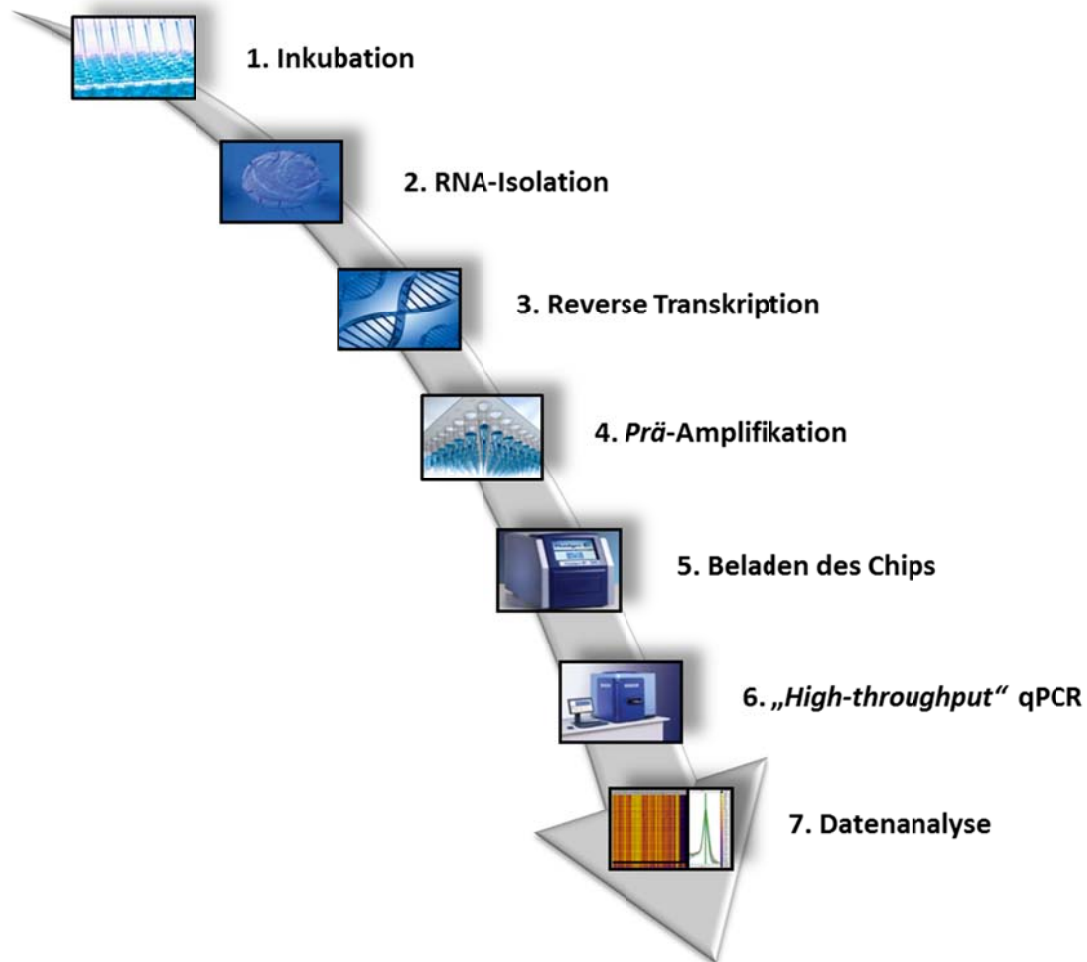


Abbildung 8: Schematischer Ablauf einer Genexpressionsanalyse

3. Fragestellung

Aus epidemiologischen Studien und tierexperimentellen Befunden ist bekannt, dass zwischen dem *Brassica*-Gemüseverzehr und der Krebsinzidenz in mehreren Zielorganen eine inverse Korrelation besteht (zusammengefasst in Verkerk et al., 2009). Im Kontext der Darmkrebsprävention rückte vor allem die Gruppe der Glucosinolate, die im Sekundärstoffwechsel der Pflanze gebildet werden und ausschließlich in *Brassica*-Gemüsen vorkommen, in den wissenschaftlichen Fokus. Aus der enzymatischen Hydrolyse der dominierenden Glucosinolate Glucoraphanin und Glucobrassicin werden die biologisch aktiven Verbindungen Sulforaphan und Indol-3-Carbinol freigesetzt, denen chemopräventive Eigenschaften zugeschrieben werden. Vor allem die Induktion Fremdstoff-metabolisierender Phase-II-Enzyme wird primär als protektiver Wirkmechanismus postuliert. Da zum Teil sehr hohe Verzehrsmengen von glucosinolatreichem Gemüse erforderlich sind, um eine gesundheitsfördernde Wirkung zu erzielen, wird von industrieller Seite die Einnahme hochdosierter Nahrungsergänzungsmittel zur Supplementierung empfohlen. Häufig haben jedoch isolierte Verbindungen im Vergleich zu ursprünglichen Lebensmitteln den Nachteil, dass andere molekulare Mechanismen und mögliche adverse Effekte infolge von Überdosierungen zum Tragen kommen. Aus einem BMBF-Verbundprojekt heraus sollte deshalb *in vitro* der molekulare Mechanismus einer möglichen Darmkrebsprävention von Glucosinolat-Hydrolyseprodukten näher untersucht werden. Dabei war es von besonderem wissenschaftlichem Interesse, zu untersuchen, welche Effekte aufgrund einer hochdosierten Anwendung auftreten können.

Das vorrangige Ziel dieser Arbeit war es zunächst, eine Hochdurchsatz-RT-qPCR-Methode zu etablieren, um konzentrations- und zeitabhängige Genexpressionsprofile nach Substanzbehandlung aufnehmen zu können. Dafür war es in erster Linie notwendig, die Auswahl für ein geeignetes Genset zu treffen. Im Rahmen der Etablierung wurden anschließend empirische Daten geniert und die systematische Auswertung der Messungen vorgenommen.

Nach erfolgreicher Etablierung sollte in anknüpfenden Untersuchungen *in vitro* der Einfluss von Sulforaphan und Indol-3-Carbinol auf die Genexpression untersucht werden. Aufgrund der unterschiedlichen chemischen Strukturen und intrazellulären Angriffspunkte wurde von der These ausgegangen, dass unterschiedliche Wirkmechanismen auch ein individuelles Genexpressionsmuster hervorrufen müssten. Um dennoch den Bezug zu Lebensmitteln aufrecht zu erhalten, wurde in weiteren Studien der Einfluss eines Myrosinase-hydrolysierten Gesamtglucosinolat-Extrakts aus Brokkoli auf die Expression untersucht. Als Zellkulturmodell wurde dafür die humane Kolonkarzinomzelllinie HCT 116 eingesetzt, da diese dem primären Expositions- und Resorptionsort, dem Darmepithelgewebe, nahe kam. Zudem waren für die Etablierung der Genexpressionsmethode die hohe Proliferationsrate und die geringe genetische Varianz der verwendeten HCT 116-Zellen von

Vorteil. Dabei dienten die aufgenommenen Genexpressionsprofile zunächst als erste Screening-Ergebnisse, um Anhaltspunkte für substanzspezifische, zelluläre Interferenzen zu akquirieren. Anhand der Erkenntnisse sollte im Anschluss die Planung weiterer Untersuchungen gezielt gefördert werden. So wurden im weiteren Verlauf der Arbeit durchflusszytometrische Analysen durchgeführt, um den Einfluss der Substanzen auf die Zellzyklusverteilungen zu ermitteln. Ein weiterer Schwerpunkt lag auf der Bestimmung von Enzymaktivitäten nach Inkubation mit Sulforaphan, Indol-3-Carbinol und Myrosinase-hydrolysiertem Gesamtglucosinolat-Extrakt aus Brokkoli. Dafür wurde exemplarisch die Aktivität der Thioredoxinreduktase und Cytochrom-P450-Monooxygenase bestimmt.

Ferner wurde in Western Blot-Analysen der Einfluss der Glucosinolat-Hydrolyseprodukte auf den Proteinstatus von p53, NQO1, p21, PRDX und β -Actin in HCT 116-Zellen untersucht. Dabei war es von besonderem wissenschaftlichem Interesse, ob die Effekte aus den Genexpressionsuntersuchungen auf Translationsebene verifiziert werden können.

4. Ergebnisse und Diskussion

In verschiedenen Versuchen wurde der Einfluss von Indol-3-Carbinol, 3,3'-Diindolylmethan, Sulforaphan und Myrosinase-hydrolysiertem Gesamtglucosinolat-Extrakt aus Brokkoli auf die Genexpression untersucht. Ferner wurde in weiterführenden Untersuchungen der Einfluss dieser Substanzen auf die Proteinexpression, die Zellzyklusverteilung und die Enzymaktivität tiefergehend analysiert. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen werden im Folgenden präsentiert und diskutiert.

4.1 Etablierung der high-throughput RT-qPCR-Methode

Ein wesentlicher Schwerpunkt dieser Arbeit beinhaltete die Etablierung einer Hochdurchsatz-Genexpressionsmethode, um zeit- und konzentrationsabhängige Genexpressionsprofile aufnehmen zu können. Dafür war es notwendig, ein Set bestehend aus 95 Genen zu selektieren, um einzelne molekulare Signalwege zu untersuchen. Im Rahmen der Etablierung wurde bewusst darauf verzichtet, kommerziell erhältliche Arrays zu verwenden, da die angebotenen molekulargenetischen Sets zum einen nicht die nötige Flexibilität boten und zum anderen den Qualitätsanforderungen nicht gerecht wurden.

Aufgrund der Verwendung von herkömmlichen Kits für die RNA-Isolation und cDNA-Synthese war für die Probenaufarbeitung keine Etablierung erforderlich. Um die RNA-Integrität zu gewährleisten, wurde diese exemplarisch mittels Agarose-Gelelektrophorese und automatisierter Kapillarelektrophorese überprüft. Ferner wurde die Versuchsdurchführung am BioMark bereits im Vorfeld vom Hersteller etabliert und optimiert, so dass ein *advanced development protocol* (ADP) bereitgestellt wurde.

4.1.1 Auswahl des Gensets

Um eine rudimentäre Orientierung über potentielle molekulare Signalwege zu erhalten, wurden zunächst in einer Arbeitsgruppe potentielle Signaltransduktionskaskaden besprochen und zusammengestellt. Dabei lag der Fokus in erster Linie darauf, molekulare Zielstrukturen zu identifizieren und die Regulation der zellulären Kaskaden zu erörtern. So wurden konkret die Signalwege Zellzyklus, Apoptose, Fremdstoffmetabolismus und DNA-Reparatur herausgearbeitet (Abbildung 9). In diesem Zusammenhang nahmen Transkriptionsfaktoren und deren regulatorische Mechanismen eine Sonderstellung ein. Der Hintergrund dafür war, dass Transkriptionsfaktoren häufig über autoregulatorische *feedback loops* auf Ebene der Genexpression reguliert werden und die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren in der Regel zu einer transkriptionellen Aktivierung von

spezifischen Feedback-Mechanismen führt. Für einige Transkriptionsfaktoren wurde in der Literatur bereits gezeigt, dass sie in einem regulatorischen Netzwerk sowohl die Expression von Antagonisten als auch die eigene Expression induzieren können. Insofern war es von besonderem Interesse, positive und negative Feedback-Mechanismen ausfindig zu machen, aus denen Rückschlüsse auf die Aktivierung einzelner Transkriptionsfaktoren gezogen werden konnten. Des Weiteren wurden für das Set gezielt Gene selektiert, deren Expression nachweislich infolge von oxidativem Stress moduliert wird.



Abbildung 9: Schematische Darstellung der molekularen Signalwege, die im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden.

Auf Basis dieser Daten wurde im Anschluss die Auswahl einzelner Targetgene und Isoformen vorgenommen. Dabei erfolgte die Priorisierung und Selektion primär nach ihrer Relevanz anhand von Literaturdaten. Die Zuordnung der Gene zu den Signalwegen ist in Abbildung 10 dargestellt. Aufgrund der ausgeprägten Vernetzung der Signalwege untereinander war eine eindeutige Zuordnung der Gene zu den jeweiligen Signalwegen jedoch nicht immer möglich. Zudem wurden weitere Gene wie zum Beispiel *MAP3K5*, aus der *mitogen-activated protein kinase* (MAPK)-Signalkaskade, sowie *VEGFA*, aus der Angiogenese, betrachtet. Mit der Zuordnung der Gene wurde die Intension verfolgt, die systematische Auswertung zu rationalisieren und die Effizienz der Methode zu erhöhen. Damit

der 28S- und 18S-Bande über die Aida-Software wurde ein 28S/18S-rRNA-Verhältnis von 2,2:1 detektiert. Somit konnte die Intaktheit der RNA bestätigt werden.

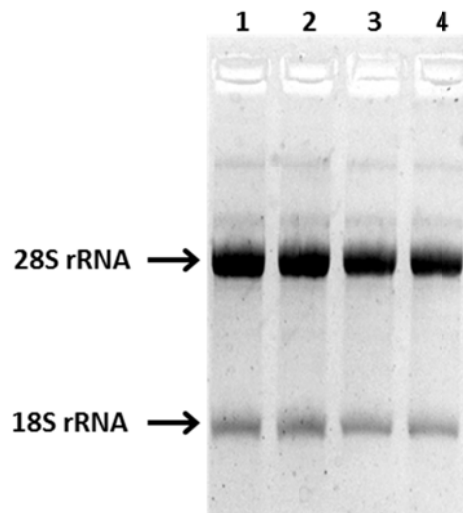


Abbildung 11: Exemplarisches Gel einer Agarose-Gelelektrophorese mit 1 µg isolierter Gesamt-RNA

Um diese Ergebnisse noch zu verifizieren, wurde eine automatisierte Kapillar-Elektrophorese mittels Lab-on-Chip-Technologie auf einem Bioanalytiker durchgeführt. Diese Technik gestattet eine weit bessere Bewertung der RNA-Integrität als dies mit der üblichen Agarose-Gelelektrophorese möglich ist. In einem Elektropherogramm wurden die einzelnen rRNA-Fractionen, die mRNA sowie fragmentierte RNAs, visualisiert (Abbildung 12). Für die exemplarisch untersuchte Probe wurde ein 28S/18S-rRNA-Verhältnis von 2:1 und eine RNA *integrity number* (RIN) von 10 ermittelt, was eine intakte, nicht degradierte und nicht fragmentierte RNA repräsentiert.

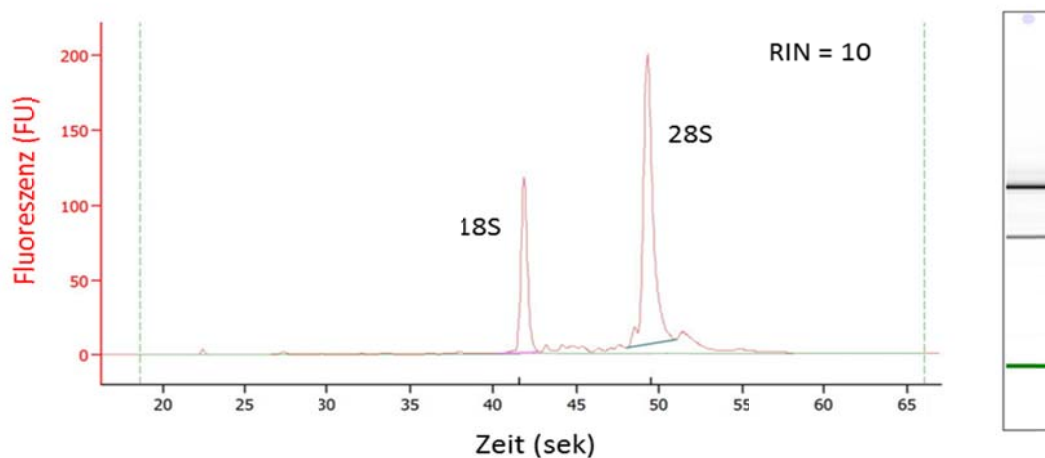


Abbildung 12: Elektropherogramm der untersuchten Gesamt-RNA (links) und virtuelles Gelbild (rechts)

4.2 Zytotoxizität

4.2.1 Einfluss von Indol-3-Carbinol und 3,3'-Diindolylmethan auf die Viabilität von HCT 116-Zellen

Als Grundlage für die nachfolgenden Zellkulturexperimente in HCT 116-Zellen musste zunächst der Konzentrationsbereich der Testsubstanzen ermittelt werden, in denen zytotoxische Effekte zu beobachten waren. Zur Beurteilung der Zellviabilität wurden die beiden Parameter Zellzahl, für akut toxische Effekte, und Koloniebildungsfähigkeit, für langfristige Zytotoxizität, nach 24-stündiger Inkubation als Endpunkte herangezogen. Der Einfluss von Indol-3-Carbinol auf die Viabilität von HCT 116-Zellen ist in Abbildung 13 und der Einfluss von 3,3'-Diindolylmethan in Abbildung 14 dargestellt.

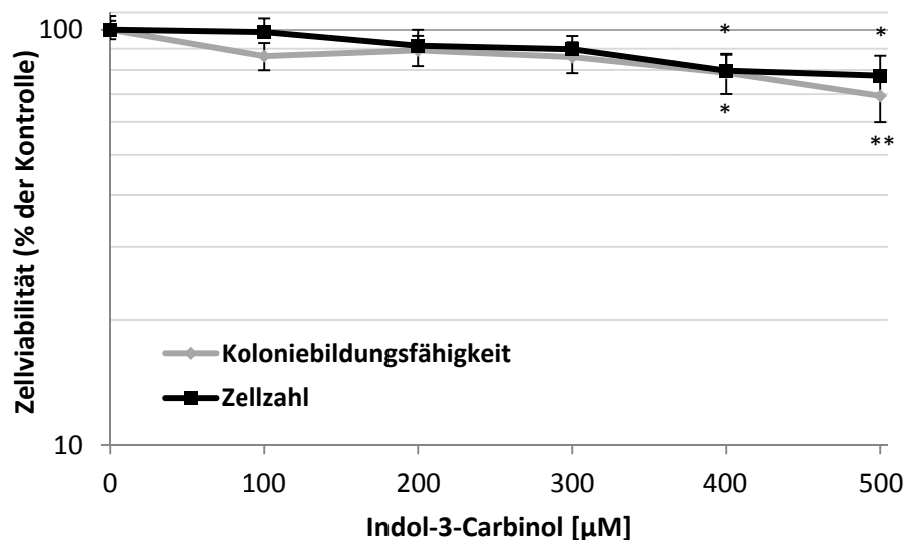


Abbildung 13: Zytotoxizität von Indol-3-Carbinol in HCT 116-Zellen nach 24-stündiger Inkubation. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Bestimmungen \pm SD. Statistisch signifikante Abweichung zur Kontrolle nach ANOVA mit Dunnett-T Post-Hoc-Test: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

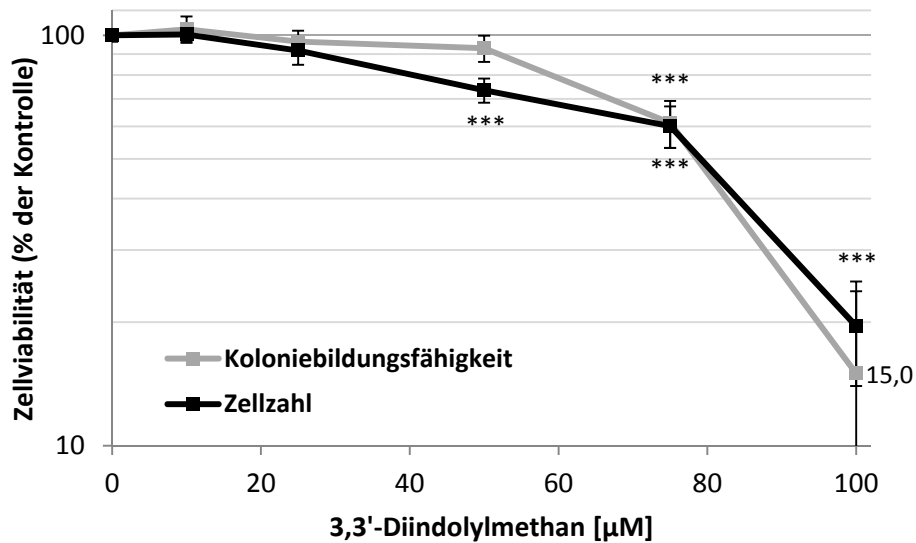


Abbildung 14: Zytotoxizität von 3,3'-Diindolylmethan in HCT 116-Zellen nach 24-stündiger Inkubation. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Bestimmungen \pm SD. Statistisch signifikante Abweichung zur Kontrolle nach ANOVA mit Dunnett-T Post-Hoc-Test: *** $p < 0,001$.

Die 24-stündige Inkubation mit Indol-3-Carbinol führte im untersuchten Konzentrationsbereich zu einer vergleichbaren Abnahme der Zellzahl und Koloniebildungsfähigkeit. Die Behandlung zeigte eine moderate konzentrationsabhängige Abnahme beider Viabilitätsparameter und erst ab einer Konzentration von 500 μM sank die Koloniebildungsfähigkeit unter 70% im Vergleich zur Kontrolle. Dagegen wurden zytotoxische Effekte von 3,3'-Diindolylmethan bereits in einem niedrigeren Konzentrationsbereich detektiert und sowohl Zellzahl als auch Koloniebildungsfähigkeit sanken bereits bei 75 μM auf 60 % ab. Zudem zeigten die Experimente, dass 3,3'-Diindolylmethan bedeutend zytotoxischer war und die Zunahme der toxischen Effekte in einem wesentlich engeren Konzentrationsbereich stattfand. Diesen Vorversuchen entsprechend, wurden die anschließenden Zellkulturexperimente in einem Konzentrationsbereich von 25 bis 500 μM Indol-3-Carbinol und 1 bis 50 μM 3,3'-Diindolylmethan durchgeführt. Auf der gleichen Basis wurde die Zytotoxizität von Sulforaphan (Piberger, 2014) und dem verwendeten Gesamtglucosinolat-Extrakt aus Brokkoli in HCT 116-Zellen ermittelt (siehe Anhang 8.7.1.1). Dabei ergab eine 24-stündige Inkubation mit Sulforaphan erst in stark zytotoxischen Konzentrationen ab 25 μM einen abweichenden Verlauf der Zellzahl von der Koloniebildung. Ein signifikanter Abfall der Zellzahl von 90 auf 38 % wurde im Bereich von 10 bis 25 μM beobachtet. Während die 24-stündige Inkubation mit unhydrolysiertem Gesamtglucosinolat-Extrakt aus Brokkoli keinen Einfluss auf die untersuchten Zellviabilitätsparameter zeigte, wurde eine deutliche Abnahme der Zellzahl auf 70 % nach Behandlung mit 25 μM Myrosinase-hydrolysiertem Gesamtglucosinolat-Extrakt aus Brokkoli beobachtet. Resultierend aus diesen

Versuchen wurden für weiterführende Experimente 12,5 µM Sulforaphan und 20 µM Gesamtglucosinolat-Extrakt aus Brokkoli eingesetzt.

4.3 Beeinflussung der Genexpression

Die Modulation zellulärer Signalwege und die Modifizierung der Genexpression finden häufig auf transkriptioneller Ebene statt. Letztendlich lassen sich, durch Analyse der transkriptionellen Veränderungen nach Substanzinkubation, selektiv Rückschlüsse auf intrazelluläre Angriffspunkte einzelner Verbindungen ableiten. Ob und in welchem Maß die Transkription nach Inkubation aktiviert oder reprimiert wird, ist zum einen substanzspezifisch und zum anderen von den Parametern Zeit und Konzentration abhängig. Aus diesem Grund wurden konzentrations- und zeitabhängige Genexpressionsprofile der Testsubstanzen mit Hilfe der Hochdurchsatz-RT-qPCR in HCT 116-Zellen aufgenommen. Ein Set, bestehend aus 95 ausgewählten Genen verschiedener Signalwege wurde zur Analyse herangezogen. Häufig wird in der Literatur ein willkürlicher Faktor (*fold change*) definiert, ab dem von einer signifikanten differentiellen Genexpression gesprochen wird. Häufig wird diese Form der Selektion bei Microarray-Analysen angewandt, um die Auswertung zu vereinfachen. Bei dieser Art der Analyse wird jedoch die biologische Relevanz einzelner Gene nicht berücksichtigt. So wäre es prinzipiell möglich, dass biologisch-relevante Gene aufgrund ihrer geringen Induzierbarkeit von der Analyse ausgeschlossen werden. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit bewusst darauf verzichtet, eine Selektion anhand eines *fold change* vorzunehmen. Eine ausführliche Beschreibung der Auswertung ist in Kapitel 6.2 aufgeführt. Bedingt durch das enorme Datenvolumen sowie der Diffizilität und Komplexität der erzeugten Daten kann in der vorliegenden Arbeit nicht im Detail auf alle Gene und Signalwege eingegangen werden. Ein vollständiger Überblick über die erzeugten Genexpressionsprofile befindet sich im Anhang 8.7.2.5. Weiterhin ist eine Zusammenfassung der untersuchten Gene in Kapitel 4.1.1 sowie der jeweiligen kodierten Proteine im Anhang 8.7.2.1 zu finden. Durch Kategorisierung, Ordnen nach relativer Genexpression und Zuordnung der Gene zu spezifischen Signalwegen konnte eine systematische Auswertung der entstandenen Genexpressionsprofile erreicht werden. Da die Gene *ABCB1*, *ADH*, *ALDH1A1*, *AXIN2*, *BBC3*, *DDIT3*, *GPX2*, *HSPA1A*, *SEPP1* sowie *UGT1* in den verwendeten HCT 116-Zellen nur auf einem sehr niedrigen Niveau exprimiert wurden, konnten diese nicht zur Auswertung herangezogen werden. Sofern es möglich war, wurden in dieser Arbeit gezielt einzelne relevante Transkriptvarianten eines Gens untersucht. Nicht immer war dies jedoch möglich, so dass für einzelne Gene mehrere Isoformen als Summenparameter detektiert wurden.

4.3.1 Konzentrationsabhängiger Einfluss von Indol-3-Carbinol

Um den konzentrationsabhängigen Einfluss von Glucosinolat-Hydrolyseprodukten auf die Genexpression zu untersuchen, wurden Genexpressionsprofile nach 24-stündiger Behandlung mit verschiedenen Indol-3-Carbinol-Konzentrationen in HCT 116-Zellen aufgenommen.

4.3.1.1 Einfluss auf Gene, die mit der zellulären Redox-Regulation assoziiert sind

Die Ursache für die Entstehung von oxidativem Stress liegt in einem Ungleichgewicht aus Bildung und Abbau von reaktiven Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species* - ROS). Für die Bildung von ROS sind sowohl endogene als auch exogene Faktoren verantwortlich, wobei die unter physiologischen Bedingungen endogen gebildeten ROS einer strikten Regulation unterliegen. Entstehen ROS über ein physiologisches Maß hinaus, kommt es zur erhöhten Genexpression zahlreicher Enzyme wie Hämoxygenase, Katalase oder Glutathionperoxidase.

In Abbildung 15 ist der konzentrationsabhängige Einfluss von Indol-3-Carbinol auf die Expression von Genen, die mit der zellulären Redox-Regulation assoziiert sind, dargestellt. Aus dem Genexpressionsprofil nach 24-stündiger Inkubation ist zu entnehmen, dass die Substanzbehandlung zu einer konzentrationsabhängigen Aktivierung zahlreicher Gene, der antioxidativen Abwehr führte. Vor allem die Transkriptmenge von *HMOX1* wurde konzentrationsabhängig von 100 bis 500 µM Indol-3-Carbinol erhöht. So führte die Inkubation mit 100 µM Indol-3-Carbinol bereits zu einer 1,4-fachen Expressionserhöhung im Vergleich zur Kontrolle, die mit zunehmender Inkubationskonzentration bis um das 5,6-fache nach Behandlung mit 500 µM anstieg. Ein vergleichbarer Einfluss nach Substanzbehandlung konnte auf die Expression von *G6PD*, *GCLC* und *TXNRD1* beobachtet werden. Zu erkennen ist, dass mit steigender Konzentration eine signifikante Aktivierung dieser Gene bis um das 2,8-fache stattfand. Simultan wurde die Expression von *CAT*, *GSR*, *MT2A* sowie *SOD2* nur marginal beeinflusst.

Vor allem die deutliche Induktion von *HMOX1* liefert Hinweise darauf, dass die Behandlung mit Indol-3-Carbinol zur Induktion von oxidativem Stress in HCT 116-Zellen führte. Durch *HMOX1* wird das Enzym Hämoxygenase kodiert, das den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt des Abbaus von Häm zu den Endprodukten Kohlenstoffmonoxid, Eisen und Biliverdin bzw. Bilirubin katalysiert. In diesem Kontext wirkt vor allem das Häm-Abbauprodukt Bilirubin, das durch Reduktion von Biliverdin mittels Biliverdin-Reduktase entsteht, als Antioxidans. Insofern stellt die Aktivierung von *HMOX1* eine zelluläre Antwort auf die Induktion von oxidativem Stress dar (zusammengefasst in Otterbein et al., 2003). Die Aktivierung von *HMOX1* nach Inkubation mit Indol-3-Carbinol kann somit als Indikator für intrazellulär generierte ROS angesehen werden.

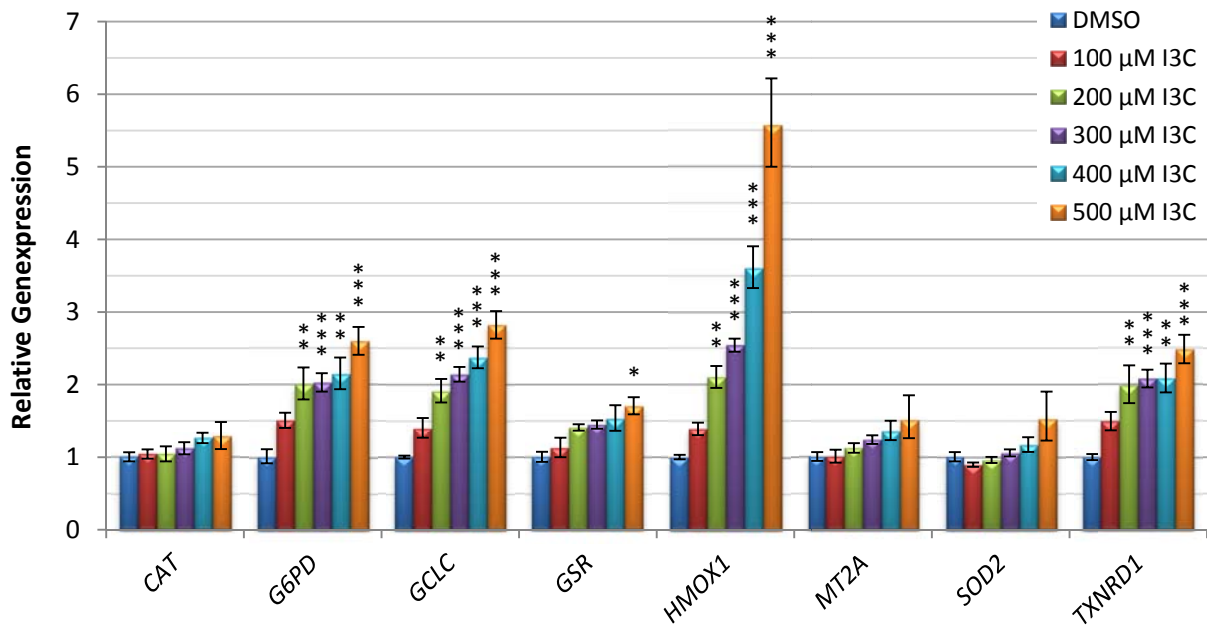


Abbildung 15: Einfluss einer 24-stündigen Inkubation mit Indol-3-Carbinol (I3C) in HCT 116-Zellen auf die relative Genexpression von Genen, deren Proteine an der zellulären Redox-Regulation beteiligt sind. Dargestellt sind die Mittelwerte aus zwei unabhängigen, in Dreifachbestimmung durchgeführten Versuchen \pm 95 %-Konfidenzintervall. Statistisch signifikante Abweichung zur Kontrolle nach ANOVA mit Dunnett-T Post-Hoc-Test: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

4.3.1.2 Einfluss auf Gene, die mit Fremdstoffmetabolismus assoziiert sind

Hinsichtlich der chemopräventiven Wirkung von Glucosinolat-Hydrolyseprodukten wird vor allem die Induktion von detoxifizierenden Enzymen des Fremdstoffmetabolismus wie Glutathion-S-Transferase (GST), UDP-Glucuronosyltransferase (UDP-GT) und NAD(P)H-Chinonoxoreduktase-1 (NQO1) als protektiv angesehen (zusammengefasst in Juge et al., 2007). So wird unter anderem postuliert, dass potentielle Kanzerogene aufgrund der gesteigerten Phase-II-Enzymaktivitäten schneller eliminiert werden können.

Im Folgenden ist der Einfluss von Indol-3-Carbinol auf die relative Expression von Genen dargestellt, die in Verbindung mit dem Fremdstoffmetabolismus stehen (Abbildung 16). Den größten Einfluss zeigte die Verbindung auf die Expression von *CYP1A1*. Bereits eine Inkubation mit 100 µM Indol-3-Carbinol führte zu einer signifikanten Induktion der *CYP1A1*-Transkriptmenge um das 3,9-fache. Zudem zeigte die Behandlung mit steigenden Konzentrationen eine dosisabhängige Induktion der *CYP1A1*-Expression bis um das 9,3-fache nach Behandlung mit 500 µM Indol-3-Carbinol. Ein wesentlich geringerer Einfluss konnte auf die Expression von *NQO1* beobachtet werden. So führte die Inkubation mit 500 µM Indol-3-Carbinol zu einer 2,9-fachen Aktivierung der *NQO1*-Expression. Im Vergleich dazu, wurde die Transkriptmenge von *GSTP1* durch die Behandlung nur marginal beeinflusst.

Über welchen Mechanismus die Induktion von *CYP1A1* verlief, kann nur spekuliert werden. In diesem Kontext wäre eine Aktivierung durch die Bindung an den *aryl-hydrocarbon-receptor* (AhR) denkbar. Aus kompetitiven Bindungsanalysen mit Indol-3-Carbinol ist bereits bekannt, dass die Verbindung eine Affinität zum AhR besitzt (Bjeldanes et al., 1991). Zudem konnte die Induktion von CYP-Isoformen über den AhR *in vitro* und *in vivo* durch Indol-3-Carbinol bereits gezeigt werden (Perdew und Babbs, 1991; Hestermann und Brown, 2003; Okino et al., 2009; Kawajiri et al., 2009). Insofern stellt die Bindung an der AhR einen plausiblen Mechanismus dar, über den die Expression von *CYP1A1* induziert wurde.

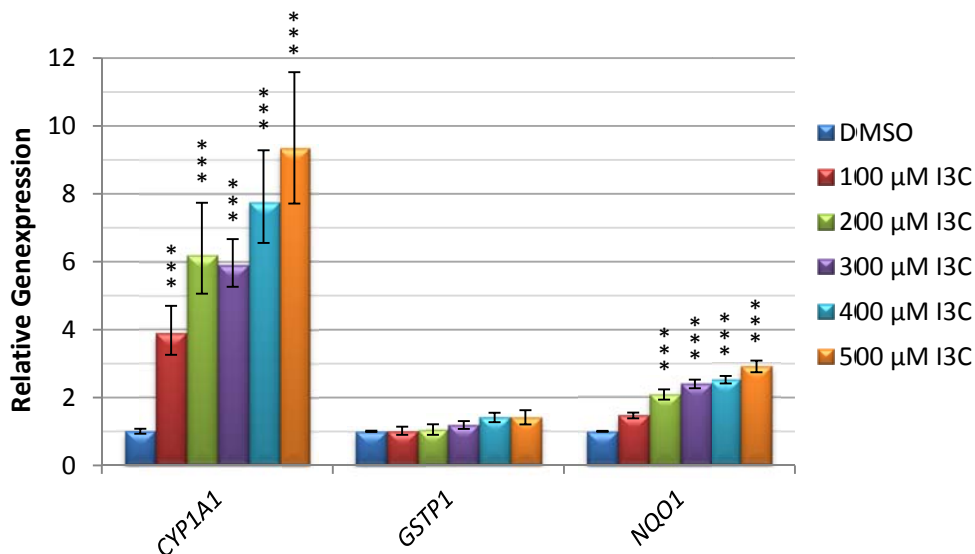


Abbildung 16: Einfluss einer 24-stündigen Inkubation mit Indol-3-Carbinol (I3C) in HCT 116-Zellen auf die relative Genexpression von Genen, die in Verbindung mit dem Fremdstoffmetabolismus stehen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus zwei unabhängigen, in Dreifachbestimmung durchgeführten Versuchen \pm 95 %-Konfidenzintervall. Statistisch signifikante Abweichung zur Kontrolle nach ANOVA mit Dunnett-T Post-Hoc-Test: *** $p < 0,001$.

4.3.1.3 Einfluss auf Gene, die mit dem Zellzyklus assoziiert sind

Zum Schutz der genomischen Integrität werden die einzelnen Phasenübergänge im Zellzyklus über sogenannte *Checkpoints* überwacht. Die Aktivierung dieser Zellzyklus-Kontrollpunkte kann sowohl durch fehlende Wachstumsstimuli als auch durch DNA-Schäden und Störungen innerhalb der Replikation erfolgen. Die Zellen arretieren infolgedessen in ihrer Zellzyklusphase und erleichtern somit im Falle von DNA-Schäden die Reparatur beziehungsweise die Wiederherstellung der Replikationsgabeln. Auf diese Weise wird verhindert, dass die DNA-Schäden verstärkt zu vererbaren Mutationen führen.

In Abbildung 17 ist der konzentrationsabhängige Einfluss von Indol-3-Carbinol auf die relative Genexpression von Genen, die mit dem Zellzyklus in Verbindung stehen, dargestellt. Demnach zeigte

die Behandlung mit Indol-3-Carbinol einen moderaten Anstieg der Transkriptmenge von *CDKN1A* und *CDKN2B*. Beide Gene wurden konzentrationsabhängig bis um das 2,8- bzw. 2,6-fache nach Inkubation mit 500 μ M Indol-3-Carbinol induziert. *CDKN1A* kodiert für den Cyclin-abhängigen Kinase-Inhibitor p21, der nach Aktivierung zum Zellzyklusarrest in der G_1/S - sowie G_2/M -Phase und zur zellulären Seneszenz führt (Abbas und Dutta, 2009). Von *CDKN2B* wird der Cyclin-abhängigen Kinase-Inhibitor p15 kodiert, der ebenso wie p21 den Arrest der Zelle in der G_1 -Phase einleitet.

Dass eine Behandlung mit Indol-3-Carbinol zur Modulation von den Cyclin-abhängigen Kinasen sowie Cyclin-abhängigen Kinase-Inhibitoren führt, wurde bereits in zahlreichen Zelllinien beobachtet (zusammengefasst in Rogan, 2006). In Analogie zu den bisherigen Ergebnissen zeigten die durchgeführten Untersuchungen vergleichbare Effekte auf die Expression von Cyclin-abhängigen Kinase-Inhibitoren in HCT 116-Zellen. Prinzipiell kann die Aktivierung von Kinase-Inhibitoren als ein Schutzmechanismus der Zelle nach Einwirkung von genotoxischem Stress verstanden werden. Inwieweit die Zellzyklusverteilung durch Aktivierung von *CDKN1A* und *CDKN2B* beeinflusst wurde, wurde in anschließenden Zellzyklusanalysen tiefergehend untersucht (siehe Kapitel 4.6.1).

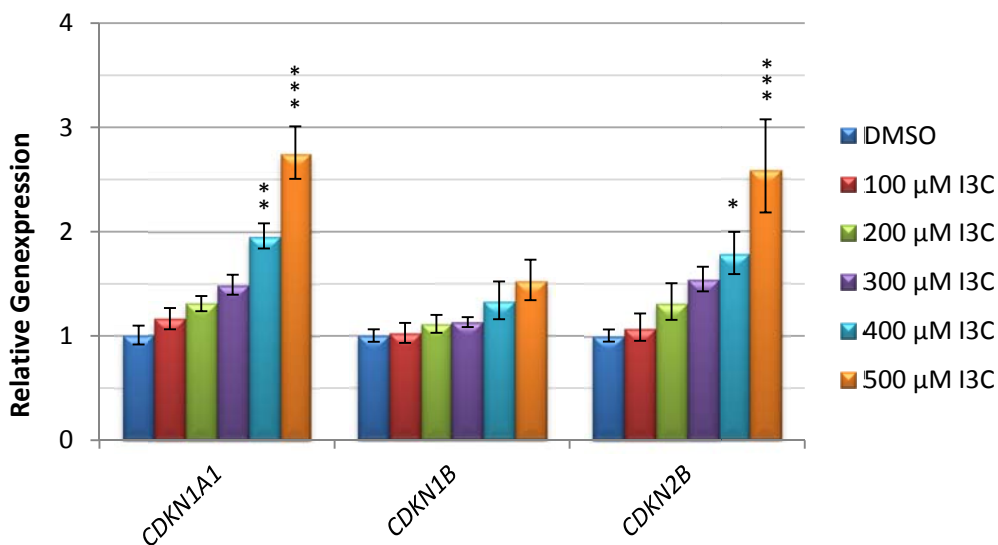


Abbildung 17: Einfluss einer 24-stündigen Inkubation mit Indol-3-Carbinol (I3C) in HCT 116-Zellen auf die relative Genexpression von Genen, die für zellzyklusregulierende Proteine kodieren. Dargestellt sind die Mittelwerte aus zwei unabhängigen, in Dreifachbestimmung durchgeführten Versuchen \pm 95 %-Konfidenzintervall. Statistisch signifikante Abweichung zur Kontrolle nach ANOVA mit Dunnett-T Post-Hoc-Test: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

4.3.2 Zeitabhängiger Einfluss von Glucosinolat-Hydrolyseprodukten

Um den zeitabhängigen Einfluss von Glucosinolat-Hydrolyseprodukten auf die Genexpression zu untersuchen, wurden HCT 116-Zellen entweder mit 12,5 μM Sulforaphan, 20 μM Myrosinase-hydrolysiertem Gesamtglucosinolat-Extrakt aus Brokkoli oder 500 μM Indol-3-Carbinol inkubiert und zu verschiedenen Zeitpunkten Genexpressionsprofile aufgenommen.

4.3.2.1 Einfluss auf Gene, die mit der zellulären Redox-Regulation assoziiert sind

Im Folgenden ist der zeitabhängige Einfluss von Glucosinolat-Hydrolyseprodukten auf die Expression von Genen, die mit der zellulären Redox-Regulation assoziiert sind, dargestellt. In allen drei aufgenommenen Genexpressionsprofilen zeigte sich der stärkste Effekt bereits nach 8 h durch eine deutliche Induktion des Gens *HMOX1*. So führte die Inkubation mit 12,5 μM Sulforaphan innerhalb von 8 h zur Induktion der *HMOX1*-Expression um das 11,5-fache (Abbildung 18). Im weiteren Verlauf verblieb die Transkriptmenge auf einem hohen Niveau bevor die Expression nach 48 h auf das 4,7-fache zurückging. Unter physiologischen Bedingungen wird die Expression von *HMOX1* durch den Repressor Bach1, der an das *antioxidant responsive element* (ARE) in der Promotorregion von *HMOX1* bindet, strikt reguliert. Erst durch Einwirkung von ROS wird die Interaktion von Bach1 mit der Promotorregion verhindert, so dass der Repressor nicht mehr bindet und folglich aus dem Nukleus geschleust wird. Dies wiederum ermöglicht dem Transkriptionsfaktor *nuclear factor erythroid 2-related factor 2* (Nrf2) die Bindung an die nun freie Promotorregion und die Induktion des Nrf2-abhängigen Gens *HMOX1* (zusammengefasst in Gozzelino et al., 2010). Des Weiteren wird *HMOX1* als sogenanntes *early response gene* in der Literatur postuliert, das unmittelbar durch oxidativen Stress aktiviert wird (zusammengefasst in Abraham und Kappas, 2008). Zudem kann durch multiple AREs in der regulatorischen Sequenz die Transkription des Gens beschleunigt werden. In diesem Zusammenhang kann die frühzeitige und ausgeprägte Induktion von *HMOX1* nach Inkubation mit Sulforaphan erklärt werden. Ferner unterstützt die signifikante Induktion von *HMOX1* um das 12-fache nach Behandlung mit 12,5 μM Sulforaphan die These, dass Sulforaphan einen der stärksten natürlichen Induzierer des Keap1-Nrf2-Signalwegs darstellt (Dinkova-Kostova und Talalay, 2008). Insofern deuten die Ergebnisse darauf hin, dass Sulforaphan den Keap1-Nrf2-Signalweg aktivierte. Ferner kann durch die ausgeprägte Induktion von *HMOX1* angenommen werden, dass die Behandlung mit Sulforaphan zur Generierung von ROS führte. Über welchen Mechanismus die gesteigerte ROS-Produktion verlief, kann nur spekuliert werden. In diesem Kontext wäre eine Induktion von reaktiven Sauerstoffspezies aufgrund einer möglichen intrazellulären Glutathion-Depletierung denkbar. So konnte in Studien bereits gezeigt werden, dass Sulforaphan primär über

passive Diffusion in die Zelle aufgenommen wird und unmittelbar über Konjugationsreaktionen an Glutathion bis in den millimolaren Bereich intrazellulär akkumuliert (Zhang, 2000).

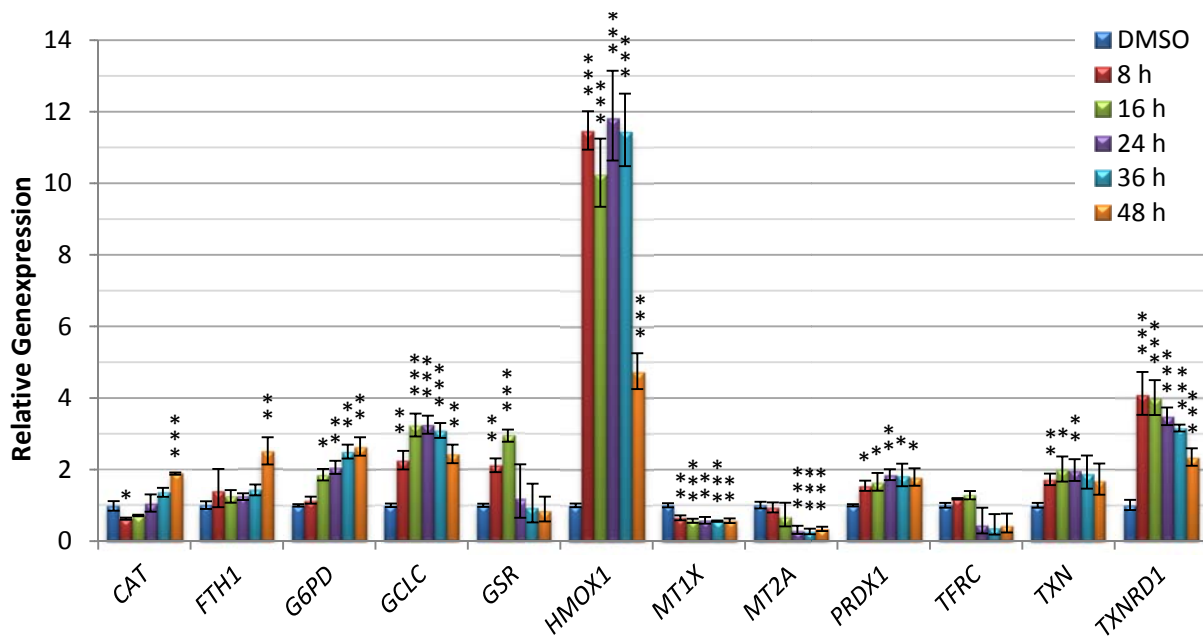


Abbildung 18: Einfluss einer zeitabhängigen Inkubation mit 12,5 µM Sulforaphan in HCT 116-Zellen auf die relative Genexpression von Genen, deren Proteine an der zellulären Redox-Regulation beteiligt sind. Dargestellt sind die Mittelwerte aus zwei unabhängigen, in Dreifachbestimmung durchgeführten Versuchen ± 95 %-Konfidenzintervall. Statistisch signifikante Abweichung zur Kontrolle nach ANOVA mit Dunnett-T Post-Hoc-Test: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Dass infolge der Sulforaphan-Behandlung möglicherweise Nrf2 aktiviert wurde, zeigte zudem die Induktion von zahlreichen Nrf2-abhängigen Genen. So wurde die Expression von *G6PD*, *GCLC*, *GSR*, *PRDX1*, *TXN* sowie *TXNRD1* bereits nach 8 h signifikant induziert.

Ein vergleichbares Genexpressionsprofil wurde nach Inkubation mit 20 µM Myrosinase-hydrolysiertem Gesamtglucosinolat-Extrakt aus Brokkoli erhalten (Abbildung 19). Bis auf minimale Unterschied in der Expressionshöhe ergab sich ein übereinstimmendes Expressionsmuster. In diesem Kontext wäre denkbar, dass synergistische Effekte verschiedener Glucosinolat-Hydrolyseprodukte innerhalb der Matrix für die stärkere Induktion verantwortlich waren. Da anzunehmen war, dass neben Glucosinolaten noch weitere reaktive Verbindungen im untersuchten Extrakt enthalten waren, wurde zusätzlich ein Genexpressionsprofil mit 20 µM unhydrolysiertem Gesamtglucosinolat-Extrakt aus Brokkoli aufgenommen (Daten nicht dargestellt). Weil die Behandlung mit unhydrolysiertem Gesamtglucosinolat-Extrakt aus Brokkoli keinen Einfluss auf die Genexpression zeigte, wurde daraus abgeleitet, dass die ermittelten Effekte primär auf die bei der Hydrolyse freigesetzten Glucosinolat-Hydrolyseprodukte zurückzuführen sind.

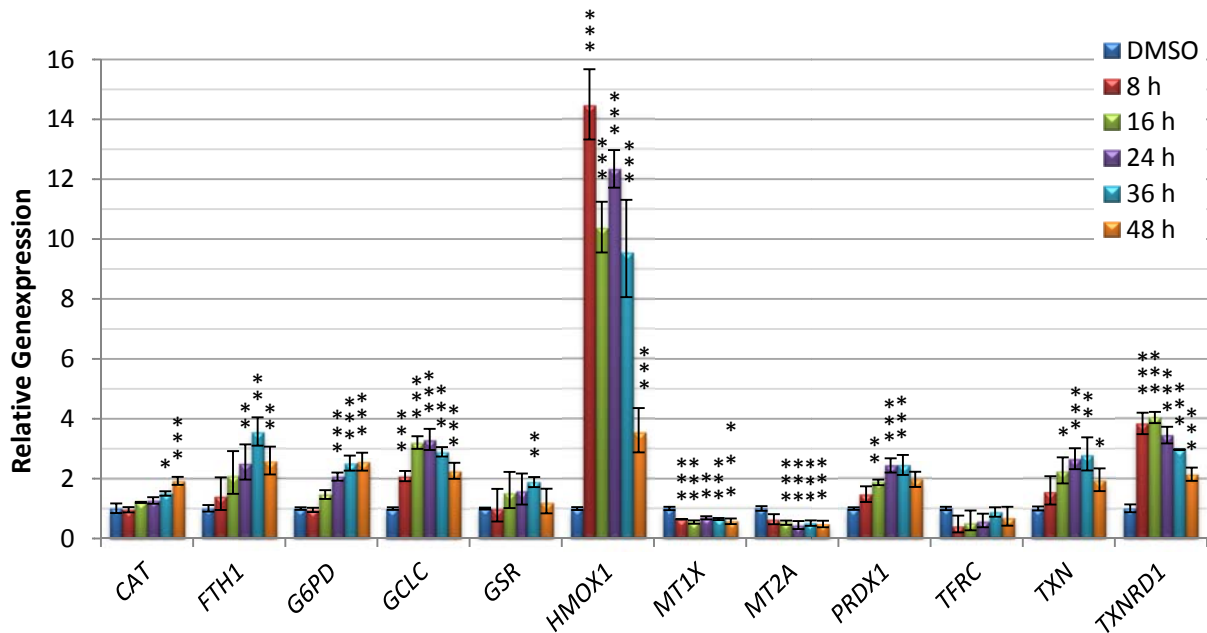


Abbildung 19: Einfluss einer zeitabhängigen Inkubation mit 20 µM Myrosinase-hydrolysiertem Gesamtglucosinolat-Extrakt aus Brokkoli in HCT 116-Zellen auf die relative Genexpression von Genen, deren Proteine an der zellulären Redox-Regulation beteiligt sind. Dargestellt sind die Mittelwerte aus zwei unabhängigen, in Dreifachbestimmung durchgeführten Versuchen ± 95 %-Konfidenzintervall. Statistisch signifikante Abweichung zur Kontrolle nach ANOVA mit Dunnett-T Post-Hoc-Test: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Ein etwas anderes Genexpressionsprofil wurde nach Inkubation mit 500 µM Indol-3-Carbinol erhalten (Abbildung 20). Ähnlich wie im Sulforaphan-induzierte Expressionsprofil wurde vor allem die Transkriptmenge von *HMOX1* signifikant induziert. Bereits nach 8 h konnte eine gesteigerte Expression um das 7,6-fache detektiert werden. Analog dazu konnte eine zeitabhängige Aktivierung der Nrf2-abhängigen Gene *GCLC*, *GSR*, *PRDX1*, *TXN* und *TXNRD1* beobachtet werden. Insofern zeigte die Behandlung mit Indol-3-Carbinol vergleichbare Effekte bezüglich der Aktivierung von oxidativen Stressgenen.

Da aus Stabilitätsuntersuchungen mit Indol-3-Carbinol bekannt war, dass die Substanz spontan in Zellkulturmedien zu 3,3'-Diindolymethan dimerisiert und die Dimerisierung innerhalb von 24 h bereits zu 50 % stattgefunden hat (Bradlow und Zeligs, 2010), konnte bei den Untersuchungen davon ausgegangen werden, dass neben Indol-3-Carbinol zusätzlich noch 3,3'-Diindolymethan im Zellkulturmedium vorlag. Um den Einfluss von 3,3'-Diindolymethan in Abwesenheit von Indol-3-Carbinol in HCT 116-Zellen näher zu untersuchen, wurden Genexpressionsprofile nach Inkubation mit 50 µM 3,3'-Diindolymethan aufgenommen (Daten nicht dargestellt).

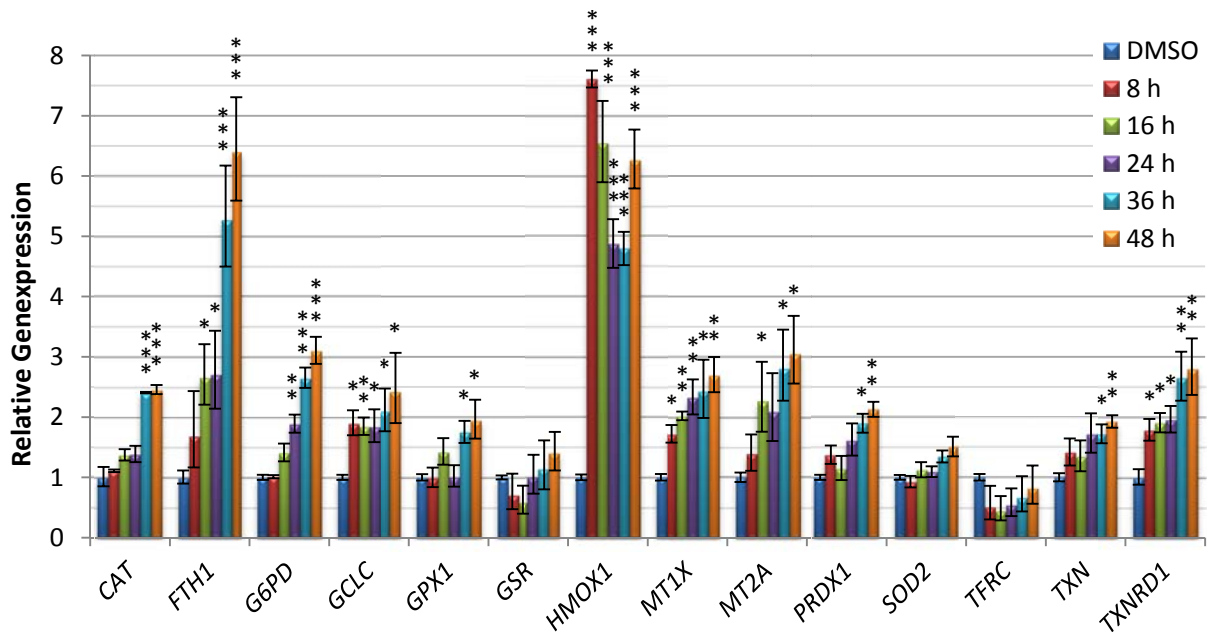


Abbildung 20: Einfluss einer zeitabhängigen Inkubation mit 500 µM Indol-3-Carbinol in HCT 116-Zellen auf die relative Genexpression von Genen, deren Proteine an der zellulären Redox-Regulation beteiligt sind. Dargestellt sind die Mittelwerte aus zwei unabhängigen, in Dreifachbestimmung durchgeführten Versuchen \pm 95 %-Konfidenzintervall. Statistisch signifikante Abweichung zur Kontrolle nach ANOVA mit Dunnett-T Post-Hoc-Test: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Beim Abgleich der Daten ergab sich ein ähnliches Expressionsmuster wie nach Behandlung mit Indol-3-Carbinol. Lediglich marginale Unterschiede in der Ausprägung der Effekte konnten beobachtet werden. Somit konnte davon ausgegangen werden, dass die erhaltenen Genexpressionsprofile nach Inkubation mit Indol-3-Carbinol zum Teil auf die Anwesenheit von 3,3'-Diindolylmethan sowie auf synergistische Effekte dieser beiden Substanzen zurückzuführen waren.

Über welchen Mechanismus Indol-3-Carbinol bzw. 3,3'-Diindolylmethan die intrazelluläre Redox-Regulation beeinflussten, kann aus den aufgenommenen Genexpressionsprofilen nicht abgeleitet werden. Vereinzelt existieren in der Literatur Hinweise dafür, dass mitochondriale membranständige ATPasen durch 3,3'-Diindolylmethan inhibiert werden und so die mitochondriale ROS-Produktion infolge einer Hyperpolarisation der inneren Mitochondrienmembran stimuliert wird (Gong et al., 2006).

Weiterhin ist in allen drei Genexpressionsprofilen zu erkennen, dass es zu einer zeitabhängigen Induktion von *FTH1* und simultanen Repression von *TFRC* kam. Beide Gene kodieren für Proteine, die eine wichtige Rolle in der Regulation der Eisen-Homöostase einnehmen. *FTH1* kodiert für das intrazelluläre Eisenspeicherprotein Ferritin H, während *TFRC* für den membranständigen Transferrin-Rezeptor kodiert. Anzunehmen ist, dass die Expressionsveränderungen von *FTH1* und *TFRC* im engen Zusammenhang mit der Induktion von *HMOX1* stehen. Wie bereits erläutert wurde, kann es durch

eine gesteigerte Hämoxxygenase-Aktivität zu einer Beschleunigung des intrazellulären Häm-Katabolismus kommen, wodurch unter anderem vermehrt Fe^{2+} -Ionen aus dem Protoporphyrin-IX-Ring des Häms mobilisiert werden. Da freie Eisenionen die Bildung von ROS über die Fenton-Reaktion katalysieren und zytotoxische Effekte hervorrufen würden, wird vor allem die Expression von *FTH1* induziert, während simultan die Transkription von *TFRC* reprimiert wird (zusammengefasst in Gozzelino et al., 2010). Eine ähnliche zelluläre Antwort konnte in den aufgenommenen Genexpressionsmustern nach Substanzbehandlung beobachtet werden.

Des Weiteren ist aus den dargestellten Genexpressionsprofilen ersichtlich, dass sich trotz Aktivierung von Nrf2 nicht alle Nrf2-abhängigen Gene induzieren ließen und sich ein individuelles Genexpressionsmuster für *CAT*, *G6PD*, *GCLC*, *GPX1*, *GSR*, *PRDX1*, *SOD2*, *TXN* und *TXNRD1* ergab. Aus der Literatur ist bekannt, dass diese Gene über Nrf2 reguliert werden können (zusammengefasst in Baird und Dinkova-Kostova, 2011). Zwar zeigte die zeitabhängige Inkubation mit 12,5 μM Sulforaphan und 20 μM Myrosinase-hydrolysiertem Gesamtglucosinolat-Extrakt aus Brokkoli, dass zahlreiche Nrf2-abhängige Gene induziert wurden, jedoch blieb beispielsweise die relative Expression der Nrf2-abhängigen Gene *GPX1* und *SOD2* unverändert. Aus diesem Grund ist anzunehmen, dass neben der Nrf2-vermittelten Induktion von Signalwegen noch weitere, bisher nicht im Detail untersuchte Mechanismen existieren müssen, über die die Genexpressionsinduktion von antioxidativen Enzymen reguliert wird. Studien deuten darauf hin, dass unter anderem Kinasen wie Proteinkinase C (PKC), Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) und MAP-Kinasen (MAPKs) an der Aktivierung von Nrf2 beteiligt sind und so die Signaltransduktion selektiv modulieren können (Huang et al., 2000; Keum et al., 2003). Ähnliche Effekte wurden bereits in einer Studie mit Indol-3-Carbinol, Sulforaphan und Allyl-Isothiocyanat beobachtet (Jeong et al., 2005). Zwar konnten alle drei Verbindungen den Transkriptionsfaktor Nrf2 aktivieren, jedoch waren die Halbwertszeit von Nrf2 und Art der Aktivierung von der jeweiligen Substanz abhängig. Ebenso korrelierte die Induktion von Nrf2-abhängigen Genen nicht immer mit der Stärke der Nrf2-Aktivierung. Die gleiche Erkenntnis kann aus den aufgenommenen Genexpressionsprofilen abgeleitet werden. Zwar induzierten alle drei Verbindungen Nrf2-abhängige Gene, jedoch waren die Anzahl von regulierten Genen und die Stärke der Induktion von der jeweiligen Testsubstanz abhängig.

Ein weiterer substanzspezifischer Effekt konnte auf die Expression von *MT1X* und *MT2A* beobachtet werden. Während Indol-3-Carbinol beide Gene zeitabhängig bis um das 3-fach induzierte, führte die Behandlung mit Sulforaphan und Myrosinase-hydrolysiertem Gesamtglucosinolat-Extrakt aus Brokkoli dahingegen zu einer Reprimierung der Expression. *MT1X* und *MT2A* kodieren für zwei Metallothionein (MT)-Isoformen und können über multiple Mechanismen reguliert werden. Neben der Regulation über das *metal response element* (MRE) kann die Expression über das *glucocorticoid responsive element* (GRE) und über das ARE gezielt modifiziert werden (zusammengefasst in Coyle et

al., 2002). Da die Aktivierung über das MRE primär durch Bindung eines Metalls an MT vermittelt wird, kann diese Form der Aktivierung in diesem Zusammenhang vernachlässigt werden. Auch die Aktivierung von Metallothionein über das GRE ist unwahrscheinlich, da es sich bei den verwendeten HCT 116-Zellen nicht um eine hormonsensitive Zelllinie handelt. Ob die induzierte Expression nach Inkubation mit Indol-3-Carbinol tatsächlich über die Aktivierung von Nrf2 und Bindung an das ARE verlief, ist schwer zu beurteilen. Auffällig ist in diesem Kontext, dass Indol-3-Carbinol als einzige der drei untersuchten Substanzen eine nachweisliche Affinität zum AhR besitzt und demzufolge einen wirksamen Agonisten darstellt. Obwohl Metallothionein-Gen keine typische XRE-Sequenz in der Promotorregion enthält, zeigten Studien mit anderen AhR-Agonisten, dass die Expression von *MT2A* durch die Bindung des ligandenabhängigen Transkriptionsfaktors an regulatorische Elemente induziert werden kann (Sato et al., 2013). Somit kann die Induktion von *MT1X* und *MT2A* theoretisch mit der Bindung von Indol-3-Carbinol an den AhR in einen Kontext gebracht werden.

Ferner kann über die mechanistischen Hintergründe der *MT1X*- und *MT2A*-Reprimierung nach Behandlung mit Sulforaphan und Myrosinase-hydrolysiertem Gesamtglucosinolat-Extrakt aus Brokkoli nur spekuliert werden. In diesen Zusammenhang wäre eine direkte Interaktion von Sulforaphan mit dem *metal-regulatory transcription factor 1* (MTF1) denkbar. Durch Aktivierung von MTF1 wird unter anderem die Expression von MT über das MRE induziert. Insofern wäre es möglich, dass Sulforaphan durch kovalente Bindung an sensitive Thiol-Gruppen von MTF1, die Bindung des Transkriptionsfaktors an die MRE-Sequenz blockierte. In der Konsequenz daraus, würde es zu einer Reprimierung der *MT1X*- und *MT2A*-Expression kommen. Dass Sulforaphan eine ausgeprägte Reaktivität gegenüber Thiol-Gruppen besitzt, konnte in der Literatur bereits gezeigt werden (Hanschen et al., 2012).

4.3.2.2 Einfluss auf Gene, die mit Fremdstoffmetabolismus assoziiert sind

In diesem Abschnitt ist der zeitabhängige Einfluss von Glucosinolat-Hydrolyseprodukten auf die Expression von Genen, die in Verbindung mit dem Fremdstoffmetabolismus stehen, dargestellt. Aus dem Genexpressionsprofil nach Inkubation mit 12,5 µM Sulforaphan ist zu entnehmen (Abbildung 21), dass vor allem *NQO1* zeitabhängig induziert wurde. Bereits nach 16-stündiger Sulforaphan-Behandlung wurde die Expression des Gens um das 2,3-fache induziert. Mit zunehmender Inkubationsdauer stieg die Transkriptmenge bis um das 2,6-fache nach 48 h an. Da *NQO1* eines der am häufigsten induzierten *downstream* Gene nach Nrf2-Aktivierung darstellt (zusammengefasst in Baird und Dinkova-Kostova, 2011), kann die Induktion primär auf die Sulforaphan-abhängige Induktion von Nrf2 zurückgeführt werden. Ferner kann die Induktion von *NQO1* als ein protektiver Mechanismus angesehen werden, da über die NAD(P)H:Chinon-

Oxidoreduktase die Detoxifikation von Chinonen zu Hydrochinonen katalysiert und die Bildung potenziell toxischer Semichinon-Radikalintermediate umgangen wird. Auf diese Weise ist es der Zelle möglich, sich gegen Chinon-induzierten oxidativen Stress zu schützen.

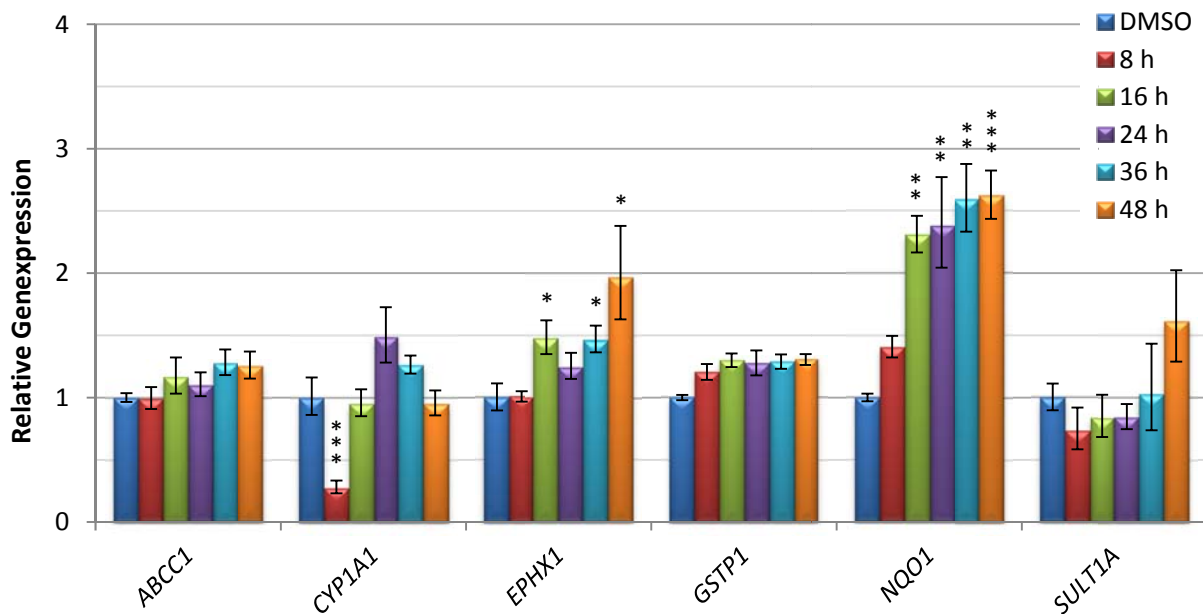


Abbildung 21: Einfluss einer zeitabhängigen Inkubation mit 12,5 µM Sulforaphan in HCT 116-Zellen auf die relative Genexpression von Genen, die in Verbindung mit dem Fremdstoffmetabolismus stehen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus zwei unabhängigen, in Dreifachbestimmung durchgeführten Versuchen \pm 95 % Konfidenzintervall. Statistisch signifikante Abweichung zur Kontrolle nach ANOVA mit Dunnett-T Post-Hoc-Test: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Ferner konnte nach Behandlung mit Sulforaphan eine Induktion der *EPHX1*-Expression um das 1,9-fache nach 48 h beobachtet werden. *EPHX1* kodiert für die Epoxidhydrolase 1, die sowohl bei der Aktivierung als auch bei der Inaktivierung von Fremdstoffen eine wichtige Rolle spielt. Da *EPHX1* unter anderem eine ARE-Sequenz in seiner Promotorregion trägt (Lee und Surh, 2005), wäre in diesem Kontext eine Aktivierung über Nrf2 denkbar. Welchen Einfluss die Induktion von *EPHX1* auf die zelluläre Homöostase in den HCT 116-Zellen in diesem Fall besitzt, ist schwer zu beurteilen, da Epoxidhydrolasen primär für den Abbau von toxischen Epoxiden zu Dihydrodiolen und damit für die Detoxifizierung verantwortlich sind. Des Weiteren ist aus dem Genexpressionsprofil zu entnehmen, dass Sulforaphan die Expression von *SULT1A1* nach 48 h um das 1,6-fache induziert. Bezieht man jedoch die Expressionsschwankungen mit in die Beurteilung ein, so relativiert sich der beobachtete Effekt.

Nur ein marginaler Einfluss konnte auf die Expression von *CYP1A1* nach Inkubation mit 12,5 µM Sulforaphan in den untersuchten HCT 116-Zellen beobachtet werden. Der ausgeprägten Reprimierung von *CYP1A1* nach bereits 8 h um das 4-fache folgte im weiteren Verlauf eine Reversion

des Effekts, indem es zu einer Überkompensation der CYP-Expression kam, so dass nach 48 h kein Einfluss mehr detektiert werden konnte. Ebenso konnte die in der Literatur beschriebene Induktion von *GSTP1* nach Sulforaphan-Behandlung in den verwendeten HCT 116-Zellen zu keinem Zeitpunkt beobachtet werden. *GSTP1* kodiert für die Glutathione-S-transferase P, die unter anderem die Konjugationsreaktion von Xenobiotika an Glutathion katalysiert. Wie bereits erwähnt wurde, konnte davon ausgegangen werden, dass Sulforaphan nach der Resorption in die Zelle unmittelbar an Glutathion konjugierte. Insofern war es überraschend, dass die Expression von *GSTP1* durch die Behandlung mit Sulforaphan nicht beeinflusst wurde.

Ein nahezu identisches Genexpressionsprofil wurde nach Inkubation mit 20 µM Myrosinase-hydrolysiertem Gesamtglucosinolat-Extrakt aus Brokkoli erhalten (Abbildung 22). Lediglich die Induktion von *NQO1* und *EPHX1* war im Vergleich zur Sulforaphan-Behandlung geringfügig ausgeprägter, was wiederum auf synergistische Effekte einzelner Glucosinolat-Hydrolyseprodukte im Extrakt schließen lässt.

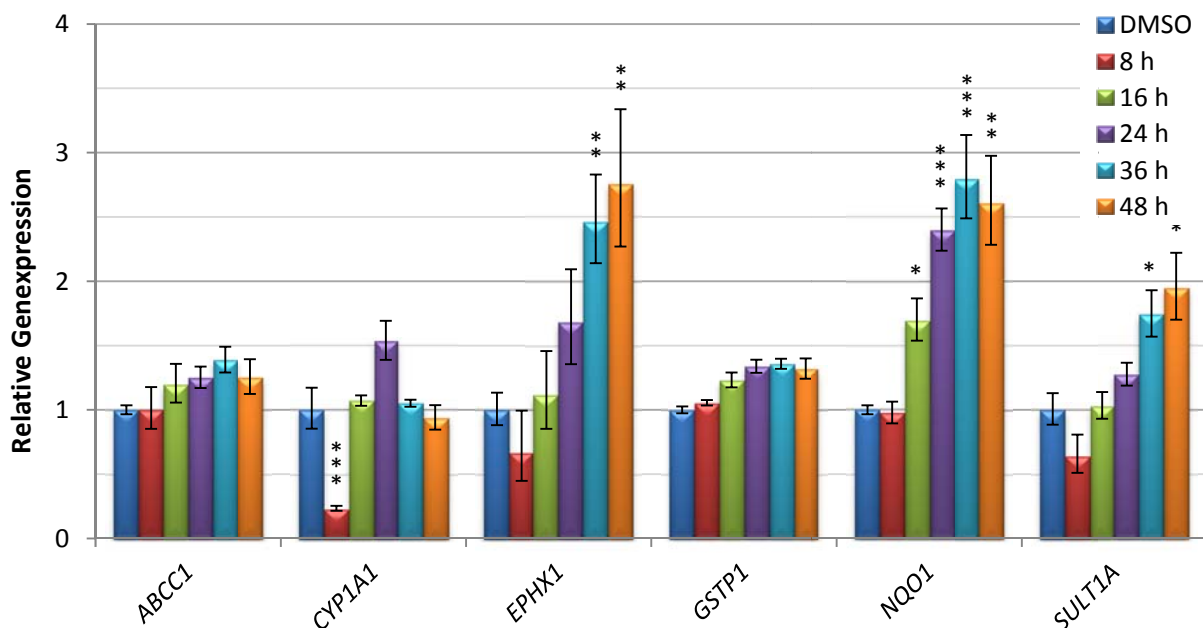


Abbildung 22: Einfluss einer zeitabhängigen Inkubation mit 20 µM Myrosinase-hydrolysiertem Gesamtglucosinolat-Extrakt aus Brokkoli in HCT 116-Zellen auf die relative Genexpression von Genen, die in Verbindung mit dem Fremdstoffmetabolismus stehen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus zwei unabhängigen, in Dreifachbestimmung durchgeführten Versuchen \pm 95 %-Konfidenzintervall. Statistisch signifikante Abweichung zur Kontrolle nach ANOVA mit Dunnett-T Post-Hoc-Test: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Ein komplett anderes Expressionsprofil ergab sich nach Inkubation mit 500 µM Indol-3-Carbinol (Abbildung 23). Bereits nach 8 h konnte eine starke Induktion der relativen Genexpression von *CYP1A1* um das 5-fache detektiert werden. Im weiteren Verlauf stieg die Expression bis um das 9-fache und erreichte ein Maximum nach 24 h. Untersuchen mit Indol-3-Carbinol in niedrigen

Konzentrationsbereichen zeigten, dass die Induktion von *CYP1A1* schon ab 50 μM ein signifikantes Niveau erreichte (Daten nicht dargestellt). Demnach wurde die Expression nach 24 h um das 1,8-fache induziert. In diesem Zusammenhang ist festzuhalten, dass bei dieser Konzentration weder ein Einfluss auf Zellviabilitätsparameter wie Zellzahl und Koloniebildungsfähigkeit noch ein Einfluss auf die Expression weiterer Gene festgestellt werden konnte. Weshalb die Induktion von *CYP1A1* nicht nach Behandlung mit Myrosinase-hydrolysiertem Gesamtglucosinolat-Extrakt aus Brokkoli beobachtet werden konnte, lässt sich vermutlich darauf zurückführen, dass der Extrakt lediglich 0,07 % Glucobrassicin enthielt und die freigesetzte Indol-3-Carbinol-Menge zu gering war, um die Expression von *CYP1A1* signifikant zu induzieren.

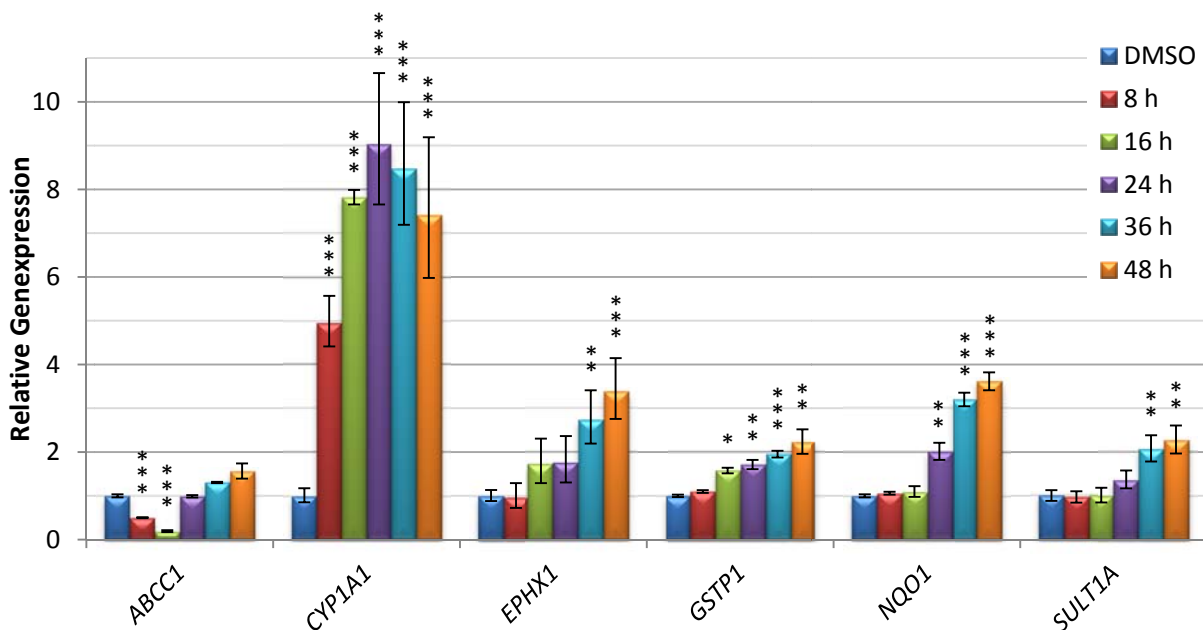


Abbildung 23: Einfluss einer zeitabhängigen Inkubation mit 500 μM Indol-3-Carbinol in HCT 116-Zellen auf die relative Genexpression von Genen, die in Verbindung mit dem Fremdstoffmetabolismus stehen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus zwei unabhängigen, in Dreifachbestimmung durchgeführten Versuchen \pm 95 %-Konfidenzintervall. Statistisch signifikante Abweichung zur Kontrolle nach ANOVA mit Dunnett-T Post-Hoc-Test: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Aus der Literatur ist bekannt, dass mit der Induktion von CYP-Isoformen nicht nur die Bildung reaktiver Intermediate beschleunigt und so die genomische Integrität negativ beeinflusst werden kann, sondern mit einer erhöhten CYP-Aktivität kann unter Umständen auch eine gesteigerte ROS-Produktion assoziiert sein. In einer *in vivo*-Studie von Shimamoto et al. wurde postuliert, dass aus der Induktion von CYP-Isoformen nach Gabe von Indol-3-Carbinol eine gesteigerte ROS-Produktion resultierte (Shimamoto et al., 2011). Dabei wurde die These vertreten, dass die Metabolisierung von Indol-3-Carbinol zur Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies führte.

Insofern könnte die Induktion von *CYP1A1* einen weiteren möglichen Mechanismus darstellen, über den ROS in den HCT 116-Zellen induziert wurden.

Weiterhin lässt sich aus dem Expressionsmuster eine klare Hierarchie ableiten, da die Induktion von *EPHX1*, *GSTP1*, *NQO1* und *SULT1A1* im Vergleich zu *CYP1A1* erst mit einer zeitlichen Verzögerung einsetzte. Mechanistisch wäre die Induktion von *EPHX1*, *GSTP1*, *NQO1* und *SULT1A1* durch die Aktivierung von Nrf2 denkbar. In diesem Kontext ist zu berücksichtigen, dass der Metabolismus von Indol-3-Carbinol bzw. 3,3'-Diindolylmethan unter anderem über Epoxidhydrolasen und Sulfotransferasen verläuft. Insofern könnte die Aktivierung von *EPHX1* und *SULT1A1* in Verbindung mit dem Metabolismus der Substanzen gebracht werden. Resultierend aus den Ergebnissen lässt sich festhalten, dass Indol-3-Carbinol als ein bifunktionaler Induzierer angesehen werden kann, der sowohl Phase-1- als auch Phase-2-Enzyme des Fremdstoffmetabolismus induziert. Darüber hinaus ist zu resümieren, dass sich die erhaltenen Genexpressionsergebnisse sehr gut in bereits publizierte Daten integrieren lassen. Obwohl es sich bei den verwendeten HCT 116-Zelle um eine immortalisierte Krebszelllinie handelte, konnten zahlreiche Analogien zu bisher veröffentlichten Studien beobachtet werden.

Ein weiterer Unterschied im aufgenommenen Genexpressionsprofil war die ausgeprägte Reprimierung von *ABCC1* nach Behandlung mit Indol-3-Carbinol. Nach einer Inkubationszeit von 16 h konnte nur noch das 0,2-fache der ursprünglichen Transkriptmenge detektiert werden. Prinzipiell wird die Transkriptmenge über die transkriptionelle und posttranskriptionelle Regulation gesteuert. Insofern wäre es denkbar, dass Indol-3-Carbinol entweder die Transkription des Gens blockierte oder die Stabilität der mRNA über RNA-Interferenz negativ beeinflusste. Über welchen Mechanismus die Regulation der mRNA stattgefunden hat, kann mit der verwendeten Methode nicht geklärt werden. Dass Indol-3-Carbinol den Efflux von Xenobiotika durch Modulation von ABC-Transportern verhindern kann, konnte in Studien bereits gezeigt werden (Arora et al., 2005). Demnach zeigte Indol-3-Carbinol einen inhibitorischen Effekt auf die Expression von P-Glykoproteinen, die in Verbindung mit der Entwicklung einer *multiple drug resistance* stehen. Ob Indol-3-Carbinol in diesem Kontext einen Einfluss auf die Expression von *ABCC1* besitzt, wurde bislang noch nicht untersucht. Somit zeigen die Ergebnisse erstmalig, dass die Verbindung neben *ABCB1* auch die Expression von *ABCC1* modulieren kann.

4.3.2.3 Einfluss auf Gene, die mit dem Zellzyklus assoziiert sind

Im Rahmen der durchgeführten Genexpressionsuntersuchungen wurde unter anderem der Einfluss von Glucosinolat-Hydrolyseprodukten auf die Expression wichtigen Zellzykluskontrollgenen in HCT 116-Zellen analysiert. Die erhaltenen Ergebnisse nach Inkubation mit 12,5 µM Sulforaphan sind

in Abbildung 24 dargestellt. Im aufgenommenen Genexpressionsprofil ist zu erkennen, dass Sulforaphan bereits nach 8 h die Expression von *CDKN1A* um das 1,5-fache induzierte. Im weiteren Verlauf war ein deutlicher Anstieg der Transkriptmenge um das 3,5-fache nach 24 h und 4,7-fache nach 48 h zu beobachten. Erst nach 36 h erfolgte zeitlich verzögert die Aktivierung von *CDKN2B* um das 1,5-fache. Aus der Literatur ist bereits bekannt, dass eine Behandlung mit Sulforaphan zu einer signifikanten Induktion von *CDKN1A* führt (Hu et al., 2006; Myzak et al., 2006).

Ein nahezu identisches Expressionsmuster wurde nach Behandlung mit 20 µM Myrosinase-hydrolysiertem Gesamtglucosinolat-Extrakt aus Brokkoli erhalten (siehe Anhang 8.7.2.5).

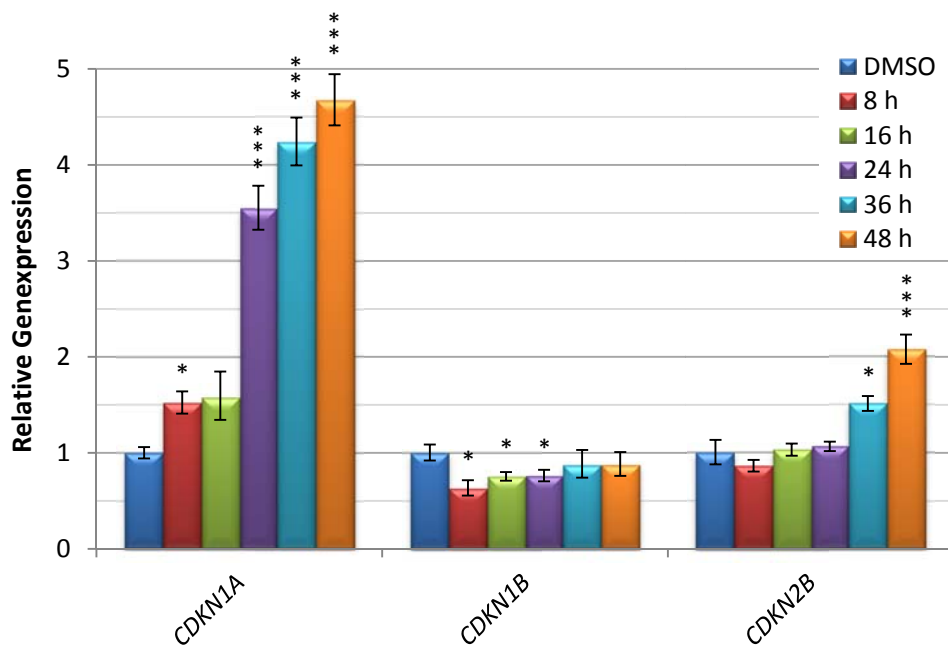


Abbildung 24: Einfluss einer zeitabhängigen Inkubation mit 12,5 µM Sulforaphan in HCT 116-Zellen auf die relative Genexpression von Genen, die für zellzyklusregulierende Proteine kodieren. Dargestellt sind die Mittelwerte aus zwei unabhängigen, in Dreifachbestimmung durchgeführten Versuchen ± 95 %-Konfidenzintervall. Statistisch signifikante Abweichung zur Kontrolle nach ANOVA mit Dunnett-T Post-Hoc-Test: * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

Noch deutlichere Effekte wurden nach Inkubation mit 500 µM Indol-3-Carbinol erhalten (Abbildung 25). Bereits nach 8 h wurde die Expression von *CDKN1A* um das 2,8-fache und *CDKN2B* um das 1,5-fache induziert. Im weiteren Verlauf kam es vor allem nach 36 h zu einem besonders intensiven Anstieg der Transkriptmenge, die nach 48 h ein Maximum erreichte. So wurde die relative Genexpression von *CDKN1A* um das 10,8-fache und von *CDKN2B* um das 3,9-fache nach 48 h induziert. Im Gegensatz zur Inkubation mit Sulforaphan wurde zusätzlich noch *CDKN1B* nach Inkubation mit Indol-3-Carbinol aktiviert. Die deutliche Induktion von allen drei Kinase-Inhibitoren ist ein sensibler Marker für das vermehrte Auftreten von genotoxischem Stress. Diese Annahme wird durch die simultane Induktion von *TP53* und *MDM2* weiter gestützt (vgl. Abbildung 27).

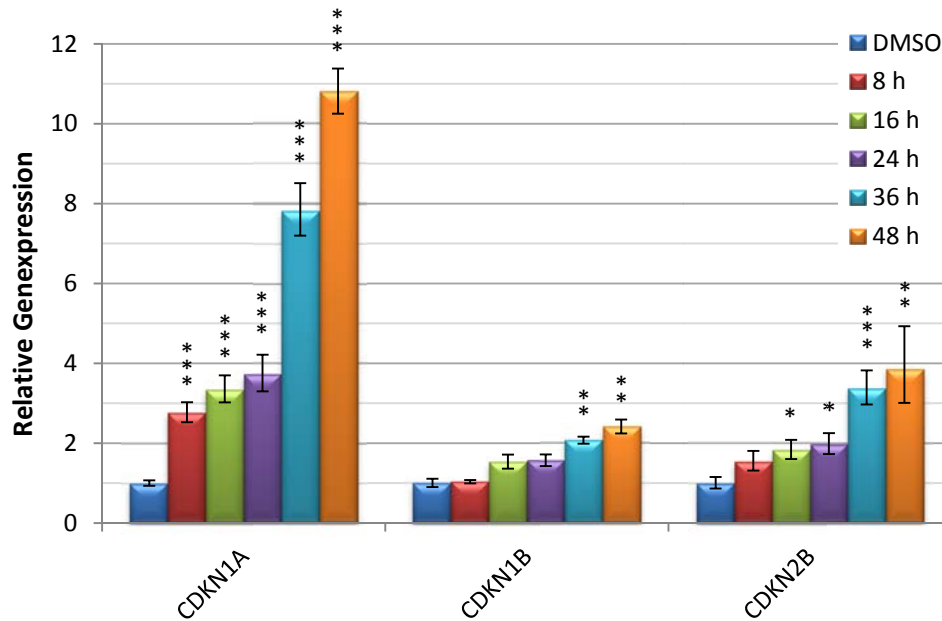


Abbildung 25: Einfluss einer zeitabhängigen Inkubation mit 500 µM Indol-3-Carbinol in HCT 116-Zellen auf die relative Genexpression von Genen, die für zellzyklusregulierende Proteine kodieren. Dargestellt sind die Mittelwerte aus zwei unabhängigen, in Dreifachbestimmung durchgeführten Versuchen \pm 95 %-Konfidenzintervall. Statistisch signifikante Abweichung zur Kontrolle nach ANOVA mit Dunnett-T Post-Hoc-Test: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

4.3.2.4 Einfluss auf Gene, die für Transkriptionsfaktoren kodieren

Im Allgemeinen beeinflussen spezifische Transkriptionsfaktoren die Ablesehäufigkeit eines Gens in der Form, dass sie die Transkription entweder selektiv induzieren oder reprimieren. Häufig werden spezifische Transkriptionsfaktoren über sogenannte autoregulatorische *feedback loops* reguliert, so dass die Induktion von spezifischen *downstream* Genen Anhaltspunkte für die Aktivierung eines Transkriptionsfaktors geben können. Im Rahmen der durchgeführten Genexpressionsanalysen wurde unter anderem die Expression der Transkriptionsfaktoren p53 und Nrf2 untersucht.

Der Einfluss einer zeitabhängigen Inkubation mit 12,5 µM Sulforaphan auf die Expression von Genen, die Teil eines Feedback-Mechanismus sind sowie für Transkriptionsfaktoren kodieren, ist in Abbildung 26 dargestellt. Insgesamt konnte nur ein marginaler Einfluss von Sulforaphan auf die Expression dieser Gene in HCT 116-Zellen beobachtet werden. So wurde die Transkriptmenge von TP53 zeitabhängig bis um das 1,7-fache induziert. TP53 kodiert für den Transkriptionsfaktor p53, der eine zentrale Rolle in der Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität spielt und deshalb auch als „Wächter des Genoms“ bezeichnet wurde (Lane, 1992). Wie einige andere Transkriptionsfaktoren auch, unterliegt p53 sowohl einem negativen als auch positiven Feedback-Mechanismus (Harris und Levine, 2005). In diesem Kontext ist es möglich, dass p53 sowohl die eigene Expression (positiver Feedback) als auch die Expression von MDM2 (negativer Feedback) induzieren kann. Insofern könnte

die Induktion von *MDM2* um das bis zu 1,7-fache nach 36-stündiger Sulforaphan-Behandlung erklärt werden.

Entgegen der Erwartungen wurde die Transkriptmenge von *NFE2L2*, das für den Transkriptionsfaktor Nrf2 kodiert, nach Inkubation mit Sulforaphan nicht wesentlich erhöht. Zwar wurde *NFE2L2* nach 8 h um das 1,7-fache induziert, jedoch kam es im weiteren Verlauf zur Reprimierung der Transkription. Obwohl die Aktivierung von Nrf2 durch Sulforaphan intensiv untersucht wurde, sind bisher keine Daten zum Einfluss von Sulforaphan auf die Expression von *NFE2L2* publiziert. Weiterhin ist aus dem aufgenommenen Genexpressionsprofil die Induktion von *KEAP1* nach 8 h um das 1,9-fache zu erkennen. *KEAP1* kodiert für das gleichnamige Protein, das Nrf2 im Cytosol bindet und so dem proteasomalen Abbau zuführt. Ähnlich wie bei MDM2 und p53 stellt die Induktion von Keap1 durch Nrf2 einen spezifischen negativen Feedback-Mechanismus dar, über den die induzierte Nrf2-Signalkaskade wieder abgeschaltet werden kann (zusammengefasst in Lee et al., 2007). Insofern deutet die gesteigerte Transkriptmenge von *NFE2L2* und *KEAP1* darauf hin, dass Nrf2 möglicherweise unmittelbar nach Behandlung mit Sulforaphan aktiviert wurde. Über den Mechanismus der Nrf2-Aktivierung kann in diesem Zusammenhang nur spekuliert werden. Denkbar wäre sowohl eine kovalente Bindung von Sulforaphan an reaktive Cysteinreste von Keap1 als auch eine selektive Modifikation von redoxsensitiven Seitenketten durch ROS.

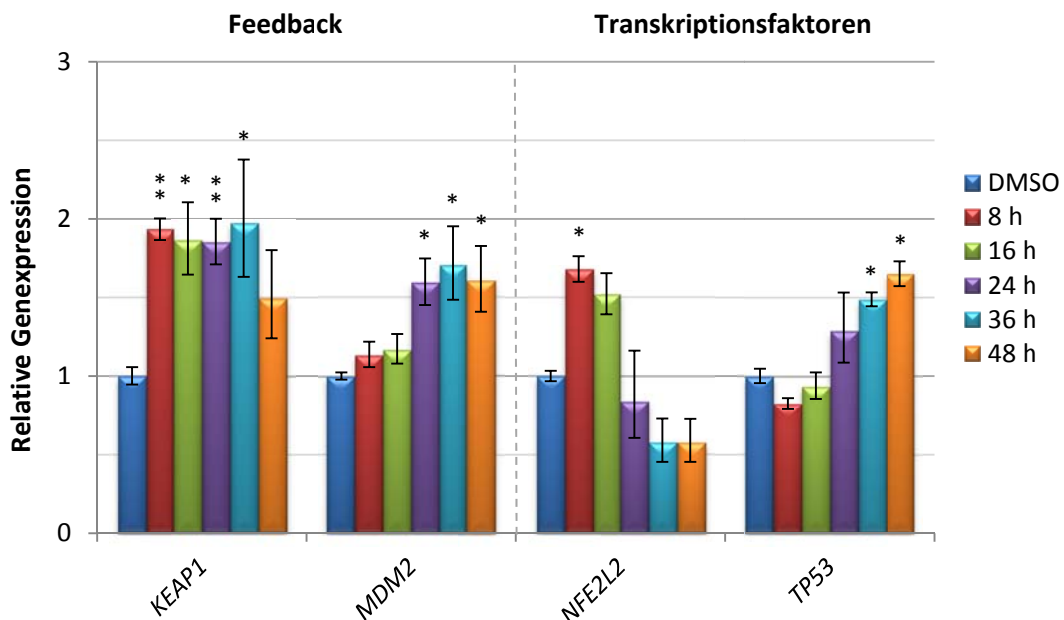


Abbildung 26: Einfluss einer zeitabhängigen Inkubation mit 12,5 µM Sulforaphan in HCT 116-Zellen auf die relative Genexpression von Genen, die Teil eines Feedback-Mechanismus sind und für Transkriptionsfaktoren kodieren. Dargestellt sind die Mittelwerte aus zwei unabhängigen, in Dreifachbestimmung durchgeführten Versuchen ± 95 %-Konfidenzintervall. Statistisch signifikante Abweichung zur Kontrolle nach ANOVA mit Dunnett-T Post-Hoc-Test: * p < 0,05; ** p < 0,01.

Ein vergleichbares Expressionsmuster wurde nach Behandlung mit 20 μ M Myrosinase-hydrolysiertem Gesamtglucosinolat-Extrakt aus Brokkoli erhalten (siehe Anhang 8.7.2.5). Bis auf Expressionsunterschiede von *NFE2L2* wurde ein nahezu identisches Expressionsmuster detektiert.

Deutlichere Effekte hingegen konnten nach Behandlung mit Indol-3-Carbinol beobachtet werden (Abbildung 27). Sowohl die Transkriptmenge von *TP53* und *MDM2* als auch von *NFE2L2* und *KEAP1* wurden zeitabhängig induziert. Dabei wurde nach 48 h die stärkste Aktivierung beobachtet. So führte die Behandlung mit Indol-3-Carbinol zu einer signifikanten Erhöhung der *MDM2*-Transkriptmenge um das 3-fache sowie von *TP53* um 2,8-fache nach 48 h. Aus der Literatur ist bekannt, dass die Regulation von p53 hauptsächlich über posttranslationale Modifikationen erfolgt und der positive Feedback-Mechanismus primär durch kontinuierlichen, genotoxischen Stress aktiviert wird (Harris und Levine, 2005). Insofern war die signifikante Induktion von *TP53* nach Behandlung mit Indol-3-Carbinol überraschend.

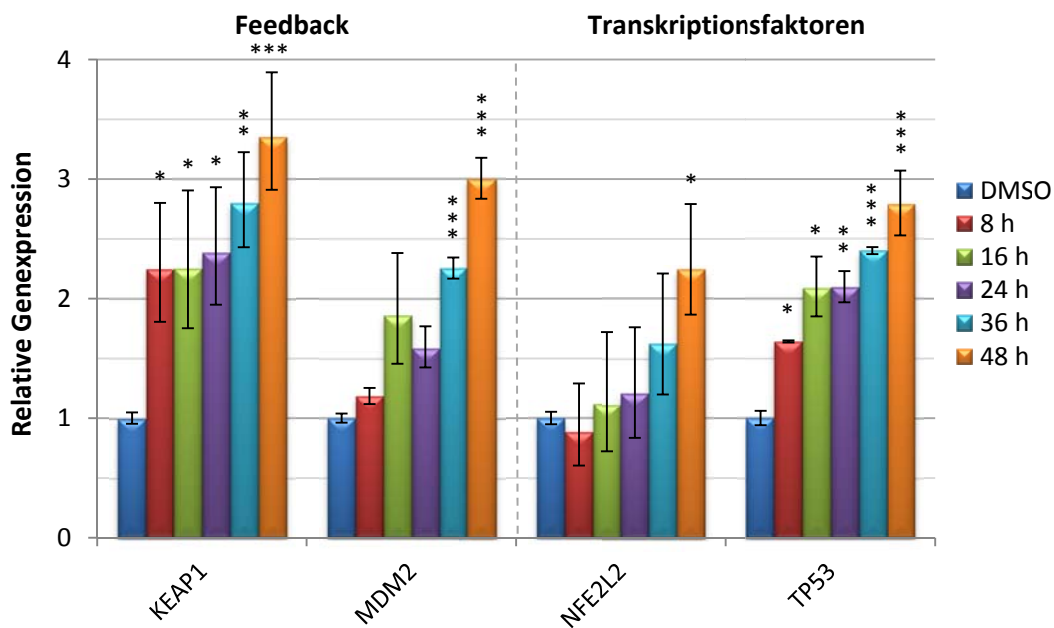


Abbildung 27: Einfluss einer zeitabhängigen Inkubation mit 500 μ M Indol-3-Carbinol in HCT 116-Zellen auf die relative Genexpression von Genen, die Teil eines Feedback-Mechanismus sind und für Transkriptionsfaktoren kodieren. Dargestellt sind die Mittelwerte aus zwei unabhängigen, in Dreifachbestimmung durchgeführten Versuchen \pm 95 %-Konfidenzintervall. Statistisch signifikante Abweichung zur Kontrolle nach ANOVA mit Dunnett-T Post-Hoc-Test: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Wie bereits aus dem Expressionsprofil von oxidativen Stressgenen nach Inkubation mit Indol-3-Carbinol zu erkennen war (vgl. Abbildung 20), wurden zahlreiche Nrf2-abhängige Gene induziert. Ein weiterer Anhaltspunkt dafür, dass Nrf2 möglicherweise aktiviert wurde, zeigte die Induktion von *KEAP1* und *NFE2L2*. So wurde die relative Geneexpression von *KEAP1* und *NFE2L2* um das 3,4-fache bzw. 2,3-fache nach 48 h zeitabhängig induziert. Ähnlich wie bei Sulforaphan kann über den

Mechanismus nur spekuliert werden. Obwohl Indol-3-Carbinol im Gegensatz zu Sulforaphan keine klassische Isothiocyanat-Struktur aufweist, konnte eine Reaktivität gegenüber Thiol-Gruppen beobachtet werden (Staub et al., 2002). Somit wäre theoretisch die direkte Modifikation von Keap1 durch kovalente Bindung von Indol-3-Carbinol möglich.

4.3.2.5 Einfluss auf Gene, die mit der DNA-Reparatur assoziiert sind

Die genomische Stabilität einer Zelle wird kontinuierlich durch das Einwirken von endo- und exogenen Faktoren beeinträchtigt. Um adäquat auf die unterschiedlichen DNA-Schäden zu reagieren, haben sich im Laufe der Evolution effiziente Reparaturmechanismen entwickelt. So lässt sich die DNA-Reparatur in Basen-Exzisions-Reparatur (BER), Nukleotid-Exzisions-Reparatur (NER), Mismatch-Reparatur (MMR) und Doppelstrangbruch-Reparatur gliedern (Hoeijmakers, 2001). Im Rahmen der Arbeit wurde unter anderem der Einfluss von Glucosinolat-Hydrolyseprodukten auf die Expression von Genen, die in Verbindung mit DNA-Reparatur stehen, untersucht. Um eine bessere Übersicht zu erhalten, wurden die Gene nach ihrer Zugehörigkeit zu DNA-Reparaturwegen geordnet.

Im Vergleich zu anderen Signalwegen zeigte die zeitabhängige Inkubation mit 12,5 µM Sulforaphan in den untersuchten HCT 116-Zellen nur einen marginalen Einfluss auf die Expression von Genen, die an der DNA-Reparatur beteiligt sind (Abbildung 28). Am deutlichsten waren die Expressionsunterschiede bei Genen, deren Proteine in der NER von zentraler Bedeutung sind. Auffällig war, dass einige Gene dieses Reparaturwegs einer mehr oder minder starken Reprimierung innerhalb der ersten 16 h unterworfen waren. Ausgeprägt war dieser Effekt vor allem bei den Genen *ERCC2*, *ERCC5* und *XPA*, deren kodierte Proteine für die Ausbildung des Präinzisionskomplexes eine wichtige Rolle spielen. Im weiteren Verlauf zeigte das Expressionsprofile dieser Gene eine Reversion der relativen Genexpression. Zuvor reprimierte Gene wurden im Anschluss in einer Art Überkompensation induziert. Über die mechanistischen Hintergründe der ausgeprägten Reprimierung kann in diesem Zusammenhang nur spekuliert werden. Denkbar wäre, dass Sulforaphan durch kovalente Bindung an zelluläre Zielstrukturen wie Transkriptionsfaktoren selektiv die Transkription von DNA-Reparaturgenen blockierte. Resultierend aus diesen Ergebnissen kann abgeleitet werden, dass die Behandlung mit Sulforaphan zu einer Reprimierung der Expression von DNA-Reparaturgenen zu frühen Zeitpunkten führte, die im weiteren Verlauf wieder kompensiert wurde.

Dass Sulforaphan gerade die frühe Reparaturphase inhibieren kann, zeigten bereits Daten aus dem eigenen Arbeitskreis (Piberger, 2014). Demnach war Sulforaphan in der Lage, selektiv die Reparatur von (+)-anti-BPDE-induzierten DNA-Addukten zu inhibieren. Ob in diesem Kontext die Reprimierung von DNA-Reparaturgenen eine wichtige Rolle spielt, ist schwer zu beurteilen, zumal die Reparatur

von DNA-Schäden unmittelbar nach Schadenssetzung durch bereits vorhandene DNA-Reparaturproteine eingeleitet wird.

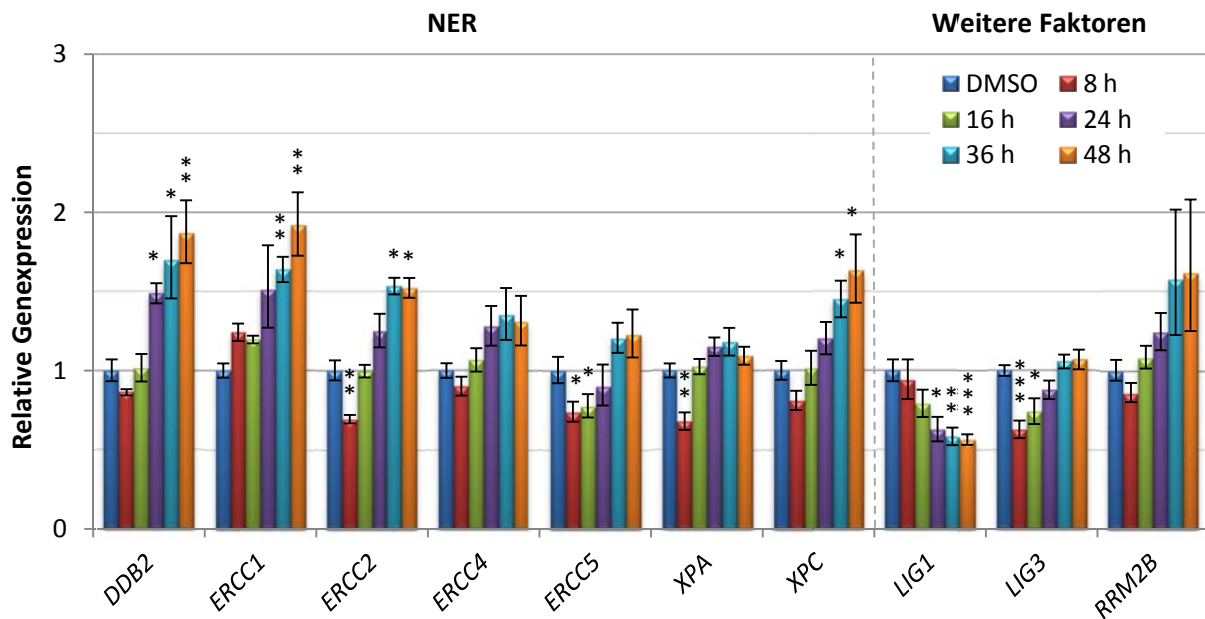


Abbildung 28: Einfluss einer zeitabhängigen Inkubation mit 12,5 µM Sulforaphan in HCT 116-Zellen auf die relative Genexpression von Genen, die in Verbindung mit DNA-Reparaturprozessen stehen. Einteilung der Gene nach Nukleotid-Exzisions-Reparatur (NER) und allgemein mit der DNA-Reparatur in Verbindung stehenden Gene. Dargestellt sind die Mittelwerte aus zwei unabhängigen, in Dreifachbestimmung durchgeführten Versuchen \pm 95 %-Konfidenzintervall. Statistisch signifikante Abweichung zur Kontrolle nach ANOVA mit Dunnett-T Post-Hoc-Test: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Weiterhin wurden vor allem *DDB2* und *XPC*, deren Proteine essentiell für die Schadenserkenkung sind, nach Inkubation mit Sulforaphan zeitabhängig beginnend ab 24 h induziert. Im weiteren Verlauf stieg die relative Expression von *DDB2* bis um das 2-fache nach 48 h an. Neben diesen beiden Genen wurde *ERCC1* im gleichen Maße induziert. *ERCC1* kodiert für das gleichnamige Protein, das zusammen mit der Endonuklease XPF Teil des Präzisionskomplexes ist, über den vor allem die Inzision und DNA-Reparatur-Synthese von sperrigen, helixverzerrenden DNA-Schäden erfolgt.

Als allgemein mit der DNA-Reparatur in Verbindung stehende Gene wurde *LIG1*, *LIG3* und *RRM2B* klassifiziert und keinem konkreten Reparaturweg zugeordnet, weil sie sowohl in der NER und BER als auch MMR involviert sind. Zu erkennen ist, dass vor allem die Expression von *RRM2B* nach 36 h um das 1,6-fache induziert wurde. *RRM2B* kodiert für die Ribonukleotid-Reduktase M2B, die für die Reduzierung der Nukleotiddiphosphate in ihre jeweiligen Desoxyribonukleotiddiphosphate verantwortlich ist. Ob *RRM2B* für die Bereitstellung von Desoxyribonukleotiden zur DNA-Reparatur induziert wurde, kann nicht beurteilt werden, zumal die Induktion von weiteren Reparaturgenen marginal ausfiel. Eine starke Reprimierung hingegen wurde zeitabhängig auf *LIG1* und anfänglich auch auf *LIG3* nach Sulforaphan-Inkubation detektiert. Die Inkubation mit Sulforaphan führte dazu,

dass die Transkriptmenge von *LIG1* im Vergleich zur Kontrolle nach 48 h um 50 % reduziert war. Der Grund für die signifikante Reprimierung könnte sowohl ein gezielter Abbau der mRNA durch induzierte RNA-Interferenz als auch eine Transkriptionsblockade durch kovalente Bindung von Sulforaphan an zelluläre Strukturen sein. Beide Gene kodieren für Proteine, die bei der DNA-Reparatur für die Verknüpfung zweier DNA-Stränge zu einem DNA-Strang benötigt werden. Insofern geben die Expressionsergebnisse einen Anhaltspunkt dafür, dass Sulforaphan möglicherweise die Ligation zu späteren Zeitpunkten inhibieren könnte. Einen Einfluss von Sulforaphan auf die Expression von Genen, deren Proteine in der BER beteiligt sind, konnte zu keinem Zeitpunkt festgestellt werden. In der Literatur sind bis dato auch noch keine systematischen Studien zum Einfluss von Sulforaphan auf die Expression von DNA-Reparaturgenen publiziert, so dass die Daten erstmalig den Einfluss von Sulforaphan auf die Expression von DNA-Reparaturgenen zeigen.

Die Inkubation mit 20 µM Myrosinase-hydrolysiertem Gesamtglucosinolat-Extrakt aus Brokkoli lieferte im Vergleich zur Sulforaphan-Behandlung ein annähernd identisches Genexpressionsmuster (Abbildung 29).

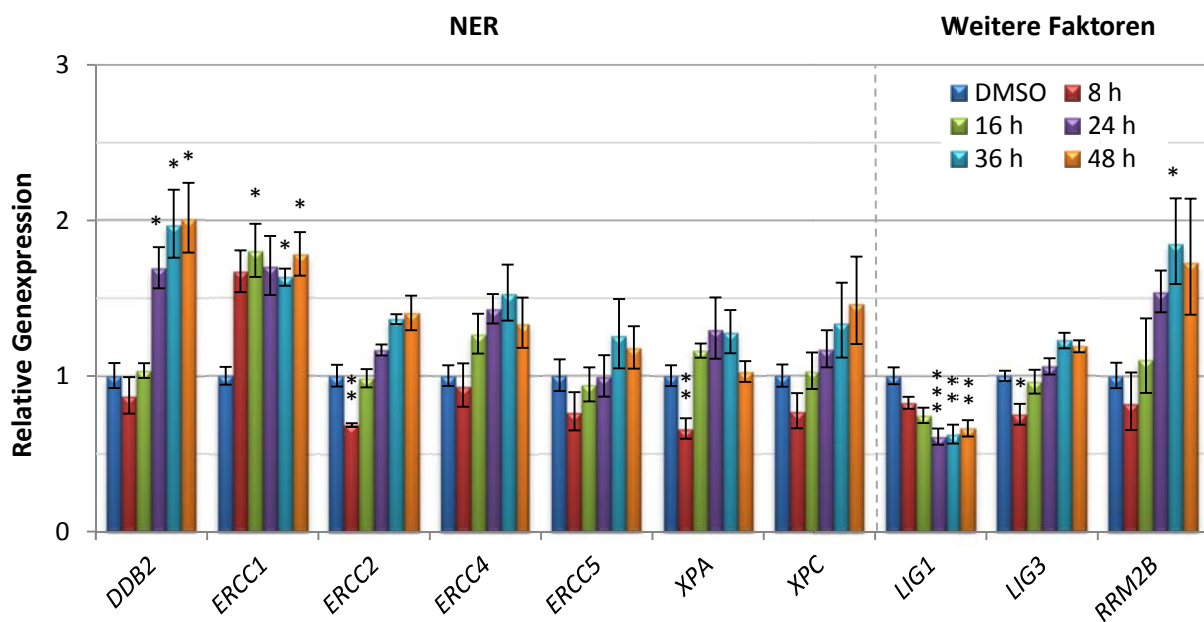


Abbildung 29: Einfluss einer zeitabhängigen Inkubation mit 20 µM Myrosinase-hydrolysiertem Gesamtglucosinolat-Extrakt aus Brokkoli in HCT 116-Zellen auf die relative Genexpression von Genen, die in Verbindung mit DNA-Reparaturprozessen stehen. Einteilung der Gene nach Nukleotid-Exzisions-Reparatur (NER) und allgemein mit der DNA-Reparatur in Verbindung stehenden Gene. Dargestellt sind die Mittelwerte aus zwei unabhängigen, in Dreifachbestimmung durchgeführten Versuchen ± 95 %-Konfidenzintervall. Statistisch signifikante Abweichung zur Kontrolle nach ANOVA mit Dunnett-T Post-Hoc-Test: * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001.

Neben *ERCC1* wurde vor allem die Expression von *DDB2* und *RRM2B* zeitabhängig induziert. Resultierend aus den erhaltenen Genexpressionsprofilen nach Inkubation mit Sulforaphan und

Myrosinase-hydrolysiertem Gesamtglucosinolat-Extrakt aus Brokkoli lässt sich damit festhalten, dass beide Verbindungen nur einen marginalen Einfluss auf die Expression von DNA-Reparaturgenen besaßen.

Ein abweichendes Genexpressionsprofil im Vergleich zur Sulforaphan-Behandlung wurde nach Inkubation mit 500 μ M Indol-3-Carbinol erhalten (Abbildung 30). Die Inkubation zeigte eine wesentlich stärkere Induktion von Genen, die für essentielle NER-Proteine kodieren. So kam es zur zeitabhängigen Expressionserhöhung der Gene *DDB1*, *DDB2*, *ERCC1*, *ERCC2*, *ERCC4*, *ERCC5*, *XPA* und *XPC* in den untersuchten HCT 116-Zellen. Vor allem nach 36 h war eine deutliche Induktion von *DDB2* um das 2,0-fache, *ERCC1* um das 3,2-fache sowie von *ERCC5* um das 2,3-fache und von *XPC* um das 2,5-fache zu beobachten. Im weiteren Verlauf der Analyse stieg die Expression der Gene noch weiter, so dass nach 48 h die maximale Induktion detektiert wurde. Simultan wurde die Expression von *LIG3* um das 1,6-fache, *POLB* um das 1,9-fache und *RRM2B* um das 2,7-fache nach 36 h selektiv induziert. Auch für diese Gene wurde die maximale Transkriptmenge nach 48-stündiger Indol-3-Carbinol-Behandlung detektiert. Konträr zur Expression von *LIG3* und *POLB*, wurde die Expression von *LIG1* und *POLD1* zeitabhängig reprimiert. So konnte nach 48 h nur die 0,5-fache *LIG1*-Expression und 0,7-fache *POLD1*-Expression erfasst werden. Weshalb *LIG1* und *POLD1* selektiv inhibiert und nicht aktiviert wurden, kann nicht beurteilt werden. Auffällig ist jedoch, dass jede Inkubation unabhängig von der untersuchten Substanz zur Reprimierung von *LIG1* führte.

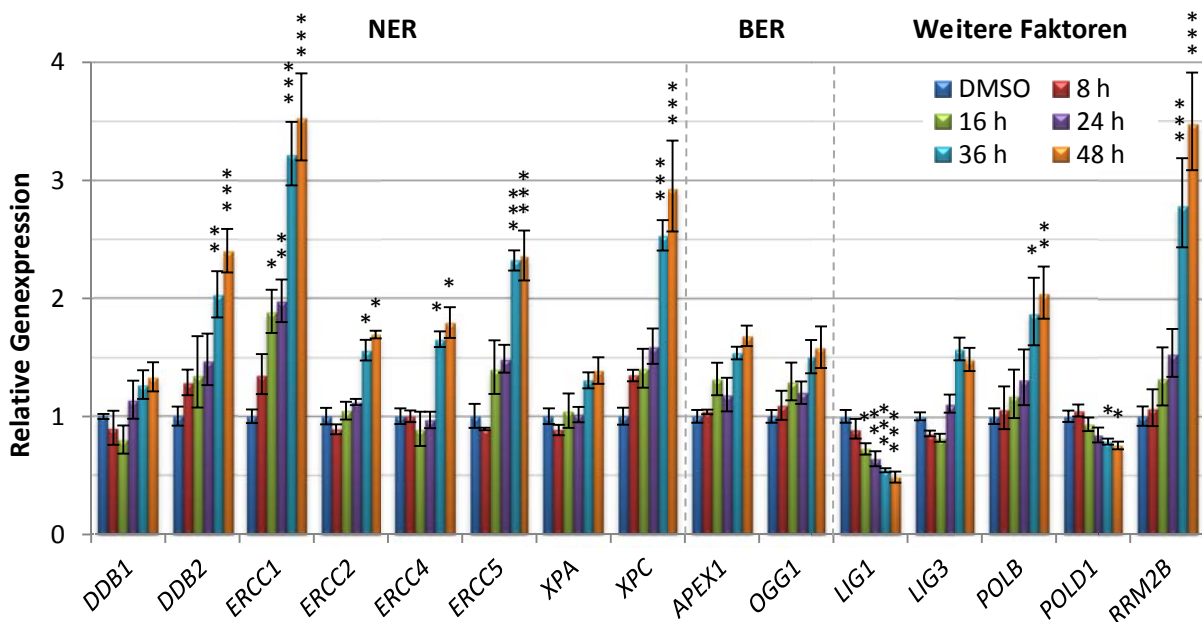


Abbildung 30: Einfluss einer zeitabhängigen Inkubation mit 500 μ M Indol-3-Carbinol in HCT 116-Zellen auf die relative Genexpression von Genen, die in Verbindung mit DNA-Reparaturprozessen stehen. Einteilung der Gene nach Nukleotid-Exzisions-Reparatur (NER), Basen-Exzisions-Reparatur (BER) und allgemein mit der DNA-Reparatur in Verbindung stehenden Gene. Dargestellt sind die Mittelwerte aus zwei unabhängigen, in Dreifachbestimmung durchgeführten Versuchen \pm 95 %-Konfidenzintervall. Statistisch signifikante Abweichung zur Kontrolle nach ANOVA mit Dunnett-T Post-Hoc-Test: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Die parallele Induktion von Genen der NER sowie von *LIG3*, *POLB* und *RRM2B* können als Indikator für eine induzierte DNA-Reparatur und –Synthese angesehen werden. Darüber hinaus passt das erhaltene Genexpressionsprofil zu dem in der Literatur beschriebenen induzierten DNA-Schadensspektrum von Indol-3-Carbinol. Aus der Literatur ist bekannt, dass Indol-3-Carbinol sperrige DNA-Addukte erzeugt und mutagen wirkt (Glatt et al., 2011; Baasanjav-Gerber et al., 2011a). Somit war zu erwarten, dass die Zelle zur Reparatur der helixverzerrenden DNA-Addukte Proteine der NER rekrutiert und simultan Gene dieses Reparaturwegs induziert. Diese These wurde zumindest partiell durch das aufgenommene Genexpressionsmuster bestätigt.

Ein weiterer Unterschied im Vergleich zum induzierten Sulforaphan-Genexpressionsmuster stellte die zeitabhängige Induktion von *APEX1* um das 1,7-fache und *OGG1* um das 1,6-fache dar. Beide Gene kodieren für wichtige Proteine der BER, die für die Entfernung von veränderten DNA-Basen und AP-Stellen von zentraler Bedeutung sind. Ob die Induktion von *OGG1* und *APEX1* tatsächlich auf das vermehrte Auftreten von oxidativen Basenschäden wie 8-Oxoguanin zurückzuführen ist, kann anhand der Daten nicht beurteilt werden. Da bislang keine systematischen Untersuchungen und nur vereinzelt Daten zum Einfluss von Indol-3-Carbinol auf einzelne DNA-Reparaturwege publiziert wurden, konnte mit dieser Arbeit zum ersten Mal der Einfluss von Indol-3-Carbinol auf die Expression von DNA-Reparaturgenen gezeigt werden. Bis dato konnte in Studien lediglich die Induktion von *BRCA1* und *BRCA2* in der Brustkrebszelllinie MCF-7 nach Behandlung mit Indol-3-Carbinol nachgewiesen werden (Meng et al., 2000, Fan et al., 2006). Resultierend aus diesen Ergebnissen lässt sich festhalten, dass eine Inkubation mit 500 µM Indol-3-Carbinol zur signifikanten Induktion von selektiven DNA-Reparaturgenen in HCT 116-Zellen führte.

4.4 Beeinflussung von Enzymaktivitäten

Die aus den Genexpressionsuntersuchungen erhaltenen Daten dienten zunächst als Grundlage für weitere Experimente, um das Spektrum möglicher intrazellulärer Angriffspunkte weiter einzugrenzen. Da Indol-3-Carbinol als einziges Hydrolyseprodukt bereits in geringen Konzentrationen die Expression von *CYP1A1* in HCT 116-Zellen signifikant induzierte, war es zunächst von Interesse, den Einfluss der Substanz auf die Cytochrom-P450-Monooxygenase-Aktivität näher zu untersuchen. Im weiteren Verlauf wurde noch die Thioredoxinreduktase-Aktivität nach Inkubation mit 12,5 µM Sulforaphan, 20 µM Myrosinase-hydrolysiertem Gesamtglucosinolat-Extrakt aus Brokkoli und 500 µM Indol-3-Carbinol in HCT 116-Zellen bestimmt. Thioredoxinreduktase wurde ausgewählt, weil die Genexpressionsprofile aller drei Verbindungen einen deutlichen Einfluss auf die Expression von *TXNRD1* zeigten.

4.4.1 Einfluss von Indol-3-Carbinol auf die Cytochrom-P450-Aktivität

Um den Einfluss von Indol-3-Carbinol auf die Cytochrom-P450-Monooxygenase-Aktivität in HCT 116-Zellen zu untersuchen, wurde die enzyspezifische 7-Ethoxyresorufin-*O*-Deethylase (EROD)-Aktivität bestimmt. Dabei beruhte die Messung der EROD-Aktivität, die lediglich die humanen CYP-Isoformen CYP1A1, 1A2 und 1B1 besitzen, auf der recht spezifischen *O*-Deethylierung des Phenoxazonderivates 7-Ethoxyresorufin in Gegenwart von Sauerstoff und einem NADPH-generierendem System zu Resorufin (Abbildung 35).

Der Einfluss einer 24-stündigen Inkubation mit Indol-3-Carbinol auf die EROD-Aktivität in HCT 116-Zellen ist in Abbildung 31 dargestellt. Zu erkennen ist, dass bereits die niedrigste Inkubationskonzentration zu einem signifikanten Anstieg der EROD-Aktivität führte. Im Vergleich zur Kontrolle mit 4,7 Units wurde die Aktivität nach Behandlung mit 50 μM Indol-3-Carbinol um das 4-fache induziert. Zudem konnte eine konzentrationsabhängige Zunahme der Enzymaktivität von 50 bis 500 μM Indol-3-Carbinol beobachtet werden. In den mit 200 und 500 μM Indol-3-Carbinol behandelten Zellen wurden EROD-Aktivitäten von 44,7 bzw. 79,2 Units ermittelt. Daraus ergaben sich, verglichen mit der Kontrollgruppe, Induktionen um das 9,5- bzw. 16,9-fache.

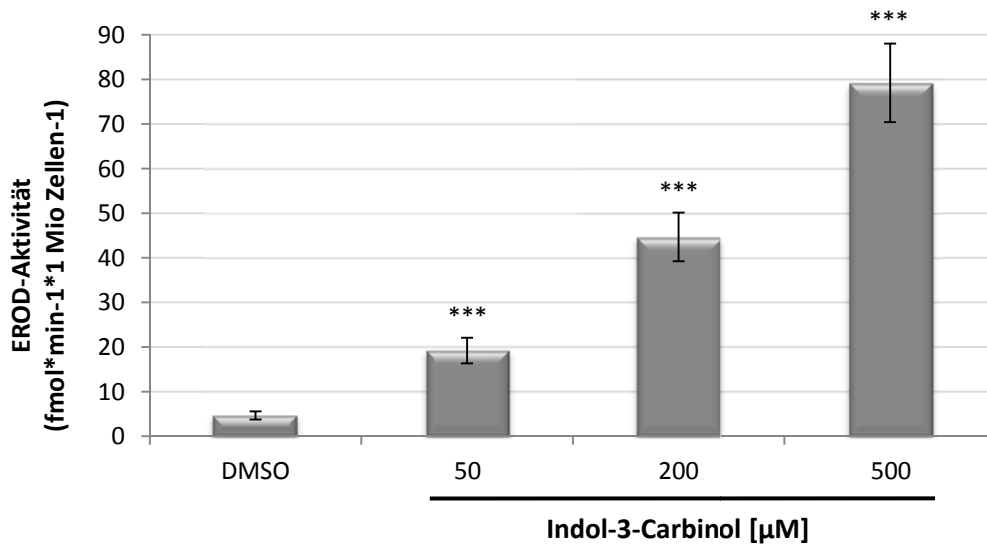


Abbildung 31: Einfluss einer 24-stündigen Inkubation mit Indol-3-Carbinol auf die EROD-Aktivität in HCT 116-Zellen. HCT 116-Zellen wurden zunächst 24 h mit Indol-3-Carbinol behandelt. Anschließend wurde der Zellextrakt für 60 min mit 7 Ethoxyresorufin und einem NADPH-generierendem System inkubiert. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD aus zwei unabhängigen Versuchen in Dreifachbestimmung. Statistisch signifikante Abweichung zur Kontrolle nach ANOVA mit Dunnett-T Post-Hoc-Test: *** $p < 0,001$.

Beim Abgleich der Daten mit den Genexpressionsergebnissen aus Kapitel 4.3.2.2 wird deutlich, dass eine Erhöhung der Transkriptmenge von *CYP1A1* um das 9-fache nach 24-stündiger Behandlung mit

500 μM Indol-3-Carbinol, eine Steigerung der Enzymaktivität um das 16,9-fache zur Folge hatte. Selbst verhältnismäßig niedrige Konzentrationen wie 50 μM Indol-3-Carbinol erhöhten die Aktivität signifikant um das 4-fache, während die Genexpression lediglich um das 1,8-fache induziert wurde. Darüber hinaus ist festzuhalten, dass bei einer Konzentration von 50 μM kein Einfluss auf Zellviabilitätsparameter und die Expression weiterer Gene detektiert werden konnte. Verglichen mit Lebermikrosomen, die als Positivkontrolle in diesem Versuch eingesetzt wurden, befand sich die gemessene Enzymaktivität in den HCT 116-Zellen zwar immer noch auf einem niedrigen Niveau, jedoch zeigte der Versuch, dass Indol-3-Carbinol signifikant das Cytochrom-P450-Protein-expressionsmuster in den HCT 116-Zellen beeinflussen kann. Vor allem die Bindung von Indol-3-Carbinol an den AhR wäre als mögliche Ursache für den enormen Anstieg der EROD-Aktivität denkbar. In diesem Kontext ist die beachtliche Übereinstimmung zu den publizierten Daten von Nho und Jeffery anzumerken. In der 7-tägigen Fütterungsstudie mit Indol-3-Carbinol an Ratten wurde gezeigt, dass die hepatische EROD-Aktivität infolge der Substanzbehandlung um das 10-fache induziert wurde (Nho und Jeffery, 2001). Daher war umso überraschender, dass bereits eine 24-stündige Inkubation mit 500 μM Indol-3-Carbinol zu einem 16,9-fachen Anstieg der EROD-Aktivität in den verwendeten HCT 116-Zellen führte.

4.4.2 Einfluss von Glucosinolat-Hydrolyseprodukten auf die Thioredoxinreduktase-Aktivität

Zur Bestimmung der Thioredoxinreduktase-Aktivität wurden zunächst HCT 116-Zellen mit jeweils einer niedrigen und einer hohen Konzentration von Sulforaphan, Myrosinase-hydrolysiertem Gesamtglucosinolat-Extrakt aus Brokkoli und Indol-3-Carbinol 24 h inkubiert. Im Anschluss daran erfolgte die Messung der Thioredoxinreduktase-Aktivität im Zellextrakt, in dem der Umsatz von 5,5'-Dithiobis-2-Nitrobenzoesäure (DTNB) zu 5-Thio-2-nitro-benzoesäure (TNB) photometrisch detektiert wurde. Die Ergebnisse aus diesem Versuch sind in Abbildung 32 dargestellt. Entgegen den Erwartungen kam es zu keiner Induktion der Thioredoxinreduktase-Aktivität nach Inkubation mit 1 bzw. 12,5 μM Sulforaphan. Obwohl eine Induktion von *TXNRD1* um das 3,5-fache nach 24 h auf Genexpressionsebene beobachtet wurde, blieb der Effekt auf Proteinebene aus. Simultan induzierten jedoch 1 bzw. 20 μM des Myrosinase-hydrolysierten Gesamtglucosinolat-Extrakts aus Brokkoli die Thioredoxinreduktase-Aktivität im Vergleich zur Kontrolle um das 4,4- respektive 7,3-fache. Aus dem Glucosinolatprofil des Extrakts konnte entnommen werden, dass vor allem Glucoraphanin mit einem Anteil von ca. 50 %, das dominierende Glucosinolat im Extrakt war. Somit war anzunehmen, dass die Hydrolyse des Extrakts primär zur Freisetzung von Sulforaphan führte und Sulforaphan-Konzentration im Extrakt vergleichbar mit der Inkubationskonzentration von 12,5 μM Sulforaphan war. Insofern war

es umso überraschender, dass die Behandlung mit Myrosinase-hydrolysiertem Gesamtglucosinolat-Extrakt aus Brokkoli die Enzymaktivität induzierte, während die Sulforaphan-Behandlung keinen Einfluss auf die Thioredoxinreduktase-Aktivität hatte. Verglichen mit den Genexpressionsergebnissen induzierte sowohl 12,5 μM Sulforaphan als auch 20 μM Myrosinase-hydrolysiertes Gesamtglucosinolat-Extrakt aus Brokkoli die Expression von *TXNRD1* um das 3,5 bzw. 3,4-fache nach 24 h. Insofern musste die Diskrepanz in den Aktivitätsbestimmungen andere Ursachen haben. Im diesem Kontext wäre denkbar, dass andere Glucosinolat-Hydrolyseprodukte für die Aktivitätssteigerung verantwortlich waren. Zudem war nicht auszuschließen, dass synergistische Effekte und die heterogene Mischung verschiedener Glucosinolate eine entscheidende Rolle gespielt haben.

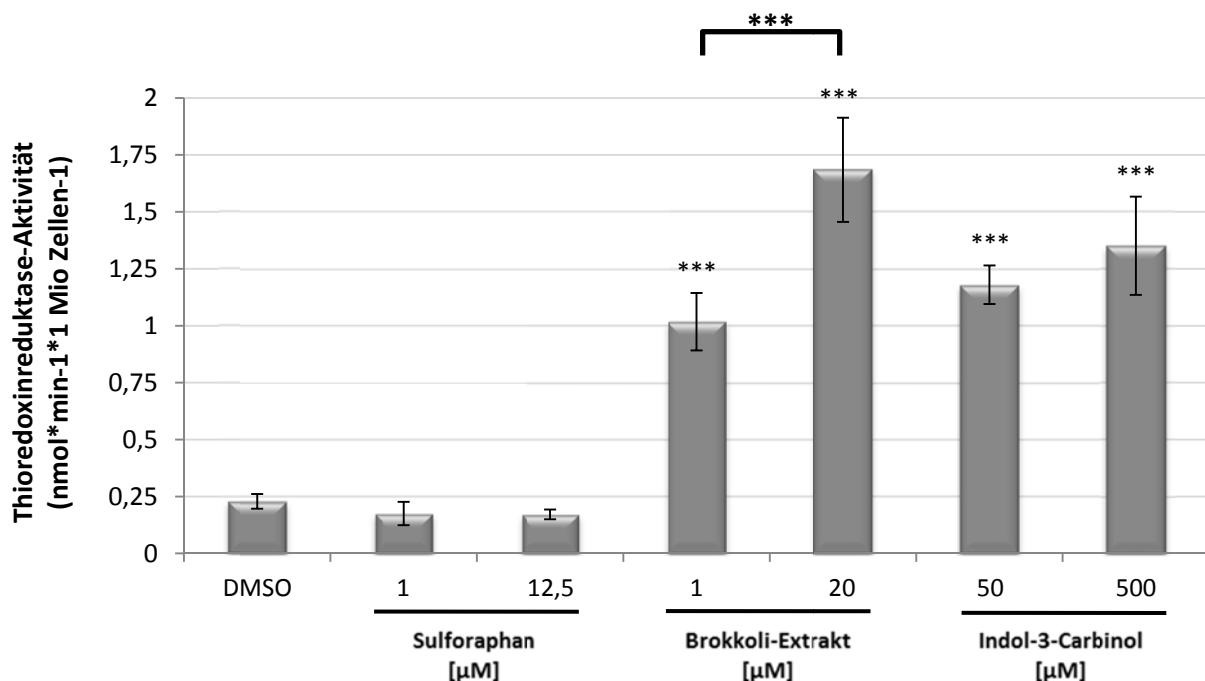


Abbildung 32: Einfluss einer 24-stündigen Inkubation mit Sulforaphan, Myrosinase-hydrolysiertem Gesamtglucosinolat-Extrakt aus Brokkoli und Indol-3-Carbinol auf die Thioredoxinreduktase-Aktivität in HCT 116-Zellen. HCT 116-Zellen wurden zunächst 24 h mit der jeweiligen Testsubstanz inkubiert. Anschließend wurde die Enzymaktivität im Zellextrakt durch Inkubation mit DNTB und NADPH-generierendem System gemessen. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD aus zwei unabhängigen Versuchen in Dreifachbestimmung. Statistisch signifikante Abweichung zur Kontrolle nach ANOVA mit Dunnett-T Post-Hoc-Test: *** $p < 0,001$.

Neben diesen Effekten war vor allem die signifikante Aktivitätssteigerung nach Inkubation mit 50 μM Indol-3-Carbinol beachtlich. Im Vergleich zur Kontrolle wurde die Aktivität von 0,23 Units auf 1,18 Units bzw. um das 5,1-fache gesteigert. Die Stärke des Effekts war insofern nicht zu erwarten, da das aufgenommene Genexpressionsprofile nach Inkubation mit 50 μM außer der Induktion von *CYP1A1* keine weiteren Anhaltspunkte für die Aktivierung anderer Gene lieferte. Vergleicht man die Aktivitätsmessung mit den Genexpressionsergebnissen nach 24-stündiger Inkubation mit 500 μM

Indol-3-carbinol, wird deutlich, dass eine Induktion von *TXNRD1* um das 2-fache eine Steigerung der Thioredoxinreduktase-Aktivität um das 5,9-fache respektive 1,35 Units zur Folge hatte. Somit ergab sich nur eine minimale Erhöhung der Thioredoxinreduktase-Aktivität im Vergleich zur Inkubation mit 50 μ M Indol-3-Carbinol.

Da in der Literatur bislang keine Untersuchungen zum Einfluss von Sulforaphan oder Indol-3-Carbinol auf die Thioredoxinreduktase-Aktivität publiziert wurden, konnten anhand der Ergebnisse weitere Erkenntnisse über die mechanistische Wirkungsweise der Substanzen akquiriert werden. Weiterhin konnte resultierend aus den Aktivitätsmessungen festgehalten werden, dass die Daten gut mit den Ergebnissen aus den Genexpressionsuntersuchungen korrelieren. Es konnten sowohl Aktivitätssteigerungen der Cytochrom-P450-Monooxygenase als auch der Thioredoxinreduktase beobachtet werden, wenn gleich die unveränderte Aktivität nach Inkubation mit Sulforaphan weiterer Untersuchungen bedarf.

4.5 Beeinflussung der Proteinexpression

Der gegenwärtige Proteinstatus einer Zelle kann als Quotient aus der Proteinneusynthese und dem Proteinabbau angesehen werden. So können unter anderem eine verstärkte Transkription sowie ein reduzierter proteasomaler Abbau selektiv zu einer Akkumulation einzelner Proteine führen. Da die Transkriptmenge eines Gens nicht zwangsläufig mit dem Proteinstatus korrelieren muss und Proteine die molekularen Einheiten auf funktionaler Ebene darstellen, ist der tatsächliche Proteingehalt für die Beurteilung des zellulären Status von entscheidender Relevanz. Ziel der Western Blot-Analysen war es daher, den Proteinstatus von p53, NQO1, p21, PRDX und β -Actin in HCT 116-Zellen nach 24-stündiger Behandlung mit Indol-3-Carbinol und Myrosinase-hydrolysiertem Gesamtglucosinolat-Extrakt aus Brokkoli zu untersuchen. Für die Analyse wurden die genannten Proteine herangezogen, weil die Transkriptmenge der einzelnen Gene nach Inkubation mit der jeweiligen Testsubstanz signifikant erhöht war. Neben diesen Proteinen wurde zusätzlich versucht, CYP1A1, MDM2 und HMOX1 mittels Western Blot zu detektieren. Jedoch war es selbst beim Einsatz von 100 μ g Gesamtprotein pro Geltasche nicht möglich, die jeweiligen Proteine mittels Chemilumineszenz-Detektion im Western Blot nachzuweisen.

4.5.1 Einfluss von Glucosinolat-Hydrolyseprodukten auf den Proteingehalt ausgewählter Proteine

Um den Einfluss von Glucosinolat-Hydrolyseprodukten auf die Proteinexpression zu untersuchen, wurden HCT 116-Zellen entweder mit 100 bis 500 μM Indol-3-Carbinol bzw. 1 bis 20 μM Myrosinase-hydrolysiertem Gesamtglucosinolat-Extrakt aus Brokkoli 24 h lang inkubiert. Im Anschluss an die Zellyse und Denaturierung der Proben erfolgte die elektrophoretische Trennung der Proteine mit anschließendem Western Blot und Immundetektion. Die Ergebnisse der Chemilumineszenz-Detektion sind in Abbildung 33 dargestellt. Zu erkennen ist, dass eine 24-stündige Inkubation mit 100 bis 500 μM Indol-3-Carbinol keinen Einfluss auf den Proteinstatus von p53 in HCT 116-Zellen besaß. Aus der Literatur sind in diesem Zusammenhang in Abhängigkeit von der verwendeten Zelllinie zum Teil konträre Ergebnisse publiziert. So ergaben Untersuchungen in MCF10A-Zellen erste Anhaltspunkte, dass die Stabilisierung von p53 nach Behandlung mit Indol-3-Carbinol vor allem durch Phosphorylierung an Ser6, 9, 15 und 392 erfolgte, während der p53-Status unverändert blieb (Brew et al., 2006). In einer weiteren Studie von Hsu et al. wurde wiederum gezeigt, dass eine 24-stündige Behandlung mit 200 μM Indol-3-Carbinol in der Prostata-Adenokarzinomzelllinie LNCaP zwar primär zur Phosphorylierung von p53 an Ser15, Ser37 und Ser392 führte, jedoch zusätzlich das Proteinlevel von p53 erhöht war (Hsu et al., 2006). Somit konnte zumindest in beiden Studien belegt werden, dass die p53-Signaltransduktion primär über posttranslationale Modifikationen verlief und die Proteinmenge von phosphoryliertem p53 erhöhte. Aus der Literatur ist bekannt, dass die Aktivierung und Stabilisierung von p53 infolge von genotoxischem Stress häufig über posttranslationale Modifikationen erfolgt, indem Kinasen an der N-terminalen Transaktivierungsdomäne gezielt Serin- und Threoninseitenketten phosphoryliert (zusammengefasst in Appella und Anderson, 2001). Insofern wäre es denkbar, dass die Behandlung von HCT 116-Zellen lediglich einen Einfluss auf den Proteinstatus von phosphoryliertem p53 besaß, ohne die Proteinmenge von p53 zu beeinflussen. Da in den zugrundeliegenden Experimenten keine phosphorylierungsspezifischen Antikörper eingesetzt wurden, können somit über den Phosphorylierungsstatus von p53 keine Rückschlüsse gezogen werden. Jedoch besteht prinzipiell die Möglichkeit, dass der Gehalt an p53 nicht mit dem Gehalt an phosphoryliertem p53 korrelierte und dieser unter Umständen wesentlich erhöht war.

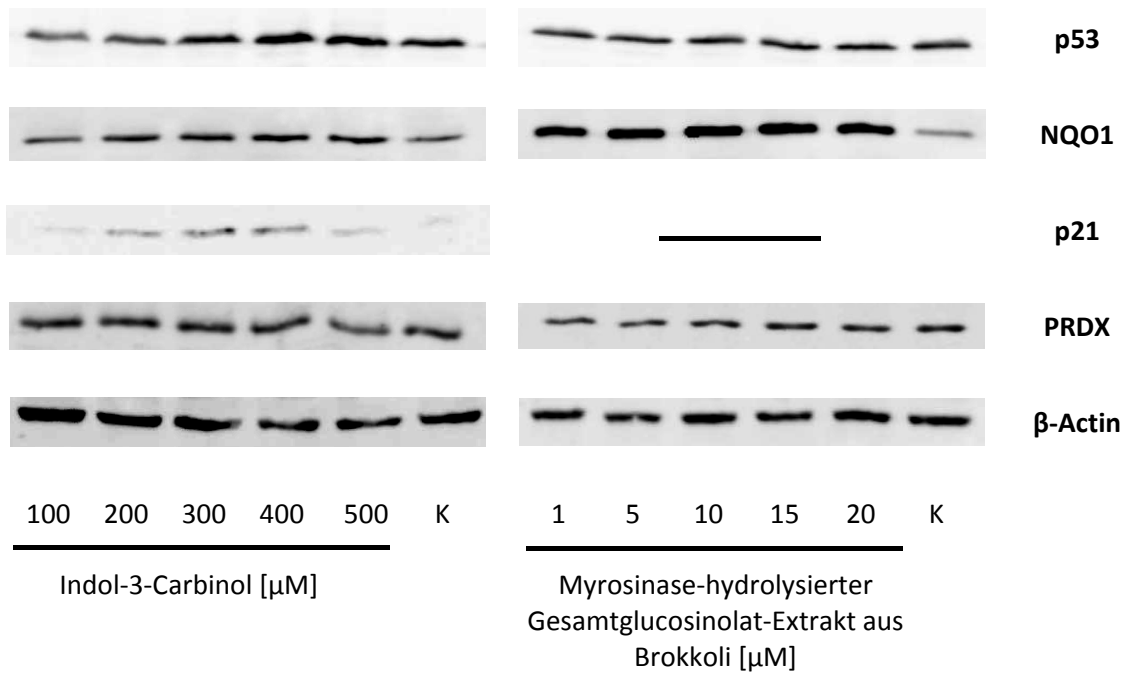


Abbildung 33: Einfluss einer 24-stündigen Inkubation mit 100 bis 500 μM Indol-3-Carbinol und 1 bis 20 μM Myrosinase-hydrolysiertem Gesamtglucosinolat-Extrakt aus Brokkoli auf die Proteinexpression von p53, NQO1, p21, PRDX in HCT 116-Zellen. Die β -Actin-Bande diente dabei als Referenz. Dargestellt sind repräsentative Ergebnisse eines Versuches von insgesamt zwei unabhängigen Bestimmungen.

Im Vergleich zu p53 zeigte die Inkubation mit 500 μM Indol-3-Carbinol stärkere Effekte auf die Proteinmenge von p21 und NQO1. Vor allem p21 wurde durch die Behandlung mit Indol-3-Carbinol konzentrationsabhängig auf Proteinebene induziert. Bereits eine 24-stündige Behandlung mit 100 μM führte zu einer signifikanten Akkumulation des Proteins, die mit steigender Konzentration bis zu 400 μM deutlich zunahm. Demgegenüber konnte p21 in Kontrollzellen nur sehr limitiert nachgewiesen werden. Somit bestätigen die Ergebnisse aus den Western Blot-Analysen die Beobachtungen aus den Genexpressions- und Zellzyklusuntersuchungen und erklären die deutliche Arretierung der Zellen in der G_0/G_1 -Phase. Demnach hatte eine 24-stündige Behandlung mit 500 μM Indol-3-Carbinol die Expression von *CDKN1A* um das 3,7-fache induziert und zu einem Zellzyklusarrest in der G_0/G_1 -Phase geführt. Ein etwas geringerer Effekt konnte auf den Gehalt von NQO1 beobachtet werden. Erst bei genauer Betrachtung war ein Unterschied zwischen der Kontrolle und den Behandlungen zu sehen. Während die NQO1 Bande in der Kontrolle relativ schwach war, zeigten die Behandlungen mit Indol-3-Carbinol eine konzentrationsabhängige Steigerung der Proteinmenge. Keine Effekte hingegen konnten auf das Proteinexpressionsmuster von Peroxiredoxin nach 24-stündiger Inkubation mit Indol-3-Carbinol in den HCT 116-Zellen detektiert werden.

Ein nahezu unverändertes Proteinexpressionsmuster konnte nach 24-stündiger Inkubation mit 1 bis 20 μM Myrosinase-hydrolysiertem Gesamtglucosinolat-Extrakt aus Brokkoli in den HCT 116-Zellen beobachtet werden. Weder auf die Stabilisierung von p53 noch auf den Gehalt von Peroxiredoxin

wurden substanzspezifische Effekte detektiert. Zudem war beachtlich, dass der Myrosinase-hydrolysierte Gesamtglucosinolat-Extrakt aus Brokkoli bei keiner Inkubationskonzentration einen Einfluss auf die Proteinmenge von p21 hatte. Die Ergebnisse stehen somit den Resultaten aus den Genexpressionsuntersuchungen konträr gegenüber. Demnach hatte eine 24-stündige Behandlung mit 20 µM Myrosinase-hydrolysiertem Gesamtglucosinolat-Extrakt aus Brokkoli eine Induktion von *CDKN1A* um das 3,6-fache zur Folge. Die erhöhte Transkriptmenge zeigte zwar, dass Glucosinolat-Hydrolyseprodukte die Expression von *CDKN1A* induzierten, jedoch wurden auf Translationsebene keine Effekte beobachtet. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass auf Grund von posttranskriptionellen Regulationsprozessen bzw. durch RNA-Interferenz die Translation der mRNA-Sequenzen verhindert wurde. Somit passen die Ergebnisse zu den durchgeführten Zellzyklusanalysen, die nach 24 h noch keinen signifikanten Zellzyklusarrest im Vergleich zur Kontrollbehandlung aufzeigten. So befanden sich 58,1 % der Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit Myrosinase-hydrolysiertem Gesamtglucosinolat-Extrakt aus Brokkoli in der G₀/G₁-Phase, während sich simultan 54,4 % der Zellen nach DMSO-Behandlung in der G₀/G₁-Phase befanden. Einen deutlichen Effekt zeigte der Myrosinase-hydrolysierte Gesamtglucosinolat-Extrakt aus Brokkoli auf die Proteinmenge von NQO1. Während der Gehalt in der Kontrollbehandlung verhältnismäßig niedrig war, erhöhte der eingesetzte Extrakt konzentrationsunabhängig den Proteingehalt. Im Vergleich zur Inkubation mit DMSO wurden bei allen Konzentrationen deutlich intensivere Banden detektiert. Somit konnten die Ergebnisse aus Genexpressionsuntersuchungen, die eine signifikante Induktion von *NQO1* nach 24 h um das 2,4-fache ergaben, auf Proteinebene verifiziert werden. Dass keine konzentrationsabhängigen Effekte festgestellt wurden, kann unter Umständen damit begründet werden, dass die Behandlung mit Indol-3-Carbinol die NQO1-Proteinmenge bis zu einem gewissen Maß erhöhte und ab einer bestimmten Proteinmenge keine Translation mehr stattfand.

Resultierend aus den Ergebnissen lässt sich zusammenfassen, dass sich die Effekte aus den Genexpressionsprofilen nur teilweise auf Proteinebene widerspiegeln. Bis auf Veränderungen im Proteinstatus von p21 und NQO1 konnten keine Effekte festgestellt werden. Eine mögliche Ursache dafür könnte in der Sensitivität der Methode liegen. So sind geringe Änderungen im Proteingehalt einzelner Enzyme nur schwer über eine Western Blot-Analyse nachweisbar. Erschwerend zur Sensitivität der Methode kam hinzu, dass wie im Fall von p53, die Regulation wahrscheinlich primär über posttranslationale Modifikationen stattfand, so dass vor allem die phosphorylierten Formen von p53 intrazellulär akkumulierten. Da die Identifizierung phosphorylierungsspezifischer Proteine nicht mit den verwendeten Antikörpern möglich war, konnten in diesem Kontext keine Effekte detektiert werden.

4.6 Beeinflussung der Zellzyklusregulation

DNA-Schädigungen führen je nach Art und Häufigkeit der entstandenen DNA-Läsionen häufig zu Veränderungen innerhalb des Zellzyklusablaufs, indem gezielt ein Zellzyklusarrest eingeleitet wird. Auf diese Weise wird der Zelle die notwendige Zeit gegeben, adäquat auf genotoxischen Stress zu reagieren. Genotoxischer Stress ist nicht zwangsläufig nur auf die direkte Interaktion einer Noxe mit der DNA zurückzuführen, sondern kann auch durch indirekte Mechanismen wie Modifizierung der DNA-Reparatur oder oxidativen Stress erzeugt werden. Da die erstellten Genexpressionsprofile mit der Induktion von *TP53*, *CDKN1A*, *CDKN1B* und *CDKN2B* nach Behandlung mit Indol-3-Carbinol und Sulforaphan Hinweise auf genotoxischen Stress lieferten, wurden in weiterführenden Untersuchungen die Zellzyklusverteilungen nach Inkubation mit 12,5 µM Sulforaphan, 20 µM Myrosinase-hydrolysiertem Gesamtglucosinolat-Extrakt aus Brokkoli und 500 µM Indol-3-Carbinol in HCT 116-Zellen analysiert. Dafür wurden die Zellzyklusphasen über Fluoreszenzmessungen nach DAPI Färbung am Durchflusszytometer analysiert. Die Einteilung in die einzelnen Zellzyklusphasen erfolgte anhand des DNA-Gehalts in einem Histogramm (vgl. Abbildung 50). Demnach enthielten Zellen mit einfachem Chromosomensatz in der G₁- bzw. G₀-Phase nur halb so viel DNA wie Zellen mit doppeltem Chromosomensatz, die sich in der G₂- bzw. M-Phase befanden. Zellen in der S-Phase hingegen wiesen einen DNA-Gehalt auf, der sich im Range zwischen einfachem und doppeltem DNA-Gehalt bewegte.

4.6.1 Einfluss von Glucosinolat-Hydrolyseprodukten auf die Zellzyklusverteilung

Über einen Zeitraum von 12 bis 48 h wurden HCT 116-Zellen mit den jeweiligen Glucosinolat-Hydrolyseprodukten inkubiert und zu entsprechenden Zeitpunkten die Zellpopulationen in den einzelnen Zellzyklusphasen ermittelt (Abbildung 34). Aus der Zellzyklusverteilung nach Inkubation mit 12,5 µM Sulforaphan in Abbildung 34 A ist zu erkennen, dass die Substanzbehandlung nach 36 h zu einem signifikanten Zellzyklusarrest der HCT 116-Zellen in der G₀/G₁-Phase führte. Dabei stieg der Anteil der Zellen in dieser Phase von 56,2 % nach 24 h auf 66,9 % nach 36 h. Simultan sank der Anteil an Zellen in der S-Phase von 25,0 % auf 18,6 % nach 36 h sowie der Anteil an Zellen in der G₂/M-Phase von 18,7 % auf 14 %. Mit steigender Inkubationsdauer konnte jedoch keine weitere Akkumulation der Zellen in der G₀/G₁-Phase beobachtet werden. Aus den Genexpressionsuntersuchungen war nach 24-stündiger Inkubation mit Sulforaphan eine signifikante Induktion von *CDKN1A* um das 3,5-fache bzw. um das 4,2-fache nach 36 h zu erkennen (vgl. Abbildung 24). Somit bestätigen die Zellzyklusuntersuchungen die These, dass die Induktion von *CDKN1A* zur gesteigerten Synthese von p21 und damit zur Einleitung des Zellzyklusarrests führte. Da nicht davon ausgegangen

werden kann, dass Sulforaphan direkt DNA-Schäden generierte, muss ein indirekter Mechanismus angenommen werden.

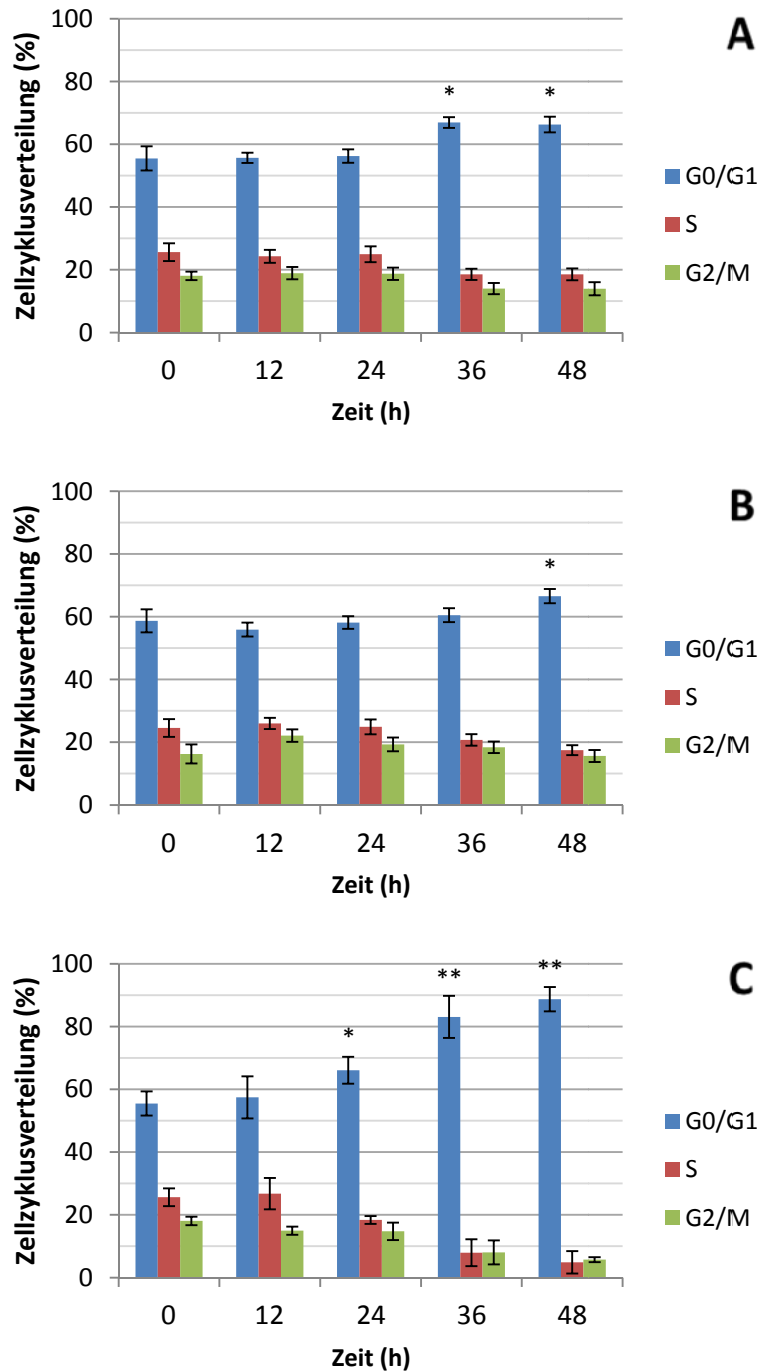


Abbildung 34: Einfluss einer zeitabhängigen Inkubation mit 12,5 µM Sulforaphan **(A)**, 20 µM Myrosinase-hydrolysiertem Gesamtglucosinolat-Extrakt aus Brokkoli **(B)** und 500 µM Indol-3-Carbinol **(C)** auf die Zellzyklusverteilung in HCT 116-Zellen. Dargestellt sind Mittelwerte der prozentualen Zellzyklusphasenanteile ± SD aus zwei unabhängigen Versuchen in Dreifachbestimmung. Statistisch signifikante Abweichung zur Kontrolle nach ANOVA mit Dunnett-T Post-Hoc-Test: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

In diesem Zusammenhang wäre die Induktion von oxidativen Basenschäden auf Grund einer gestörten zellulären Redox-Homöostase denkbar. Dass Sulforaphan zur vermehrten ROS-Produktion in den HCT 116-Zellen führte, wurde bereits anhand der Genexpressionsprofile deutlich. Vor allem die frühe Induktion von oxidativen Stressgenen, gefolgt von der Induktion von Zellzyklusarrestgenen sowie von *TP53* deutete auf prooxidative Mechanismen hin. Zwar wurden bisher Untersuchungen zum Einfluss von Sulforaphan auf die Zellzyklusverteilung publiziert, jedoch zeigten sich sehr heterogener Effekte. In Abhängigkeit vom Assay-Design und von der untersuchten Zelllinie war Sulforaphan in der Lage, sowohl einen G_0/G_1 -Phase- als auch einen G_2/M -Phase-Arrest zu induzieren (Bhamre et al., 2009; Bryant et al., 2010).

Eine nahezu identische Zellzyklusverteilung wurde nach Inkubation mit 20 μ M Myrosinase-hydrolysiertem Gesamtglucosinolat-Extrakt aus Brokkoli erhalten (Abbildung 34 B). Auch hier führte die Inkubation zu einer signifikanten Arretierung der Zellen in der G_0/G_1 -Phase nach 48 h. Im Vergleich zur Kontrolle waren zum gleichen Zeitpunkt 8,3 % mehr Zellen in der G_0/G_1 -Phase arretiert. Da angenommen werden kann, dass primär Sulforaphan das dominierende Glucosinolat-Hydrolyseprodukt nach der Freisetzung war, könnten auch die erhaltenen Effekte vornehmlich auf die Anwesenheit von Sulforaphan zurückgeführt werden. Demzufolge können für diesen Sachverhalt die vermuteten Mechanismen aus der Inkubation mit Reinsubstanz Sulforaphan übertragen werden. Die Zellzyklusverteilung nach Inkubation mit 500 μ M Indol-3-Carbinol ist aus der Abbildung 34 C zu entnehmen. Bereits nach 24-stündiger Substanzbehandlung kam es zu einer signifikanten Arretierung der HCT 116-Zellen von 66,1 % in der G_0/G_1 -Phase. Im weiteren Verlauf konnte eine zeitabhängige Zunahme von Zellen in dieser Phase bis nach 48 h beobachtet werden. Simultan sank der Anteil an Zellen in der S- und G_2/M -Phase nach 48 h ab. Somit könnte die Arretierung der Zellen in der G_0/G_1 -Phase die Konsequenz aus der starken Induktion von *CDKN1A* um das 3,7-fache nach 24 h bzw. 7,8- und 10,8-fache nach 36 und 48 h gewesen sein. *CDKN1A* kodiert für p21, das unter anderem den Übergang der Zellen von der G_1 - in die S-Phase durch Hemmung des Cyclin E/CDK 2-Komplexes verhindert. Des Weiteren interagiert p21 in der frühen G_1 -Phase mit dem Cyclin D/CDK 4,6-Komplex und verhindert so das Voranschreiten der Zellen in der G_1 -Phase. Daher kann angenommen werden, dass die Induktion von *CDKN1A* und die signifikante Arretierung der Zellen in der G_0/G_1 -Phase im engen Zusammenhang stehen.

Ein weiterer Anhaltspunkt für einen ausgeprägten Zellzyklusarrest in der G_0/G_1 -Phase war die gleichzeitige Induktion von *CDKN2B*. *CDKN2B* kodiert für den CDK-Inhibitor p15 und war bereits nach 24 h um das 2-fache induziert. p15 ist ebenso wie p21 an der Regulation des Cyclin D/CDK 4,6-Komplexes beteiligt, indem es die Phosphorylierung von Rb und somit die Progression aus der G_1 - in die S-Phase blockiert. Insofern deuten die signifikante Zellzyklusarretierung in der G_0/G_1 -Phase sowie die aufgenommenen Genexpressionsprofile darauf hin, dass vermutlich oxidativer Stress induziert

sowie die Regulation des Zellzyklus gestört wurde. In der Literatur wurde bereits häufiger ein induzierter Zellzyklusarrest in der G_0/G_1 -Phase nach Behandlung mit Indol-3-Carbinol beschrieben (Cover et al., 1998; Neave et al., 2005; Brew et al., 2006). Charakteristisch für alle Studien war, dass Indol-3-Carbinol das Wachstum von Tumorzellen hemmte. So berichteten Brew et al. von einer Arretierung von MCF-7-Zellen nach Behandlung mit 300 μM Indol-3-Carbinol in der G_0/G_1 -Phase. Das Defizit aller Arbeiten lag jedoch darin, dass auf den zugrunde liegenden Mechanismus bzw. auf die Ursache der Arretierung nicht weiter eingegangen wurde.

Resultierend aus den erhaltenen Ergebnissen lässt sich festhalten, dass eine Behandlung mit 500 μM Indol-3-Carbinol möglicherweise die zelluläre Redox-Homöostase beeinträchtigte und so genotoxischen Stress in den Zellen induzierte. Sowohl eine indirekte Induktion von oxidativen DNA-Schäden durch die gesteigerte ROS-Produktion als auch eine direkte Interaktion mit der DNA durch Bildung von DNA-Addukten wären als mögliche Mechanismen denkbar.

5. Zusammenfassende Diskussion

Der Fokus der hier präsentierten Arbeit lag primär auf der toxikologischen Betrachtung der Glucosinolat-Hydrolyseprodukte Sulforaphan und Indol-3-Carbinol. Vor dem Hintergrund, dass Verbraucher zunehmend Nahrungsergänzungsmittel und funktionelle Lebensmittel zur Krebsprävention sowohl auf Basis einzelner Glucosinolat-Hydrolyseprodukte als auch auf Basis isolierter Brokkoli-Extrakte konsumieren und bis dato keine validen Daten zur Risikoabschätzung bei erhöhter Exposition vorliegen, machten Untersuchungen zur toxikologischen Bewertung der einzelnen Verbindungen erforderlich. Als zugrunde liegende molekulare chemopräventive Mechanismen werden vor allem die selektive Inhibition Fremdstoff-metabolisierender Phase-I- und die simultane Induktion von Phase-II-Enzymen postuliert. Ferner werden die Einleitung eines Zellzyklusarrests und die Apoptoseinduktion in Tumorzellen als antikanzerogene und damit als potentiell protektive Effekte angesehen (zusammengefasst in Juge et al., 2007; Aggarwal und Ichikawa, 2005).

Neben dem aliphatischen Glucosinolat Glucoraphanin ist das Indol-Glucosinolat Glucobrassicin das dominierende Glucosinolat in Brokkoli. Erst durch enzymatische Hydrolyse dieser Verbindungen werden die bioaktiven Substanzen Sulforaphan und Indol-3-Carbinol freigesetzt. Im Rahmen der Arbeit galt es zu untersuchen, ob und in welchem Maße die unterschiedlichen Verbindungen ein individuelles Genexpressionsmuster in HCT 116-Zellen induzieren. Anhand des substanzspezifischen Genexpressionsprofils sowie weiterer Untersuchungsergebnisse aus Zellzyklus- und Western Blot-Analysen sollte im Anschluss eine toxikologische Bewertung von Nahrungsergänzungsmitteln auf Sulforaphan-, Indol-3-Carbinol- bzw. Brokkoli-Basis erfolgen.

Ein Schwerpunkt dieser Arbeit lag zunächst in der Etablierung einer Hochdurchsatz-Genexpressionsmethode, um zeit- und konzentrationsabhängige Genexpressionsprofile detektieren zu können. Dafür lag der Fokus in einem ersten Abschnitt in der Auswahl eines geeigneten Gensets, in der Generierung von empirischen Daten und in der systematischen Auswertung der generierten Ergebnisse. Im Anschluss daran erfolgt die Aufnahme von Genexpressionsprofilen nach Inkubation von HCT 116-Zellen mit Sulforaphan, Indol-3-Carbinol und Myrosinase-hydrolysiertem Gesamtglucosinolat-Extrakt aus Brokkoli.

Anhand des induzierten Genexpressionsprofils durch Sulforaphan konnte zunächst eine zeitabhängige Aktivierung von zahlreichen Nrf2-regulierten Targetgenen wie *TXNRD1*, *GCLC*, *GSR*, *PRDX1* und *TXN* beobachtet werden. In diesem Zusammenhang wurde deutlich, dass die Behandlung mit Sulforaphan nicht alle Nrf2-regulierten Gene im gleichen Maße induzierte, sondern zu einer selektiven Induktion dieser Gene in HCT 116-Zellen führte. Obwohl *GPX1* und *SOD2* ebenso

ARE-Sequenzen in ihrer Promotorregion tragen, wurde kein Einfluss auf die Transkription dieser Gene festgestellt. Daraus konnte die These abgeleitet werden, dass nach Aktivierung von Nrf2 nicht automatisch alle Nrf2-regulierten *downstream* Gene äquivalent in ihrer Expression beeinflusst werden. Anzunehmen ist, dass unter anderem Kinasen und Phosphatasen gezielt über Phosphorylierungen bzw. Dephosphorylierung an der Nrf2-Signaltransduktion beteiligt und so für die Feinabstimmung auf Proteinebene verantwortlich sind. Dies könnte einen weiteren wichtigen molekularen Mechanismus darstellen, über den der Keap1-Nrf2-Signalweg in Abhängigkeit vom zellulären Redox-Status und veränderten physiologischen Bedingungen modifiziert und feinjustiert werden kann. In diesem Zusammenhang haben einige Arbeiten bereits gezeigt, dass unter anderem Proteinkinasen wie MAPKs, PI3K und PKC an der Regulation und Signaltransduktion beteiligt sind (Huang et al., 2000; Keum et al., 2003). Insofern wäre es zu erklären, weshalb die Sulforaphan-Behandlung nicht simultan zur Induktion von allen Nrf2-abhängigen Genen in HCT 116-Zellen führte. Ob die Aktivierung von Nrf2 durch kovalente Bindung von Sulforaphan an Cysteinreste von Keap1 oder durch eine ROS-induzierte oxidative Modifikation von Keap1-Seitenketten erfolgte, konnte aus dem aufgenommenen Genexpressionsmuster nicht abgeleitet werden. Ein Hinweis, dass die Aktivierung eventuell durch eine gesteigerte ROS-Produktion erfolgte, könnte die deutliche Induktion des *early response gene HMOX1* sein. So könnte die Expressionserhöhung von *HMOX1* unter anderem als Marker für eine gestörte intrazelluläre Redox-Homöostase und damit für eine übermäßige ROS-Generierung angesehen werden. Über welchen Mechanismus Sulforaphan möglicherweise intrazelluläre ROS induzierte, konnte aus den Daten nur bedingt abgeleitet werden. Aus der Literatur ist bekannt, dass Sulforaphan primär über passive Diffusion in die Zelle aufgenommen wird und unmittelbar über Konjugationsreaktionen an Glutathion bis in den millimolaren Bereich akkumuliert (zusammengefasst in Zhang und Callaway, 2002). In diesem Kontext wäre zu hinterfragen und in weiteren Studien zu klären, inwieweit die Depletierung des intrazellulären GSH-Levels für die gestörte Redox-Homöostase verantwortlich war. Anhaltspunkte für eine gesteigerte Glutathion-Synthese lieferte bereits die zeitabhängige Induktion von *GCLC*. *GCLC* kodiert für die γ -Glutamat-Cystein-Ligase, die primär für den geschwindigkeits-bestimmenden Schritt in der Glutathion-Neusynthese verantwortlich ist, indem sie die Ligation von Glutamat mit Cystein zum Dipeptid γ -Glutamylcystein katalysiert. Die Induktion von *GCLC* könnte somit als Antwort auf die Verringerung des zellulären Glutathion-Pools angesehen werden.

Weiterhin lieferten die Genexpressionsuntersuchungen in Kombination mit den Zellzyklusanalysen Hinweise dafür, dass Sulforaphan in höheren Konzentrationen möglicherweise prooxidativ wirkte und genotoxischen Stress in HCT 116-Zellen induzierte. Vor allem die deutliche Induktion des Zellzykluskontrollgens *CDKN1A* nach 24 h sowie die signifikante Arretierung der Zellen in der G_0/G_1 -Phase nach 36 h unterstützen diese These. Über welchen Mechanismus die Induktion von

genotoxischem Stress verlief, kann nur spekuliert werden. Denkbar wäre in diesem Zusammenhang, dass Sulforaphan vermehrt intrazelluläre ROS generierte und die unmittelbare Elimination der reaktiven Spezies über Superoxiddismutase und Katalase nicht mehr in ausreichendem Maße gewährleistet war. Folglich wurde die intrazelluläre Redox-Homöostase negativ beeinflusst. Dass Sulforaphan allein jedoch nicht in der Lage ist, oxidative Basenschäden und DNA-Strangbrüche zu induzieren, haben Arbeiten aus dem eigenen Arbeitskreis gezeigt (Piberger, 2014). Insofern ist es fraglich, inwieweit die Induktion von *TP53* nach Sulforaphan-Behandlung, als Hinweis für das vermehrte Auftreten von DNA-Schäden angesehen werden kann. Somit wäre in weiteren Untersuchungen zu klären, ob die Ergebnisse aus den Genexpressionsanalysen auch auf Proteinebene verifiziert werden können.

In diesem Kontext muss darüber diskutiert werden, ob die Induktion von oxidativen Stressgenen wie *HMOX1*, *TXNRD1*, *GCLC*, *GSR* und *PRDX* als ein rein protektiver Effekt angesehen werden kann oder ob die Hochregulation primär das Resultat einer übermäßigen ROS-Produktion darstellt. In der Literatur findet häufig keine Differenzierung statt, ob die Induktion von antioxidativen und Fremdstoff-metabolisierenden Phase-II-Enzymen auch mit dem Auftreten von adversen Effekten im Zusammenhang stehen kann. In der einseitigen Betrachtungsweise wird die Aktivierung dieser Enzyme lediglich mit einer Steigerung der antioxidativen Kapazität in Verbindung gebracht. Anhand der hier dargestellten Daten wurde jedoch gezeigt, dass diese These für hohe Sulforaphan-Konzentrationen relativiert werden muss. In Kombination mit einer gestörten zellulären Homöostase infolge von pathophysiologischen Prozessen oder der Exposition gegenüber anderen genotoxischen Noxen müsste mit weiteren adversen Effekten gerechnet werden. Somit kann in der Konsequenz festgehalten werden, dass bei einer Supplementierung mit Sulforaphan die genomische Stabilität unter Umständen negativ beeinflusst werden könnte.

Das vom Myrosinase-hydrolysierten Gesamtglucosinolat-Extrakt aus Brokkoli induzierte Genexpressionsprofil in HCT 116-Zellen war im Wesentlichen vergleichbar mit dem Sulforaphan-induzierten Expressionsmuster. Nur sporadisch wurden minimale Unterschiede in der Ausprägung der Effekte beobachtet. Die Ursache für die Kongruenz in den Daten lag wohl in der Zusammensetzung des Extrakts, da vor allem das Glucosinolat Glucoraphanin knapp 48,9 % des Gesamtglucosinolat-Gehalts ausmachte. Demnach konnte davon ausgegangen werden, dass durch die Hydrolyse vor allem Sulforaphan freigesetzt wurde. Weiterhin konnte aus den Genexpressions- und Zellzyklusuntersuchungen abgeleitet werden, dass die primären Effekte auf die Anwesenheit von Sulforaphan zurückzuführen waren und andere Hydrolyseprodukte und Matrixbestandteile nur einen marginalen Einfluss auf die Modulation der Expression besaßen. Divergierende Ergebnisse wurden hingegen bei der Bestimmung der Thioredoxinreduktase-Aktivität ermittelt. Während die Sulforaphan-Inkubation keinen Einfluss auf die Enzymaktivität besaß, führte die Behandlung mit

Myrosinase-hydrolysiertem Gesamtglucosinolat-Extrakt aus Brokkoli zu einer 4,4- bzw. 7,4-fachen Steigerung der Aktivität. Die Daten zeigten insofern konträre Ergebnisse, da beide Verbindungen zeitabhängig die Transkriptmenge von *TXNRD1* induzierten. Ob die Ursache für die Aktivitätssteigerung tatsächlich auf das heterogene Glucosinolat-Spektrum zurückzuführen ist, wäre in weiteren Untersuchungen zu prüfen.

Ein nahezu unverändertes Proteinexpressionsmuster wurde aus den Western Blot-Analysen nach 24-stündiger Inkubation mit Myrosinase-hydrolysiertem Gesamtglucosinolat-Extrakt aus Brokkoli erhalten. Bis auf die Proteinmenge von *NQO1* konnten keine signifikanten Effekte festgestellt werden. Zu vermuten ist, dass die Sensitivität des verwendeten Assays nicht ausreichte, um geringe Änderungen im Proteinstatus zu detektieren. Mit Hilfe einer sensitiveren Referenzmethode wäre hier zu prüfen, ob die experimentellen Daten aus den Genexpressionsanalysen verifiziert werden können. Da die Ergebnisse aus den Untersuchungen mit Sulforaphan und Myrosinase-hydrolysiertem Gesamtglucosinolat-Extrakt aus Brokkoli in weiten Teilen vergleichbar waren, können für Nahrungsergänzungsmittel auf Basis von Extrakten die gleichen Schlussfolgerungen getroffen werden wie für eine Supplementierung mit Sulforaphan. Unter Berücksichtigung der potentiell prooxidativen und genotoxischen Wirkungsweise könnten bei Supplementierung mit hochdosierten Präparaten die postulierten chemopräventiven Eigenschaften unter Umständen vollständig aufgehoben werden.

Ein anderer molekularer Wirkmechanismus konnte aus dem Genexpressionsprofil nach Inkubation mit Indol-3-Carbinol abgeleitet werden. Vor allem die deutliche Induktion von *CYP1A1* auf Transkriptionsebene zu frühen Zeitpunkten sowie die signifikante Steigerung der Cytochrom-P450-Monooxygenase-Aktivität auf Proteinebene waren Indol-3-Carbinol spezifische Effekte. Bereits im niedrigen Konzentrationsbereich von 50 μM wurde die Transkriptmenge um das 1,8-fache und die Enzymaktivität um das 4-fache gesteigert. Weder die Inkubation mit Sulforaphan noch mit Myrosinase-hydrolysiertem Gesamtglucosinolat-Extrakt aus Brokkoli zeigten ähnliche Effekte. Aus der Literatur ist bereits bekannt, dass Indol-3-Carbinol eine Affinität zum AhR besitzt und den ligandenabhängigen Transkriptionsfaktor aktivieren kann (Bjeldanes et al., 1991; Jellinck et al., 1993). Insofern konnte davon ausgegangen werden, dass die Bindung von Indol-3-Carbinol an den AhR für die *CYP1A1*-Induktion verantwortlich war. Erst zu späteren Zeitpunkten und bei wesentlich höheren Konzentrationen wurden Effekte auf die Expression von *NQO1*, *SULT1A* und *GSTP1* beobachtet. Demzufolge konnte aus dem Expressionsmuster eine Hierarchie in der Aktivierung von Fremdstoff-metabolisierenden Enzymen abgeleitet werden. Ferner konnte aus den Untersuchungen die Erkenntnis abgeleitet werden, dass Indol-3-Carbinol im Gegensatz zu Sulforaphan einen bifunktionaler Induzierer darstellt, der sowohl in der Lage ist, Phase-I- als auch Phase-II-Enzyme zu induzieren. In der Regel stellt die Induktion von Cytochrom-P450-Isoformen noch keinen adversen Effekt dar. Erst wenn potentiell mutagene Substanzen wie Benzo[a]pyren von Cytochrom-P450 in das

ultimative Kanzerogen transformiert werden, sind adverse Effekte zu erwarten. Zu vermuten ist, dass durch die erhöhte CYP-Aktivität unter anderem die Bildung reaktiver Intermediate beschleunigt wird und so die genomische Integrität negativ beeinflusst werden kann.

Aus den konzentrationsabhängigen Genexpressionsprofilen wurde deutlich, dass erst mit steigender Indol-3-Carbinol-Konzentration zahlreiche oxidative Stressgene wie *CAT*, *HMOX1*, *PRDX1*, *TXN* und *TXNRD1* induziert wurden. Ob die Aktivierung dieser Gene über den Keap1-Nrf2-Signalsweg verlief, kann nur vermutet werden. In diesem Zusammenhang könnte die Induktion von *KEAP1* und *NFE2L2* nach Indol-3-Carbinol-Behandlung ein möglicher Hinweis sein. Auch hier könnte nur spekuliert werden, ob die Aktivierung durch kovalente Bindung von Indol-3-Carbinol an sensitive Thiol-Gruppen von Keap1 erfolgte oder durch eine gesteigerte ROS-Produktion redox-sensitive Seitenketten von Keap1 modifiziert wurden, so dass Nrf2 nicht mehr dem proteasomalen Abbau zugeführt werden konnte und in den Zellkern translokalisierte. Dass die Bindung von Indol-3-Carbinol trotz seiner indolischen Struktur an reaktive Proteinseitenketten wie Cysteine möglich ist, wurde in Studien bereits gezeigt (Staub et al., 2002). Somit wäre eine direkte kovalente Bindung an Keap1 theoretisch möglich.

Weiterhin konnten aus dem Indol-3-Carbinol-induzierten Genexpressionsprofil ähnlich wie bei Sulforaphan eine Aktivierung von oxidativen Stress- und Zellzyklusarrestgenen beobachtet werden. Neben dem Markergen für oxidativen Stress *HMOX1* wurden die Gene *CDKN1A*, *CDKN2B* und *TP53* zeitabhängig bereits nach 8 h verstärkt transkribiert. Die Induktion dieser Gene könnte somit als Anhaltspunkt für induzierte DNA-Läsionen angesehen werden. Dass Indol-3-Carbinol möglicherweise genotoxischen Stress in den HCT 116-Zellen induzierte, könnte zudem aus dem eingeleiteten Zellzyklusarrest in der G_0/G_1 -Phase abgeleitet werden. Bereits nach 24 h kam es zu einer signifikanten Arretierung von 66 % der Zellen in dieser G_0/G_1 -Phase. Im weiteren Verlauf stieg der Anteil an Zellen in dieser Phase noch bis auf 89 % an. Die Ursache für den deutlichen Zellzyklusarrest könnte sowohl auf direkte als auch indirekt induzierte DNA-Schäden zurückzuführen sein. Mechanistische Untersuchungen in diesem Zusammenhang haben gezeigt, dass Indol-3-Carbinol die mitochondrialen membranständigen ATPasen inhibieren konnte, wodurch es zu einer Hyperpolarisation der inneren Mitochondrienmembran und zu einem Absinken des zellulären ATP Levels kam. Dieser Effekt war wiederum mit einer Stimulation der mitochondrialen ROS-Produktion gekoppelt (Song et al., 2005). Über diesen Mechanismus wäre die indirekte Induktion von oxidativen Basenschäden infolge einer übermäßigen ROS-Produktion denkbar. Weiterhin war für das Indol-3-Carbinol-induzierte Genexpressionsprofil auffällig, dass zusätzlich Gene, deren Proteine in der DNA-Reparatur eine wichtige Rolle spielen, signifikant induziert wurden. So wurden vor allem Gene aus der Nukleotid-Exzisions-Reparatur induziert. Da bereits gezeigt wurde, dass Indol-3-Carbinol prämutagene DNA-Läsionen in Form von sperrigen DNA-Addukten ausbildet (Glatt et al., 2011; Schreiner, 2005),

wurde vor allem eine Stimulation von Genen aus der Nukleotid-Exzisions-Reparatur erwartet. Insofern passten die experimentellen Daten zum vermuteten DNA-Schadensspektrum. Ein weiteres Indiz für die Induktion von DNA-Schäden konnte aus den Western-Blot-Analysen abgeleitet werden. Vor allem p21 wurde durch die Behandlung mit Indol-3-Carbinol konzentrationsabhängig auf Proteinebene stabilisiert. Somit bestätigen die Ergebnisse aus den Western Blot-Analysen die Beobachtungen aus den Genexpressions- und Zellzyklusuntersuchungen und erklären die deutliche Arretierung der Zellen in der G₀/G₁-Phase. Resultierend aus den Ergebnissen lässt sich festhalten, dass Indol-3-Carbinol im niedrigen Dosisbereich vor allem zur Induktion von *CYP1A1* führte. Erst im höheren Konzentrationsbereich traten die prooxidativen und genotoxischen Eigenschaften der Verbindung in den Vordergrund. Ferner wäre im Hinblick auf das in der Literatur beschrieben mutagene Potential von Indol-3-Carbinol eine Supplementierung auf Basis dieser Verbindung aus toxikologischer Sicht nicht zu empfehlen.

Die experimentellen Daten zur toxikologischen Bewertung von Nahrungsergänzungsmitteln auf Sulforaphan-, Indol-3-Carbinol- bzw. Brokkoli-Basis zeigten, dass adverse Effekte durch die Einnahme von hochdosierten Präparaten nicht ausgeschlossen werden können. Dies könnte unter Umständen dazu führen, dass sich gerade in Kombination mit weiteren genotoxischen Noxen die Kanzerogenität erhöht. Vor dem Hintergrund, dass Nahrungsergänzungsmittel vor allem zur positiven Stimulation von gesundheitlich bedeutsamen, physiologischen Parametern im Rahmen der Prävention eingenommen werden, müssen die postulierten antikanzerogenen Eigenschaften aus toxikologischer Sicht zum Teil in Frage gestellt werden.

Die zu Beginn der Arbeit aufgestellte These, dass chemische Verbindungen mit unterschiedlichen molekularen Wirkmechanismen und intrazellulären Angriffspunkten ein individuelles Genexpressionsmuster hervorrufen müssten, konnte anhand der generierten Expressionsprofile bestätigt werden. Sowohl für Indol-3-Carbinol als auch für Sulforaphan zeigten sich in Abhängigkeit von der Konzentration und dem zeitlichen Inkubationsverlauf substanzspezifische Effekte auf die Expression von Genen. So war die ausgeprägte Induktion von Zellzykluskontrollgenen und *CYP1A1* sowie die beachtliche Induktion von Genen, die mit der DNA-Reparatur assoziiert sind, charakteristisch für Indol-3-Carbinol. Für Sulforaphan war primär die Aktivierung von Genen, deren Proteine an der zellulären Redox-Regulation beteiligt sind, kennzeichnend. Anhand der Expressionsmuster konnte demzufolge auf die unterschiedlichen Wirkmechanismen der einzelnen Verbindungen geschlossen werden. Somit bietet die etablierte Methode eine Möglichkeit, Genexpressionsanalysen in die toxikologische Beurteilung und Risikoabschätzung von chemischen Verbindungen mit einfließen zu lassen. Ein weiteres vielversprechendes Potential dieser Methode könnte in der Aufnahme eines toxikologischen „Fingerprints“ liegen. Mithilfe dieses Fingerabdrucks könnten zukünftig aussagekräftige Informationen zu den Toxizitätsmechanismen einzelner Substanzen gewonnen werden.

6. Material und Methoden

Eine tabellarische Zusammenstellung der verwendeten Lösungen, Chemikalien, Verbrauchsmaterialien und Geräte befindet sich im Anhang.

6.1 Zellkultur

6.1.1 Zelllinie und Kultivierungsbedingungen

Als Zellkulturmodell wurde die humane Kolonkarzinomzelllinie HCT 116 verwendet, die unter sterilen Bedingungen bei 37 °C und 100 % Luftfeuchtigkeit in einer 5%igen CO₂-Atmosphäre kultiviert wurde. Die adhärent wachsende Zelllinie wurde ursprünglich von Prof. Vogelstein (John Hopkins Universität, Baltimore, USA) etabliert und später von Prof. Schönfelder (Charité, Universitätsmedizin, Berlin) unserem Arbeitskreis zur Verfügung gestellt. Die Lagerung erfolgte in flüssigem Stickstoff bei -196 °C in einem Einfriermedium aus 90 % FKS und 10 % DMSO. Kultiviert wurde die Zelllinie in sterilem DMEM, das zusätzlich mit 10 % fötalem Kälberserum sowie mit jeweils 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin versetzt war. Alle Arbeiten erfolgten unter einer Sterilbank mit sterilen Geräten und Verbrauchsmaterialien. Der Zustand der Zellen wurde durch Begutachtung im Lichtmikroskop kontrolliert und alle 2 bis 3 Tage erfolgte eine Subkultivierung der Zellen durch Ausdünnen. Hierfür wurden alle verwendeten Lösungen zunächst im Wasserbad auf 37 °C vorgewärmt. Zum Ablösen der Zellen wurden diese zweimal für jeweils ca. 30 sek mit 0,25 % Trypsinlösung gewaschen und nach Entfernen der Waschlösung für ca. 1½ - 2 min im Brutschrank belassen. Im Anschluss wurden die Zellen mit frischem Medium abgelöst, resuspendiert und mit Hilfe eines elektronischen Zellzählgeräts im Größenbereich zwischen 9 - 30 µm quantifiziert. Es wurde mit einer mittleren Verdopplungszeit von 24 h gerechnet und dementsprechend ein adäquater Anteil der Zellen in ein neues Kultivierungsgefäß überführt.

6.1.2 Inkubation der Zellen

Die Inkubation mit Indol-3-Carbinol (I3C), 3,3'-Diindolylmethan (DIM) und Sulforaphan (SFN) erfolgte in DMSO mit einer Lösungsmittelkonzentration von 0,2 %. Entsprechend der endgültigen Analysenkonzentrationen wurden die Stammlösungen (400 mM I3C, 400 mM DIM und 50 mM SFN), die als Aliquote bei -20 °C gelagert wurden, kurz vor der Inkubation mit DMSO verdünnt. Zur Berechnung der exakten Inkubationsvolumina wurde das Mediumvolumen im Kulturgefäß mittels Messpipette bestimmt und die Inkubationskonzentration mit einem Verdünnungsfaktor von 500 ermittelt.

Die Inkubation mit Myrosinase-hydrolysiertem Gesamtglucosinolat-Extrakt aus Brokkoli erfolgte in DMSO mit einer Lösungsmittelkonzentration von 0,2 %.

6.1.3 Koloniebildungsfähigkeit

Zur Bestimmung der Koloniebildungsfähigkeit wurden die Zellen nach erfolgter Behandlung zunächst über ein elektronisches Zellzählgerät gezählt. Anschließend wurden jeweils 300 Zellen in 60 mm Kulturschalen ausgestreut. Nach ca. 8 - 9 Tagen wurde das Medium abgesaugt, die Kolonien mit kaltem PBS gewaschen und mit eiskaltem 96 %igen Ethanol fixiert. Im weiteren Verlauf erfolgte eine 30-minütige Giemsa-Färbung der Kolonien und mehrmaliges Waschen der Schalen mit destilliertem Wasser. Die Auszählung der Kolonien erfolgte visuell.

6.2 Genexpressionsuntersuchungen

Die Aufnahme von Genexpressionsprofilen auf Transkriptionsebene wurde mittels Hochdurchsatz-RT-qPCR durchgeführt. Die Bestimmung der RNA-Integrität wurde anhand einer automatisierten Kapillar-Elektrophorese überprüft und erfolgte in Kooperation mit Dr. Olivier Armant (Karlsruher Institut für Technologie).

Versuchsansatz

Je 5×10^5 HCT 116-Zellen wurden in 60 mm Zellkulturschalen ausgestreut, mindestens 24 h anwachsen gelassen und anschließend mit der jeweiligen Testsubstanz für eine definierte Zeit inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen abtrypsiniert, in 2 ml PBS_{FKS} aufgenommen und in einem 2 ml Reaktionsgefäß durch eine 3-minütige Zentrifugation bei 4 °C und 1.250 rpm pelletiert. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt, das Pellet in 1 ml PBS resuspendiert und die Zellsuspension erneut bei 4 °C und 4.500 rpm für 3 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet trocken bei -80 °C gelagert.

RNA-Isolierung und Quantifizierung

Die Isolierung der RNA sowie alle folgenden Arbeiten erforderten möglichst kontaminationsfreie Arbeitsbedingungen. Um RNasen, DNasen sowie RNA und DNA auf allen Arbeitsflächen zu entfernen, wurden diese mit Ethanol sowie speziellen Reinigungslösungen (DNA Away, RNase Away) dekontaminiert. Die Isolierung der RNA erfolgte mit dem NucleoSpin RNA II Kit von Macherey-Nagel in einem dekontaminierten Abzug. Die Zellpellets wurden dafür zunächst in 100 µl PBS und anschließend mit 350 µl Lysepuffer (RA1) und 3,5 µl Mercaptoethanol versetzt und gevortext. Um zu gewährleisten, dass alle Zellen quantitativ lysiert waren, wurden die Suspensionen kurz sonifiziert (5x pulse, output control 1, duty cycle 10). Anschließend wurden 350 µl 70 %iger Ethanol zugegeben und erneut gevortext. Die gesamte Probe wurde in ein 2 ml Säulen-Reaktionsgefäß mit Filtereinsatz überführt und bei 4 °C und 9.000 rpm für 30 sek zentrifugiert, wobei die RNA und DNA an der

Membran adsorbiert wurden. Der Durchgang wurde verworfen und der Filter mit 350 µl *membrane desalting buffer* (MDB) gespült, indem bei 4 °C und 11.000 rpm für 1 min zentrifugiert wurde. Danach wurde der Durchgang erneut verworfen und die RNA einem DNase-Verdau unterzogen. Es erfolgte die Zugabe von 95 µl DNase Reaktionsgemisch (10 µl DNase und 90 µl DNase Reaktionspuffer) und ein 20-minütiger DNA-Verdau bei Raumtemperatur. In einem Waschschrift mit 200 µl RA2-Puffer und einer Zentrifugation bei 4 °C und 9.000 rpm für 30 sek wurde die Reaktion gestoppt. Der Filter wurde auf ein neues Reaktionsgefäß überführt und die Probe erneut mit 600 µl RA3-Puffer gewaschen. Es folgte eine Zentrifugation bei 4 °C und 9.000 rpm für 30 sek, ein weiterer Waschschrift mit 250 µl RA3-Puffer und eine 2-minütige Zentrifugation bei 4 °C und 13.000 rpm. Der Durchgang wurde verworfen und die RNA durch 1-minütige Zentrifugation bei 13.000 rpm mit 25 µl RNase-freiem Wasser in ein neues Reaktionsgefäß eluiert. Der Elutionsschritt wurde ein weiteres Mal wiederholt und die isolierte RNA bei -80 °C gelagert. Der RNA-Gehalt wurde direkt vor der Umschreibung in die cDNA photometrisch durch Messung der Absorption bei 260 nm bestimmt. Dazu wurden 2 µl Probenmaterial auf eine NanoQuant-Platte pipettiert und im Spektralphotometer (Tecan) vermessen. Zudem wurde die Absorption bei 280 nm ermittelt und das Verhältnis 260/280 nm berechnet. Jede Probe musste einen Absorptionsquotienten größer 2,00 aufweisen, da sonst die Probe zu stark mit Proteinen und Salzen verunreinigt war.

Bestimmung der RNA-Integrität mittels Elektrophorese

Die RNA-Integrität wurde beispielhaft für einige RNA-Proben mittels denaturierender RNA-Gelelektrophorese überprüft. Zu diesem Zweck wurde ein 1,2 %iges Agarosegel durch Aufkochen von 1,2 g Agarose in 83 ml Wasser und 5 ml 20x MOPS-Puffer sowie durch Zugabe von 12 ml Formalin nach Abkühlung der Lösung auf 65 °C hergestellt. 1 µg isolierte RNA wurden mit Formamid-Denaturierungspuffer auf ein Gesamtvolumen von 15 µl gebracht und 10 min bei 65 °C im Heizblock denaturiert. Nach Zugabe von 1,5 µl Lämmli-Ladepuffer (4x) wurde die Elektrophorese in 1x MOPS-Puffer bei 60 V und für 2 h durchgeführt. Die anschließende Detektion erfolgte im Geldokumentationsgerät (Fuji LAS3000)

Bestimmung der RNA-Integrität mittels automatisierter Kapillar-Elektrophorese

Die Integrität der isolierten Gesamt-RNA wurde mit dem RNA-6000-Nano-LabChip-Kit am Agilent-2100-Bioanalyser ermittelt. RNA-Proben mit einem Gehalt von bis zu 500 ng/µl wurden in die Chip-Wells pipettiert und über in Glas eingezogene Mikrokapillaren elektrophoretisch aufgetrennt. Im Anschluss erfolgte die automatische Detektion der RNA-Fragmente über einen Fluoreszenzdetektor. Aus diesen Daten generierte der Bioanalyser sowohl ein Elektropherogramm als auch ein virtuelles Gelbild. Über die Software wurde zudem für jede untersuchte RNA-Probe eine *RNA integrity number* (RIN) generiert, wobei RIN 0 für komplett degradiert und RIN 10 für intakt steht.

cDNA-Synthese

Die folgenden Arbeiten wurden in einem separaten Raum, an einer PCR-Arbeitsbank und mit kontaminationsfreien Verbrauchsmaterialien durchgeführt. Für die Umschreibung in die cDNA wurde das Synthese-Kit von Quanta verwendet und jede Probe wurde zweimal umgeschrieben. Der Reaktionsansatz, bestehend aus je 1 µg RNA, 4 µl Reaktionsmix (5x) und 1 µl reverse Transkriptase, wurde mit Nuklease-freiem Wasser auf 20 µl ergänzt, kurz gevortext und zentrifugiert. In einem Thermocycler erfolgte die anschließende cDNA-Synthese (Tabelle 1). Die cDNA wurde im Anschluss zentrifugiert und bis zur Präamplifikation bei -20 °C gelagert.

Tabelle 1: Temperaturprogramm zur cDNA-Synthese

Temperatur (°C)	Zeit (min)
25	5
42	30
85	5
4	∞

Prä-Amplifikation (Specific Target Amplifikation)

Um eine ausreichende Menge an Template jedes Gens für die RT-qPCR in den Proben garantieren zu können, war eine *Prä-Amplifikation* jedes Gens mittels spezifischer Primer notwendig. Zu Beginn der Untersuchungen wurden die Primepaare von der Firma Fluidigm designt und synthetisiert. Da im Laufe der Versuche das Set-Up umgestellt wurde, wurde ein Teil der Primer selbst designt und etabliert (siehe Anhang 8.7.2). Zunächst wurde je 1 µl jedes 100 µM *forward*- und *reverse*-Primer-Paars in einem 500 µl Reaktionsgefäß gepoolt und mit DNA-Suspensionspuffer auf ein Endvolumen von 200 µl ergänzt. Die eingesetzte Primer-Konzentration im Ansatz betrug letztlich 500 nM. In PCR-Streifen wurde in jedes Reaktionsgefäß zuerst der Supermix, besteht aus TaqMan PreAmp Mix, gepoolten Primern sowie Wasser pipettiert, und anschließend die cDNA zugegeben (Tabelle 2). Zusätzlich zur cDNA wurde noch ein externer cDNA-Standard, eine *no template control* (NTC) in Form von Wasser sowie eine nicht umgeschriebene RNA-Probe als -reverse Transkriptase (-RT)-Kontrolle mitgeführt. Nach kurzem Vortexen und Zentrifugieren erfolgte die *Prä-Amplifikation* im Thermocycler (Tabelle 3).

Tabelle 2: Pipettierschema zur Herstellung des *Prä*-Amplifikations-Mix

Komponente	Volumen/Reaktion (µl)
TaqMan PreAmp Mix (2x)	2,5
500 nM gepoolte Primer	0,5
Wasser	0,75
cDNA	1,25

Tabelle 3: Temperaturprogramm zur *Prä*-Amplifikation

Temperatur (°C)	Zeit (min)
95	10
95	15 sek
60	4
4	∞

← 12x

Exonukleaseverdau

Damit nicht verbrauchte Primer-Oligonukleotide vor der eigentlichen Amplifikation wieder aus dem System entfernt werden, wurde ein Exonukleaseverdau durchgeführt. Dazu wurden je 2 µl Exonukleasemix, besteht aus 0,2 µl Reaktionspuffer (10x), 0,4 µl Exonuklease (20 U/µl) und 1,4 µl Wasser, zur *prä*-amplifizierten cDNA pipettiert. Nach kurzem Vortexen und Zentrifugieren wurde der Exonukleaseverdau im Thermocycler bei 37 °C für 40 min durchgeführt. Durch anschließendes Erhitzen auf 85 °C für 15 min wurde die Exonuklease wieder inaktiviert. Die Proben wurden im weiteren Verlauf 1:5 mit TE-Puffer verdünnt und bis zur qPCR bei -20 °C gelagert.

Primer- und Probenvorbereitung

Die 100 µM *forward*- und *reverse*-Primer-Paare wurden zunächst auf eine Konzentration von 5 µM verdünnt. In eine 96-Well-Platte wurde in jedes Well je 2,5 µl eines *forward*- und *reverse*-Primer-Paars pipettiert und mit einem Mix aus 22,5 µl DNA-Suspensionspuffer und 25 µl *assay loading reagent* (2x) verdünnt.

Zur Probenvorbereitung wurden in PCR-Streifen je 2,25 µl der *prä*-amplifizierten cDNA mit einem Mix, besteht aus 2,5 µl SsoFast EvaGreen Supermix (2x) und 0,25 µl *DNA binding dye sample loading reagent* (20x), versetzt. Des Weiteren wurde eine zusätzliche NTC in Form von Wasser mitgeführt.

qPCR

Die qPCR-Analyse erfolgte am BioMark-System, einem Hochdurchsatz-PCR-Gerät, das die simultane Analyse von 96 x 96 unabhängigen PCR-Reaktionen ermöglichte. Zunächst wurden die Akkumulatoren des *dynamic array* mit einem Fluid im *integrated fluidic circuits (IFC)-Controller* geprint. Dabei wurde das Fluid in die Kanäle des auf dem Chip befindlichen *dynamic array* geleitet. Im Anschluss wurden je 5 µl der vorbereiteten Primer- und Probenlösung in die entsprechen Assay- und Proben-Inlets pipettiert und der Chip im *IFC-Controller* erneut geprint, so dass letztendlich alle Reaktionskammern mit je einer Probe und einem Primer-Paar gefüllt waren. Im weiteren Verlauf wurde der Chip im BioMark-System platziert und die Real-Time PCR durchgeführt (Tabelle 4).

Tabelle 4: Analysenprogramm der Real-Time PCR

Segment	Prozess	Temperatur (°C)	Zeit (sek)	Heizrate (°C/Sek)
1	Thermisches Mischen	70	2400	5,5
		60	30	5,5
2	Hot Start	95	60	5,5
3	PCR (30 Zyklen)	96	5	5,5
		60	20	5,5
4	Schmelzkurvenanalyse	60	3	1
		60-95		1 °C/3 sek

Auswertung über Real-Time PCR Analysis

Die Auswertung der Rohdaten wurde zunächst mit der Software *Real-Time PCR Analysis* von Fluidigm durchgeführt. Zuerst wurde die vollständige Beladung der einzelnen Reaktionskammern über den Passiv-Referenzfarbstoff ROX überprüft. Die Detektion der Amplifikate erfolgte mit Hilfe des interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffs EvaGreen, wobei die Spezifität jeder PCR-Reaktion über die Schmelzkurvenanalyse sichergestellt wurde. In den Analyse-Settings wurde mit linearer Basislinien-Korrektur, mit der *Cq-threshold*-Methode *auto-detectors* und mit einem *quality-threshold* von 0,65 gearbeitet. In der Software wurden die Cq-Werte über eine Farbskala kodiert und visuelle in einer *heat-map* dargestellt, in der nicht-erfolgte PCR-Reaktionen detektiert und gefiltert werden konnten. Über die mitgeführten NTCs fand die Überprüfung auf eventuelle Kontaminationen statt, während anhand der -RT-Kontrolle die Kontamination der RNA und die Spezifität der Primer-Paare überprüft wurde. Zudem wurde die -RT-Kontrolle zur Berechnung der genomischen DNA-Kontamination herangezogen.

Auswertung über GenEx

Da die Verarbeitung der umfangreichen Daten über eine Standardsoftware nicht mehr möglich war, wurde die weitere Datenanalyse über die Software *GenEx* vorgenommen. Mit Hilfe der Software war es zudem möglich, über die integrierten Programme *NormFinder* und *geNorm* die geeigneten Referenzgene zu selektieren. Insgesamt standen die 5 Referenzgene *ACTB*, *B2M*, *GAPDH*, *GUSB* und *HPRT1* sowohl aus den Kontroll- als auch aus den Behandlungsgruppen für jede Analyse zur Auswahl. Die Normalisierung der Daten erfolgte durch das bereits beschriebene relative Quantifizierungsmodell (siehe Absatz 2.3.3).

Überprüfung der PCR-Produkte mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese

Um die Spezifität der Primer zu überprüfen, wurde zusätzlich zur Schmelzkurvenanalyse eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt, in der alle PCR-Produkte überprüft wurden. So konnte die Amplifikation auf eine mögliche Artefakt- und Primer-Dimerbildung überprüft werden. Zu Beginn wurde ein 2 %iges Agarose-Gel durch Aufkochen der Agarose in TAE-Puffer und Überführen in eine Gelkammer hergestellt. Für die PCR wurden in einem 20 µl Ansatz die benötigten Reagenzien pipettiert und die Reaktion im Thermocycler gestartet (Tabelle 5 und 6). Zur Überprüfung der Primer auf Dimerbildung wurde Wasser anstelle von cDNA pipettiert.

Tabelle 5: Pipettierschema zur Herstellung des PCR-Mix

Komponente	Volumen/Reaktion (µl)
SsoFast EvaGreen Supermix (2x)	10
Wasser	8
1 µM jedes Primer-Paars	1
cDNA	1

Tabelle 6: Temperaturprogramm zur Amplifikation

Temperatur (°C)	Zeit (sek)	
95	60	
96	5	← 40x
60	20	
4	∞	

Nach erfolgter Amplifikation wurden 4,8 µl Ladepuffer zum gesamten Ansatz pipettiert und 8 µl davon in die Geltaschen geladen. Als Referenz dienten 4 µl DNA-Leiter (GelPilot, 50 bp). Anschließend wurde die Elektrophorese bei 100 V für 80 min durchgeführt und die Amplifikate im

Geldokumentationsgerät (Fuji LAS3000) detektiert (siehe Anhang 8.7.2.4). Anhand der Ergebnisse wurde im weiteren Verlauf darüber entschieden, ob die Performance der Primer akzeptabel war oder ein neues Primer-Design erforderlich war.

6.3 Enzymaktivitäten

6.3.1 Bestimmung der EROD-Aktivität

Durch Bestimmung der 7-Ethoxyresorufin-*O*-Deethylase (EROD)-Aktivität lassen sich die humanen CYP-Isoformen CYP1A1, 1A2 und 1B1 charakterisieren. Die EROD-Aktivität beruht auf der recht spezifischen *O*-Deethylierung des Phenoxazonderivates 7-Ethoxyresorufin in Gegenwart von Sauerstoff und einem NADPH-generierendem System zu Resorufin (Abbildung 35). Resorufin kann mittels Fluoreszenzdetektion bei der Anregungswellenlänge von 530 nm und der Emissionswellenlänge von 580 nm detektiert werden.

Versuchsansatz

Je 5×10^6 HCT 116-Zellen wurden in 150 mm Zellkulturschalen ausgestreut, mindestens 24 h anwachsen gelassen und anschließend mit der jeweiligen Testsubstanz für eine definierte Zeit inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen abtrypsiniert, in 10 ml PBS_{FKS} aufgenommen und in einem 15 ml Plastikröhrchen durch eine 3-minütige Zentrifugation bei 4 °C und 1.250 rpm pelletiert. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt, das Pellet in 3 ml PBS resuspendiert und die Suspension erneut bei 4 °C und 1.250 rpm zentrifugiert. Die Zellen wurden in 1,5 ml Kaliumhydrogenphosphatpuffer resuspendiert und am elektronischen Zellzählgerät wurde die Zellzahl bestimmt. In ein 1,5 ml Reaktionsgefäß wurden $12,6 \times 10^6$ Zellen pipettiert, für 3 min bei 4 °C und 4500 rpm pelletiert und wieder in 100 µl Kaliumhydrogenphosphatpuffer resuspendiert. Bis zur Analyse erfolgte die Lagerung bei -20 °C.

Bestimmung der EROD-Aktivität

Das NADPH-generierende System wurde vor jeder Inkubation frisch hergestellt und die Prozessierung der Proben erfolgte innerhalb von 2 h unter Ausschluss von Tageslicht. Um zu gewährleisten, dass alle Zellen quantitativ lysiert waren, wurden die Suspensionen kurz sonifiziert (5x pulse, output control 1, duty cycle 10). Zu 100 µl der Zellsuspensionen wurden 5 µl 1 mM 7-Ethoxyresorufin und 1 µl Kaliumhydrogenphosphatpuffer pipettiert und für 5 min bei 37 °C vorinkubiert. Nach erfolgter Vorinkubation wurden jeweils 17,5 µl NADPH-generierendes System zum Ansatz pipettiert und für weitere 60 min bei 37 °C inkubiert. Das Abstoppen der Reaktion erfolgte durch Zugabe von 250 µl eiskaltem Methanol. Das ausgefällte Protein wurde durch Zentrifugation bei 4 °C und 10.000 rpm

pelletiert, der Überstand wurde zur Analyse in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und auf Eis unter Ausschluss von Tageslicht gelagert.

Berechnung der EROD-Aktivität

Die Quantifizierung erfolgte mittels externer Kalibrierung im Bereich von 0,25-14 pmol Resorufin über die Peakflächen.

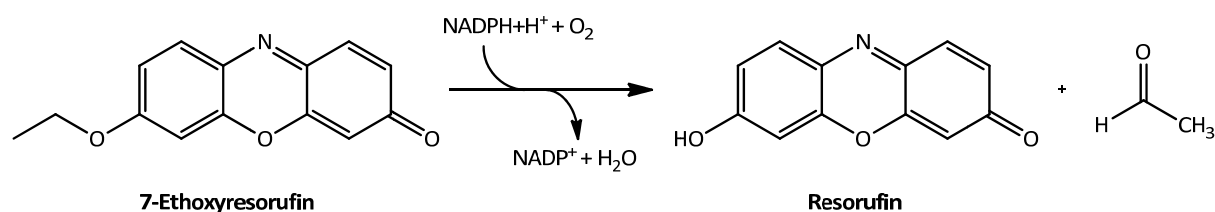


Abbildung 35: Schematische Darstellung der zugrunde liegenden Reaktion zur Quantifizierung der 7-Ethoxyresorufin-O-Deethylase-Aktivität

6.3.2 Bestimmung der Thioredoxinreduktase-Aktivität

Die Thioredoxinreduktase-Aktivität wurde mit Hilfe des Kits von Cayman Chemicals bestimmt. Grundlage für die Quantifizierung der Thioredoxinreduktase-Aktivität bildete dabei die Reduktion des Ellmans-Reagenz 5,5'-Dithiobis-2-Nitrobenzoesäure (DTNB) zu 5-Thio-2-Nitrobenzoesäure (TNB) unter NADPH-Verbrauch (Abbildung 36). Der Verlauf der Reaktion konnte über die Absorptionsänderung bei 405 nm durch das Entstehen des gelb gefärbten Produkts TNB detektiert werden. Durch Einsatz des spezifischen Thioredoxinreduktase-Inhibitors Aurothiomalat (ATM), wurden zudem nicht-Thioredoxinreduktase-abhängige DTNB Reduktionen erfasst.

Versuchsansatz

Je 1×10^6 HCT 116-Zellen wurden in 100 mm Zellkulturschalen ausgestreut, mindestens 24 h anwachsen gelassen und anschließend mit der jeweiligen Testsubstanz für eine definierte Zeit inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen abtrypsiniert, in 5 ml PBS_{FKS} aufgenommen und in einem 15 ml Plastikröhrchen durch eine 3-minütige Zentrifugation bei 4 °C und 1.250rpm pelletiert. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt, das Pellet in 5 ml PBS resuspendiert und die Zellzahl am elektronischen Zellzählgerät bestimmt. In ein 1,5 ml Reaktionsgefäß wurden $3,5 \times 10^6$ Zellen pipettiert, für 3 min bei 4 °C und 4.500rpm pelletiert und wieder in 60 µl Kaliumhydrogenphosphatpuffer resuspendiert. Bis zur Analyse erfolgte die Lagerung bei -20 °C.

Bestimmung der Thioredoxinreduktase-Aktivität

Um zu gewährleisten, dass alle Zellen quantitativ lysiert waren, wurden die Suspensionen zu Beginn kurz sonifiziert (5x pulse, output control 1, duty cycle 10). Anschließend erfolgte eine 15-minütige Zentrifugation bei 4 °C und 8.500 rpm. Bis zur weiteren Analyse wurde der Überstand auf Eis gelagert. In eine 96-Well-Platte wurden gemäß dem Protokoll verschiedene Ansätze zu je 160 µl pipettiert und die Reaktion durch Zugabe von 20 µl NADPH und 20 µl DTNB gestartet. Nach 10 sek Schütteln wurde die Absorption am Mikrotiterplattenlesegerät (Tecan) bei 405 nm und Raumtemperatur gemessen. Im weiteren Verlauf erfolgte 12 min lang im 1-Minutenabstand die erneute Messung der Absorption.

Berechnung der Thioredoxinreduktase-Aktivität

In der Regel wurde mindestens über 6 Zyklen eine lineare Absorptionsänderung zur Quantifizierung herangezogen (Gleichung 6.1). Im Anschluss wurde die Absorptionsänderung noch durch die nicht-Thioredoxinreduktase-abhängige DTNB-Reduktionen und den Blindwert korrigiert (Gleichung 6.2). Die Thioredoxinreduktase-Aktivität konnte unter Berücksichtigung des Extinktionskoeffizient $\epsilon_{\text{TNB}, 405 \text{ nm}}=6,35 \text{ mM}^{-1}$, des Gesamtvolumens, der eingesetzten Zellen ($1,16 \times 10^6$ Zellen) sowie einem Umrechnungsfaktor berechnet werden (Gleichung 6.3) Eine Unit ist definiert als die NADPH-abhängige Produktion von 2 µmol TNB pro Minute bei 22 °C.

$$\Delta A_{405}/\text{min} = \frac{A_{405}(\text{Zeitpunkt 2}) - A_{405}(\text{Zeitpunkt 1})}{\text{Zeitpunkt 2 (min)} - \text{Zeitpunkt 1 (min)}} \quad (\text{Gl. 6.1})$$

$$\Delta A/\text{min (Probe)}_{\text{korr.}} = \Delta A/\text{min (Probe)} - [\Delta A/\text{min (Probe + ATM)} - \Delta A/\text{min (BW + ATM)}] \quad (\text{Gl. 6.2})$$

$$\text{Enzymaktivität (U)} = \frac{\Delta A/\text{min (Probe)}_{\text{korr.}}}{6,35 \text{ mM}^{-1}} \cdot \frac{0,2 \text{ ml}}{1,16} \cdot 1000 \quad (\text{Gl. 6.3})$$

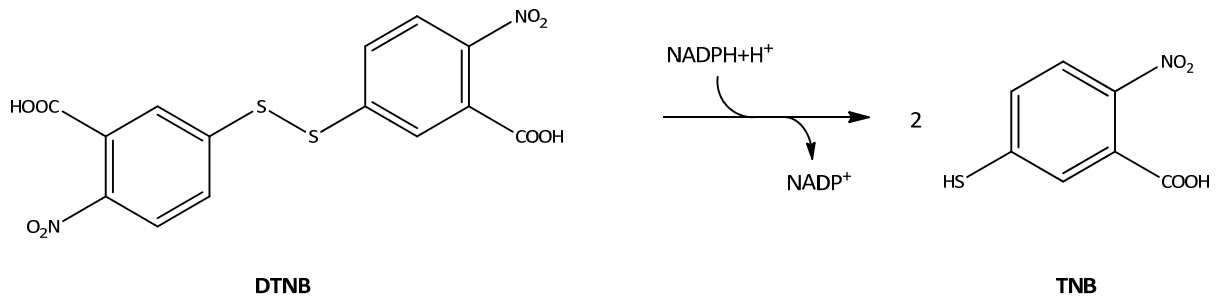


Abbildung 36: Schematische Darstellung der zugrunde liegenden Reaktion zur Quantifizierung der Thioredoxin-reduktase-Aktivität (DTNB = 5,5'-Dithiobis-2-Nitrobenzoesäure; TNB = 5-Thio-2-Nitrobenzoesäure)

6.4 Zellzyklusuntersuchungen

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie kann die Zellzyklusverteilung anhand einer DNA-Quantifizierung bestimmt werden. Da der DNA-Gehalt der Zellen beim Durchlaufen des Zellzyklus durch Replikation während der S-Phase zunimmt, kann eine Einteilung der Zellen anhand ihres DNA-Gehalts in G₀/G₁-, S- und G₂/M-Phase erfolgen. Zum Anfärben der DNA wurde der membrangängige Farbstoff 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) verwendet, der bevorzugt an AT-reiche Regionen der DNA bindet.

Versuchsansatz

Je 1x10⁶ HCT 116-Zellen wurden in 100 mm Zellkulturschalen ausgestreut, mindestens 24 h anwachsen gelassen und anschließend mit der jeweiligen Testsubstanz für eine definierte Zeit inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen abtrypsiniert, in 5 ml PBS_{FKS} aufgenommen und in einem 15 ml Plastikröhrchen durch eine 3-minütige Zentrifugation bei 4 °C und 1.250 rpm pelletiert. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt, das Pellet in 1 ml PBS resuspendiert, mit 3 ml eiskaltem Methanol auf dem Vortex versetzt und bis zur Analyse bei -20 °C gelagert.

DAPI-Färbung und Durchflusszytometrie

Vor der Messung am Durchflusszytometer wurde die Suspension bei 4.500 rpm und 4 °C zentrifugiert und das Pellet in 2 ml DAPI-Färbelösung (Cystain DNA/Protein, Partec) resuspendiert. Nach 4 h wurden die Proben in spezielle Messröhrchen pipettiert und die Messung am Durchflusszytometer (LSR-Fortessa) vorgenommen. Bei der Messung wurden 20.000 Events/Zellen pro Analyse aufgenommen. Die Auswertung wurde mit dem Softwareprogramm FACSDiva durch Gaten und Zuordnung der Zellen zur G₀/G₁-, S- und G₂/M-Phase realisiert.

Gating-Prozedur

Bei dieser Methode der Bestimmung der Zellzyklusverteilung können häufig zwei Zellkerne der G_0/G_1 -Phase Aggregate bilden und werden lediglich als ein singuläres Ereignis, d.h. eine Zelle mit höherem DNA-Gehalt in der G_2/M -Phase, registriert. Durch Auftreten solcher Doubletten kommt es letztendlich zur Verschiebung des Histogramms zugunsten der G_2/M -Phase. Durch einstellen definierter Gates im Dotplot, werden vorhandene Doubletten detektiert und von der Analyse ausgeschlossen. Zunächst wurde die gesamte Zellpopulation durch Darstellung von SSC-A gegen FSC-A erfasst und Zelltrümmer durch setzen eines Gates (P1) von der weiteren Analyse diskriminiert. Aus dieser selektierten Zellpopulation wurden die Doubletten durch die Darstellung von FSC-H gegen FSC-W detektiert und von der weiteren Analyse ausgegattet. Anschließend erfolgte die Darstellung der Zellen im Histogramm (siehe Anhang 8.7.3.1)

6.5 Immunologischer Nachweis zellulärer Proteine

Die Bestimmung ausgewählter Proteine wurde durch eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese mit anschließendem Western Blot realisiert.

Versuchsansatz

Je 1×10^6 HCT 116-Zellen wurden in 100 mm Zellkulturschalen ausgestreut, mindestens 24 h anwachsen gelassen und anschließend mit der jeweiligen Testsubstanz für eine definierte Zeit inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen abtrypsiniert, in 5 ml PBS_{FKS} aufgenommen und in einem 15 ml Plastikröhrchen durch eine 3-minütige Zentrifugation bei $4^\circ C$ und 1.250 rpm pelletiert. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt, das Pellet in 1 ml PBS resuspendiert und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach einer weiteren 3-minütigen Zentrifugation bei $4^\circ C$ und 4.500 rpm wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet trocken bei $-20^\circ C$ gelagert.

Proteinextraktion und Gehaltsbestimmung nach Bradford

Zur Aufarbeitung der Proben wurden die Pellets in 100 μ l eiskaltem RIPA-Puffer resuspendiert und 15 min auf Eis geschüttelt. Der Aufschluss der Zellmembran erfolgte durch Sonifizieren (5x pulse, output control 1, duty cycle 10) auf Eis. Anschließend wurden alle unlöslichen Zellbestandteile durch eine 20-minütige Zentrifugation bei $4^\circ C$ und 13.000 rpm abgetrennt und der Überstand als Proteinextrakt weiter verwendet. Für die Quantifizierung des Proteingehaltes nach Bradford wurde ein Aliquot des Extraktes 1:150 in Wasser verdünnt. Parallel dazu wurden aus einer BSA-Stammlösung (10 mg/1 ml) eine 1:10-Verdünnung (1 mg/1 ml) hergestellt. Die Kalibrierung mittels BSA erfolgte im Konzentrationsbereich von 0,01-0,075 mg/ml. In die Wells einer 96-Well-Platte wurden in Doppelbestimmung 20 μ l der verdünnten Probe bzw. Kalibrierlösung mit 180 μ l

Reagenzmix (140 µl Wasser + 40 µl Protein-Assay-Reagenz) versetzt und nach 5 min die Absorption bei 595 nm in einem Mikrotiterplattenlesegerät (Tecan) gemessen. Der Proteinextrakt wurde mit Ladepuffer und Reduzierungsgens versetzt und durch Zugabe von Wasser auf einen Gehalt von 3 µg/µl eingestellt. Anschließend wurden die Proteine in der Probe durch 10-minütiges Erhitzen bei 95 °C denaturiert und die denaturierten Extrakte bei -20 °C gelagert.

SDS-Page und Western Blot

Für die SDS-Page wurde die Elektrophoresekammer mit Lämmli-Laufpuffer gefüllt und die Taschen des Gels, bestehend aus 12 % Trenngel und 4 % Sammelgel, mit jeweils 45 µg Protein bzw. 6 µl Molekulargewichtsmarker beladen. Die elektrophoretische Trennung wurde bei einer Spannung von 110 V im Sammelgel und 130 V im Trenngel durchgeführt. Im nächsten Schritt wurde das Gel entnommen, zugeschnitten und für 15 min im eiskalten Transferpuffer konditioniert. Die Konditionierung der Nitrozellulose-Membran und des Whatman-Papiers erfolgte ebenso für 15 min in eiskaltem Transferpuffer. Für den Blot-Vorgang wurde das Gel direkt auf der Nitrozellulose-Membran platziert und von beiden Seiten wurden Membran und Gel von je 6 Stück Whatman-Papier eingebettet. Durch Andrücken des Stapels wurde sichergestellt, dass sich keine Luftblasen zwischen den einzelnen Schichten befanden. Der Proteintransfer erfolgte in einem Tank-Blot-Verfahren auf Eis bei einer Stromstärke von 400 mA (für 4 Gele, ca. 9,5 mA/cm²) über einen Zeitraum von 70 min.

Immunmarkierung und Chemilumineszenz-Detektion

Zunächst wurde die Nitrozellulose-Membran nach dem Blot-Vorgang für 1 h in Blockierlösung in einem 50 ml Tube inkubiert. Die Antikörper-Inkubation wurde mit 5 ml des in Blockierlösung verdünnten Primärantikörpers (siehe Anhang 8.3) über Nacht bei 4°C auf einem Rotator durchgeführt. Bevor mit 5 ml des in Blockierlösung verdünnten Sekundärantikörpers inkubiert werden konnte, wurde die Membran dreimal in PBS-T gewaschen. Nach 1 h Inkubation auf dem Rotator bei Raumtemperatur wurde die Membran erneut dreimal in PBS-T und noch zweimal in PBS gewaschen.

Die Detektion der Chemilumineszenzreaktion erfolgte anschließend nach Zugabe von 1 ml ECL Reagenz, das für genau 1 min auf der Membran belassen wurde, im Geldokumentationsgerät (Fuji LAS3000). Grundlage für die Detektion war dabei die Oxidation von Luminol durch die an den Sekundärantikörper gekoppelte Meerrettich-Peroxidase. Zusätzlich zur Chemilumineszenz wurde der Molekulargewichtsmarker durch Messung im Weißlicht aufgenommen. Für weitere immunologische Nachweise wurde die Membran in PBS-T gewaschen und erneut mit Primär- und Sekundärantikörper inkubiert.

6.6 Hydrolyse des Gesamtglucosinolat-Extrakts aus Brokkoli

Der Versuch wurde von Dr. Ann Liza Piberger und Isabel Pfeiffer 2011 im Arbeitskreis etabliert. Bei der Umsetzung der im Extrakt enthaltenen Glucosinolate mittels Myrosinase entstehen äquimolare Mengen Glucose, die bei vollständiger Hydrolyse ein Maximum erreichen, das enzymatisch detektiert werden kann. Aus den Vorarbeiten wurde eine optimale Reaktionszeit für die maximale Hydrolyse von 100 min abgeleitet.

Versuchsansatz

Für die Umsetzung der Glucosinolate wurden 362 µl bidestilliertem Wasser in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß vorgelegt und anschließend 58 µl Gesamtglucosinolat-Extrakt aus Brokkoli dazu pipettiert. In den Deckel des Reaktionsgefäßes wurden 10 µl Myrosinase mit einer Volumenaktivität von 33 U/ml pipettiert und die Reaktion durch kurzes Zentrifugieren in der Tischzentrifuge gestartet. Die daraus resultierende Glucosinolatkonzentration im Ansatz betrug 40 mM. Zur vollständigen Homogenisierung der Probe erfolgte kurzes Vortexen und eine erneute Zentrifugation. Im Anschluss wurde der Ansatz für 100 min bei 37 °C im Thermoblock inkubiert. Zum Abstoppen der enzymatischen Reaktion wurde das Reaktionsgefäß auf Eis gelagert und nach 5 min ein entsprechendes Aliquot zur Verdünnung in DMSO entnommen. Unmittelbar nach der Verdünnung in DMSO wurde die Lösung zur Inkubation in der Zellkultur eingesetzt.

7. Literaturverzeichnis

- ABBAS, T. & DUTTA, A. 2009. p21 in cancer: intricate networks and multiple activities. *Nature Reviews Cancer*, 9, 400-414.
- ABRAHAM, N. G. & KAPPAS, A. 2008. Pharmacological and clinical aspects of heme oxygenase. *Pharmacological Reviews*, 60, 79-127.
- AGERBIRK, N., OLSEN, C. E. & SORENSEN, H. 1998. Initial and final products, nitriles, and ascorbigens produced in myrosinase-catalyzed hydrolysis of indole glucosinolates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 1563-1571.
- AGGARWAL, B. B. & ICHIKAWA, H. 2005. Molecular targets and anticancer potential of indole-3-carbinol and its derivatives. *Cell Cycle*, 4, 1201-1215.
- ANDERSEN, C. L., JENSEN, J. L. & ØRNTOFT, T. F. 2004. Normalization of Real-Time Quantitative Reverse Transcription-PCR Data: A Model-Based Variance Estimation Approach to Identify Genes Suited for Normalization, Applied to Bladder and Colon Cancer Data Sets. *Cancer Research*, 64, 5245-5250.
- ANDERTON, M. J., MANSON, M. M., VERSCHOYLE, R., GESCHER, A., STEWARD, W. P., WILLIAMS, M. L. & MAGER, D. E. 2004a. Physiological modeling of formulated and crystalline 3,3'-diindolylmethane pharmacokinetics following oral administration in mice. *Drug Metabolism and Disposition*, 32, 632-638.
- ANDERTON, M. J., MANSON, M. M., VERSCHOYLE, R. D., GESCHER, A., LAMB, J. H., FARMER, P. B., STEWARD, W. P. & WILLIAMS, M. L. 2004b. Pharmacokinetics and tissue disposition of indole-3-carbinol and its acid condensation products after oral administration to mice. *Clinical Cancer Research*, 10, 5233-5241.
- APPELLA, E. & ANDERSON, C. W. 2001. Post-translational modifications and activation of p53 by genotoxic stresses. *European Journal of Biochemistry*, 268, 2764-2772.
- ARORA, A., SETH, K., KALRA, N. & SHUKLA, Y. 2005. Modulation of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance in K562 leukemic cells by indole-3-carbinol. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 202, 237-243.
- BAASANJAV-GERBER, C., HOLLNAGEL, H. M., BRAUCHMANN, J., IORI, R. & GLATT, H. 2011a. Detection of genotoxicants in Brassicales using endogenous DNA as a surrogate target and adducts determined by P-32-postlabelling as an experimental end point. *Mutagenesis*, 26, 407-413.
- BAASANJAV-GERBER, C., MONIEN, B. H., MEWIS, I., SCHREINER, M., BARILLARI, J., IORI, R. & GLATT, H. 2011b. Identification of glucosinolate congeners able to form DNA adducts and to induce mutations upon activation by myrosinase. *Molecular Nutrition & Food Research*, 55, 783-792.
- BAIRD, L. & DINKOVA-KOSTOVA, A. T. 2011. The cytoprotective role of the Keap1-Nrf2 pathway. *Archives of Toxicology*, 85, 241-272.
- BARKNOWITZ, G., ENGST, W., SCHMIDT, S., BERNAU, M., MONIEN, B. H., KRAMER, M., FLORIAN, S. & GLATT, H. 2014. Identification and Quantification of Protein Adducts Formed by Metabolites of 1-Methoxy-3-indolylmethyl Glucosinolate in Vitro and in Mouse Models. *Chemical Research in Toxicology*, 27, 188-199.
- BHAMRE, S., SAHOO, D., TIBSHIRANI, R., DILL, D. L. & BROOKS, J. D. 2009. Temporal Changes in Gene Expression Induced by Sulforaphane in Human Prostate Cancer Cells. *Prostate*, 69, 181-190.

- BJELDANES, L. F., KIM, J. Y., GROSE, K. R., BARTHOLOMEW, J. C. & BRADFIELD, C. A. 1991. AROMATIC HYDROCARBON RESPONSIVENESS-RECEPTOR AGONISTS GENERATED FROM INDOLE-3-CARBINOL INVITRO AND INVIVO - COMPARISONS WITH 2,3,7,8-TETRACHLORODIBENZO-PARA-DIOXIN. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88, 9543-9547.
- BLACKBURN, M., GAIT, M. J., LOAKES, D. & WILLIAMS, D. 2006. *Nucleic acids in chemistry and biology*, Cambridge, RSC Publ.
- BONES, A. M. & ROSSITER, J. T. 2006. The enzymic and chemically induced decomposition of glucosinolates. *Phytochemistry*, 67, 1053-1067.
- BRADLOW, H. L. 2008. Indole-3-carbinol as a chemoprotective agent in breast and prostate cancer. *In Vivo*, 22, 441-445.
- BRADLOW, H. L. & ZELIGS, M. A. 2010. Diindolylmethane (DIM) Spontaneously Forms from Indole-3-carbinol (I3C) During Cell Culture Experiments. *In Vivo*, 24, 387-391.
- BREW, C. T., ARONCHIK, I., HSU, J. C., SHEEN, J. H., DICKSON, R. B., BJELDANES, L. F. & FIRESTONE, G. L. 2006. Indole-3-carbinol activates the ATM signaling pathway independent of DNA damage to stabilize p53 and induce G1 arrest of human mammary epithelial cells. *International Journal of Cancer*, 118, 857-868.
- BRYANT, C. S., KUMAR, S., CHAMALA, S., SHAH, J., PAL, J., HAIDER, M., SEWARD, S., QAZI, A. M., MORRIS, R., SEMAAN, A., SHAMMAS, M. A., STEFFES, C., POTTI, R. B., PRASAD, M., WEAVER, D. W. & BATCHU, R. B. 2010. Sulforaphane induces cell cycle arrest by protecting RB-E2F-1 complex in epithelial ovarian cancer cells. *Molecular Cancer*, 9.
- BUSTIN, S. A. 2002. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *Journal of Molecular Endocrinology*, 29.
- BUSTIN, S. A. 2004. *A-Z of quantitative PCR*, La Jolla, Calif., Internat. Univ. Line.
- BUSTIN, S. A., BENES, V., GARSON, J. A., HELLEMANS, J., HUGGETT, J., KUBISTA, M., MUELLER, R., NOLAN, T., PFAFFL, M. W., SHIPLEY, G. L., VANDESOMPELE, J. & WITTEWER, C. T. 2009. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clinical Chemistry*, 55, 611-622.
- CHENG, D. L., HASHIMOTO, K. & UDA, Y. 2004. In vitro digestion of sinigrin and glucotropaeolin by single strains of Bifidobacterium and identification of the digestive products. *Food and Chemical Toxicology*, 42, 351-357.
- CHRISTENSEN, J. G. & LEBLANC, G. A. 1996. Reversal of multidrug resistance in vivo by dietary administration of the phytochemical indole-3-carbinol. *Cancer Research*, 56, 574-581.
- COVER, C. M., HSIEH, S. J., TRAN, S. H., HALLDEN, G., KIM, G. S., BJELDANES, L. F. & FIRESTONE, G. L. 1998. Indole-3-carbinol inhibits the expression of cyclin-dependent kinase-6 and induces a G(1) cell cycle arrest of human breast cancer cells independent of estrogen receptor signaling. *Journal of Biological Chemistry*, 273, 3838-3847.
- COYLE, P., PHILCOX, J. C., CAREY, L. C. & ROFE, A. M. 2002. Metallothionein: The multipurpose protein. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 59, 627-647.
- DASHWOOD, R. H. 1998. Indole-3-carbinol: Anticarcinogen or tumor promoter in brassica vegetables? *Chemico-Biological Interactions*, 110, 1-5.

- DECKWER, W.-D., PÜHLER, A. & SCHMID, R. D. 1999. *Römp-Lexikon Biotechnologie und Gentechnik*, Stuttgart [u.a.], Thieme.
- DINKOVA-KOSTOVA, A. T. & TALALAY, P. 2008. Direct and indirect antioxidant properties of inducers of cytoprotective proteins. *Molecular Nutrition & Food Research*, 52, S128-S138.
- FAHEY, J. W., ZALCMANN, A. T. & TALALAY, P. 2001. The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. *Phytochemistry*, 56, 5-51.
- FAHEY, J. W., ZHANG, Y. & TALALAY, P. 1997. Broccoli sprouts: An exceptionally rich source of inducers of enzymes that protect against chemical carcinogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94, 10367-10372.
- FREEMAN, S. 2010. *Biological Science*, San Francisco, Benjamin Cummings (Pearson).
- FULLER, Z., LOUIS, P., MIHAJLOVSKI, A., RUNGAPARNESTRY, V., RATCLIFFE, B. & DUNCAN, A. J. 2007. Influence of cabbage processing methods and prebiotic manipulation of colonic microflora on glucosinolate breakdown in man. *British Journal of Nutrition*, 98, 364-372.
- GLATT, H., BAASANJAV-GERBER, C., SCHUMACHER, F., MONIEN, B. H., SCHREINER, M., FRANK, H., SEIDEL, A. & ENGST, W. 2011. 1-Methoxy-3-indolylmethyl glucosinolate; a potent genotoxicant in bacterial and mammalian cells: Mechanisms of bioactivation. *Chemico-Biological Interactions*, 192, 81-86.
- GONG, Y. X., SOHN, H., XUE, L., FIRESTONE, G. L. & BJELDANES, L. F. 2006. 3,3'-diindolylmethane is a novel mitochondrial H⁺-ATP synthase inhibitor that can induce p21(Cip1/Waf1) expression by induction of oxidative stress in human breast cancer cells. *Cancer Research*, 66, 4880-4887.
- GOZZELINO, R., JENEY, V. & SOARES, M. P. 2010. Mechanisms of Cell Protection by Heme Oxygenase-1. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*.
- GUHANIYOGI, J. & BREWER, G. 2001. Regulation of mRNA stability in mammalian cells. *Gene*, 265, 11-23.
- HALKIER, B. A. & GERSHENZON, J. 2006. Biology and biochemistry of glucosinolates. *Annual Review of Plant Biology*. Palo Alto: Annual Reviews.
- HANSCHEN, F. S., BRÜGGEMANN, N., BRODEHL, A., MEWIS, I., SCHREINER, M., ROHN, S. & KROH, L. W. 2012. Characterization of Products from the Reaction of Glucosinolate-Derived Isothiocyanates with Cysteine and Lysine Derivatives Formed in Either Model Systems or Broccoli Sprouts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 7735-7745.
- HARRIS, S. L. & LEVINE, A. J. 2005. The p53 pathway: positive and negative feedback loops. *Oncogene*, 24, 2899-2908.
- HAYES, J. D., KELLEHER, M. O. & EGGLESTON, I. M. 2008. The cancer chemopreventive actions of phytochemicals derived from glucosinolates. *European Journal of Nutrition*, 47, 73-88.
- HESTERMANN, E. V. & BROWN, M. 2003. Agonist and chemopreventative ligands induce differential transcriptional cofactor recruitment by aryl hydrocarbon receptor. *Molecular and Cellular Biology*, 23, 7920-7925.
- HIGDON, J. V., DELAGE, B., WILLIAMS, D. E. & DASHWOOD, R. H. 2007. Cruciferous vegetables and human cancer risk: epidemiologic evidence and mechanistic basis. *Pharmacological Research*, 55, 224-236.

- HIGUCHI, R., FOCKLER, C., DOLLINGER, G. & WATSON, R. 1993. KINETIC PCR ANALYSIS - REAL-TIME MONITORING OF DNA AMPLIFICATION REACTIONS. *Bio-Technology*, 11, 1026-1030.
- HOEIJMAKERS, J. H. J. 2001. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature*, 411, 366-374.
- HSU, J. C., DEV, A., WING, A., BREW, C. T., BJELDANES, L. F. & FIRESTONE, G. L. 2006. Indole-3-carbinol mediated cell cycle arrest of LNCaP human prostate cancer cells requires the induced production of activated p53 tumor suppressor protein. *Biochemical Pharmacology*, 72, 1714-1723.
- HU, R., XU, C. J., SHEN, G. X., JAIN, M. R., KHOR, T. O., GOPALKRISHNAN, A., LIN, W., REDDY, B., CHAN, J. Y. & KONG, A. N. T. 2006. Gene expression profiles induced by cancer chemopreventive isothiocyanate sulforaphane in the liver of C57BL/6J mice and C57BL/6J/Nrf2 (-/-) mice. *Cancer Letters*, 243, 170-192.
- HUANG, H. C., NGUYEN, T. & PICKETT, C. B. 2000. Regulation of the antioxidant response element by protein kinase C-mediated phosphorylation of NF-E2-related factor 2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97, 12475-12480.
- JANNING, W. & KNUST, E. 2008. *Genetik : allgemeine Genetik, molekulare Genetik, Entwicklungsgenetik; 37 Tabellen*, Stuttgart [u.a.], Thieme.
- JELLINCK, P. H., FORKERT, P. G., RIDDICK, D. S., OKEY, A. B., MICHNOVICZ, J. J. & BRADLOW, H. L. 1993. AH RECEPTOR-BINDING PROPERTIES OF INDOLE CARBINOLS AND INDUCTION OF HEPATIC ESTRADIOL HYDROXYLATION. *Biochemical Pharmacology*, 45, 1129-1136.
- JEONG, W. S., KEUM, Y. S., CHEN, C., JAIN, M. R., SHEN, G. X., KIM, J. H., LI, W. G. & KONG, A. N. T. 2005. Differential expression and stability of endogenous nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2) by natural chemopreventive compounds in HepG2 human hepatoma cells. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 38, 167-176.
- JUGE, N., MITHEN, R. F. & TRAKA, M. 2007. Molecular basis for chemoprevention by sulforaphane: a comprehensive review. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 64, 1105-1127.
- JUNG, K. A. & KWAK, M. K. 2010. The Nrf2 System as a Potential Target for the Development of Indirect Antioxidants. *Molecules*, 15, 7266-7291.
- KAINZ, P. 2000. The PCR plateau phase - towards an understanding of its limitations. *Biochimica Et Biophysica Acta- Gene Structure and Expression*, 1494, 23-27.
- KAWAJIRI, K., KOBAYASHI, Y., OHTAKE, F., IKUTA, T., MATSUSHIMA, Y., MIMURA, J., PETTERSSON, S., POLLENZ, R. S., SAKAKI, T., HIROKAWA, T., AKIYAMA, T., KUROSUMI, M., POELLINGER, L., KATO, S. & FUJII-KURIYAMA, Y. 2009. Aryl hydrocarbon receptor suppresses intestinal carcinogenesis in Apc > Min/+ mice with natural ligands. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106, 13481-13486.
- KEUM, Y. S., OWUOR, E. D., KIM, B. R., HU, R. & KONG, A. N. T. 2003. Involvement of Nrf2 and JNK1 in the activation of antioxidant responsive element (ARE) by chemopreventive agent phenethyl isothiocyanate (PEITC). *Pharmaceutical Research*, 20, 1351-1356.
- KIM, Y. S. & MILNER, J. A. 2005. Targets for indole-3-carbinol in cancer prevention. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 16, 65-73.

- KISSEN, R., ROSSITER, J. T. & BONES, A. M. 2009. The 'mustard oil bomb': not so easy to assemble?! Localization, expression and distribution of the components of the myrosinase enzyme system. *Phytochemistry Reviews*, 8, 69-86.
- KREBS, J., GOLDSTEIN, E. & KILPATRICK, S. 2011. *Lewins Genes : X*, Boston, Mass. [u.a.], Jones and Bartlett.
- KUBISTA, M., ANDRADE, J. M., BENGTSSON, M., FOROOTAN, A., JONAK, J., LIND, K., SINDELKA, R., SJOBACK, R., SJOGREEN, B., STROMBOM, L., STAHLBERG, A. & ZORIC, N. 2006. The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine*, 27, 95-125.
- KUSHAD, M. M., BROWN, A. F., KURILICH, A. C., JUVIK, J. A., KLEIN, B. P., WALLIG, M. A. & JEFFERY, E. H. 1999. Variation of glucosinolates in vegetable crops of Brassica oleracea. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 1541-1548.
- LANE, D. P. 1992. CANCER - P53, GUARDIAN OF THE GENOME. *Nature*, 358, 15-16.
- LEE, J. S. & SURH, Y. J. 2005. Nrf2 as a novel molecular target for chemoprevention. *Cancer Letters*, 224, 171-184.
- LEE, O.-H., JAIN, A. K., PAPUSHA, V. & JAISWAL, A. K. 2007. An auto-regulatory loop between stress sensors INrf2 and Nrf2 controls their cellular abundance. *Journal of Biological Chemistry*, 282, 36412-36420.
- LIVAK, K. J. & SCHMITTGEN, T. D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(T)^{-ΔΔC_T} method. *Methods*, 25, 402-408.
- LOGAN, J., KIRSTIN, E. & SAUNDERS, N. 2009. *Real-time PCR : current technology and applications*, Norfolk, UK, Caister Academic Press.
- MCMAHON, M., ITOH, K., YAMAMOTO, M., CHANAS, S. A., HENDERSON, C. J., MCLELLAN, L. I., WOLF, C. R., CAVIN, C. & HAYES, J. D. 2001. The cap 'n' collar basic leucine zipper transcription factor Nrf2 (NF-E2 p45-related factor 2) controls both constitutive and inducible expression of intestinal detoxification and glutathione biosynthetic enzymes. *Cancer Research*, 61, 3299-3307.
- MILLER, P. E. & SNYDER, D. C. 2012. Phytochemicals and Cancer Risk: A Review of the Epidemiological Evidence. *Nutrition in Clinical Practice*, 27, 599-612.
- MÜLHARDT, C. 2009. *Der Experimentator: Molekularbiologie, Genomics*, Heidelberg, Spektrum Akad.-Verlag.
- MULLIS, K. B. & FALOONA, F. A. 1987. SPECIFIC SYNTHESIS OF DNA INVITRO VIA A POLYMERASE-CATALYZED CHAIN-REACTION. *Methods in Enzymology*, 155, 335-350.
- MYZAK, M. C., HARDIN, K., WANG, R., DASHWOOD, R. H. & HO, E. 2006. Sulforaphane inhibits histone deacetylase activity in BPH-1, LnCaP and PC-3 prostate epithelial cells. *Carcinogenesis*, 27, 811-819.
- NEAVE, A. S., SARUP, S. M., SEIDELIN, M., DUUS, F. & VANG, O. 2005. Characterization of the N-methoxyindole-3-carbinol (NI3C)-induced cell cycle arrest in human colon cancer cell lines. *Toxicological Sciences*, 83, 126-135.
- NHO, C. W. & JEFFERY, E. 2001. The Synergistic Upregulation of Phase II Detoxification Enzymes by Glucosinolate Breakdown Products in Cruciferous Vegetables. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 174, 146-152.

- OKINO, S. T., POOKOT, D., BASAK, S. & DAHIYA, R. 2009. Toxic and Chemopreventive Ligands Preferentially Activate Distinct Aryl Hydrocarbon Receptor Pathways: Implications for Cancer Prevention. *Cancer Prevention Research*, 2, 251-256.
- OTTERBEIN, L. E., SOARES, M. P., YAMASHITA, K. & BACH, F. H. 2003. Heme oxygenase-1: unleashing the protective properties of heme. *Trends in Immunology*, 24, 449-455.
- PERDEW, G. H. & BABBS, C. F. 1991. PRODUCTION OF AH RECEPTOR LIGANDS IN RAT FECAL SUSPENSIONS CONTAINING TRYPTOPHAN OR INDOLE-3-CARBINOL. *Nutrition and Cancer-an International Journal*, 16, 209-218.
- PERTEA, M. & SALZBERG, S. L. 2010. Between a chicken and a grape: estimating the number of human genes. *Genome Biology*, 11.
- PFAFFL, M. W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29.
- PFAFFL, M. W., TICHOPAD, A., PRGOMET, C. & NEUVIANS, T. P. 2004. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper - Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnology Letters*, 26, 509-515.
- PIBERGER, A. L. 2014. Untersuchungen zum Einfluss von Sulforaphan auf die DNA Einzelstrangbruch- und Nukleotidexzisionsreparatur. *Dissertation*, Institut für Angewandte Biowissenschaften, Abteilung Lebensmittelchemie, Karlsruher Institut für Technologie.
- PREISS, T. & W. HENTZE, M. 2003. Starting the protein synthesis machine: eukaryotic translation initiation. *BioEssays*, 25, 1201-1211.
- REED, G. A., ARNESON, D. W., PUTNAM, W. C., SMITH, H. J., GRAY, J. C., SULLIVAN, D. K., MAYO, M. S., CROWELL, J. A. & HURWITZ, A. 2006. Single-dose and multiple-dose administration of indole-3-carbinol to women: Pharmacokinetics based on 3,3'-diindolylmethane. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 15, 2477-2481.
- ROGAN, E. G. 2006. The natural chemopreventive compound indole-3-carbinol: State of the science. *In Vivo*, 20, 221-228.
- SAIKI, R. K., SCHARF, S., FALOONA, F., MULLIS, K. B., HORN, G. T., ERLICH, H. A. & ARNHEIM, N. 1985. ENZYMATIC AMPLIFICATION OF BETA-GLOBIN GENOMIC SEQUENCES AND RESTRICTION SITE ANALYSIS FOR DIAGNOSIS OF SICKLE-CELL ANEMIA. *Science*, 230, 1350-1354.
- SATO, S., SHIRAKAWA, H., TOMITA, S., TOHKIN, M., GONZALEZ, F. J. & KOMAI, M. 2013. The aryl hydrocarbon receptor and glucocorticoid receptor interact to activate human metallothionein 2A. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 273, 90-99.
- SCHREINER, M. 2005. Vegetable crop management strategies to increase the quantity of phytochemicals. *European Journal of Nutrition*, 44, 85-94.
- SCHUMACHER, F., FLORIAN, S., SCHNAPPER, A., MONIEN, B. H., MEWIS, I., SCHREINER, M., SEIDEL, A., ENGST, W. & GLATT, H. 2014. A secondary metabolite of Brassicales, 1-methoxy-3-indolylmethyl glucosinolate, as well as its degradation product, 1-methoxy-3-indolylmethyl alcohol, forms DNA adducts in the mouse, but in varying tissues and cells. *Archives of Toxicology*, 88, 823-836.
- SHIMAMOTO, K., DEWA, Y., ISHII, Y., KEMMOCHI, S., TANIAI, E., HAYASHI, H., IMAOKA, M., MORITA, R., KUWATA, K., SUZUKI, K., SHIBUTANI, M. & MITSUMORI, K. 2011. Indole-3-carbinol enhances oxidative stress responses resulting in the induction of preneoplastic liver cell

- lesions in partially hepatectomized rats initiated with diethylnitrosamine. *Toxicology*, 283, 109-117.
- SKORDOS, K. W., SKILES, G. L., LAYCOCK, J. D., LANZA, D. L. & YOST, G. S. 1998. Evidence supporting the formation of 2,3-epoxy-3-methylindoline: A reactive intermediate of the pneumotoxin 3-methylindole. *Chemical Research in Toxicology*, 11, 741-749.
- SONENBERG, N. & HINNEBUSCH, A. G. 2009. Regulation of Translation Initiation in Eukaryotes: Mechanisms and Biological Targets. *Cell*, 136, 731-745.
- SONG, L. J., MORRISON, J. J., BOTTING, N. P. & THORNALLEY, P. J. 2005. Analysis of glucosinolates, isothiocyanates, and amine degradation products in vegetable extracts and blood plasma by LC-MS/MS. *Analytical Biochemistry*, 347, 234-243.
- STAUB, R. E., FENG, C. L., ONISKO, B., BAILEY, G. S., FIRESTONE, G. L. & BJELDANES, L. F. 2002. Fate of indole-3-carbinol in cultured human breast tumor cells. *Chemical Research in Toxicology*, 15, 101-109.
- STAUB, R. E., ONISKO, B. & BJELDANES, L. F. 2006. Fate of 3,3'-diindolylmethane in cultured MCF-7 human breast cancer cells. *Chemical Research in Toxicology*, 19, 436-442.
- STRESSER, D. M., WILLIAMS, D. E., GRIFFIN, D. A. & BAILEY, G. S. 1995. MECHANISMS OF TUMOR MODULATION BY INDOLE-3-CARBINOL - DISPOSITION AND EXCRETION IN MALE FISCHER-344 RATS. *Drug Metabolism and Disposition*, 23, 965-975.
- VANDESOMPELE, J., DE PRETER, K., PATTYN, F., POPPE, B., VAN ROY, N., DE PAEPE, A. & SPELEMAN, F. 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology*, 3.
- VAQUERIZAS, J. M., KUMMERFELD, S. K., TEICHMANN, S. A. & LUSCOMBE, N. M. 2009. A census of human transcription factors: function, expression and evolution. *Nat Rev Genet*, 10, 252-263.
- VERHOEVEN, D. T. H., GOLDBOHM, R. A., VANPOPPEL, G., VERHAGEN, H. & VANDENBRANDT, P. A. 1996. Epidemiological studies on brassica vegetables and cancer risk. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 5, 733-748.
- VERHOEVEN, D. T. H., VERHAGEN, H., GOLDBOHM, R. A., VANDENBRANDT, P. A. & VANPOPPEL, G. 1997. A review of mechanisms underlying anticarcinogenicity by brassica vegetables. *Chemico-Biological Interactions*, 103, 79-129.
- VERKERK, R., SCHREINER, M., KRUMBEIN, A., CISKA, E., HOLST, B., ROWLAND, I., DE SCHRIJVER, R., HANSEN, M., GERHAEUSER, C., MITHEN, R. & DEKKER, M. 2009. Glucosinolates in Brassica vegetables: The influence of the food supply chain on intake, bioavailability and human health. *Molecular Nutrition & Food Research*, 53, S219-S265.
- VOET, D., VOET, J. G. & PRATT, C. W. 2010. *Lehrbuch der Biochemie*, Weinheim, Wiley-VCH.
- WAIN, H. M., BRUFORD, E. A., LOVERING, R. C., LUSH, M. J., WRIGHT, M. W. & POVEY, S. 2002. Guidelines for human gene nomenclature. *Genomics*, 79, 464-470.
- WATSON, J. D., BAKER, T. A., BELL, S. P., GANN, A., LEVINE, M. & LOSICK, R. 2011. *Watson Molekularbiologie*, München [u.a.], Pearson Studium.
- WENG, J. R., TSAI, C. H., KULP, S. K. & CHEN, C. S. 2008. Indole-3-carbinol as a chemopreventive and anti-cancer agent. *Cancer Letters*, 262, 153-163.

- ZHANG, Y. S. 2000. Role of glutathione in the accumulation of anticarcinogenic isothiocyanates and their glutathione conjugates by murine hepatoma cells. *Carcinogenesis*, 21, 1175-1182.
- ZHANG, Y. S. 2004. Cancer-preventive isothiocyanates: measurement of human exposure and mechanism of action. *Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 555, 173-190.
- ZHANG, Y. S. & CALLAWAY, E. C. 2002. High cellular accumulation of sulphoraphane, a dietary anticarcinogen, is followed by rapid transporter-mediated export as a glutathione conjugate. *Biochemical Journal*, 364, 301-307.

8. Anhang

8.1 Abkürzungsverzeichnis

Konvention zur Schreibweise von Gensymbolen und Proteinamen

Für die Schreibweise von humanen Gen- und Proteinsymbolen wurde folgende Regel angewandt: Gensymbole wurden groß und kursiv und Proteinsymbole lediglich groß geschrieben (Wain et al., 2002).

A	Adenin
ADP	<i>advanced development protocol</i>
AhR	<i>aryl-hydrocarbon-receptor</i>
ARE	<i>antioxidant response element</i>
ATM	Aurothiomalat
ATP	Adenosintriphosphat
BER	Basen-Exzisions-Reparatur
Bp	Basenpaare
C	Cytosin
cDNA	Komplementäre cDNA
Cp	<i>crossing point</i>
Cq	<i>quantification cycle</i>
CYP	Cytochrom-P450-Monooxygenase
DIM	3,3'-Diindolylmethan
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosid-Triphosphat
dsDNA	doppelsträngigen DNA
DTNB	5,5'-Dithiobis-2-Nitrobenzoesäure
EROD	7-Ethoxyresorufin-O-Deethylase
FKS	fötales Kälberserum
FSC	<i>forward scatter</i>
G	Guanin
GRE	<i>glucocorticoid responsive element</i>
GSH	Glutathion
GST	Glutathion-S-Transferase
hSULT1A1	humane Sulfotransferase 1A1
HPLC	<i>high-performance liquid chromatography</i>
I3C	Indol-3-Carbinol
IFC	<i>integrated fluidic circuit</i>

Anhang

Keap1	<i>Kelch-like ECH-associated protein 1</i>
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MDR1	<i>multidrug-resistance-protein 1</i>
min	Minuten
MIQE	<i>minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments</i>
MMR	Mismatch-Reparatur
MRE	<i>metal response element</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MRP	<i>multidrug resistance-related protein</i>
MT	Metallothionein
MTF1	<i>metal-regulatory transcription factor 1</i>
NAD ⁺	Nicotinamidadenindinukleotid
NER	Nukleotid-Exzisions-Reparatur
Nrf2	<i>nuclear factor-E2-related factor 2</i>
NTC	<i>no template control</i>
NQO1	NAD(P)H-Chinonoxidoreduktase-1
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PKC	Proteinkinase C
PRDX	Peroxiredoxin
qPCR	<i>quantitative PCR</i>
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
rRNA	<i>ribosomal RNA</i>
RT	reverser Transkriptase
SD	<i>standard deviation</i> (Standardabweichung)
sek	Sekunden
Ser	Serin
SFN	Sulforaphan
SSC	<i>side scatter</i>
ssDNA	einzelsträngige DNA
T	Thymin
TM	Trockenmasse
TNB	5-Thio-2-Nitrobenzoesäure
tRNA	<i>transfer-RNA</i>
UDP-GT	UDP-Glucuronosyltransferase

8.2 Verwendete Chemikalien

Acetonitril (HiPerSolv, $\geq 99,9\%$)	VWR (Darmstadt)
Acrylamid (37,5 : 1) Rotiphorese Gel	Roth (Karlsruhe)
Agarose	Roth (Karlsruhe)
Ameisensäure (AnalaR NORMAPUR, $\geq 99\%$)	VWR (Darmstadt)
Amersham ECL Western Blotting Detection	GE Healthcare (Freiburg)
Ammoniumperoxodisulfat (APS, $\geq 98\%$)	Roth (Karlsruhe)
Aprotinin	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Assay Loading Reagent 2x	Fluidigm (San Francisco)
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Bromphenolblau, in wässriger Lösung	AppliChem (Darmstadt)
BSA Albumin Fraktion V	Merck (Darmstadt)
Coulter Isoton II Diluent	Beckman Coulter (Krefeld)
DAPI (Cystain DNA/Protein)	Partec (Münster)
3,3'-Diindolylmethan	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Dikaliumhydrogenphosphat	Roth (Karlsruhe)
Dimethylsulfoxid (DMSO, $\geq 99,9\%$)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4 , $\geq 99\%$)	Roth (Karlsruhe)
DNA Away	Molecular BioProducts
DNA Binding Dye Sample Loading Reagent 20x	Fluidigm (San Francisco)
DNA-Leiter (GelPilot, 50 bp)	Qiagen (Hilden)
DNA Suspensionspuffer	Teknova (Hollister)
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
7-Ethoxyresorufin	AnaSpec (Fremont)
Ethanol, vergällt (96 %)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Ethanol (Rotipuran)	Roth (Karlsruhe)
Ethylendiamintetraessigsäure Dinatriumsalz Dihydrat (EDTA, $\geq 99\%$)	Roth (Karlsruhe)
Exonuklease I (20 U/ μl)	New England BioLabs (Frankfurt am Main)
Exonuklease Reaktionspuffer	New England BioLabs (Frankfurt am Main)
FACS-Flow	BD (Heidelberg)
Formamid	Roth (Karlsruhe)
Formalin (37 %)	Roth (Karlsruhe)
GelRed	VWR (Darmstadt)

Anhang

Giemsa-Stammlösung	Roth (Karlsruhe)
Glycin (≥ 99 %)	Roth (Karlsruhe)
Indol-3-Carbinol (≥ 98 %)	Merck (Darmstadt)
iScript cDNA Synthese Kit	VWR (Darmstadt)
Isocitrat	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Isocitrat-Dehydrogenase Typ IV (18 U/mg)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Isopropanol (2-Propanol ≥ 99,9 %)	Roth (Karlsruhe)
Kaliumchlorid (KCl, ≥ 99,5 %)	Roth (Karlsruhe)
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄ , ≥ 99 %)	Merck (Darmstadt)
Leupeptin	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Magnesiumchlorid	Roth (Karlsruhe)
2-Mercaptoethanol	Roth (Karlsruhe)
Methanol (≥ 99,5 %)	Roth (Karlsruhe)
Milchpulver	Roth (Karlsruhe)
3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure (MOPS)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Myrosinase (≥ 100 U/g)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
NADPH-Tetranatriumsalz (≥ 97 %)	Roth (Karlsruhe)
Natriumacetat	VWR (Darmstadt)
Natriumchlorid (NaCl, ≥ 99,5 %)	Roth (Karlsruhe)
Natriumdeoxycholat (DOC)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Natriumdodecylsulfat (SDS), fest	Roth (Karlsruhe)
Natriumdodecylsulfat (SDS)-Lösung (10 %)	AppliChem (Darmstadt)
Natriumfluorid (NaF, ≥ 99 %)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Natriumvanadat (Na ₃ VO ₄ , ≥ 90 %)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
PageRuler Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific (Schwerte)
PCR Certified Water	Teknova (Hollister)
Penicillin-Streptomycin-Lösung (Penicillin: 5.000 U/ ml, Streptomycin: 5 mg/ l)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Pepstatin	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF, ≥ 99 %)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Primer	Eurofins (Hamburg)
Primer (Gene Expression Design)	Fluidigm (San Francisco)
Protein Assay Farbstoff-Konzentrat (Bradford- Reagenz)	BioRad (München)
Protein Loading Buffer, 5x	Thermo Fisher Scientific (Schwerte)
Reducing Agent, 20x	Thermo Fisher Scientific (Schwerte)

Resorufin	Sigma-Aldrich (Steinheim)
RNA-Isolierungskit NucleoSpin RNAII	Macherey-Nagel (Düren)
RNase Away	Molecular BioProducts
Salzsäure Maßlg. 1N, 0.1N	Roth (Karlsruhe)
SsoFast EvaGreen Supermix with Low ROX	BioRad (München)
Sulforaphan (≥ 99,3 %)	Enzo Life Sciences (Lörrach)
TaqMan PreAmp Master-Mix 2x	Life Technologies (Darmstadt)
TE-Puffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8,0)	Teknova (Hollister)
Tetramethylethyldiamin (TEMED, ≥ 99 %)	Roth (Karlsruhe)
Thioredoxin Reductase Colorimetric Assay Kit	Cayman (Michigan)
Tris Ultra Qualität (≥ 99,9 %)	Roth (Karlsruhe)
Triton X-100 10 % Lsg.	ThermoScientific (Rockford)
Trypsin, 10fach (wird 1:10 in PBS-EDTA verdünnt)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Tween 20	Roth (Karlsruhe)
Universal cDNA-Random Primed Human Normal Tissues	BioCat (Heidelberg)
Wasser (Rotisolv, Ultra LC-MS)	Roth (Karlsruhe)

8.3 Verwendete Antikörper

Tabelle 7: Übersicht über die verwendeten Primärantikörper und deren Verdünnung

Primärantikörper	Herkunft	Spezifität	Verdünnung	Hersteller
Actin (sc-1616)	Ziege	polyklonal	1:1000	Santa Cruz
NQO1 (sc-16464)	Ziege	polyklonal	1:500	Santa Cruz
PRX I (sc-7381)	Ziege	polyklonal	1:500	Santa Cruz
p21 (sc-817)	Maus	monoklonal	1:500	Santa Cruz
p53	Maus	monoklonal	1:1000	Dako Cytomation

Tabelle 8: Übersicht über die verwendeten Sekundärantikörper und deren Verdünnung

Sekundärantikörper	Herkunft	Spezifität	Verdünnung	Hersteller
HRP	Ziege	anti-Maus	1:1000	Santa Cruz
HRP	Affe	anti-Ziege	1:1000	Santa Cruz

8.4 Lösungen und Puffer

Alle Puffer und Lösungen wurden in bidestilliertem Wasser angesetzt und bei längerer Lagerung eventuell aus Stabilitätsgründen sterilfiltriert. Lösungen, die zur Zellkultivierung eingesetzt wurden (Medium, PBS, TBS, PBS-EDTA), wurden mittels Sterilfiltration entkeimt bzw. autoklaviert.

Zellkultur

Kulturmedium für HCT 116 Zellen	DMEM 10 % FKS 100 U Penicillin/ml 100 µg Streptomycin/ml
PBS (pH 7,4)	100 mM NaCl 7 mM Na ₂ HPO ₄ 4,5 mM KCl 3 mM KH ₂ PO ₄
PBS-EDTA	0,5 mM EDTA in PBS
PBS mit FKS	10 % FKS in PBS
TBS (pH 7,4)	51,3 mM NaCl 2,7 mM KCl 25 mM Tris
Trypsin-Lösung	0,25 % Trypsin in PBS-EDTA

RNA-Elektrophorese

Agarosegel	1,2 g Agarose 83 ml H ₂ O 5 ml MOPS (20-fach) 12 ml Formalin (37 %) (Antipolymerisationszusatz, Formaldehyd + MeOH 37%ig)
Formamid-Denaturierungspuffer (FDP)	54 µl Wasser 35 µl Formaldehyd (37 %) 10 µl MOPS (20-fach) 100 µl Formamid (rekristallisiert) 0,2 µl GelRed (10 mg/ml)
Lämmli-Ladepuffer (4-fach)	320 nM Tris (pH 6,8) 8 % SDS 40 % Glycerin 8 % Mercaptoethanol 0,04 % Bromphenolblau
MOPS pH 7,0 (20-fach)	400 mM MOPS 100 mM Na-Acetat 10 mM EDTA

Anhang

DNA-Elektrophorese

Agarosegel	2 g Agarose 100 ml TAE-Puffer (1-fach) 10 µl GelRed
TAE-Puffer (50-fach)	2 M Tris 1 M Eisessig 0,05 M Na ₂ EDTA
Ladepuffer	3 ml Glycerin 7 ml H ₂ O 25 mg Bromphenolblau

SDS-PAGE

Lämmli-Laufpuffer (10-fach)	30,24 g Tris 100 µl 10 % SDS oder 10 g 100 %,s SDS Mit destilliertem H ₂ O auf 1 l auffüllen
Lämmli-Laufpuffer (1-fach)	100 ml Lämmli-Laufpuffer (10-fach) 900 ml bidest. Wasser 14,4 g Glycin
Trenngel 12 %	7,0 ml H ₂ O 4 ml Tris 1,5 M, pH 8,8 160 µl SDS 10 % 4,8 ml Acrylamid 40 % (37,5 : 1) 12,8 µl TEMED 40 µl APS
Trenngelpuffer (pH 8,8)	1,5 M Tris
Sammelgel 4 %	7,6 ml H ₂ O 1,25 ml Tris 1,5 M, pH 6,8 100 µl SDS 10 % 1,0 ml Acrylamid 6,4 µl TEMED 20 µl APS 40 %
Sammelgelpuffer (pH 6,8)	1,0 M Tris

Western Blot

Blockierlösung	5 % (w/v) Milchpulver in PBS-T
RIPA-Puffer	100 µl 100 mM Tris (pH 8,0) (10 mM) 150 µl 1 M NaCl (150 mM) 100 µl 10 mM EDTA (1 mM) 100µl 10 % TritonX-100 (1 %) 100 µl 10 % DOC (1 %) 10 µl 10 % SDS (0,1 %) 100 µl 10 mM PMSF in Isopropanol (1 mM) 5 µl 0,2 mg/ml Aprotinin (1 µg/ml) 5 µl 0,2 mg/ml Leupeptin (1 µg/ml) 1 µl 1,0 mg/ml Pepstatin (1 µg/ml) 20 µl 1 M NaF (50 mM) 1 µl 1 M Na ₃ VO ₄ (1 mM) 308 µl H ₂ O (dest., steril)
Transferpuffer (Tris-Glycin-Puffer nach Towbin) (10-fach)	30,3 g Tris 144,1 g Glycin Mit destilliertem H ₂ O auf 1 l auffüllen
Transferpuffer (pH 8,3, 1-fach)	100 ml Transferpuffer (10-fach) 200 ml Methanol 700 ml bidest. Wasser
PBS-T (Waschlösung)	PBS mit 0,05 % (v/v) Tween

EROD-Assay

7-Ethoxyresorufin-Stammlösung (2,5 mM)	5 mg 7-Ethoxyresorufin in einem 1:3 Gemisch von 2083 µl DMSO und 6349 µl Methanol
Kaliumhydrogenphosphatpuffer (0,1 M)	0,1 M K ₂ HPO ₄ -Lösung vorlegen und mit 0,1 M KH ₂ PO ₄ auf pH 7,4 einstellen
NADPH-generierendes System	1,1 mg NADPH-Tetranatriumsalz (1,21 mM) 4,6 µl 2,33 M Isocitrat (9,4 mM) 4,8 µl 1 M MgCl ₂ (4,2 mM) 7,8 µl Isocitrat-Dehydrogenase (0,9 Units) Mit Kaliumhydrogenphosphatpuffer auf 40 µl auffüllen

Thioredoxinreduktase-Assay

Kaliumhydrogenphosphatpuffer (50 mM)	50 mM K ₂ HPO ₄ -Lösung vorlegen und mit 50 mM KH ₂ PO ₄ auf pH 7,4 einstellen 1 mM EDTA
--------------------------------------	---

8.5 Verbrauchsmaterialien

3 ml-Einwegspritzen	Braun
96-Lochplatte, transparent	TPP
96-Well-Nunclon Surface Platten, transparent	Thermo Scientific
Accuvetten (Zählcups)	Beckmann Coulter
Cryoröhrchen mit Innengewinde	Roth
Dynamic Array (96x96)	Fluidigm
Einmalspritzen, 1 ml	Terumo
Eppendorf-Reaktionsgefäße 1,5 – 2,0 ml	Sarstedt
Falcon-Tubes	BD
Glasfaserfilter	Whatman
HPLC-Gewindeglasflaschen	Chromatographie-Zubehör Klaus Trott
Kanüle 0,4x20 mm	Terumo
Latexhandschuhe	Ansell
Mikroplatten-Verschlussfolie	VWR
Multiply Pro-Gefäße, 0,5 ml	Sarstedt
Nitrilhandschuhe	VWR
Nitrozellulose-Membran (Optitran, BA-S83)	GE-Healthcare
Parafilm	Sigma Aldrich
PCR Deckelkette, flach, 8er	Sarstedt
pH-Indikatorstäbchen	Roth
Pipettenspitzen 0,1 – 20 µl	Brand
Pipettenspitzen 1 – 200 µl	Roth
Pipettenspitzen 100 – 1000 µl	Sarstedt
Pipettenspitzen 500 – 5000 µl	Eppendorf
Pipettenspitzen LTS 20 µl	Mettler-Toledo
Plastikröhrchen (50 und 15 ml)	Sarstedt
RNA 6000 Nano Kit	Agilent
Schraubkappen für HPLC-Gewindeglasflaschen	Chromatographie-Zubehör Klaus Trott
Whatmann Papier 1,2 mm	Roth
Zellkulturschalen (verschiedene Größen)	TPP

8.6 Verwendete Geräte

Autoklav D-150	Systec
Bioanalyzer 2100	Agilent
Biofreezer Herafreeze top	Thermo Scientific
Biofuge pico	Heraeus
Biomark HD System	Fluidigm
Blotting Kammer	Peqlab
Brutschrank Heracell 150i	Thermo Scientific
Centrifuge 5810R	Eppendorf
Elektrophorese-Kammern	Peqlab
Elektrophorese-Powerstation	Peqlab
Folio	Severin
Galaxy Mini Centrifuge	VWR International
Gas-Sicherheitsbrenner 1SCS micro	Roth
HPLC-Autosampler, SIL-20AC	Shimadzu
HPLC-Degaser, DGU-20A3	Shimadzu
HPLC-Fluoreszenzdetektor, RF-10AXL	Shimadzu
HPLC-Säule, Luna 5 µm C18(2) 100 A, 250x4,6 mm	Phenomenex
HPLC-Pumpe, LC-20AT	Shimadzu
IFC-Controller HX	Fluidigm
Infinite M200 Pro	Tecan
Kolbenhubpipetten (verschiedene Volumina)	Eppendorf
Kühl- und Gefrierschränke	Bosch
Laborspülmaschine Professional G7883	Miele
LAS 3000	Raytest
LSR-Fortessa	BD
Megafuge 1.0	Heraeus
MicroCentrifuge	Roth
Mikrotiterplattenlesegerät Infinite M200 Pro	Tecan
Mini Rocker MR-1	Peqlab
Multikanalpipette (1-10 µl)	Mettler-Toledo
NanoQuant Platte	Tecan
PCR Workstation Pro	Peqlab
pH-Meter 3210	WTW

Anhang

Pipettierhilfe	Hirschmann Laborgeräte
Real-Time System CFX96	BioRad
Reinstwasseranlage Milli-Q	Millipore
Schüttler Shaker DOS-10L	Neolab
Software AIDA	Raytest
Software Data Collection	Fluidigm
Software Expert 2100	Agilent
Software FACSDiva	BD
Software GenEx	MultiD
Software LCsolution	Shimadzu
Software Real-Time PCR Genetic Analysis	Fluidigm
Sterilbank HERAsafeKS	Thermo Scientific
Taumler 3012	GFL
Thermocycler T100	BioRad
Timer	Roth
Tischinkubator B15	Thermo Scientific
Trockenschrank Hereaus T6	Hereaus Instruments
Ultrafeinwaage BP 61S	Sartorius
Ultraschallschleuse	Branson
Ultraschall-Messgerät Sonifier W 250 D	Branson
Vortex-Genie 2T	Scientific Industries
Waage VWR 1502	Sartorius
Wasserbad	Memmert
Wasserbad	Julabo
Zellzählgerät Coulter Z2	Beckman Coulter

8.7 Ergänzende Daten

8.7.1 Gesamtglucosinolat-Extrakt aus Brokkoli

8.7.1.1 Zytotoxizität des Myrosinase-hydrolysierten Gesamtglucosinolat-Extrakts aus Brokkoli

Die Bereitstellung der Zytotox-Daten erfolgte durch Dr. Ann Liza Piberger.

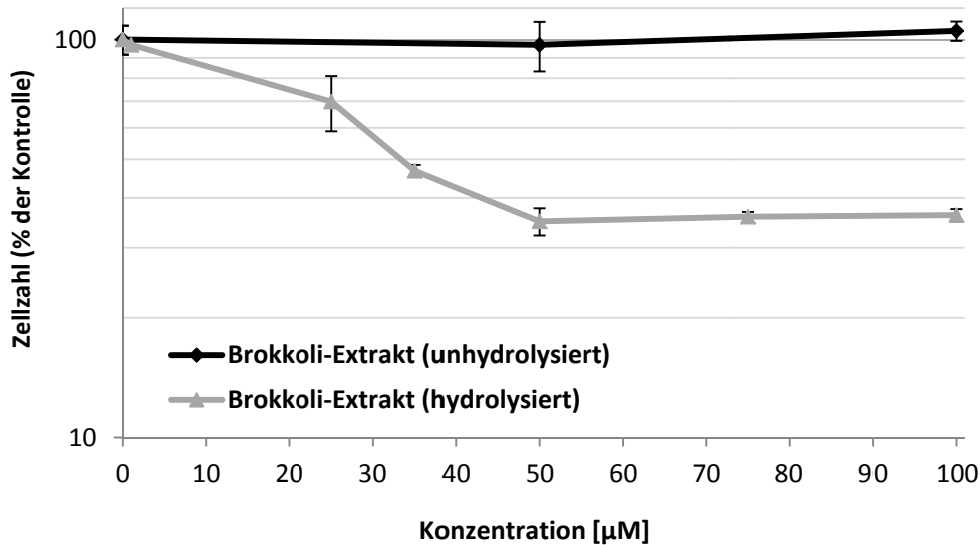


Abbildung 37: Einfluss von Myrosinase-hydrolysiertem und unhydrolysiertem Gesamtglucosinolat-Extrakt aus Brokkoli auf die Zellzahl in HCT 116-Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Bestimmungen \pm SD.

8.7.1.2 Glucosinolatprofil

Die Herstellung des wässrigen Gesamtglucosinolat-Extrakts aus Sprossen- und Pflanzenmaterial erfolgte am 15.04.2011 durch das Institut für Nutzpflanzenforschung der Technischen Universität Berlin. Dieser wurde am 29.04.2011 geliefert und anschließend aliquotiert und bei -20°C eingefroren.

Tabelle 9: Glucosinolatprofil des Extrakts

Glucosinolat-Typ	Trivialname	Konzentration [mM]	Anteil an Gesamtkonzentration (%)
4-Methylsulfinylbutyl-	Glucoraphanin	144,94	48,89
3-Methylsulfinylpropyl-	Glucoiberin	75,83	25,58
4-Methylthiobutyl-	Glucoerucin	46,29	15,61
2-Hydroxy-3-Butenyl-	Progoitrin	18,81	6,35

Anhang

4-Hydroxyindolyl-3-Methyl-	4-Hydroxygluco brassicin	4,28	1,44
3-Butenyl-	Gluconapin	2,91	0,98
5-Methylsulfinylpentyl-	Glucoalyssin	2,12	0,72
1-Methoxy-3-Indolylmethyl-	Neoglucobrassicin	0,75	0,25
4-Methoxy-3-Indolylmethyl-	4-Methoxygluco brassicin	0,3	0,10
3-Indolylmethyl-	Glucobrassicin	0,21	0,07
Gesamt:		296,44	

8.7.2 Genexpression

8.7.2.1 Untersuchte Gene

Tabelle 10: Übersicht über die untersuchten Gene und deren kodierte Proteine

Gensymbol	Ref-Sequenz	Kodiertes Protein
<i>ABCB1</i>	NM_000927.4	Multidrug resistance protein 1
<i>ABCC1</i>	NM_004996.3	Multidrug resistance-associated protein 1 (7 verschiedene Spleißvarianten)
	NM_019862.2	
	NM_019898.2	
	NM_019899.2	
	NM_019900.2	
	NM_019901.1	
	NM_019902.1	
<i>ACTB</i>	NM_001101.3	Actin, cytoplasmic 1
<i>ADH</i>	NM_000667.3	Alcohol dehydrogenase 1A
	NM_000668.5	Alcohol dehydrogenase 1B
	NM_000669.4	Alcohol dehydrogenase 1C
	NM_000670.3	Alcohol dehydrogenase 4
	NM_000671.4	Alcohol dehydrogenase 5
	NM_000672.3	Alcohol dehydrogenase 6
	NM_000673.4	Alcohol dehydrogenase 7
<i>ALDH1A1</i>	NM_000689.4	Retinal dehydrogenase 1
<i>APAF1</i>	NM_001160.2	Apoptotic protease-activating factor 1 (5 verschiedene Spleißvarianten)
	NM_013229.2	
	NM_181861.1	
	NM_181868.1	
	NM_181869.1	
<i>APEX1</i>	NM_001244249.1	APEX nuclease (Multifunctional DNA repair enzyme) 1

Anhang

	NM_001641.3	(4 verschiedene Spleißvarianten)
	NM_080648.2	
	NM_080649.2	
ATM	NM_000051.3	Serine-protein kinase ATM
	NM_138292.3	(3 verschiedene Spleißvarianten)
	NM_138293.1	
ATR	NM_001184.3	Serine/threonine-protein kinase ATR
AXIN2	NM_004655.3	Axin-2
B2M	NM_004048.2	Beta-2-microglobulin
BAX	NM_004324.3	Apoptosis regulator BAX
	NM_138761.3	(5 verschiedene Spleißvarianten)
	NM_138763.3	
	NM_138764.4	
	NM_138762.2	
BBC3	NM_001127240.2	Bcl-2-binding component 3
	NM_001127241.2	(4 verschiedene Spleißvarianten)
	NM_001127242.2	
	NM_014417.4	
BCL2	NM_000633.2	Apoptosis regulator Bcl-2
	NM_000657.2	(2 verschiedene Spleißvarianten)
BCL2L1	NM_001191.2	Bcl-2-like protein 1
	NM_138578.1	(2 verschiedene Spleißvarianten)
BRCA1	NM_007294.3	Breast cancer type 1 susceptibility protein
	NM_007297.3	(12 verschiedene Spleißvarianten)
	NM_007298.3	
	NM_007299.3	
	NM_007300.3	
	NM_007295.2	
	NM_007296.2	
	NM_007301.2	
	NM_007302.2	
	NM_007303.2	
	NM_007305.2	
	NM_007306.2	
BRCA2	NM_000059.3	Breast cancer type 2 susceptibility protein
BTRC	NM_001256856.1	F-box/WD repeat-containing protein 1A
	NM_003939.4	(3 verschiedene Spleißvarianten)
	NM_033637.3	
CAT	NM_001752.3	Catalase
CCND1	NM_053056.2	G1/S-specific cyclin-D1

Anhang

CDKN1A	NM_000389.4	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1 (4 verschiedene Spleißvarianten)
	NM_001220777.1	
	NM_001220778.1	
	NM_078467.2	
CDKN1B	NM_004064.4	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B
CDKN2B	NM_004936.3	Cyclin-dependent kinase 4 inhibitor B (2 verschiedene Spleißvarianten)
	NM_078487.2	
CYP1A1	NM_000499.3	Cytochrome P450 1A1
DDB1	NM_001923.4	DNA damage-binding protein 1
DDB2	NM_000107.2	DNA damage-binding protein 2
DDIT3	NM_001195053.1	DNA damage-inducible transcript 3 protein
	NM_001195054.1	
	NM_001195055.1	
	NM_001195056.1	
	NM_001195057.1	
	NM_004083.5	
E2F1	NM_005225.2	Transcription factor E2F1
EGFR	NM_005228.3	Epidermal growth factor receptor (4 verschiedene Spleißvarianten)
	NM_201282.1	
	NM_201283.1	
	NM_201284.1	
EPHX1	NM_000120.3	Epoxide hydrolase 1 (3 verschiedene Spleißvarianten)
	NM_001136018.3	
	NM_001291163.1	
ERCC1	NM_001166049.1	DNA excision repair protein ERCC-1 (3 verschiedene Spleißvarianten)
	NM_001983.3	
	NM_202001.2	
ERCC2	NM_000400.3	TFIIH basal transcription factor complex helicase XPD subunit (2 verschiedene Spleißvarianten)
	NM_001130867.1	
ERCC4	NM_005236.2	DNA repair endonuclease XPF
ERCC5	NM_000123.3	DNA repair protein complementing XP-G cells
FTH1	NM_002032.2	Ferritin heavy chain
G6PD	NM_000402.4	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase (2 verschiedene Spleißvarianten)
	NM_001042351.2	
GADD45A	NM_001199741.1	Growth arrest and DNA damage-inducible protein GADD45 alpha (3 verschiedene Spleißvarianten)
	NM_001199742.1	
	NM_001924.3	
GAPDH	NM_001256799.2	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (4 verschiedene Spleißvarianten)
	NM_001289745.1	

Anhang

	NM_001289746.1	
	NM_002046.5	
GCLC	NM_001197115.1 NM_001498.3	Glutamate--cysteine ligase catalytic subunit (2 verschiedene Spleißvarianten)
GPX1	NM_000581.2 NM_201397.1	Glutathione peroxidase 1 (2 verschiedene Spleißvarianten)
GPX2	NM_002083.3	Glutathione peroxidase 2
GSR	NM_000637.3 NM_001195102.1 NM_001195103.1 NM_001195104.1	Glutathione reductase, mitochondrial (4 verschiedene Spleißvarianten)
GSTP1	NM_000852.3	Glutathione S-transferase P
GUSB	NM_000181.3 NM_001284290.1	Beta-glucuronidase (2 verschiedene Spleißvarianten)
HMOX1	NM_002133.2	Heme oxygenase 1
HPRT1	NM_000194.2	Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase
HSPA1A	NM_005345.5	Heat shock 70 kDa protein 1A/1B
IL8	NM_000584.3	Interleukin-8
JUN	NM_002228.3	Transcription factor AP-1
KEAP1	NM_012289.3 NM_203500.1	Kelch-like ECH-associated protein 1 (2 verschiedene Spleißvarianten)
LIG1	NM_000234.2 NM_001289063.1 NM_001289064.1	DNA ligase 1 (3 verschiedene Spleißvarianten)
LIG3	NM_002311.4 NM_013975.3	DNA ligase 3 (2 verschiedene Spleißvarianten)
MAP3K5	NM_005923.3	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 5
MDM2	NM_001145337.2 NM_001145339.2 NM_001145340.2 NM_001278462.1 NM_002392.5 NM_001145336.1 NM_006878.3 NM_006879.3 NM_006880.2 NM_006881.3 NM_006882.3 NM_032739.1	E3 ubiquitin-protein ligase Mdm2 (12 verschiedene Spleißvarianten)

Anhang

MGMT	NM_002412.3	Methylated-DNA--protein-cysteine methyltransferase
MLH1	NM_000249.3	DNA mismatch repair protein Mlh1
	NM_001167617.1	(7 verschiedene Spleißvarianten)
	NM_001167618.1	
	NM_001167619.1	
	NM_001258271.1	
	NM_001258273.1	
	NM_001258274.1	
MSH2	NM_000251.2	DNA mismatch repair protein Msh2
	NM_001258281.1	(2 verschiedene Spleißvarianten)
MT1X	NM_005952.3	Metallothionein-1X
MT2A	NM_005953.3	Metallothionein-2
MYC	NM_002467.4	Myc proto-oncogene protein
NAT1	NM_000662.6	Arylamine <i>N</i> -acetyltransferase 1
	NM_001160170.2	(9 verschiedene Spleißvarianten)
	NM_001160171.2	
	NM_001160172.2	
	NM_001160173.2	
	NM_001160174.2	
	NM_001160175.2	
	NM_001160176.2	
	NM_001160179.2	
NFE2L2	NM_001145412.2	Nuclear factor erythroid 2-related factor 2
	NM_001145413.2	(3 verschiedene Spleißvarianten)
	NM_006164.4	
NFKB1	NM_001165412.1	Nuclear factor NF-kappa-B p105 subunit
	NM_003998.3	(2 verschiedene Spleißvarianten)
NFKBIA	NM_020529.2	NF-kappa-B inhibitor alpha
NFKB2	NM_001077494.3	Nuclear factor NF-kappa-B p100 subunit
	NM_001261403.2	(4 verschiedene Spleißvarianten)
	NM_001288724.1	
	NM_002502.5	
NQO1	NM_000903.2	NAD(P)H dehydrogenase [quinone] 1
	NM_001025433.1	(4 verschiedene Spleißvarianten)
	NM_001025434.1	
	NM_001286137.1	
OGG1	NM_002542.5	<i>N</i> -glycosylase/DNA lyase
	NM_016819.3	(8 verschiedene Spleißvarianten)
	NM_016820.3	
	NM_016821.2	

Anhang

	NM_016826.2	
	NM_016827.2	
	NM_016828.2	
	NM_016829.2	
PARP1	NM_001618.3	Poly [ADP-ribose] polymerase 1
PCNA	NM_002592.2	Proliferating cell nuclear antigen
	NM_182649.1	(2 verschiedene Spleißvarianten)
PLK3	NM_004073.2	Serine/threonine-protein kinase PLK3
PMAIP1	NM_021127.2	Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1
POLB	NM_002690.2	DNA polymerase beta
POLD1	NM_001256849.1	DNA polymerase delta catalytic subunit
	NM_002691.3	(2 verschiedene Spleißvarianten)
PPM1D	NM_003620.3	Protein phosphatase 1D
PRDX1	NM_001202431.1	Peroxiredoxin-1
	NM_002574.3	(4 verschiedene Spleißvarianten)
	NM_181696.2	
	NM_181697.2	
RAD50	NM_005732.3	DNA repair protein RAD50
	NM_133482.1	(2 verschiedene Spleißvarianten)
RAD51	NM_001164269.1	DNA repair protein RAD51 homolog 1
	NM_001164270.1	(4 verschiedene Spleißvarianten)
	NM_002875.4	
	NM_133487.3	
RRM2B	NM_001172477.1	Ribonucleoside-diphosphate reductase subunit M2 B
	NM_001172478.1	(3 verschiedene Spleißvarianten)
	NM_015713.4	
SEPP1	NM_001085486.1	Selenoprotein P
	NM_001093726.1	(3 verschiedene Spleißvarianten)
	NM_005410.2	
SIRT2	NM_001193286.1	NAD-dependent protein deacetylase sirtuin-2
	NM_012237.3	(3 verschiedene Spleißvarianten)
	NM_030593.2	
SLC30A1	NM_021194.2	Zinc transporter 1
SOD1	NM_000454.4	Superoxide dismutase [Cu-Zn]
SOD2	NM_000636.2	Superoxide dismutase [Mn], mitochondrial
	NM_001024465.1	(3 verschiedene Spleißvarianten)
	NM_001024466.1	
SULT1A	NM_001055.3	Sulfotransferase 1A
	NM_177529.2	(5 verschiedene Spleißvarianten)

Anhang

	NM_177530.2	
	NM_177534.2	
	NM_177536.3	
TFRC	NM_001128148.1	Transferrin receptor protein 1
	NM_003234.2	(2 verschiedene Spleißvarianten)
TNFRSF10B	NM_003842.4	Tumor necrosis factor receptor superfamily member 10B
	NM_147187.2	(2 verschiedene Spleißvarianten)
TP53	NM_000546.5	Cellular tumor antigen p53
	NM_001126112.2	(15 verschiedene Spleißvarianten)
	NM_001126113.2	
	NM_001126114.2	
	NM_001126115.1	
	NM_001126116.1	
	NM_001126117.1	
	NM_001126118.1	
	NM_001276695.1	
	NM_001276696.1	
	NM_001276697.1	
	NM_001276698.1	
	NM_001276699.1	
	NM_001276760.1	
	NM_001276761.1	
TXN	NM_001244938.1	Thioredoxin
	NM_003329.3	(2 verschiedene Spleißvarianten)
TXNRD1	NM_001093771.2	Thioredoxin reductase 1, cytoplasmic
	NM_001261445.1	(7 verschiedene Spleißvarianten)
	NM_001261446.1	
	NM_003330.3	
	NM_182729.2	
	NM_182742.2	
	NM_182743.2	
UGT1	NM_019093.2	UDP-glucuronosyltransferase 1A3
	NM_007120.2	UDP-glucuronosyltransferase 1A4
	NM_019078.1	UDP-glucuronosyltransferase 1A5
	NM_001072.3	UDP-glucuronosyltransferase 1A6
	NM_205862.1	
	NM_019077.2	UDP-glucuronosyltransferase 1A7
	NM_019076.4	UDP-glucuronosyltransferase 1A8
	NM_021027.2	UDP-glucuronosyltransferase 1A9
	NM_019075.2	UDP-glucuronosyltransferase 1A10
VEGFA	NM_001025366.2	Vascular endothelial growth factor A
	NM_001025367.2	(19 verschiedene Spleißvarianten)

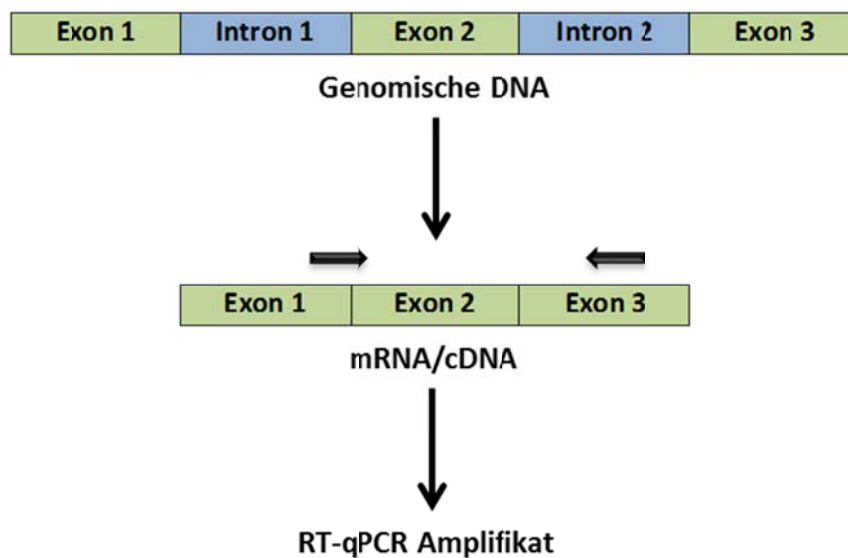
	NM_001025368.2	
	NM_001025369.2	
	NM_001025370.2	
	NM_001033756.2	
	NM_001171622.1	
	NM_001171623.1	
	NM_001171624.1	
	NM_001171625.1	
	NM_001171626.1	
	NM_001171627.1	
	NM_001171628.1	
	NM_001171629.1	
	NM_001171630.1	
	NM_001204384.1	
	NM_001204385.1	
	NM_001287044.1	
	NM_003376.5	
XIAP	NM_001167.3	E3 ubiquitin-protein ligase XIAP
	NM_001204401.1	(2 verschiedene Spleißvarianten)
XPA	NM_000380.3	DNA repair protein complementing XP-A cells
XPC	NM_001145769.1	DNA repair protein complementing XP-C cells
	NM_004628.4	(2 verschiedene Spleißvarianten)
XRCC5	NM_021141.3	X-ray repair cross-complementing protein 5

8.7.2.2 Parameter für das Primer-Design

Sofern es möglich war, wurden in dieser Arbeit gezielt einzelne relevante Transkriptvarianten eines Gens untersucht. Dafür wurden zunächst alle Spleißvarianten, die für eine Isoform kodieren, in einer BLAST-Suche ermittelt. Nicht immer war es jedoch möglich, isoliert nur eine Isoform zu erfassen, so dass für einzelne Gene wie *ADH* und *UGT1* alle Isoformen als Summenparameter detektiert wurden. Für das Primer-Design wurde die spezielle Software *Beacon Designer* und die Internetplattform NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) verwendet. Dies ermöglichte die Eingabe von Designkriterien und prüfte unter anderem auf Fehlhybridisierung, Komplementärstrukturen und *self annealing*. Um die Koamplifikation mit genomischer DNA zu verhindern, wurden die Primer, sofern es möglich war, über eine Exon-Exon-Schnittstelle gelegt (Abbildung 38). Zudem konnte durch einen Sequenzabgleich sichergestellt werden, dass keine Pseudogene in der zu untersuchenden Sequenz existierten.

Tabelle 11: Beacon Designer spezifische Einstellungen

Parameter	Wert
Assay	SYBR-Green
Primer-Konzentration	500 nM
Primer-Länge	16-30 bp
GC-Anteil	40-60 %
Schmelztemperatur	60 ± 5 °C
Amplikonlänge	100-250 bp

**Abbildung 38:** Primer-Design über eine Exon-Exon-Schnittstelle, um die Koamplifikation von genomischer DNA zu verhindern.

8.7.2.3 Primersequenzen

Tabelle 12: Auswahl der genutzten Primersequenzen

Gen	Forward-Primer (5'→3')	Reverse-Primer (5'→3')
ABCB1	AACACCACTGGAGCATTGAC	ACAGCAAGCCTGGAACCTA
ABCC1	CCTGTTCTCGGAAACCATCC	AAGGTGATCCTCGACAGGAA
ACTB	CCAACCGCGAGAAGATGAC	TAGCACAGCCTGGATAGCAA
ADH	GGTGGACATCAACAAGGACAA	CAACATAACAGGGAAGCCATCAT
ALDH1A1	CTGATGCCGACTTGGACAATG	ATACTTCTTAGCCCGCTCAACA
APAF1	ACCGTCTCCGCATTCTGA	TCTGTAACACTCTTGTCTCTGGTT
APEX1	ACTGTGCCTTCAAGAGACCAAATG	TCCTCATCGCCTATGCCGTAA

Anhang

ATM	TACCAAGCAGCATGGAGGAA	GATTCATGGTAACTGGTTCCTTCTAC
ATR	CATTCCAAAGCGCCACTGAA	CGCTGCTCAATGTCAAGAACA
AXIN2	TGATAAGGTCCTGGCAACTCA	GCGTGGTCTCTCTGTCTCT
B2M	AAGATGAGTATGCCTGCCGTGT	TCTTCAAACCTCCATGATGCTGCT
BAX	GGGTTGTCGCCCTTTTCTAC	TCTTGGATCCAGCCCAACA
BBC3	ACGACCTCAACGCACAGTA	ATGCTACATGGTGCAGAGAAAAG
BCL2	TGACAGAGGATCATGCTGTACTTA	TCCAATTCCTTTCCGATCTTTATTTCA
BCL2L1	CCTCTCCCGACCTGTGATAC	GGCTCAACCAGTCCATTGTC
BRCA1	GCTTGACACAGGTTTGGAGTATGC	GAGAGTTGGACACTGAGACTGGTT
BRCA2	ATGCAGCAGACCCAGCTTA	TCCATGGCCTTCCTAATTTCCA
BTRC	GAGCAGTGGTCAGAGTCAGAT	ACACAAGTTCAGCAGCACATAG
CAT	AGAAGTGCGGAGATTCAACAC	CCTCATTGAGCAGTTCACA
CCND1	AGAGGCGGAGGAGAACAAA	AGGGCGGATTGAAAATGAAC
CDKN1A	GCAGACCAGCATGACAGATTTTC	ACAAACTGAGACTAAGGCAGAAGA
CDKN1B	AGGAAGCGACCTGCAACC	TTGGGGAACCGTCTGAAACA
CDKN2B	TTACGGCCAACGGTGGATTA	GGCATGCCCTTGTTCTCC
CYP1A1	AAACCAGTGGCAGATCAACC	AGGGGTGAGAAACCGTTCA
DDB1	GGAGTCAATCACCTATCACAATGG	GGTATGTCAAGCACTCAGCAAT
DDB2	TCAAAGGGATTGGAGCTGGAG	GTGACCACCATTCCGGCTACTA
DDIT3	TTAAGTCTAAGGCACTGAG	GGTGTGGTGATGTATGAA
E2F1	AGCTCATTGCCAAGAAGTCCAA	TCCTGGGTCAACCCCTCAA
EGFR	GAACCCCGAGGGCAAATACA	CACGAGCCGTGATCTGTCA
EPHX1	CCACGACTTACACCAGAGGAT	AATCTCCACCTGCTTCTTCCA
ERCC1	GCCGACTGCACATTGATCC	TCCGCTGGTTTCTGCTCATA
ERCC2	TACCCCGAGCAGTTCTCCTA	CTGAGGGCATCTCCAGGAC
ERCC4	CTTCTGGAATCTCTGAGAGCAA	GAGGTGCTGGAGTCAAGAAA
ERCC5	TTGATGGGGATGCTCCACTA	TGGAGTCACTGGACGCTAA
FTH1	TTACCTGTCCATGTCTTAC	CATCACAGTCTGGTTTCT
G6PD	GCCGTCACCAAGAACATTCA	CTCCCGAAGGGCTTCTCC
GADD45A	GCTCCTGCTCTTGGAGAC	CAGGATCCTTCCATTGAGATGAA
GAPDH	ACACCATGGGGAAGGTGAAG	GTGACCAGGCGCCAATA
GCLC	TGGATGCCATGGGATTTGGAA	CTCAGATATACTGCAGGCTTGGAA
GPX1	CACCCTCTTTCGCTTCC	GAGCTTGGGGTCGGTCATAA
GPX2	GCTTTCATTGCCAAGTCCTTCTAT	TCATTCTGACAGTTCTCCTGATGT

Anhang

GSR	TTGCGTGAATGTTGGATGTGTA	ATGGGACTTGGTGAGATTGTTT
GSTP1	CACCTGTACCAGTCCAATACC	TCCTGCTGGTCTTCCATA
GUSB	CATCGATGACATCACCGTCAC	ACAGGTTACTGCCCTTGACA
HMOX1	CAGTCAGGCAGAGGGTGATA	GCTCCTGCAACTCCTCAA
HPRT1	GCTTTCCTTGGTCAGGCAGTA	ACTTCGTGGGGTCTTTTAC
HSPA1A	TCCTGTGTTTGCAATGTTGAA	CTGCATGTAGAAACCGGAAAA
IL8	TTCAGAGACAGCAGAGCACAC	AAGTTCTTTAGCACTCCTTGGCA
JUN	AAGAACTCGGACCTCCTCAC	TGGATTATCAGGCGCTCCA
KEAP1	AACTTCGCTGAGCAGATTGG	CGTAGAACCGTCGCTGTT
LIG1	TGGGAAGTACCCGGACATCA	GCTTCGGTGTCCAGGATGAA
LIG3	TCCAGGACTTCCTTCGGAAA	CAGCAGCAGCTTCACTGTTA
MAP3K5	ATCATTTCGGAAGGCGGTACA	ACTCTCAGATGCAAGGCTGAA
MDM2	CCATGATCTACAGGAACCTGGTA	GACACCTGTTCTCACTACA
MGMT	TGTGAAATTCGGAGAAGTGA	GAGGATGGGGACAGGATT
MLH1	CTTCACCCAGACTTTGCTACC	GGCATAGACCTTATCACTACTCC
MSH2	CCAGCAGCAAAGAAGTGCTA	TGTTTCACCTTGGACAGGAAC
MT1X	ACCACGCTTTTCATCTGTCC	GAGCAGTTGGGGTCCATTTC
MT2A	AACCTGTCCCGACTCTAG	GAAGTCGCGTTCTTTACA
MYC	GCCGCATCCACGAAACTTTG	GAGGCTGCTGGTTTTCCACTAC
NAT1	AGGAAGAAGCAGCAATCTGTCT	TCGGATCTGGTGTGAAGAATGT
NFE2L2	CAGTCAGCGACGGAAAGAGTA	GGGCAACCTGGGAGTAGTT
NFKB1	ACTTTCGAGGAAATACCC	GATAGAGGCTAAGTGTAGAC
NFKB1A	AGAGTGCTGGAGTTCAGGATAAC	TGAAGGTGGATGATTGCTAAGTGT
NFKB2	CCTGACTTTGAGGGACTGTATC	GGCTAGATGCAAGGCTGTT
NQO1	TCGGACCTCTATGCCATGAAC	AAAGTTCGCAGGGTCTTCA
OGG1	GTGTACTAGCGGATCAAGTATGGA	CAGTCGCACACCTTGGAAATT
PARP1	TTCTGGAGGACGACAAGGAA	GTTGCTACCGATCACCGTAC
PCNA	TCTGAGGGCTTCGACACCTA	CATTGCCGGCGCATTTTAGTA
PLK3	ACTGTCCAGGTGAACTTC	GAAGCGAGGTAAGTACAAG
PMAIP1	CAGTTGGAGGCTGAGGTTC	TCCTGAGTTGAGTAGCACACT
POLB	AAGAAATTGCCTGGAGTAGGAACA	CAGATGGACCAATGCCACTAACT
POLD1	AGCTGGTGGAGTCTAAGTACAC	GACGGAGTCAGTGTACCATA
PPM1D	AGCCAGAACTTCCCAAGGAAA	ACTACACGATTCACCCCAGAC
PRDX1	GCCTTCCAGTTCCTGACAA	TTCGGCTGAATCTGAAGCTTG

Anhang

RAD50	TCCCTCCTGGAACCAAAGGAA	AGACGAATCTGGGCTCTCACA
RAD51	GGGAAGACCCAGATCTGTCA	ATGTACATGGCCTTTCCTTAC
RRM2B	CCTTGCGATGGATAGCAGATAGA	AGTCCTGGCATAAGACCTCTC
SEPP1	AAACTGCTCTCTCACGACTCTC	AGGTGCTGATGTCCATGATTGT
SIRT2	TCAAGCCAACCATCTGTCACTA	CTCCACCAAGTCCTCCTGTT
SLC30A1	AGAAGTGGTGATACAGTGGAAGT	GGGTCAGGGAAACATGGATTC
SOD1	TGATCTCACTCTCAGGAGACCAT	ACCACAAGCCAAACGACTTC
SOD2	AGGATCCACTGCAAGGAACA	GTGCTCCCACACATCAATCC
SULT1A	AAGTTCATGGTCGGAGAAGTGT	ACGGTGGTGTAGTTGGTCATAG
TFRC	CACCATCAAGCTGCTGAATGA	GCCTTACTATACGCCACATAACC
TNFRSF10B	GCACCACGACCAGAAACAC	ACAATCACCGACCTTGACCAT
TP53	CGAGATGTTCCGAGAGCTGAAT	TTTATGGCGGGAGGTAGACTGA
TXN	TTACAGCCGCTCGTCAGA	CCCACCTTTTGTCCCTTCTT
TXNRD1	GCATCCCTGGTGACAAAGAA	CCAACAACCAGGGTCTTACC
UGT1	TCCCAGGAATTTGAAGCCTACAT	TCGTGTTGTTGCAAGATTCCG
VEGFA	TACATCTTCAAGCCATCC	CTGTAGGAAGCTCATCTC
XIAP	AGGAGTGTCTGGTAAGAACTACTG	GCATACTGTCTTTCTGAGCATTCA
XPA	ACATCATTCACAATGGGGTGATA	ACCCCAAACCTCAAGAGACC
XPC	TAAAGGGGTCCATGAGGACACA	CTGGCTGGCTGCAGATGTTA
XRCC5	TGATTTGCTGGAGGACATTGAAAG	AATCGGCTGCTGAGGTCA

8.7.2.4 Primer-Etablierung

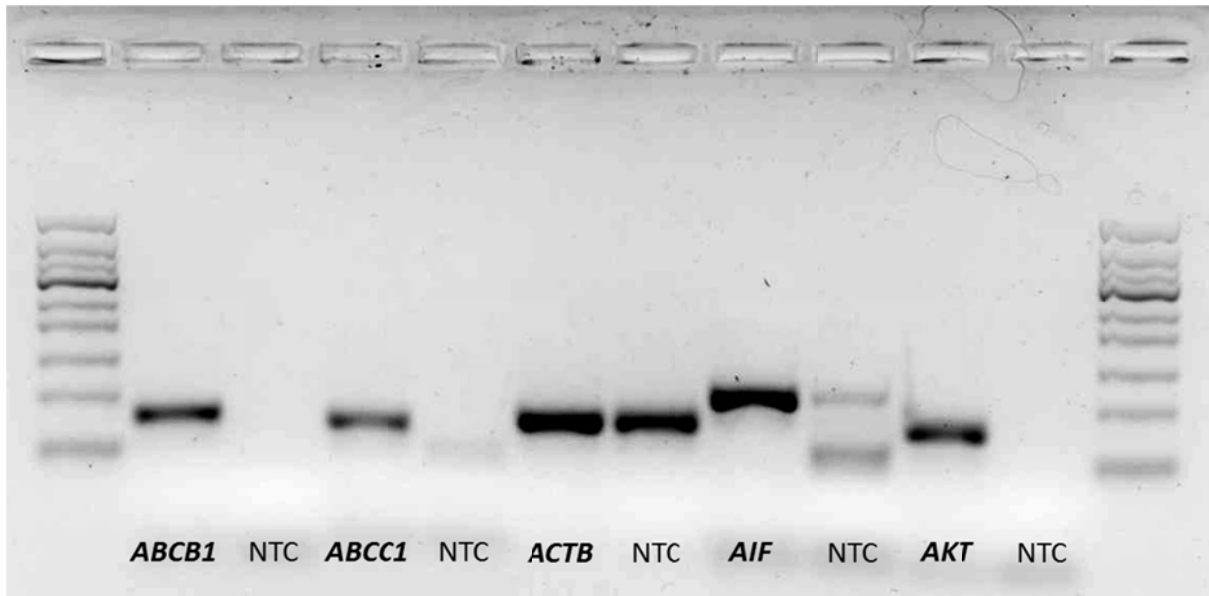


Abbildung 39: Beispielhaftes Gelbild der Amplifikate nach erfolgter PCR-Reaktion und anschließender Agarose-Gelelektrophorese (NTC=no template control)

8.7.2.5 Weitere Genexpressionsprofile

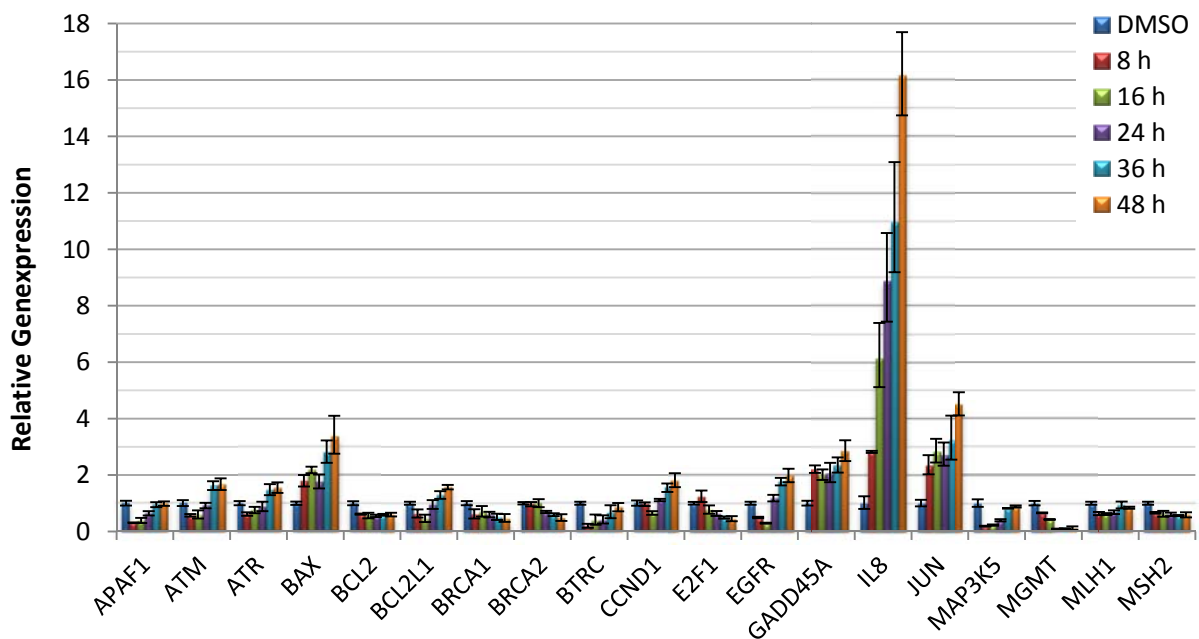


Abbildung 40: Genexpressionsprofil nach Inkubation mit 500 µM Indol-3-Carbinol in HCT 116-Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus zwei unabhängigen, in Dreifachbestimmung durchgeführten Versuchen ± 95 %-Konfidenzintervall.

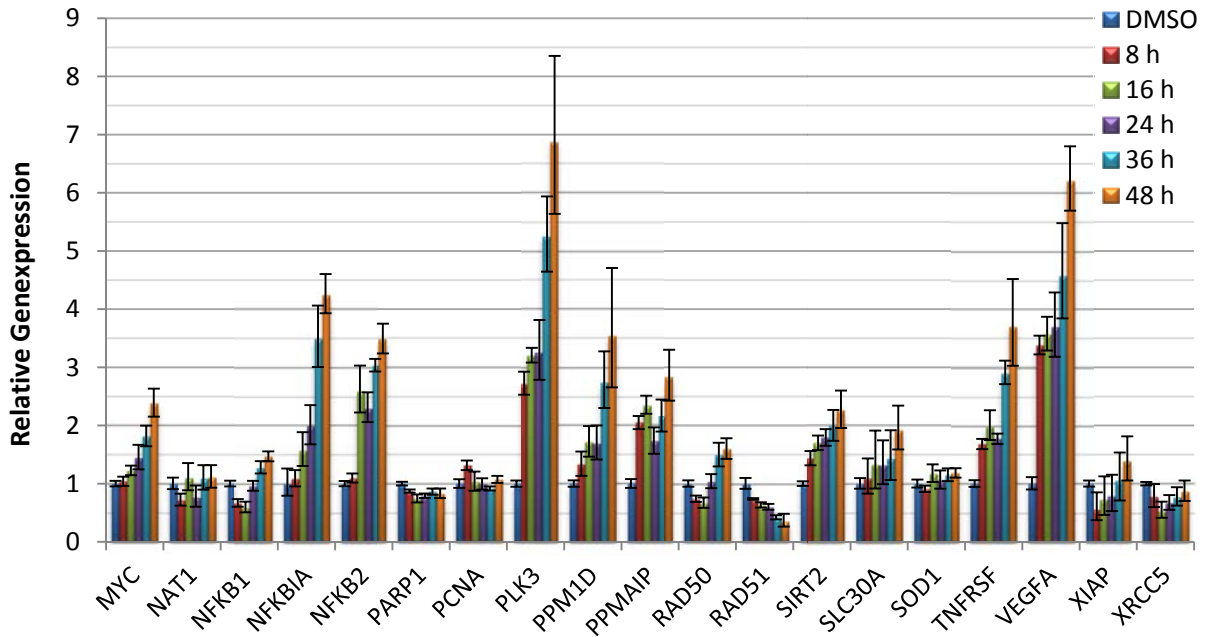


Abbildung 41: Genexpressionsprofil nach Inkubation mit 500 µM Indol-3-Carbinol in HCT 116-Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus zwei unabhängigen, in Dreifachbestimmung durchgeführten Versuchen \pm 95 %-Konfidenzintervall.

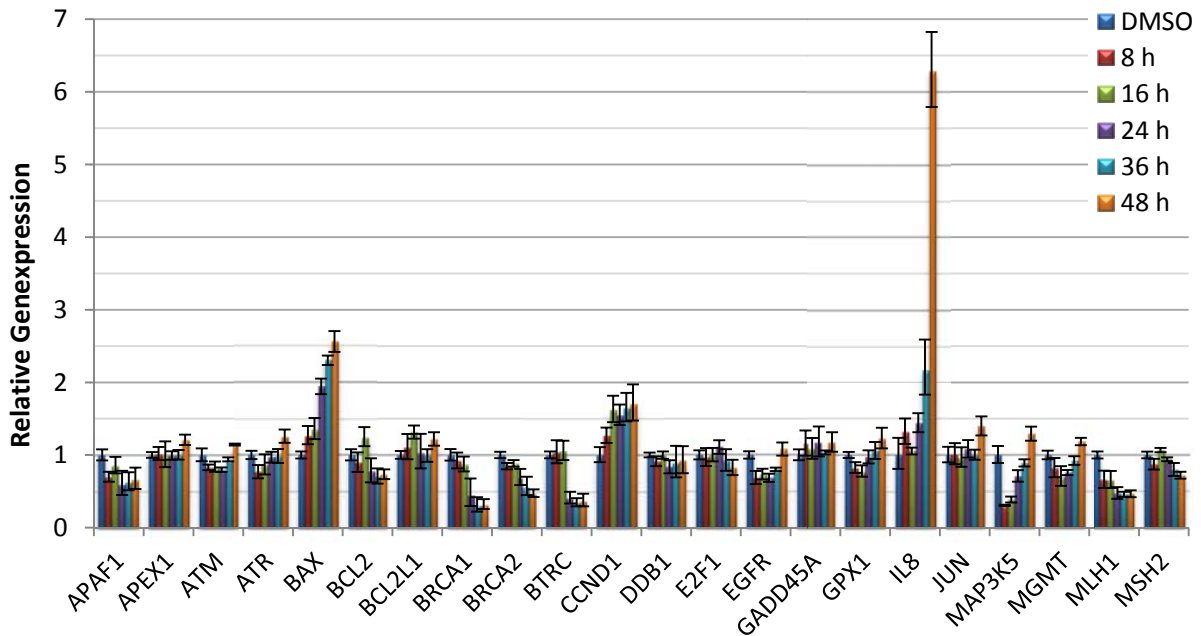


Abbildung 42: Genexpressionsprofil nach Inkubation mit 12,5 µM Sulforaphan in HCT 116-Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus zwei unabhängigen, in Dreifachbestimmung durchgeführten Versuchen \pm 95 %-Konfidenzintervall.

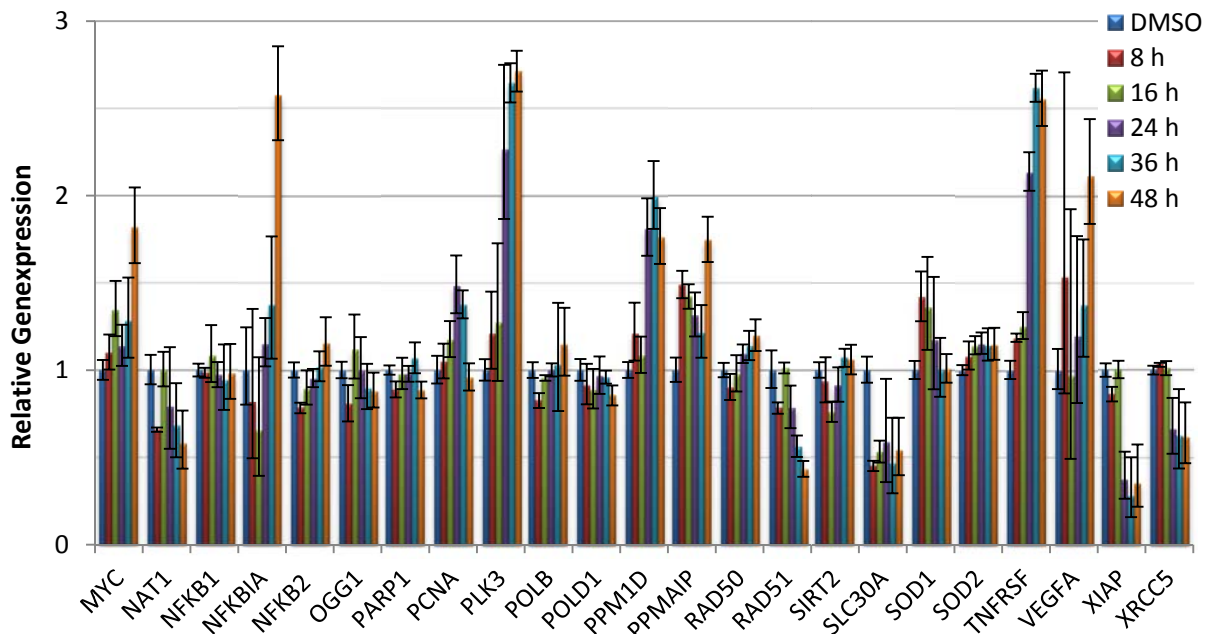


Abbildung 43: Genexpressionsprofil nach Inkubation mit 12,5 µM Sulforaphan in HCT 116-Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus zwei unabhängigen, in Dreifachbestimmung durchgeführten Versuchen ± 95 %-Konfidenzintervall.

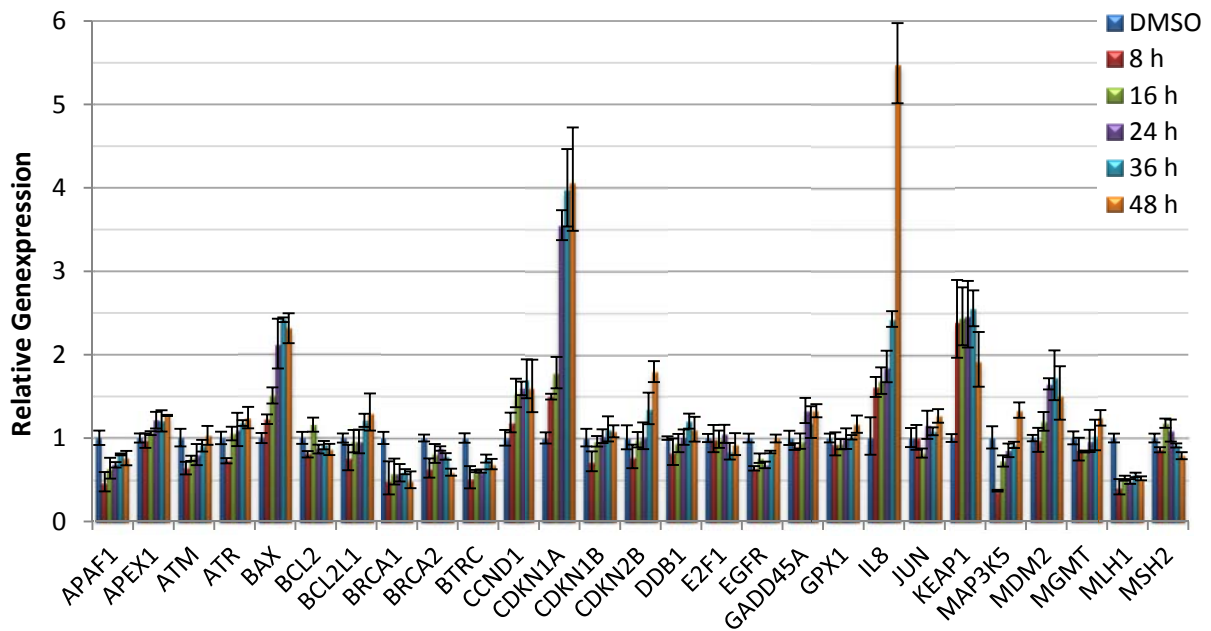


Abbildung 44: Genexpressionsprofil nach Inkubation mit 20 µM Myrosinase-hydrolysiertem Gesamtglucosinolat-Extrakt aus Brokkoli in HCT 116-Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus zwei unabhängigen, in Dreifachbestimmung durchgeführten Versuchen ± 95 %-Konfidenzintervall.

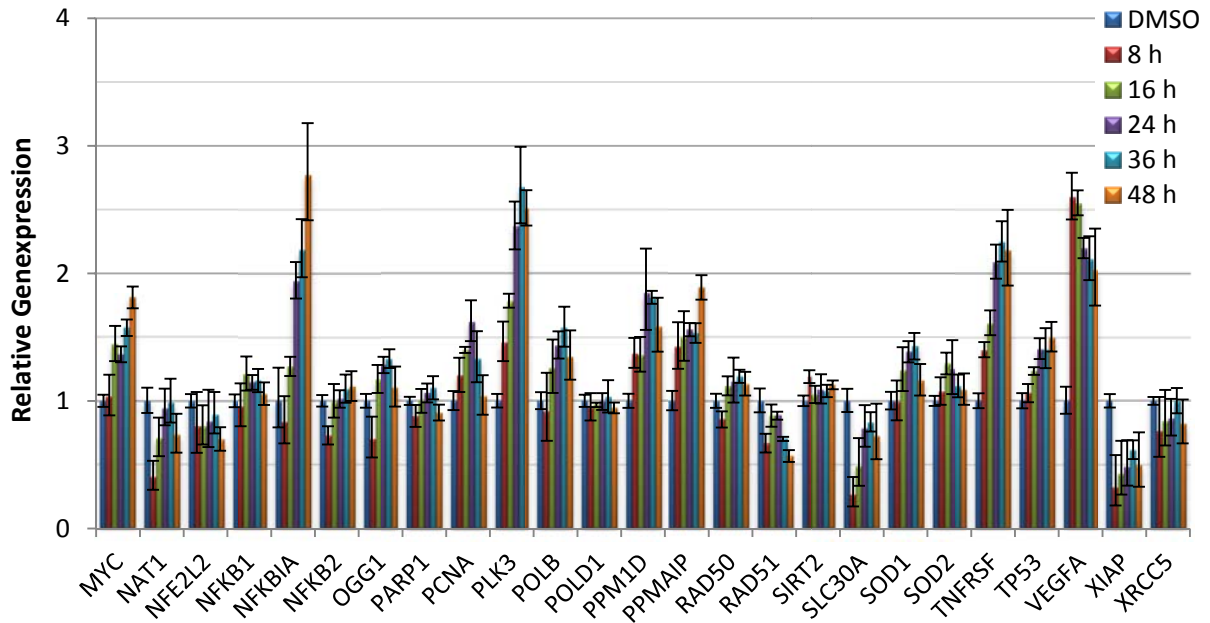


Abbildung 45: Genexpressionsprofil nach Inkubation mit 20 µM Myrosinase-hydrolysiertem Gesamtglucosinolat-Extrakt aus Brokkoli in HCT 116-Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus zwei unabhängigen, in Dreifachbestimmung durchgeführten Versuchen \pm 95 %-Konfidenzintervall.

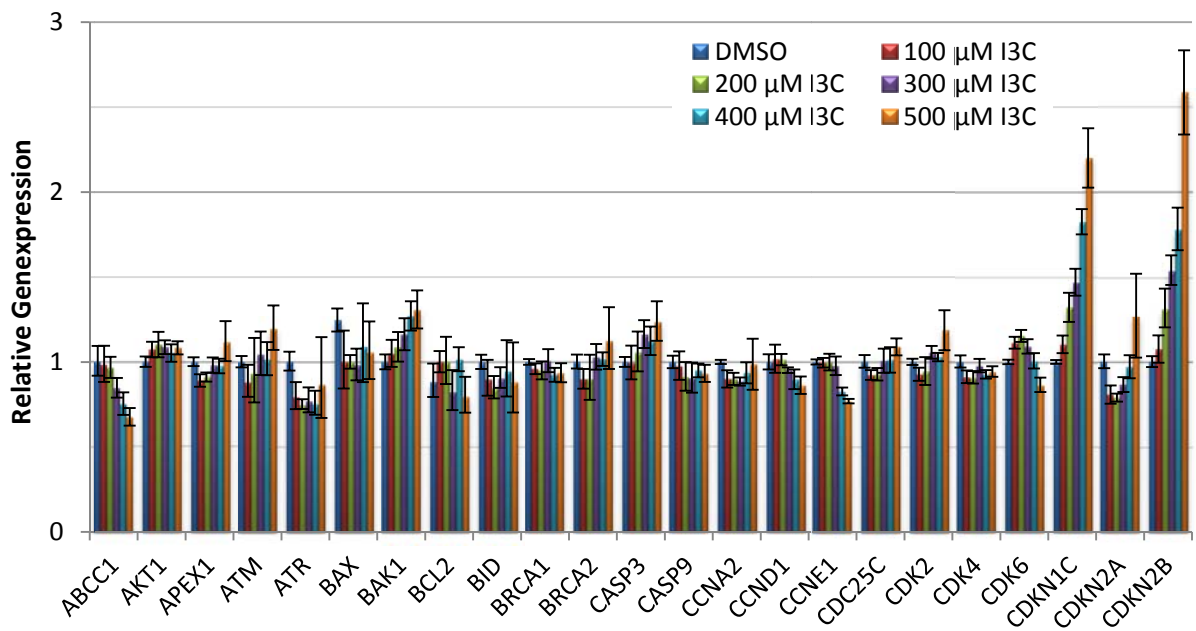


Abbildung 46: Genexpressionsprofil nach 24-stündiger Inkubation mit Indol-3-Carbinol in HCT 116-Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus zwei unabhängigen, in Dreifachbestimmung durchgeführten Versuchen \pm 95 %-Konfidenzintervall.

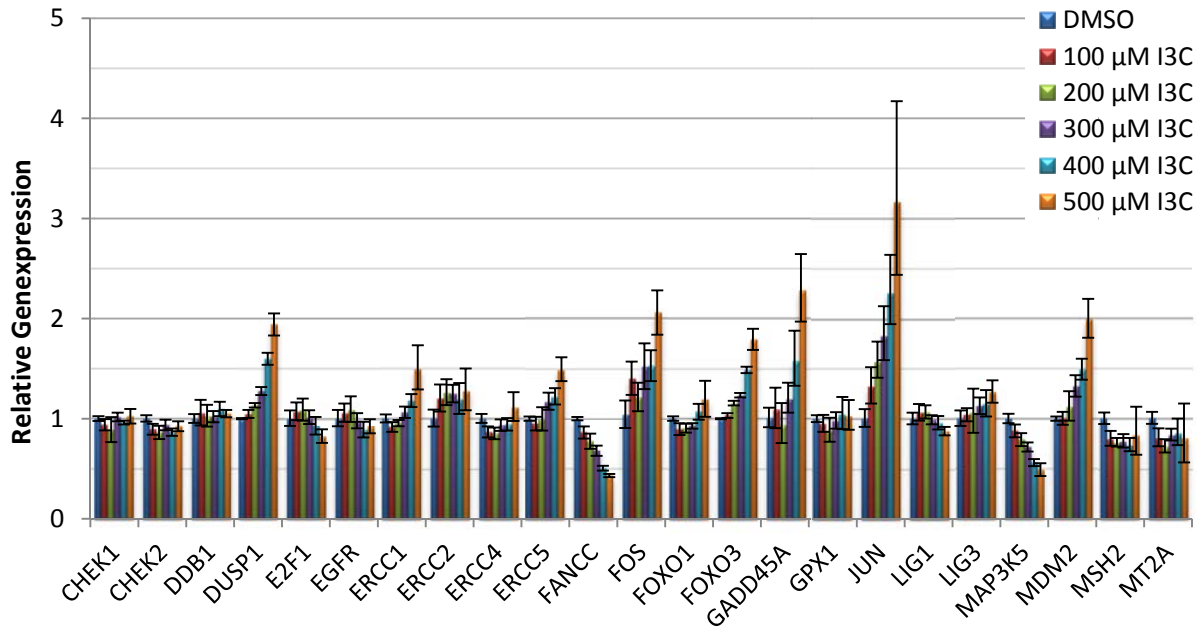


Abbildung 47: Genexpressionsprofil nach 24-stündiger Inkubation mit Indol-3-Carbinol in HCT 116-Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus zwei unabhängigen, in Dreifachbestimmung durchgeführten Versuchen \pm 95 %-Konfidenzintervall.

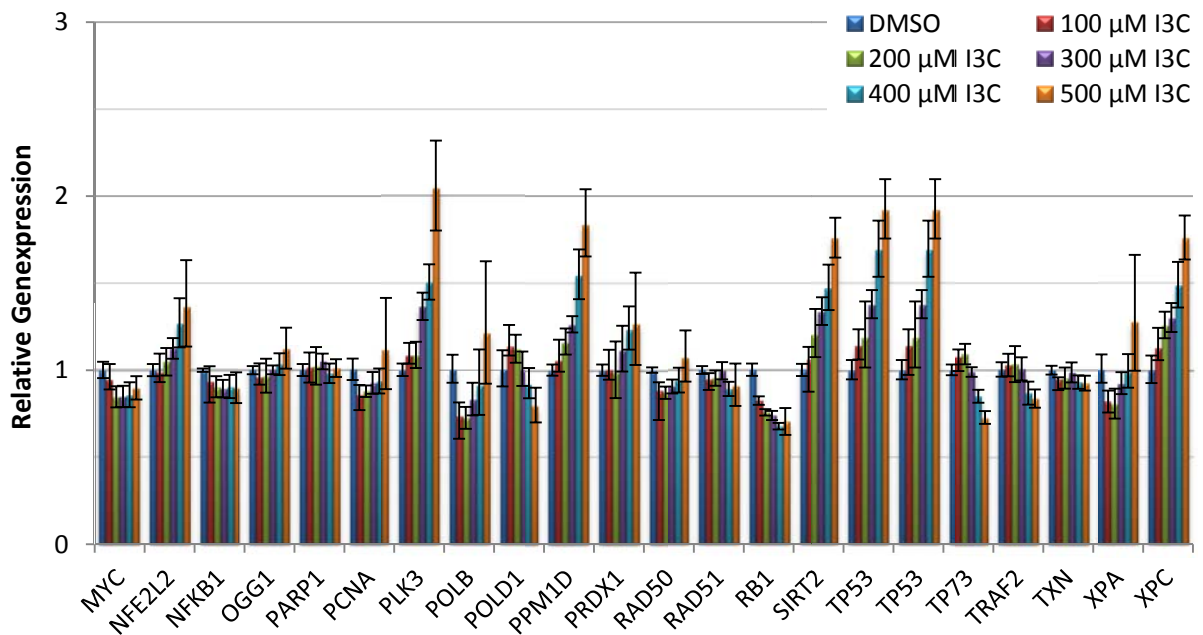


Abbildung 48: Genexpressionsprofil nach 24-stündiger Inkubation mit Indol-3-Carbinol in HCT 116-Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus zwei unabhängigen, in Dreifachbestimmung durchgeführten Versuchen \pm 95 %-Konfidenzintervall.

8.7.3 Zellzyklusuntersuchungen

8.7.3.1 Gating-Prozedur

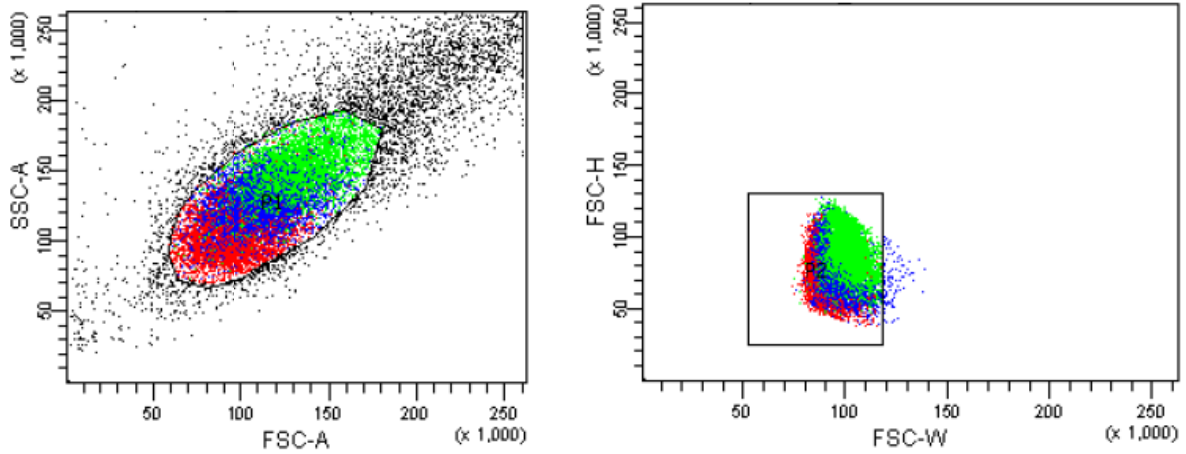


Abbildung 49: Darstellung der Gating Prozedur während der durchflußzytometrischen Analyse. Zuerst wurde die gesamte Zellpopulation im SSC-A vs. FSC-A Dotplot aufgezeichnet. Anschließend wurde die Doubletten im FSC-H vs. FSC-W Dotplot ausgegated.

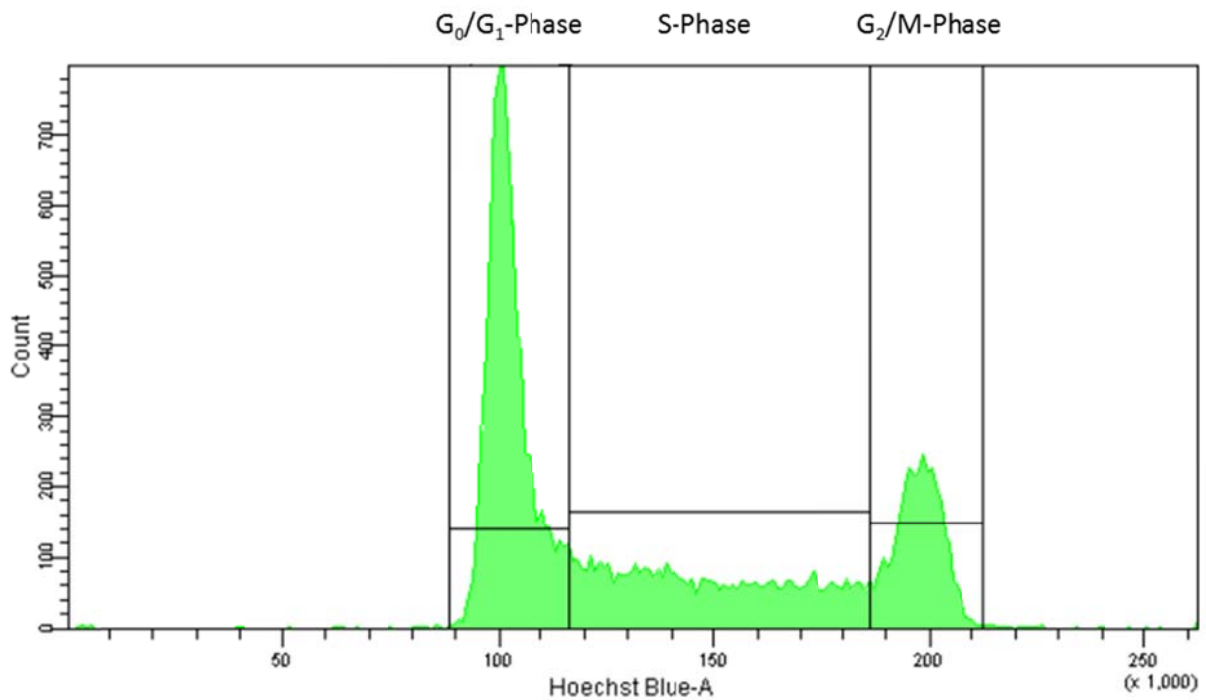


Abbildung 50: Histogramm einer Kontrollbehandlung mit DMSO in HCT 116-Zellen. Pro Messung wurden 20.000 Events/Zellen detektiert.

8.7.4 Bestimmung der EROD-Aktivität

8.7.4.1 HPLC-Analyse

Tabelle 13: Parameter der HPLC

Parameter	Wert
Injektionsvolumen	100 µl
Temperatur Autosampler	4 °C
Temperatur Säulenofen	20 °C
Flussrate	0,5 ml/min

Tabelle 14: HPLC-Gradientenprogramm

Gesamtzeit (min)	Bidestilliertes Wasser (0,1 % Ameisensäure) (%)	Acetonitril (0,1 % Ameisensäure) (%)
0	60	40
8	30	70
11	0	100
14	0	100
17	60	40
28	60	40

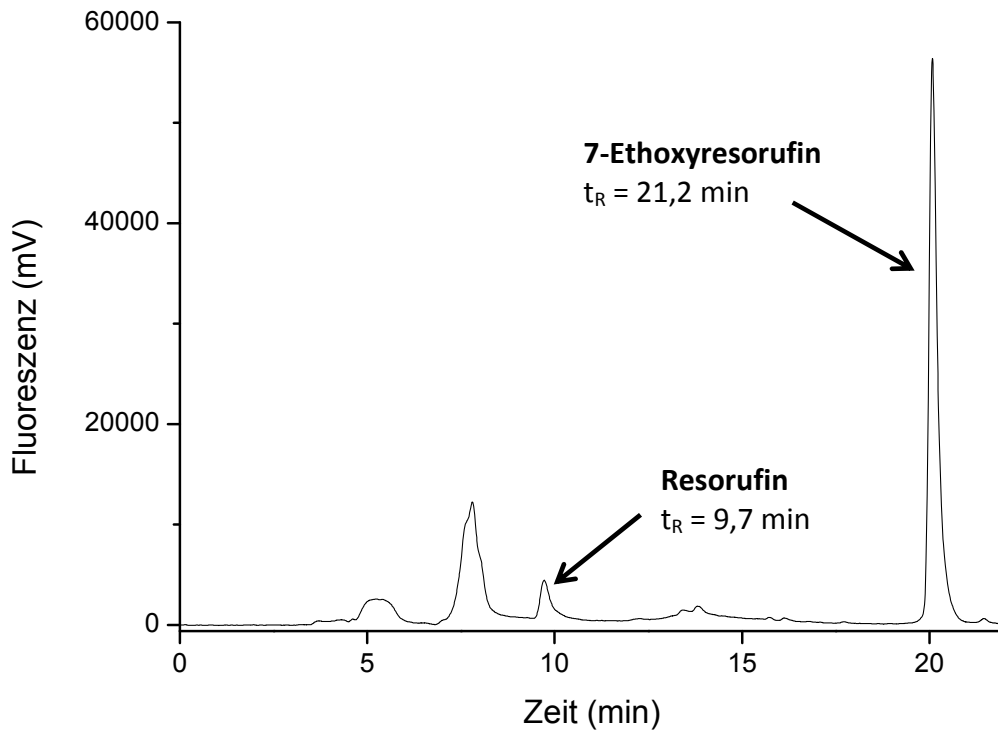


Abbildung 51: HPLC-Chromatogramm einer mit Indol-3-Carbinol-behandelten Probe nach 60-minütiger Inkubation mit 20 µM 7-Ethoxyresorufin und NADPH-generierendem System. Detektion mit dem Fluoreszenzdetektor bei 530 nm Anregungs- und 580 nm Emissionswellenlänge.

8.7.4.2 Externe Kalibrierung

Zunächst wurde eine 4,4 mM Resorufinstammlösung auf 40 nM in Methanol verdünnt. Die externe Kalibrierung wurde durch weiteres Verdünnen der 40 nM Resorufinlösung in Methanol erstellt. 100 µl der verdünnten Lösung wurden in die HPLC eingespritzt.

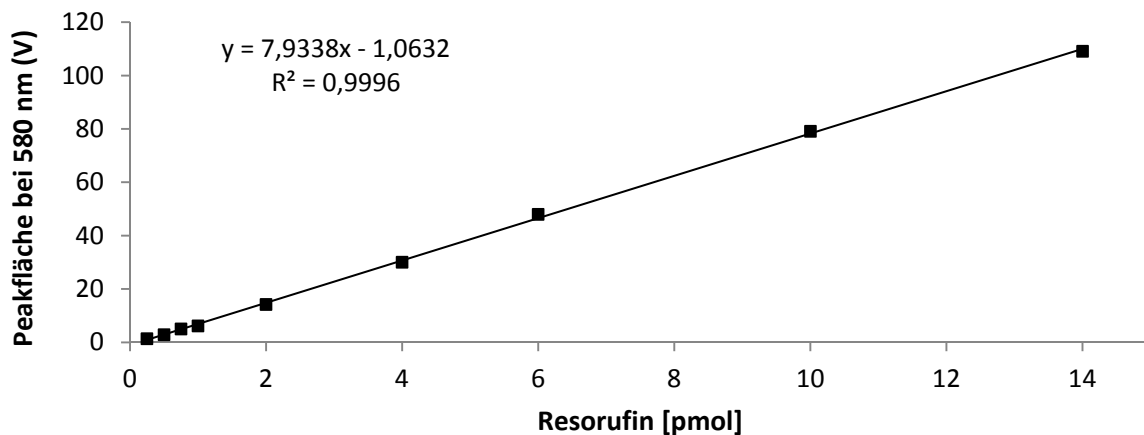


Abbildung 52: Externe Kalibriergerade im Bereich von 0,25-14 pmol Resorufin

9. Publikationsliste

Publikationen in Vorbereitung

- B. Fischer, D. Neumann, A. L. Piberger, S. F. Risnes „*Identification of the impact on genes involved in maintenance of genomic stability by gene expression profiling using high-throughput-RT-qPCR*“
- D. Neumann, A. L. Piberger, B. Fischer „*Impact of sulforaphane and indole-3-carbinol on gene expression in HCT 116 cells*“

Vorträge auf Fachtagungen

- BMBF-Projekttreffen 2011
Berlin (GER), 05. Juli 2011
„*Einfluss von Glucosinolaten und deren Abbauprodukte auf die genomische Stabilität: Genexpressionsanalysen*“
D. Neumann, A. Hartwig
- 12. Treffen des Toxikologie-Netzwerk Baden-Württemberg
Karlsruhe (GER), 23. November 2012
Toxikologie-Netzwerk Baden-Württemberg (BWTOX.NET) Symposium
„*Impact of indole-3-carbinol and 3,3'-diindolylmethane on the gene expression profiles in HCT 116 cells*“
D. Neumann, B. Fischer, O. Deppe, A. Hartwig

Posterbeiträge auf Fachtagungen

- 2. Statusseminar Ernährung BMBF
Potsdam (GER), 16. – 18. Mai 2011
Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF)
„*Verbesserte Gewinnung und Verarbeitung diätetischer Glucosinolate sowie die Charakterisierung ihrer potenziellen Funktion in der Prävention von Darmkrebs - Einfluss von Glucosinolaten und deren Abbauprodukten auf die genomische Stabilität: DNA-Reparaturprozesse*“
A. L. Piberger, D. Neumann, A. Hartwig

- 11. Treffen des Toxikologie-Netzwerk Baden-Württemberg
Konstanz (GER), 13. Oktober 2011
Toxikologie-Netzwerk Baden-Württemberg (BWTOX.NET) Symposium 2011
„Gene expression profiling of indole-3-carbinol treated HCT 116 cells by high-throughput PCR“
D. Neumann, A. Hartwig
- 26. Tagung der Gesellschaft für Umweltmutationsforschung
Mainz (GER), 28. Februar – 2. März 2012
Gesellschaft für Umweltmutationsforschung (GUM)
„Induktion von DNA-Reparatur-assoziierten Genen durch Indol-3-Carbinol in HCT 116-Zellen“
D. Neumann, A. Hartwig
- 42nd Annual EEMS Meeting
Warschau (POL), 16. – 20. September 2012
European Environmental Mutagen Society (EEMS)
„Global gene expression profiling of indole-3-carbinol and 3,3'-diindolylmethane treated HCT 116 cells by high-throughput PCR“
D. Neumann, B. Fischer, O. Deppe, A. Hartwig
- 3. Statusseminar Ernährung BMBF
Berlin (GER), 19. – 21. November 2012
Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF)
„Verbesserte Gewinnung und Verarbeitung diätetischer Glucosinolate sowie die Charakterisierung ihrer potenziellen Funktion in der Prävention von Darmkrebs - Einfluss von Glucosinolate-Hydrolyseprodukten auf DNA-Reparaturprozesse und Genexpression sowie die Bedeutung für die genomische Stabilität“
A. L. Piberger, D. Neumann, A. Hartwig
- Regionalverbandstagung Südwest 2013
Karlsruhe (GER), 19. – 20. März 2013
Lebensmittelchemische Gesellschaft, Fachgruppe der Gesellschaft Deutscher Chemiker (GDCh)
„Einfluss von Indol-3-Carbinol und 3,3'-Diindolylmethan auf die Genexpression in HCT 116-Zellen“
D. Neumann, A. Hartwig

- Pharmakologen-Tagung 2014
Heidelberg (GER), 25. Juli 2014
Toxikologie-Netzwerk Baden-Württemberg (BWTOX.NET) Symposium 2014
„Glucosinolate hydrolysis products induce distinct gene expression pathways in HCT 116 cells“
D. Neumann, B. Fischer, A. Hartwig

10. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Andrea Hartwig, die meiner Arbeit stets großes Vertrauen entgegenbrachte und mich fachlich in jeglicher Form unterstützte.

Finanziell wurde diese Arbeit durch das Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) im Rahmen des Forschungsvorhabens (0315370B) „Improving dietary glucosinolate production, processing and characterization of potential health effects for the prevention of colon cancer“ sowie durch die Exzellenzinitiative des Karlsruher Instituts für Technologie unterstützt.

Ein besonderer Dank geht an Ann Liza Piberger für die Etablierung des Myrosinase-Assay, die Bereitstellung der Zytotoxdaten sowie für die fachliche Unterstützung und die Korrektur meiner Arbeit.

Ein großes Dankeschön gebührt dem Karlsruher Arbeitskreis für die angenehme und kollegiale Zusammenarbeit. Vor allem bedanken möchte ich bei Elisa für die entspannte Atmosphäre im Büro und bei Chris für die außeruniversitären, sozialen Aktivitäten.

Weiterhin möchte ich mich bei Oliver Deppe und Bettina Fischer für die tollen Ergebnisse, ihren Fleiß und vor allem die angenehme Zusammenarbeit während der Diplomarbeit bedanken.

Ein weiter Dank gilt Stefanie Fleck für die Erlernung des EROD-Assay und Olivier Armant für die Messungen am Bioanalyser.

Dir, Beatrix, möchte ich für die bedingungslose Unterstützung, Geduld und das entgegengebrachte Vertrauen während der gesamten Zeit danken. Ohne Deine Bereitschaft mit mir nach Karlsruhe zu ziehen, hätte sich alles schwieriger gestaltet.

Zuletzt danke ich meiner lieben Mutter für die treue Unterstützung und das jahrelange Vertrauen.