

Untersuchungen zu chemopräventiven Aktivitäten von
Isoflavonoiden aus der Sojabohne (*Glycine max*) sowie
deren im menschlichen Darm gebildeten reduktiven
Metaboliten in humanen Prostatazellen

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der
Friedrich-Schiller-Universität Jena

von

Dipl. troph. Marian Raschke

geboren am 16.10.1976 in Nordhausen

1. Gutachter: Frau Prof. Dr. Beatrice L. Pool-Zobel (Jena)
2. Gutachter: Frau Prof. Dr. Sabine E. Kulling (Potsdam)
3. Gutachter: Herr Prof. Dr. Stefan Wölfl (Heidelberg)

Tag der öffentlichen Verteidigung: 04. April 2006

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis..... I

Abbildungsverzeichnis..... V

Tabellenverzeichnis..... VII

Abkürzungsverzeichnis..... VIII

1 Einleitung 1

1.1 Zur Bedeutung des Prostatakarzinoms 1

 1.1.1 Häufigkeiten und globale Verteilung 1

 1.1.2 Zelluläre und molekulare Karzinogenese..... 3

 1.1.3 Risikofaktoren 7

1.2 Chemoprävention des Prostatakarzinoms..... 13

 1.2.1 Überblick über Strategien und potentielle Wirkstoffe 13

 1.2.2 Isoflavonoide als potentiell chemopräventive Wirkstoffe 15

 1.2.2.1 Exposition und Metabolismus 15

 1.2.2.2 Biologische Aktivitäten 18

 1.2.2.3 Beeinflussung des Prostatakarzinomrisikos (epidemiologische Befunde)..... 18

2 Problemstellung und Ziele der Arbeit..... 20

3 Materialien und Methoden..... 25

3.1 Materialien 25

 3.1.1 Verwendete Zellmodelle 25

| | | |
|------------|--|-----------|
| 3.1.2 | Verwendeten Testsubstanzen | 27 |
| 3.1.3 | Verwendete Lösungen, Reagenzien und Kits | 27 |
| 3.1.4 | Verwendete Laborgeräte sowie Arbeitsmittel..... | 28 |
| 3.1.5 | Verwendete Software und Datenbanken..... | 28 |
| 3.2 | Methoden | 28 |
| 3.2.1 | Kultivierung der Zelllinien..... | 28 |
| 3.2.2 | Zellzahl- und Vitalitätsbestimmung (Trypanblau-Ausschluss mit Neubauerkammer)..... | 27 |
| 3.2.3 | Zellwachstumsassay (DAPI Assay) | 27 |
| 3.2.4 | Zytotoxizitätsbestimmung (MTT Assay)..... | 29 |
| 3.2.5 | Alkalische Einzelzellmikrogelelektrophorese (Comet Assay)..... | 29 |
| 3.2.6 | Multiple Genexpressionsanalyse (cDNA-Macroarray)..... | 33 |
| 3.2.7 | TaqMan Real-Time PCR..... | 38 |
| 3.2.8 | Immunzytochemische Detektion von Metallothioneinen | 42 |
| 3.2.9 | Statistische Analysen und grafische Darstellung | 46 |
| 4 | Ergebnisse | 48 |
| 4.1 | Effekte von Isoflavonoiden auf das Zellwachstum | 48 |
| 4.1.1 | Charakterisierung der Zelllinien hinsichtlich ihrer Verdopplungszeiten..... | 48 |
| 4.1.2 | Charakterisierung der Zelllinien hinsichtlich ihrer Wachstums- antworten auf die Behandlungen mit Dihydrotestosteron oder 17 β -Östradiol..... | 49 |
| 4.1.3 | Effekte von Genistein und dessen Darmmetaboliten auf das Zellwachstum | 48 |

| | | |
|------------|--|-----------|
| 4.1.4 | Effekte von Daidzein und dessen Darmmetaboliten auf das Zellwachstum | 49 |
| 4.1.5 | Effekte von synthetischen Isoflavonoidgemischen auf das Zellwachstum | 55 |
| 4.2 | Effekte von Isoflavonoiden auf die Mitochondrienaktivität | 56 |
| 4.2.1 | Charakterisierung der Zelllinien hinsichtlich ihrer Mitochondrienaktivitäten nach Androgen- und Östrogenbehandlung..... | 56 |
| 4.2.2 | Effekte ausgewählter Isoflavonoide auf die Mitochondrienaktivität | 54 |
| 4.2.3 | Effekte synthetischer Isoflavonoidgemische auf die Mitochondrienaktivität..... | 55 |
| 4.3 | Effekte von Isoflavonoiden auf die DNA-Integrität..... | 58 |
| 4.3.1 | Charakterisierung der Zelllinien hinsichtlich der Induktion von DNA-Schäden durch Androgen- und Östrogenbehandlung | 59 |
| 4.3.2 | Effekte der Isoflavonoide auf die Rate an DNA-Schäden | 59 |
| 4.3.3 | Effekte von Genistein auf das Ausmaß der durch oxidativen Stress induzierten DNA-Schäden | 57 |
| 4.3.4 | Charakterisierung der Zelllinien bezüglich ihrer relativen Empfindlichkeit gegenüber oxidativem Stress..... | 58 |
| 4.3.5 | Effekte von Genistein auf das Ausmaß wasserstoffperoxyd-induzierter DNA-Schäden..... | 59 |
| 4.3.6 | Effekte von Genistein auf das Ausmaß hämoglobin-induzierter DNA-Schäden | 65 |
| 4.4 | Effekte von Genistein auf die Gen- und Proteinexpression | 66 |
| 4.4.1 | Effekte von Genistein auf die Expression von Genen der Biotransformation und Stressantwort (cDNA-Makroarray) | 68 |

| | | |
|------------|---|-------------|
| 4.4.2 | Effekte von Genistein auf die Genexpression der Glutathion- reduktase, der Mikrosomalen Glutathion S-Transferase 1 und des Metallothioneins 1X (Taqman Real-Time PCR) | 64 |
| 4.4.3 | Effekte von Genistein auf die Proteinexpression von Metallothioneinen | 67 |
| 5 | Diskussion..... | 77 |
| 5.1 | Wachstumsfördernde bzw. wachstumshemmende Aktivitäten von Isoflavonoiden in Prostatazellen..... | 79 |
| 5.2 | Genotoxische Aktivitäten von Isoflavonoiden in Prostatazellen | 79 |
| 5.3 | Antigenotoxische Aktivitäten von Genistein in Prostatazellen..... | 81 |
| 5.4 | Effekte von Genistein auf die antioxidative Abwehr von Prostatazellen | 85 |
| 6 | Schlussfolgerungen und Ausblick..... | 94 |
| 7 | Zusammenfassung / English Abstract | 99 |
| | Literaturverzeichnis..... | IX |
| | Anhang A | XVI |
| | Anhang B..... | XXVI |

Abbildungsverzeichnis

| | |
|--|----|
| Abbildung 1: Die funktionellen Kompartimente des Prostataepithels | 4 |
| Abbildung 2: Genetische Veränderungen während der Prostatakarzinogenese | 6 |
| Abbildung 3: Darstellung des reduktiven Isoflavonoid-Stoffwechsels der menschlichen Darmflora | 13 |
| Abbildung 4: Fließschema für die Durchführung des Comet Assay | 30 |
| Abbildung 5: Fließschema für die Durchführung der cDNA-Macroarray-Analyse | 32 |
| Abbildung 6: Fließschema für die Durchführung der TaqMan Real-Time PCR | 38 |
| Abbildung 7: Fließschema für die Durchführung der Immunzytochemischen Detektion | 43 |
| Abbildung 8: Wachstumskinetiken und Verdopplungszeiten der Zelllinien | 47 |
| Abbildung 9: Wachstumsantworten von LNCaP Zellen und LAPC-4 Zellen auf die Behandlungen mit 17 β -Östradiol und Dihydrotestosteron | 48 |
| Abbildung 10: Wachstumsantworten von LNCaP Zellen und LAPC-4 Zellen auf die Behandlungen mit Genistein und seinen reduktiven Metaboliten .. | 49 |
| Abbildung 11: Wachstumsantworten von LNCaP Zellen und LAPC-4 Zellen auf die Behandlungen mit Daidzein und seinen reduktiven Metaboliten ... | 50 |
| Abbildung 12: Wachstumsantworten von LNCaP Zellen und LAPC-4 Zellen auf die Behandlungen mit S-Equol und razemischem Equol | 51 |
| Abbildung 13: Wachstumsantworten von LNCaP Zellen und LAPC-4 Zellen auf die Behandlungen mit Mix S und Mix R | 52 |
| Abbildung 14: Mitochondrienaktivitäten von LNCaP Zellen und LAPC-4 Zellen nach Behandlungen mit 17 β -Östradiol und Dihydrotestosteron | 53 |
| Abbildung 15: Mitochondrienaktivitäten von LNCaP Zellen und LAPC-4 Zellen nach Behandlungen mit den Isoflavonoiden Genistein, O-DMA sowie S-Equol und razemischem Equol | 54 |
| Abbildung 16: Mitochondrienaktivitäten von LNCaP Zellen und LAPC-4 Zellen nach Behandlungen mit Mix S und Mix R | 55 |

| | |
|---|----|
| Abbildung 17: Vergleich der Empfindlichkeiten von LNCaP Zellen und LAPC-4 Zellen gegenüber H ₂ O ₂ -induzierten DNA-Schäden | 58 |
| Abbildung 18: Effekt einer 60 min Inkubation mit Genistein auf das Ausmaß oxidativ-induzierter DNA-Schäden in LAPC-4 und LNCaP Zellen | 59 |
| Abbildung 19: Effekt einer 24 h Vorinkubation mit Genistein auf das Ausmaß oxidativ-induzierter DNA-Schäden in LAPC-4 Zellen | 60 |
| Abbildung 20: Effekt von Genistein auf das Ausmaß hämoglobin-induzierter DNA-Schäden in LAPC-4 Zellen..... | 61 |
| Abbildung 21: Einfluss von Genistein auf die Genexpression vonMetallothionein 1X, Mikrosomale Glutathion-S-Transferase 1 und Glutathionreduktase in LAPC-4 Zellen..... | 64 |
| Abbildung 22: Kinetiken der Genexpression von Metallothionein 1X, Mikrosomale Glutathion-S-Transferase 1 und Glutathionreduktase in LAPC-4 Zellen nach Inkubation mit Genistein..... | 65 |
| Abbildung 23: Genexpression von Metallothionein 1X nach Inkubation mit Genistein und 17β-Östradiol..... | 66 |
| Abbildung 24: Immunzytochemische Detektion von Metallothioneinen in LAPC-4 Zellen | 67 |
| Abbildung 25: Einfluss von DMSO, Zinksulfat , 17β-Östradiol und Genistein auf die Proteinexpression von Metallothioneinen in LAPC-4 Zellen..... | 68 |
| Abbildung 26: Einfluss von DMSO, Zinksulfat, 17β-Östradiol und Genistein auf die intrazelluläre Lokalisation von Metallothioneinen in LAPC-4 Zellen . | 69 |
| Abbildung 27: Karyotyp von LNCaP Zellen nach Rainbow-FISH..... | IV |
| Abbildung 28: Karyotyp von LAPC-4 Zellen nach M-FISH..... | IV |
| Abbildung 29: Repräsentative Aufnahmen der cDNA Makroarrays HS-011 und HS-012..... | IV |
| Abbildung 30: Scatterplots der normalisierten Daten aus den cDNA-Makroarray-Analysen für die Spots der Ziel- und Housekeeping-Gene | IV |
| Abbildung 31: Promotorregion des Gens Metallothioneine 1X..... | IV |
| Abbildung 32: Sequenzanalysen der PCR-Produkte..... | IV |

Tabellenverzeichnis

| | |
|--|----|
| Tabelle 1: Präventionsstrategien für das Prostatakarzinom | 11 |
| Tabelle 2: Relative Isoflavonoid-Konzentrationen im menschlichen Plasma | 24 |
| Tabelle 3: PCR-Primer und Sonden für die TaqMan Real Time PCR | 40 |
| Tabelle 4: Wirkung der Steroidhormone auf die DNA-Integrität..... | 56 |
| Tabelle 5: Wirkung der Isoflavonoide auf die DNA-Integrität..... | 57 |
| Tabelle 6: Multiple Genexpressionsanalyse nach Behandlung mit 1 μ M Genistein | 62 |
| Tabelle 7: Multiple Genexpressionsanalyse nach Behandlung mit 10 μ M Genistein | 63 |

Abkürzungsverzeichnis

| | | | |
|-----------------------|--|-----------------------------------|---|
| °C | Grad Celsius | H₂O | Wasser |
| µg | Mikrogramm (10 ⁻⁶ Gramm) | H₂O₂ | Wasserstoffperoxyd |
| µM | Mikromolar (10 ⁻⁶ Molar) | IMDM | <i>Iscove's modified Dulbecco's medium</i> |
| ACTB | β-Aktin | M | Molar (Mol pro Liter) |
| AR | Androgenrezeptor | MAPK | Mitogen-aktivierte Proteinkinase |
| ARE | <i>Antioxidant response element</i> | mg | Milligramm (10 ⁻³ Gramm) |
| bp | Basenpaare | MGST-1 | Mikrosomale Glutathion-S-Transferase 1 |
| BPH | Benigne Prostatahyperplasie | min | Minute |
| bspw. | Beispielsweise | mM | Millimolar (10 ⁻³ Molar) |
| bzgl. | Bezüglich | MRE | <i>Metal response element</i> |
| CCS | Aktivkohle-gefiltertes Fötale Kälberserum | MT-1X | Metallothionein 1X |
| CO₂ | Kohlendioxyd | MTT | 3(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)2,5-Diphenyl-Tetrazoliumbromid |
| C_T | <i>Threshold cycle</i> | nM | Nanomolar (10 ⁻⁹ Molar) |
| CYP | Cytochrom-P450-abhängige Monooxygenase | o.g. | Oben genannt |
| Da | Dalton | PBS | Phosphatgepufferte Kochsalzlösung |
| DAB | Diaminobenzidin | PIN | Prostatische Intraepitheliale Neoplasie |
| DAPI | 4',6'-Diamidino-2-Phenylindol-Hydrochlorid | pM | Pikomolar (10 ⁻¹² Molar) |
| DHT | Dihydrotestosteron | ROS | Reaktive Sauerstoffspezies |
| E2 | 17β-Östradiol | RPMI | <i>Roswell Park Memorial Institute medium</i> |
| ER | Östrogenrezeptor | sec | Sekunde |
| ERE | <i>Estrogen response element</i> | sog. | So genannt |
| FCS | Fötale Kälberserum | U/min | Umdrehungen pro Minute |
| g | Gramm | UVB | Ultraviolette B-Strahlung |
| ggf. | Gegebenenfalls | z. B. | zum Beispiel |
| GRE | <i>Glucocorticoid response element</i> | ZnSO₄ | Zinksulfat |
| GSH | Glutathion-Sulfhydryl | | |
| GSR | Glutathionreduktase | | |
| GSSG | Glutathion-Disulfid | | |
| h | Stunde | | |

1 Einleitung

1.1 Zur Bedeutung des Prostatakarzinoms

1.1.1 Häufigkeiten und globale Verteilung

Der Begriff Prostatakarzinom bezeichnet allgemein das klinisch manifeste Stadium der häufigsten malignen Erkrankung der Prostata. Dem klinischen Stadium geht eine mehrere Dekaden umfassende latente, histologisch nachweisbare Karzinogenese voraus. Eine aktuelle Schätzung globaler Tumorinzidenzen ergab, dass das Prostatakarzinom mit rund einer halben Millionen Fällen pro Jahr fast 10 % aller Tumorneuerkrankungen bei Männern stellt. Es ist somit die dritthäufigste Tumorform des Mannes weltweit (Quinn & Babb, 2002).

Allerdings bestehen beachtliche geografische Unterschiede. Viele Länder in Asien und Nordafrika weisen sehr niedrige Inzidenzraten (< 6 Fälle pro 100000 Einwohner) auf, während Nordamerika, Nord- und Mitteleuropa, Australien und Zentralafrika deutlich höhere Inzidenzraten (> 30 Fälle pro 100000 Einwohner) besitzen (Quinn & Babb, 2002). Wie hoch das Risiko in einigen Ländern der westlichen Welt gegenwärtig ist, verdeutlicht der Blick auf die USA. Die Wahrscheinlichkeit, dass ein US-Amerikaner im Laufe seines Lebens an einem klinischen Prostatakarzinom erkrankt, liegt derzeit bei geschätzten 17,8 %; d. h. jeder sechste männliche US-Amerikaner wird voraussichtlich ein invasives Prostatakarzinom entwickeln (Jemal *et al.*, 2005).

Mit einer Inzidenzrate von 101 Fällen pro 100000 Einwohner (erhoben im Jahr 2000) zählt Deutschland zu den Ländern mit einer sehr hohen Prostatakrebshäufigkeit. Die Bundesrepublik nimmt damit im europäischen Vergleich hinter Finnland, Schweden, Belgien und Österreich den fünften Platz ein (Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland, 2004). Mit einem Anteil von rund 20 % bei den malignen Neuerkrankungen (ca. 40.600 Fälle pro Jahr) ist das Prostatakarzinom die häufigste Tumorform bei Männern in Deutschland (Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland, 2004).

Im Gegensatz zu den teilweise beträchtlichen globalen Unterschieden bzgl. der Inzidenzen variieren die Mortalitätsraten deutlich geringer. Jedoch liegen auch sie in

vielen asiatischen Ländern wie Japan, Indien und China mit < 5 Fällen pro 100000 Einwohner klar unter denen westlicher Industrieländer, wie den USA oder Großbritannien, mit > 25 Fällen pro 100000 Einwohnern (Quinn & Babb, 2002).

Im Jahr 2000 lag die Mortalitätsrate für das Prostatakarzinom in Deutschland bei 27,7 Fällen pro 100000 Einwohner. Das Prostatakarzinom war damit die dritthäufigste maligne Todesursache beim Mann (Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland, 2004).

Die 5-Jahres-Überlebensrate für Patienten mit diagnostiziertem Prostatakarzinom wird in Europa als moderat bezeichnet und liegt im Mittel bei ca. 50 – 60 %. In den USA ist sie mit fast 90 % international am höchsten (Quinn & Babb, 2002). In Deutschland ist die 5-Jahres-Überlebensrate mit rund 80 % ebenfalls gut (Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland, 2004).

Die Unterschiede zwischen den Inzidenz- bzw. Mortalitätsraten von westlichen Industrieländern und östlichen Entwicklungsländern lassen sich teilweise mit den verschieden entwickelten Gesundheitssystemen bzw. den unterschiedlichen diagnostischen Möglichkeiten erklären. Jedoch liegen die Daten hoch entwickelter östlicher Industrienationen wie Japan durchaus im Bereich anderer Länder ihrer Region (Quinn & Babb, 2002). Zudem besitzen asiatische Männer – entgegen früherer Annahmen – möglicherweise auch ein geringeres Risiko für latente Karzinome, die aufgrund fehlender Beschwerden meist unerkannt bleiben (Gu *et al.*, 1994).

Studien an asiatischen Emigranten in den USA ermittelten ein – im Vergleich zum jeweiligen Herkunftsland – deutlich erhöhtes Risiko, an Prostata-, Mamma- und Zervixkarzinomen zu erkranken. Die Autoren dieser Migrationsstudien verwiesen deshalb auf eine potentielle Bedeutung von Lifestyle-Faktoren, wie den Ess- und Trinkgewohnheiten, als eine mögliche Hauptursache für die sich stark unterscheidenden spezifischen Tumorrisiken zwischen asiatischen und westlichen Ländern (Gomez *et al.*, 2003; Shimizu *et al.*, 1991).

Während ca. 55 % der Frauen bis 65 Jahren von ihrem Arzt die Diagnose Mammakarzinom erhalten, entwickeln nur 15 % der Männer bis 65 Jahren ein Prostatakarzinom (Quinn & Babb, 2002). Das mittlere Erkrankungsalter für das Prostatakarzinom liegt in Deutschland bei 71 Jahren und damit rund 5 Jahre über dem Durchschnittsalter für maligne Erkrankungen im Allgemeinen (Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener

Krebsregister in Deutschland, 2004). Beim Prostatakarzinom scheinen deshalb Lifestyle-Faktoren das Risiko besonders im höheren Lebensalter zu beeinflussen, wohingegen beim Mammakarzinom ein deutlich früherer Lebensabschnitt von entscheidender Bedeutung ist (Gomez *et al.*, 2003).

1.1.2 Zelluläre und molekulare Karzinogenese

Im Gegensatz zu den meisten anderen menschlichen Organen wächst die Prostata stetig über die gesamte Lebenszeit. Während sie zu Beginn der Pubertät lediglich 2 - 3 g leicht ist, wiegt sie im Alter von 20 Jahren durchschnittlich 20 - 30 g. Die Prostata eines 65-jährigen Mannes erreicht bereits ein zwei- bis dreifaches (Gao & Isaacs, 2002).

Die Prostata gliedert sich in drei Zonen: Die zentrale Zone umfasst ca. 25 % des glandulären Parenchyms und besteht aus großen Drüsen und Gangstrukturen. Nur etwa 5 % aller Prostatatumoren entstehen hier. In der eher kleinen Transitionalzone entstehen ca. 20 % der Prostatatumoren, jedoch die überwiegende Anzahl der benignen Prostatahyperplasien (BPH). Die BPH ist keine präneoplastische Läsion, sondern stellt eine eigenständige Erkrankung dar. Die periphere Zone umfasst rund 70 % des gesamten Prostatavolumens und umschließt hufeisenförmig die Transitionalzone. Rund 70 – 80 % aller Prostatatumoren entstehen hier; dagegen tritt die BPH in dieser Zone vergleichsweise selten auf (Bonkhoff & Remberger, 1998).

Das für die Entstehung von Karzinomen relevante Prostataepithel besteht aus drei Zelltypen, den androgenabhängigen sekretorischen Epithelzellen, den androgenunabhängigen Basalzellen sowie den neuroendokrinen Zellen, wobei der sekretorische Zelltyp den Hauptanteil, sowohl des gesunden als auch hyper- und neoplastischen Epithels ausmacht (Bonkhoff & Remberger, 1998). Vermutlich gehen 70 % aller Epithelzellen aus einem sich langsam teilenden pluripotenten Stammzellkompartiment – einer Teilpopulation der Basalzellen – hervor (**Abbildung 1a**). Das anteilmäßig dominierende sekretorische Epithel rekrutiert sich weiterhin zu ca. 30 % aus schnell proliferierenden und bereits sekretorisch-differenzierten Epithelzellen (Foster *et al.*, 2000). Prostatakarzinome entstehen wahrscheinlich aus dieser Zellpopulation, da Tumorzellen überwiegend exokrin sind und morphologisch den sekretorischen Epithelzellen ähneln (Foster *et al.*, 2000).

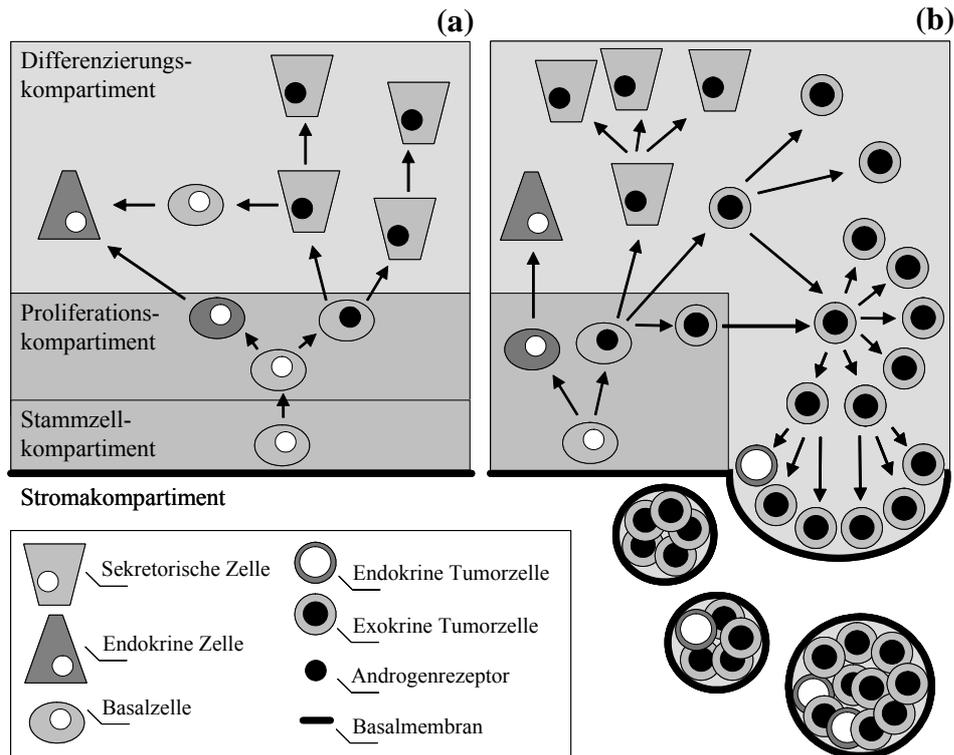


Abbildung 1: Die funktionellen Kompartimente des Prostataepithels. Schematische Darstellung der grundlegenden Differenzierungs- und Proliferationsvorgänge im gesunden Prostataepithel (a). Aus pluripotenten basalen Stammzellen werden endokrine und exokrine (sekretorische) Zellen gebildet. Die exokrine Zellpopulation rekrutiert sich zusätzlich zu einem geringen Teil aus bereits differenzierten sekretorischen Zellen des Differenzierungskompartiments. Diese Prozesse sind bei der Entstehung eines Prostatakarzinoms gestört (b). Nach der malignen Transformation verlagert sich die Proliferationszone in das Differenzierungskompartiment. Im Zuge der Stromainvasion bildet der Tumor eine neue tumorassoziierte Basalmembran aus, die den Tumor umschließt (modifiziert nach Bonkoff & Remberger, 1998; Foster et al., 2000).

Für geschätzte 10 % der Patienten wird eine genetische Prädisposition vermutet. Diese so genannten hereditären Formen besitzen Alterationen in spezifischen Genen. Bisher konnten gewisse Suszeptibilitätsloci, wie z. B. der *hereditary prostate cancer locus 1* (HPC1) und der *X-linked hereditary prostate cancer locus* (HPCX), identifiziert werden (Simard et al., 2003). Auch einzelne Gene, bspw. die Ribonuclease L (RNASEL) oder der *macrophage scavenger receptor 1* (MSR1), wurden vorgeschlagen (Rebbeck, 2002). Ihr Einfluss auf die Tumorentstehung ist noch größtenteils unklar. Der überwiegende Anteil der Prostatatumoren entwickelt sich jedoch sporadisch.

Auch die der Initiation, Promotion und Progression sporadischer Prostatakarzinome zugrunde liegenden zell- und molekularbiologischen Ereignisse sind weitestgehend unbekannt. Als sicher gilt ein bei Tumoren häufig beobachteter mehrstufiger Prozess, in dem genetische Veränderungen von Protoonkogenen und Tumorsuppressorgenen von zentraler Bedeutung sind (siehe unten).

Die früheste morphologisch-identifizierbare prämaligene Läsion ist die Prostatistische Intraepitheliale Neoplasie (PIN). Ähnlich wie das sich hieraus entwickelnde Karzinom tritt die PIN meist multifokal auf – d. h. es existieren mehrere von einander unabhängige Foci – und ist genetisch äußerst heterogen, was die Identifizierung von charakteristischen Prozessen erschwert (Foster *et al.*, 2000). Dennoch treten innerhalb der Prostatakarzinogenese spezifische Ereignisse gehäuft auf. So besitzt die PIN eine erhöhte proliferative Aktivität der sekretorisch-differenzierten Epithelzellen, während das eigentliche Proliferationskompartiment (die Basalzellen) seine Teilungsfunktion weitestgehend verliert und nur noch für ca. 10 % der Zellneubildungen verantwortlich ist (**Abbildung 1b**). Wie auch das gesunde Epithel benötigt die PIN eine androgene Stimulation. Ein Androgenmangel führt deshalb zur teilweisen Rückbildung dieser neoplastischen Vorstufe des Prostatakarzinoms (Foster *et al.*, 2000).

Frühe Ereignisse der Prostatakarzinogenese beinhalten Chromosomenaberrationen und Aneuploidien. Bereits 32 - 68 % der PIN weisen diese Merkmale auf, was einerseits zu einer gestörten Expression von Protoonkogenen wie erbB-2, erbB-3 und c-met aber auch zur *loss of heterocycosity* (LOH) bei Tumorsuppressorgenen (z. B. nm23-H1) führt. Zudem ist bereits früh eine Telomeraseaktivität nachweisbar (Foster *et al.*, 2000). Ein weiteres charakteristisches Merkmal von PIN und frühen Karzinomen ist der durch Hypermethylierung des Promotors verursachte Verlust der Glutathion-S-Transferase π (GST- π) (**Abbildung 2**). Während dieses Protein in gesunden Zellen vorhanden ist, exprimieren ca. 90 % aller Prostatatumoren kein GST- π (Foster *et al.*, 2000). Dieses wichtige Phase-II-Enzym ist an Entgiftungsreaktionen vieler Kanzerogene, wie z. B. von DNA-schädigenden reaktiven Elektrophilen, beteiligt (Hayes *et al.*, 2005).

Die letztlich zur malignen Transformation führenden Prozesse sind bisher kaum bekannt. Allerdings scheint die bereits bei frühen Tumorstadien deutlich verminderte genetische Stabilität eine zentrale Rolle zu spielen (Foster *et al.*, 2000).

Die gesteigerte proliferative Aktivität des Epithels führt zu einer Invasion des Stroma-
gewebes (Bonkhoff & Remberger, 1998). Später durchbricht der Tumor die fibrös-
muskuläre Prostatakapsel und wandert in umliegende Gewebe. Ein noch vollständig in
der Kapsel lokalisiertes Prostatakarzinom kann in den allermeisten Fällen durch die
Entfernung der Prostata (Radikale Prostataektomie) vollständig geheilt werden. Auch
eine Strahlentherapie (Brachytherapie) findet bei lokalen Prostatatumoren erfolgreich
Anwendung (Denmeade & Isaacs, 2002).

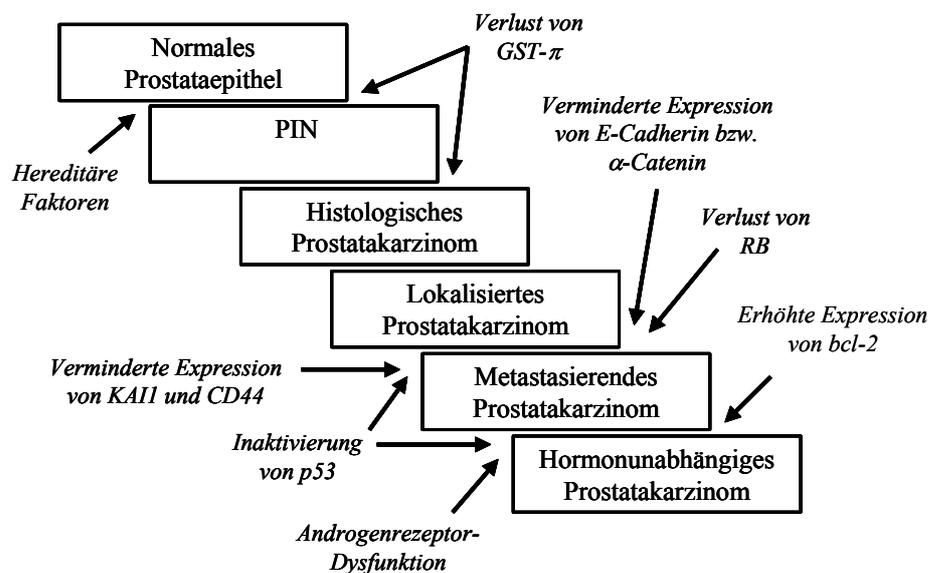


Abbildung 2: Genetische Veränderungen während der Prostatakarzinogenese. Die früheste nachweisbare präneoplastische Veränderung ist die Prostatische Intraepitheliale Neoplasie (PIN). Dieses Stadium geht häufig mit einem Verlust der Expression von GST-π einher. Dagegen stellen die Inaktivierung der Tumorsuppressorgene p53 und RB vergleichsweise späte Ereignisse; sie fördern wahrscheinlich die Bildung von Metastasen. Der Übergang zum hormonunabhängigen Stadium erfolgt aufgrund von Dysfunktionen innerhalb des Androgenrezeptor-Signalwegs und wird durch die erhöhte Expression von bcl-2 unterstützt (modifiziert nach Gao & Isaacs, 2002).

Jedoch besitzen ca. 50 % der Patienten zum Zeitpunkt der Diagnose bereits ein klinisch fortgeschrittenes Karzinom und Metastasen (Gao & Isaacs, 2002). Dieses progrediente Tumorstadium geht häufig mit dem Verlust bzw. einer Inaktivierung der Tumorsuppressorgene RB und p53 sowie einer gestörten Expression von E-Cadherin einher (Karayi & Markham, 2004).

Da die Mehrzahl der metastasierenden Prostatakarzinome noch auf eine Androgenstimulation angewiesen ist, kam der mechanischen bzw. chemischen Kastration in

früheren Zeiten eine zentrale therapeutische Bedeutung zu. Dies führte häufig zu einer fast vollständigen apoptotischen Rückbildung der Tumoren. In der heutigen Zeit wird eine Androgendepletion mit Hilfe von Antiandrogenen erreicht. Der Entzug von Androgenen ist jedoch eine eher palliative Therapieform, denn sie führt in der Regel zu keiner Heilung des Patienten (Denmeade & Isaacs, 2002).

In den allermeisten Fällen tritt nach einiger Zeit ein erneutes und zumeist beschleunigtes Wachstum der nunmehr androgenunabhängigen Tumorzellen auf. Als mögliche Ursachen für den Eintritt in dieses hormonunabhängige Stadium gelten u. a. die Amplifikation und Mutation des Androgenrezeptors (AR) sowie die Umgehung des AR-Signalweges (Feldman & Feldman, 2001). Patienten in diesem Stadium können nur noch mit zytotoxischer Chemotherapeutika behandelt werden und besitzen eine äußerst schlechte Prognose (Denmeade & Isaacs, 2002).

1.1.3 Risikofaktoren

Alter

Es gelang bisher nur vergleichsweise wenige Risikofaktoren eindeutig zu benennen: Wie zuvor erwähnt, steigt das Tumorrisiko mit dem Lebensalter an (Quinn & Babb, 2002). Die genauen Ursachen für diesen stark altersbedingten Anstieg des Prostatakarzinomrisikos sind unbekannt. Jedoch existieren belastbare Thesen, auf deren Grundlage die vorliegende Arbeit in weiten Teilen basiert.

Die Entstehung des Prostatakarzinoms ist eng mit einem altersabhängigen Anstieg radikal-induzierter oxidativer DNA-Schäden assoziiert (Malins *et al.*, 2001). Die hierfür verantwortlichen reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) werden in jeder Zellen aus endogenen (Mitochondrien, Cytochrome-P450, Peroxisomen und inflammatorische Zellen) sowie exogenen Quellen (redoxzyklusfähige Substanzen, Metallionen und ionisierende Strahlung) generiert. Allein 4 - 5 % des in den Mitochondrien umgesetzten molekularen Sauerstoffs münden in ROS (Klaunig & Kamendulis, 2004). Die Bildung dieser physiologischen Oxidantien wird durch eine Vielzahl von enzymatischen (z. B. Superoxid-Dismutase, Katalase und Glutathionperoxidase) und nicht-enzymatischen (z. B. Glutathion, Ascorbinsäure und α -Tocopherol) antioxidativen Schutzsystemen ausgeglichen. Eine Verschiebung dieses Gleichgewichtes zugunsten eines oxidativen Milieus bezeichnet man als oxidativen Stress (Klaunig & Kamendulis, 2004).

Im Tierversuch mit Ratten konnte ein altersabhängiger Anstieg des oxidativen Stresses der Prostata auf eine verminderte Aktivität von antioxidativen Enzymen zurückgeführt werden. (Ghatak & Ho, 1996). Eine Humanstudie fand darüber hinaus eine – gegenüber dem normalen Prostatagewebe – verminderte Proteinexpression der Superoxid-Dismutase und Katalase in PIN und Prostatakarzinomen (Bostwick *et al.*, 2000).

Der oxidative Stress ist ein im Alter ubiquitär auftretender Faktor, welcher das häufige Auftreten unabhängig nebeneinander existierender Mikroadenome, die extrem hohe Prävalenz bei sehr alten Männern sowie den global überproportional-stark altersbedingten Anstieg des Risikos erklären könnte (Bostwick *et al.*, 2000).

Obwohl ein sicherer Beweis für die ursächliche Bedeutung von oxidativem Stress bei der Entstehung von Prostatakarzinomen bisher nicht erbracht wurde, erscheint die Verminderung von oxidativem Stress aus o. g. Gründen als möglicher Präventivansatz für das Prostatakarzinom und wird im weiteren Verlauf der Arbeit aufgegriffen.

Familiäre Häufung

Ein zweiter Risikofaktor ist die familiäre Häufung. Geschätzte 10 % aller Prostatakarzinome gehen ursächlich auf genetische Faktoren zurück. Diese hereditären Tumoren entwickeln sich meist früher als die sporadischen Formen (Rebbeck, 2002). Es wurden verschiedene Genregionen mit prädisponierenden Merkmalen für die Bildung hereditärer Prostatakarzinome identifiziert, z. B. HPC1 und HPCX. Auch spezifische Gene, wie z. B. RNASEL und MSR1 wurden diskutiert (Simard *et al.*, 2003). Darüber hinaus wird eine genetische Beeinflussung des Risikos für bis zu 42 % aller Prostata-tumoren angenommen. Als mögliche Suszeptibilitätsgene hierfür gelten bspw. der AR, die 5 α -Reduktase II (SRD5A2) sowie die Cytochrom-P450 17 α -Hydroxylase (CYP17) (Simard *et al.*, 2003).

Die hereditären Formen des Prostatakarzinoms stellen einen gesonderten Themenkomplex dar und finden aufgrund der inhaltlichen Ausrichtung dieser Arbeit keine weitere Erwähnung.

Ethnogenetische Zugehörigkeit

Der dritte anerkannte Risikofaktor ist die ethnogenetische Herkunft (Parnes *et al.*, 2005). Sie ist jedoch häufig mit rein ethnischen Komponenten, z. B. Lifestyle-Faktoren assoziiert, die wiederum selbst Einfluss auf das Tumorrisiko nehmen. Dennoch

existieren Hinweise, dass genetische Unterschiede zwischen verschiedenen ethnischen Gruppen das Risiko beeinflussen. Eine differenzierte Betrachtung der Krebsstatistik der USA (Erhebungszeitraum 1997 - 2001) zeigt eine prostataspezifisch sehr hohe Inzidenzrate für Afroamerikaner (271 Fälle pro 100000 Einwohner), die sich deutlich von jener für Kaukasier (167 pro 100000), Asiaten (101 pro 100000) oder Indianer und Inuit (51 pro 100000) unterscheidet (Jemal *et al.*, 2005).

Afroamerikaner besitzen das weltweit höchste Prostatakarzinomrisiko (Bostwick *et al.*, 2004). Als Ursache wird eine erhöhte Exposition mit zirkulierenden Androgenen vermutet, die möglicherweise auf polymorphe Enzyme des Androgen-Stoffwechsels, wie z. B. das Cytochrom-P450 17 α -Hydroxylase oder die 5 α -Reduktase II zurück zu führen ist (Ntais *et al.*, 2003). Auch der AR selbst unterliegt genetischen Variationen. Der für die transkriptionelle Regulation kodierende Genabschnitt besitzt verschiedene polymorphe Sequenzen, die in einem möglichen Zusammenhang mit dem Tumorrisiko stehen. Beispielsweise wiederholt sich das Triplet CAG charakteristisch (kodiert für einen Polyglutamin-Rest). Bei Afroamerikanern ist dieser Polyglutamin-Rest häufig kürzer, was zu einer gesteigerten transkriptionellen Aktivität des Rezeptors führt. Dagegen vermindert ein langer Polyglutamin-Rest die Rezeptoraktivität, bis hin zu einer fast vollständigen Androgen-Resistenz im Falle des Kennedy-Syndroms (Parnes *et al.*, 2005). Umfangreiche Daten aus der *Health-Professionals Follow-Up Study* bestätigten den Zusammenhang zwischen einem verkürzten Polyglutamin-Rest und einem erhöhten Prostatakarzinomrisiko (Giovannucci *et al.*, 1997).

Ernährungsabhängige Faktoren

Trotz jahrzehntelanger Anstrengungen gelang es bisher nicht, eindeutige das Risiko erhöhende Ernährungsfaktoren zu identifizieren. Der *World Cancer Research Fund* benannte im Jahr 1997 nach Auswertung der damaligen Datenlage eine Reihe von Ernährungsfaktoren, die möglicherweise das Prostatakarzinomrisiko beeinflussen. Als „das Risiko möglicherweise erhöhend“ wurden eine erhöhte Aufnahme von Gesamtfett, gesättigten bzw. tierischen Fetten, Fleisch, Milch und Milchprodukten eingestuft (World Cancer Research Fund & American Institute for Cancer Research, 1997). In der Folgezeit wurden weitere Risikofaktoren vorgeschlagen, bspw. rotes Fleisch, Alkohol, Cadmium sowie der Lifestylefaktor Zigarettenrauch. Für alle diese Faktoren kann gegenwärtig keine überzeugende Einstufung als Risikofaktor erfolgen (Bostwick *et al.*, 2004; Chan *et al.*, 2005).

1.2 Chemoprävention des Prostatakarzinoms

1.2.1 Überblick über Strategien und potentielle Wirkstoffe

Chemopräventive Strategien

In den vorangegangenen Kapiteln wurden die Prozesse der Prostatakarzinogenese sowie die bedeutenden Risikofaktoren vorgestellt. In der Folge werden Ansatzpunkte für mögliche Strategien zur Reduktion des Tumorrisikos – der sog. Chemoprävention – vorgestellt. Im engeren Sinne bezeichnet die Chemoprävention ausschließlich die mittels einer klinischen Phase-III-Studie bestätigte Reduktion des Tumorrisikos durch eine oder mehrere Substanzen. In einem weiter gefassten experimentellen Sinne versteht man unter diesem Begriff auch eine Verminderung der Tumorzahl (bspw. im Tierversuch) sowie eine Verzögerung und Verlangsamung der Tumorbildung (Lippman & Hong, 2002). Demnach erlauben *In-vitro*-Studien keine Aussagen über die chemopräventive Wirksamkeit von Substanzen. Sie stellen jedoch ein äußerst wichtiges Hilfsmittel bei der Suche nach potentiell chemopräventiven Wirkungen dar und werden hier exemplarisch aufgeführt, um die Vielfalt chemopräventiver Strategien aus mechanistischer Sicht aufzuzeigen (**Tabelle 1**). Die vorliegende Arbeit sucht schwerpunktmäßig nach möglichen antiproliferativen und antioxidativen Wirkungen.

Epidemiologische und klinische Daten potentieller Wirkstoffe

Für einige der in Tabelle 1 aufgeführten Substanzen existieren prospektive epidemiologische oder sogar klinische Daten, die ihr mögliches chemopräventives Potential bekräftigen bzw. ihre Wirksamkeit dokumentieren. Die vielleicht deutlichste präventive Wirkung ergab die umfangreiche *Prostate Cancer Prevention Trial, PCPT* (Phase-III-Studie), in welcher der synthetische 5 α -Reduktase-Hemmer Finasterid das Prostatakarzinomrisiko um ca. 25 % reduzierte (Thompson *et al.*, 2003).

Auch für Selen weisen die Daten aus der *Nutritional Prevention of Cancer Trial, NPC* (Duffield-Lillico *et al.*, 2003), sowie aus fünf von sechs prospektiven Kohortenstudien (Dagnelie *et al.*, 2004) auf eine chemopräventive Wirkung hin.

Tabelle 1
Präventionsstrategien für das Prostatakarzinom^a

| Wirkmechanismus | Wirkstoff |
|------------------------------------|--|
| Hemmung der Proliferation | Phytoöstrogene, Vitamin D, Vitamin E |
| Induktion von Apoptose | Phytoöstrogene, Selen |
| Hemmung der Angiogenese | Phytoöstrogene |
| Steigerung der Zelldifferenzierung | Vitamin E |
| Hemmung der 5 α -Reduktase | Dutasterid, Finasterid, Phytoöstrogene |
| Hemmung der Aromatase | Lycopin |
| Immunmodulation | Phytoöstrogene, Selen |
| Modulation von Cytochromen P450 | Lycopin, Selen |
| Antioxidative Wirkung | Lycopin, Phytoöstrogene, Selen |

^a modifiziert nach Djavan et al. (2004)

Ähnliches gilt für Vitamin E. Die Ergebnisse der *Health-Professionals Follow-Up Study, HPFS* (Chan et al., 1999), der *Alpha-Tocopherol Beta Carotene Cancer Prevention Trial, ATBC* (Virtamo et al., 2003), sowie der *Beta-Carotene and Retinol Efficacy Trial, CARET* (Goodman et al., 2003), lassen eine potente chemopräventive Wirkung – besonders für Raucher bzw. ehemalige Raucher – vermuten. Die Ergebnisse aus prospektiven Kohortenstudien sind dagegen widersprüchlich (Dagnelie et al., 2004). Eine umfangreiche prospektive Kohortenstudie innerhalb der *Health-Professionals Follow-Up Study, HPFS*, erbrachte einen inversen Zusammenhang zwischen der Lycopinaufnahme und dem Prostatakarzinomrisiko (Giovannucci et al., 2002). Die kürzlich durchgeführte Metaanalyse aller verfügbaren Daten aus Kohorten- und Fall-Kontroll-Studien weist ebenfalls auf eine mögliche chemopräventive Wirkung von Lycopin hin, wobei die Ergebnisse hier eine weniger starke Beeinflussung zeigten (Etminan et al., 2004).

Darüber hinaus werden gegenwärtig einige klinische Studien mit Flutamid, Dutasterid, Selen, Vitamin E, Lycopin und Genistein bzw. Isoflavonoiden durchgeführt. Diese Studien werden umfangreiche Erkenntnisse über die Wirksamkeit dieser potentiell chemopräventiven Substanzen liefern (Parnes et al., 2004; Barqawi et al., 2004).

1.2.2 Isoflavonoide als potentiell chemopräventive Wirkstoffe

1.2.2.1 Exposition und Metabolismus

Chemische Strukturen

Isoflavonoide stellen eine Untergruppe der Flavonoide dar, welche zu den Polyphenolen gehören und ein C₁₅-Grundgerüst aufweisen. Sie werden ausschließlich in Pflanzen produziert. Isoflavonoide besitzen eine charakteristische 3-Phenylchroman-Struktur, die mehr oder weniger stark substituiert – meist hydroxyliert – ist. Die beiden bekanntesten Isoflavonoide sind Genistein (4',5,7-Trihydroxyisoflavon) und Daidzein (4',7-Dihydroxyisoflavon).

In Pflanzen liegen Isoflavonoide überwiegend in mit Glukose konjugierter Form vor. Diese glykosidische Bindung ist gegenüber den meisten Zubereitungsverfahren stabil. Lediglich fermentierte Lebensmittel, wie Miso, Natto oder Tempeh besitzen höhere Gehalte der ungebundenen Aglykone (Heinonen *et al.*, 2003; Setchell *et al.*, 2002).

Quellen und aufgenommene Mengen

Relativ wenige Lebensmittel besitzen nennenswerte Isoflavonoid-Gehalte. Eine herausragende Stellung nehmen dabei die Samen der Sojabohne (*Glycine max*) sowie alle daraus hergestellten Produkte, wie z. B. Sojamilch oder Tofu ein. Aber auch über andere Leguminosen werden relevante Mengen aufgenommen (Valsta *et al.*, 2003; Liggins *et al.*, 2000). Sojaprodukte sind ein wesentlicher Bestandteil der traditionellen asiatischen Kost und führen bspw. in China zu einer Aufnahme von bis zu 100 mg Isoflavonoiden pro Tag (Ho *et al.*, 2000). Im Gegensatz dazu werden in Europa durchschnittlich weniger als 1 mg Isoflavonoide pro Tag aufgenommen (van Erp-Baart *et al.*, 2003). Dies wird größtenteils über höher verarbeitete Produkte – wie Wurstwaren oder Schokolade – verwirklicht, in denen Sojaprotein und Sojalecithin Verwendung als Lebensmittelzusätze finden (Valsta *et al.*, 2003).

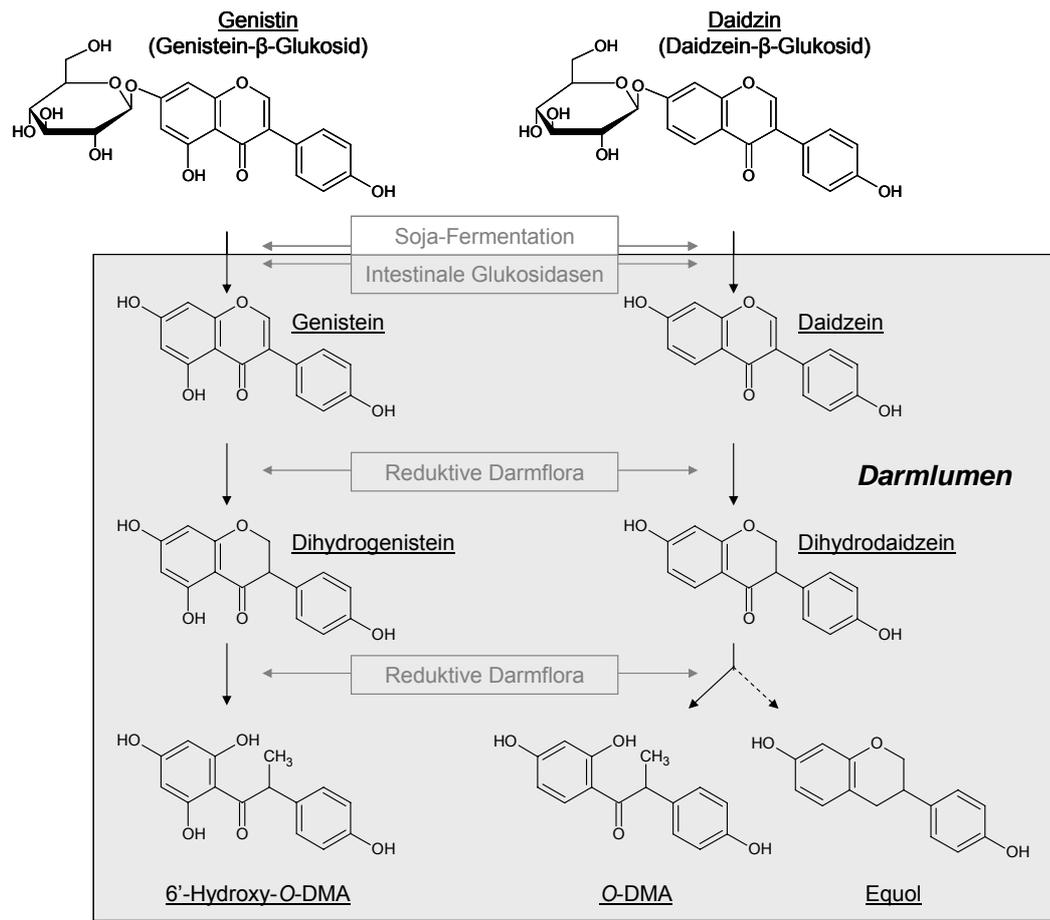


Abbildung 3: Darstellung des reduktiven Isoflavonoid-Stoffwechsels der menschlichen Darmflora. In pflanzlichen Lebensmitteln liegen Isoflavonoide überwiegend in glykosidischer Form vor, meist an Glukose gebunden (Glukosid). Sowohl die Fermentation von Sojaprodukten als auch die Aktivität intestinaler Glukosidasen führt zur Freisetzung der Aglykone (Genistein und Daidzein). Die Darmflora metabolisiert diese zu einer Reihe von reduktiven Metaboliten. Dabei treten teilweise deutliche interindividuelle Unterschiede auf. So wird der Daidzein-Metabolit Equol nur in einem Teil der Bevölkerung gebildet (modifiziert nach Heinonen *et al.* 2003).

Mengenmäßig bedeutsame Isoflavonoide und deren Metabolismus

Genistein und Daidzein sind die beiden quantitativ dominierenden Isoflavonoide. Sie liegen in vielen Lebensmitteln in glykosidischer Form vor (Heinonen *et al.*, 2003). Im menschlichen Verdauungstrakt erfolgt die hydrolytische Spaltung der Glykoside durch intestinale Glukosidasen sowie durch die Glukosidasen der Darmflora. Isoflavonoide werden beim Menschen wahrscheinlich ausschließlich als Aglykone, nicht jedoch als Glykoside absorbiert (Setchell *et al.*, 2002).

Weiterhin besitzt die menschliche Darmflora die Fähigkeit Isoflavonoide zu reduzieren (Heinonen *et al.*, 2003), was zur Bildung einiger Metabolite führt, deren biologische Aktivitäten bisher weitgehend unbekannt sind (**Abbildung 3**).

Neben diesem reduktiven Metabolismus der Darmflora wurde beim Menschen ein oxidativer Metabolismus von Isoflavonoiden durch Cytochrom P450-abhängige Monooxygenasen (CYP) nachgewiesen (Kulling *et al.*, 2001). Auch die Methylierung der Hydroxylgruppen sowie Ringspaltungen wurden beschrieben; ihre Bedeutung scheint jedoch gering (Heinonen *et al.*, 2003).

Darüber hinaus existiert ein umfangreicher Phase-II-Stoffwechsel. Isoflavonoide werden durch UDP-Glucuronosyltransferasen (UGT) und Sulfotransferasen (SULT) konjugiert und so als Mono- und Diglucuronide, Mono- und Disulfate oder als Sulfo-glucuronide ausgeschieden. Die Elimination der Konjugate erfolgt überwiegend renal (Doerge *et al.*, 2000).

Konzentrationen im Blut

Die Bestimmung von Isoflavonoiden in Körperflüssigkeiten beschränkt sich in den meisten Untersuchungen auf die beiden Haupt-Isoflavonoide Genistein und Daidzein, wobei sich die zuvor erwähnten ethnischen Unterschiede in den alimentär zugeführten Isoflavonoid-Mengen auch in den Blutkonzentrationen widerspiegeln. In asiatischen Populationen liegen sie häufig in einem Bereich um 1 μM (Gesamt-Isoflavonoid) und damit um einen Faktor ≥ 10 über den entsprechenden Konzentrationen von Europäern (Morton *et al.*, 2002). Nach der Supplementation von Isoflavonoid-Präparaten wurden jedoch auch mittlere Peak-Konzentrationen von 28 μM Genistein und 9 μM Daidzein bestimmt (Bloedon *et al.*, 2002).

Geschätzte 90 - 99 % der Isoflavonoide liegen im Blut an Proteine gebunden vor und sind wahrscheinlich weitgehend physiologisch inaktiv (Bloedon *et al.*, 2002; Miltyk *et al.*, 2003). Nach der Gabe von Isoflavonoiden in pharmakologischen Dosen wurden im menschlichen Plasma mittlere Halbwertszeiten von 3,8 h für freies Genistein sowie 7,7 h für freies Daidzein ermittelt. Die entsprechenden Analysen für Gesamt-Genistein bzw. Gesamt-Daidzein ergaben 10,1 h bzw. 10,8 h, wobei die Clearance von Isoflavonoiden als ein Resultat aus Metabolismus und Exkretion aufzufassen ist (Bloedon *et al.*, 2002).

1.2.2.2 Biologische Aktivitäten

Isoflavonoide besitzen eine Reihe von biologischen Aktivitäten. Im Hinblick auf eine mögliche Bedeutung für die Chemoprävention des Prostatakarzinoms beschränkt sich dieses Kapitel auf das Vorstellen einiger hierfür potentiell relevanter Effekte.

Phytoöstrogene Eigenschaften

Die wohl bekannteste Aktivität der Isoflavonoide ist ihre Fähigkeit, den Östrogenrezeptor (ER) zu binden und zu transaktivieren, wobei Genistein und Daidzein höhere Bindungsaffinitäten zu ER β als zu ER α besitzen (Kuiper *et al.*, 1997), sie gehören also zu den Phytoöstrogenen. Diese Gruppe von in Pflanzen gebildeten nicht-steroidalen Substanzen bindet aufgrund von strukturellen Ähnlichkeiten mit Steroidhormonen an deren Rezeptoren und vermittelt so biologische Effekte in Menschen und Tieren. Phytoöstrogene besitzen eine im Vergleich zu Östrogenen deutlich geringere Affinität zum ER. Dafür erreichen Phytoöstrogene bis zu eintausendfach höhere Blutkonzentrationen als Östrogene, was die geringere Affinität kompensiert (Ren *et al.*, 2001). Zudem scheint die Transaktivierung von ER α und ER β durch Genistein und Daidzein um einiges effektiver zu sein, als sich aufgrund ihrer Bindungsaffinitäten vermuten ließe (Kuiper *et al.*, 1998). Neben den Isoflavonoiden gehören auch Lignane, Coumestane sowie eine Reihe weiterer Flavonoide, wie z. B. Quercetin, zur Gruppe der Phytoöstrogene (Kuiper *et al.*, 1998; Denis *et al.*, 1999).

Ein übermäßiger Verzehr von Phytoöstrogenen kann bei Weidetieren Infertilität hervorrufen, die sog. *red clover disease* (Kallela *et al.*, 1984). Aufgrund dieser und ähnlicher Wirkungen zählt man Phytoöstrogene auch zu den *endocrine disruptors*. Dieser Sammelbegriff wird für Stoffe verwendet, die aufgrund von hormonähnlichen Wirkungen zu einer Störung der endokrinen Regelmechanismen führen und so die Gesundheit beeinträchtigen. Ob dies auch für eine exzessive Aufnahme von Phytoöstrogenen über die menschliche Ernährung zutrifft, ist unklar.

Seit kurzem ist bekannt, dass Genistein, Daidzein, Formononetin und Biochanin A zudem Bindungsaffinitäten zum Androgen- und Progesteronrezeptor besitzen und diese ebenfalls transaktivieren, jedoch nur in unphysiologisch-hohen Konzentrationen (Beck *et al.*, 2003). Jedoch hemmen bereits 100 nM Genistein die Expression des AR und AR-regulierter Genen, wie dem Prostataspezifischen Antigen (PSA) (Bektic *et al.*, 2004).

Die ursprüngliche Annahme, dass Isoflavonoide ihre Aktivitäten in Zellen ausschließlich über Steroidhormonrezeptoren vermitteln, wurde allerdings widerlegt. Tatsächlich gewinnen steroidhormonrezeptor-unabhängige Wirkungen zunehmend an Bedeutung, auch im Hinblick auf eine mögliche Chemoprävention (Holzbeierlein *et al.*, 2005).

Effekte auf die Proliferation, Apoptose und Angiogenese

Genistein, Daidzein und Equol wirken in verschiedenen Zelltypen – auch in Prostatazellen – antiproliferativ und proapoptotisch. Als mögliche Mechanismen wurden die Hemmung von Protein-Tyrosin-Kinasen, der Phosphatidylinositol-Kinase oder der DNA-Topoisomerase II vorgeschlagen (Sarkar & Li, 2002; Magee & Rowland, 2004). Genistein moduliert darüber hinaus die Expressionen der für die Regulierung der Apoptose wichtigen Proteine bax und bcl-2, dem Cyclin-Kinase-Inhibitor p21^{WAF}, dem Transkriptionskomplex NFκB und der Proteinkinase B (Akt). Auch diese Wirkungen lassen in der Summe auf antiproliferative und proapoptotische Eigenschaften schließen (Sarkar & Li, 2002).

Darüber hinaus hemmt Genistein das Wachstum von Endothelzellen und unterdrückt so die für das Tumorenwachstum essentielle Angiogenese. Diese Effekte werden u. a. über die Hemmung des *transforming growth factor β* (TGF-β) vermittelt (Sarkar & Li, 2002).

Effekte auf die Invasion und Metastasierung

Genistein unterdrückt die Expression von c-erbB-2 sowie der MAP-Kinase p38 und hemmt damit die Sekretion einiger Matrixmetalloproteinasen (MMP) in MDA-MB-435 Mammakarzinomzellen. Dies führt zu einer verminderten Invasivität und Metastasierung dieser Zellen (Sarkar & Li, 2002). In PC-3 Prostatakarzinomzellen vermindert Genistein die über TGF-β vermittelte Aktivierung von p38, was eine Hemmung der Expression von MMP-2 und MMP-9 sowie eine verminderte Invasivität dieser Zellen zur Folge hat (Huang *et al.*, 2005a).

Effekte auf das Immunsystem

In Tierversuchen führt Daidzein in Mäusen zu einer Aktivierung von Lymphozyten. Weiterhin scheinen einige Isoflavonoid-Glucuronide die Aktivität der Natürlichen Killerzellen von Schweinen zu stimulieren. (Ren *et al.*, 2001).

Beim Menschen verminderte eine 16-wöchige Gabe von Sojamilch bei postmenopausalen Frauen die zirkulierenden Konzentrationen des Tumornekrosefaktors α (TNF- α), welcher im Verdacht steht, die Promotion verschiedener Tumoren zu fördern. Diese Wirkung wurde ebenfalls *in vitro* – durch eine Inkubation mit Genistein und Daidzein – in menschlichen Monozyten erreicht (Huang *et al.*, 2005b). In anderen Humanstudien zeigte Genistein jedoch eher immunsuppressive Wirkungen und hemmte z. B. die Aktivitäten von aktivierten Killer T-Lymphozyten und Natürlichen Killerzellen (Polkowski & Mazurek, 2000).

Effekte auf die Multi-Drug Resistance (MDR)

Die Tumorprogression geht häufig mit einer Überexprimierung von P-Glykoprotein (Pgp) und *multi-drug resistance proteins* (MRP) einher, was eine zunehmende Resistenz gegenüber Chemotherapeutika zur Folge hat. Genistein hemmt die Aktivität dieser Proteine und hilft somit, die für eine erfolgreiche Therapie notwendigen effektiven Konzentrationen dieser Wirkstoffe in den Zellen aufrecht zu halten (Polkowski & Mazurek, 2000). So hemmt Genistein die Aktivität des *breast cancer resistance protein* (BCRP) in co-transfizierten humanen K562/BCRP Leukämiezellen (Imai *et al.*, 2004).

Effekte auf die DNA Integrität

In V79 Lungenfibroblasten des Chinesischen Hamsters induziert Genistein die Bildung von Mikrokernen, nicht jedoch von DNA-Strangbrüchen. Darüber hinaus wurden auch schwach-mutagene Wirkungen im Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase-Mutationsassay (HPRT-Assay) beobachtet (Kulling & Metzler, 1997). Die von Daidzein abgeleiteten Metabolite Equol und O-DMA – nicht jedoch Daidzein selbst – induzierten in L5178Y Maus Lymphomazellen ebenfalls die Bildung von Mikrokernen (Schmitt *et al.*, 2003).

Auch in humanen Zelllinien wurden genotoxische Effekte beobachtet. So induzierte Genistein DNA-Strangbrüche in den Prostatazelllinien LNCaP und PC-3; Daidzein hatte hingegen keinen Effekt (Mitchell *et al.*, 2000). Bislang existieren jedoch keine *in vivo* erhobenen Daten, die ein genotoxisches oder Potential von Isoflavonoiden stützen.

Antioxidative Eigenschaften

Isoflavonoide besitzen eine Reihe von antioxidativen Eigenschaften. Genistein, Daidzein, O-DMA und Equol schützen Lipoproteine vor radikal-induzierter Oxidation (Hodgson *et al.*, 1996). Genistein vermindert darüber hinaus radikal-induzierte DNA-Strangbrüchen (Win *et al.*, 2002). Dies wird möglicherweise durch die Abstraktion eines Elektrons ermöglicht, dem sog. Radikalfangen. Dabei ist unklar wie sich ein so entstehendes Isoflavonoid-Radikal weiter verhält (Patel *et al.*, 2001). Andere Autoren bezweifeln dagegen die Radikalfängereigenschaften von Isoflavonoiden (Guo *et al.*, 2002). Ein direkter Einfluss von Isoflavonoiden auf den Redoxstatus von Transitionsmetallionen, eine Chelatierung dieser Ionen sowie eine direkte Reaktion mit Peroxiden sind unwahrscheinlich (Win *et al.*, 2002).

Isoflavonoide vermitteln jedoch auch indirekte antioxidative Effekte. Genistein induziert *in vitro* die Expression von antioxidativen Proteinen, wie der Glutathion-Peroxidase in LNCaP Prostatazellen (Suzuki *et al.*, 2002) oder von Metallothioneinen in Caco-2 Darmzellen (Kameoka *et al.*, 1999). In einem Tierexperiment mit Ratten induzierte die Gabe von Isoflavonoiden oder Tofu in verschiedenen Organen (z. B. dem Dünndarm) die Aktivitäten der Superoxid-Dismutase und Katalase (Liu *et al.*, 2005).

Oxidativer Stress aktiviert NF κ B, moduliert dessen DNA-Bindungsaktivität und beeinflusst über diesen Weg die Genexpression. Genistein hemmt die Aktivierung von NF κ B und verhindert so oxidativ ausgelöste Prozesse. Von einigen Autoren werden solche Aktivitäten ebenfalls als indirekte antioxidative Effekte gewertet (Sarkar & Li, 2002).

1.2.2.3 Beeinflussung des Prostatakarzinomrisikos (epidemiologische Befunde)

Studien mit asiatischen Migranten in den USA ergaben ein – im Vergleich zum Herkunftsland – erhöhtes Risiko für hormon-assoziierte Tumorformen, wie Brust- und Prostatakarzinome. Diese Studien verwiesen auf eine mögliche Risikobeeinflussung durch Lifestyle-Faktoren, wie den Ess- und Trinkgewohnheiten (Gomez *et al.*, 2003; Shimizu *et al.*, 1991). Da Sojaprodukte in vielen asiatischen Ländern eine zentrale Stellung in der täglichen Ernährung einnehmen, wird vermutet, dass einige Sojainhaltsstoffe chemopräventive Eigenschaften besitzen und sich möglicherweise günstig auf das Prostatakarzinomrisiko auswirken.

Die verfügbare epidemiologische Literatur bietet allerdings kaum Anhaltspunkte für einen direkten Zusammenhang zwischen der Aufnahme von Isoflavonoiden und einer Senkung des Prostatakarzinomrisikos. Lediglich Lee *et al.* (2003) bestimmten innerhalb einer Fall-Kontroll-Studie ein vermindertes Prostatakarzinomrisiko durch einen erhöhten Tofu-Verzehr sowie einen Trend zur Reduktion des Prostatakarzinomrisikos durch eine hohe Genistein-Aufnahme (-44 %, $p = 0,058$).

Auch für Lebensmittel mit sehr hohen Gehalten an Isoflavonoiden ist die Datenlage eher ungenügend. Lediglich eine prospektive Kohortenstudie ermittelte ein durch den häufigen Verzehr von Sojamilch um bis zu 70 % vermindertes Prostatakarzinomrisiko ($p = 0,02$) (Jacobsen *et al.*, 1998). Zwei weitere prospektive Kohortenstudien bestimmten eine Senkung des Risikos durch einen hohen Verzehr von Hülsenfrüchten (Dagnelie *et al.*, 2004).

In einer Fall-Kontroll-Studie war der häufige Verzehr von Tofu mit einer Reduktion des Prostatakarzinomrisikos (-42 %, $p = 0,032$) assoziiert (Lee *et al.* 2003). Eine weitere Fall-Kontroll-Studie ermittelte ein geringeres Prostatakarzinomrisiko bei Männern mit einem hohen Verzehr des Sojaproduktes Natto (-75 %, $p = 0,03$). Ein signifikanter Unterschied in den verzehrten Mengen an Tofu wurde in dieser Studie nicht beobachtet (Sonoda *et al.*, 2004).

Eine kürzlich veröffentlichte Literaturarbeit bemerkt in diesem Zusammenhang, dass die umfangreichsten – und damit aussagekräftigsten – epidemiologischen Studien zur Identifizierung von ernährungsbedingten Krebsrisikofaktoren ausschließlich in westlichen Industrienationen durchgeführt wurden. Da in diesen Ländern kaum Sojaprodukte (und Isoflavonoide) verzehrt werden, lieferten diese Studien keine geeigneten Erkenntnisse (Chan *et al.*, 2005).

Es erscheint daher sinnvoll, die biologischen Wirkungen der Soja-Isoflavonoide und ihrer Metabolite in den Zielzellen der Prostatakarzinogenese zunächst mit Hilfe von experimentellen Arbeiten *in vitro* zu studieren, um so geeignete Biomarker für spätere, gezieltere prospektive Interventionsstudien zu gewinnen.

2 Problemstellung und Ziele der Arbeit

Der häufige Verzehr von Sojaprodukten trägt im asiatischen Kulturkreis möglicherweise zum dort – gegenüber der westlichen Welt – deutlich geringeren Prostatakarzinomrisiko bei. Die Sojabohne und viele aus ihr hergestellte traditionelle Lebensmittel stellen eine herausragende Quelle für Isoflavonoide dar. Einige Vertreter dieser zu den Flavonoiden gehörenden Substanzgruppe besitzen ausgeprägte phytoöstrogene Eigenschaften, d. h. sie interagieren mit Steroidrezeptoren und blockieren deren Aktivierung durch die originären Liganden bzw. ahmen diese nach. Deshalb wurde Isoflavonoiden eine ursächliche Bedeutung für die vermuteten chemopräventiven Eigenschaften von Sojaprodukten bei der Entstehung von Prostatakarzinomen und weiteren hormon-abhängigen Tumorformen nachgesagt. Es ist bisher allerdings unklar, ob Isoflavonoide tatsächlich präventiv auf die Entstehung von Karzinomen in der Prostata wirken und über welche Mechanismen etwaige Aktivitäten vermittelt werden. Zudem entstehen im menschlichen Darm mehrere reduktive Isoflavonoid-Metabolite, die bisher kaum untersucht wurden, und die vermutlich ein anderes Spektrum von Wirkungen aufweisen. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, nach möglichen chemopräventiven Effekten von Isoflavonoiden und deren reduktiven Metaboliten in Prostatazellen *in vitro* zu suchen. Darüber hinaus wurden toxikologische Aspekte berücksichtigt, die im Kontext einer Risikobewertung der zum Teil in der Öffentlichkeit propagierten jedoch nicht auf Evidenz basierenden chemopräventiven Anwendung von Isoflavonoiden in Form von Supplementen gesehen werden sollten.

Um das Verständnis über die biologischen und möglicherweise chemopräventiven Wirkungen von Isoflavonoiden in menschlichen Prostatazellen zu verbessern, sollten mit Hilfe der Prostatakarzinomzelllinien LNCaP und LAPC-4 insbesondere die folgenden Fragestellungen bearbeitet werden:

- Besitzen Isoflavonoide ein Potential, das Wachstum von Prostatakarzinomzellen zu modulieren? Hierbei sollten sowohl mögliche wachstumshemmende als auch wachstumsfördernde Eigenschaften berücksichtigt werden.
- Besitzen die im menschlichen Darm gebildeten reduktiven Isoflavonoid-Metabolite (Dihydrogenistein, Dihydrodaidzein, *O*-DMA, 6'-Hydroxy-*O*-DMA

und Equol) ähnliche biologische Aktivitäten wie ihre pflanzlichen Vorstufen (Genistein und Daidzein) oder führen sie zu unterschiedlichen Effekten?

- Welchen Einfluss nimmt die in Prostatatumoren gehäuft auftretende T877A Mutation des AR auf die biologischen Eigenschaften von Isoflavonoiden in Prostatazellen? Ergeben sich möglicherweise Konsequenzen für Patienten mit solchen Tumoren in Bezug auf den Verzehr von Sojaprodukten. Zur Klärung dieser Fragestellung diene ein Vergleich der Effekte in LNCaP Zellen (mit T877A Mutation) und LAPC-4 (Wildtyp-AR).
- Beeinträchtigen die Soja-Isoflavonoide oder aber ihre reduktiven Metabolite die DNA-Integrität von Prostatazellen?
- Welches der untersuchten Isoflavonoide besitzt die höchste biologische Aktivität – ohne jedoch genotoxische Effekte auszulösen – und sollte daher vertiefend in Bezug auf chemopräventive Mechanismen hin untersucht werden?
- Schützen Isoflavonoide die DNA von Prostatazellen vor oxidativ-induzierter Schädigung? Wenn ja, welche möglichen Mechanismen liegen diesem potentiell chemopräventiven Effekt zugrunde?
- Wirken Isoflavonoide möglicherweise antioxidativ, indem sie die Expression entsprechender Gene in Prostatazellen modulieren und so den oxidativen Druck auf die DNA vermindern? Über welche Mechanismen werden diese Effekte vermittelt?
- Übertragen sich solche transkriptionellen Effekte auch auf die translationale Ebene? Welche funktionellen Konsequenzen für den Redoxstatus von Prostatazellen lassen sich hieraus ableiten?

3 Materialien und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Verwendete Zellmodelle

Prostatakarzinome entwickeln sich überwiegend aus androgenabhängigen Zellen des Prostataepithels und sind über weite Strecken der Prostatakarzinogenese auf eine androgene Stimulation angewiesen. Für die hier durchgeführten Untersuchungen wurden deshalb zwei androgenabhängige Prostatakarzinomzelllinien verwendet.

LNCaP

Die Prostatakarzinomzelllinie LNCaP wurde 1977 von Horoszewicz *et al.* aus einer Lymphknotenmetastase eines 50-jährigen Kaukasiers gewonnen. Ein Jahr zuvor wurde bei diesem ein moderat differenziertes primäres Prostatakarzinom diagnostiziert und mit Östrogenen und Cisplatin behandelt (Horoszewicz *et al.*, 1983). Die Zelllinie wächst androgenabhängig, expremiert Epithelzellantigene (Zytokeratin 8 und 18) sowie PSA und besitzt mit im Mittel 77 Chromosomen (33 – 91) einen hypotetraploiden Chromosomensatz (van Bokhoven *et al.*, 2003b; Webber *et al.*, 1997). Ihr AR besitzt eine funktionelle Mutation der Ligandenbindungsdomäne (T877A), welche zu einer verminderten Affinität gegenüber Dihydrotestosteron führt, wohingegen die Affinität gegenüber Östrogenen erhöht ist (Sack *et al.*, 2001; Webber *et al.*, 1997).

Die in dieser Arbeit verwendeten LNCaP Zellen wurden von der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Braunschweig) bezogen. Eine Analyse des Karyotyps dieser Zellen am Institut für Humangenetik der Friedrich-Schiller-Universität Jena ergab einen hypotetraploiden Karyotyp mit im Mittel 89 Chromosomen (87 - 90, n = 4). Die Chromosomen wiesen ein hohes Maß an Abberationen auf, was auf einen – für Prostatakarzinome typischen – eher instabilen Karyotyp schließen lässt (**Abbildung 27, Anhang B**). Dennoch variierte die Gesamtanzahl an Chromosomen vergleichsweise gering und lag innerhalb der in der Literatur berichteten Grenzen.

LAPC-4

Die Prostatakarzinomzelllinie LAPC-4 wurde 1997 von Klein *et al.* über ein Xenokraft-Modell aus einer Lymphknotenmetastase eines primären Prostatakarzinoms etabliert. Die Zelllinie wächst androgenabhängig und exprimiert Epithelzellantigene (Zytokeratin 5, 8 und 18) sowie PSA (Klein *et al.*, 1997; van Bokhoven *et al.*, 2003b). LAPC-4 Zellen besitzen einen nahezu triploiden Chromosomensatz (62 – 83 Chromosomen) (van Bokhoven *et al.*, 2003a). Die Zellen exprimieren den Wildtyp-AR (van Bokhoven *et al.*, 2003b).

Die in dieser Arbeit verwendeten LAPC-4 Zellen wurden großzügigerweise vom Center for Urologic Oncology der University of California (Los Angeles, USA) zur Verfügung gestellt. Eine Analyse des Karyotyps dieser Zellen am Institut für Humangenetik der Friedrich-Schiller-Universität Jena ergab einen hypotetraploiden Karyotyp mit im Mittel 78 Chromosomen (77 - 80, n = 4). Im Vergleich zur Zelllinie LNCaP wurden hier deutlich weniger Chromosomenabberationen ermittelt (**Abbildung 28, Anhang B**). Die Gesamtanzahl an Chromosomen schwankte ebenfalls relativ gering und lag im Bereich der Angaben aus der Literatur.

3.1.2 Verwendete Testsubstanzen

Die beiden Soja-Isoflavonoide Genistein und Daidzein wurden von TCI Tokyo (Japan) bezogen. Die Metabolite Dihydrogenistein, Dihydrodaidzein, *O*-Desmethylangolensin (*O*-DMA) sowie S-Equol stammten von Plantech (UK). Der einzige nicht kommerziell verfügbare Metabolit 6'-Hydroxy-*O*-DMA wurde in der Abteilung für Organische Chemie der Universität Helsinki (Finnland) synthetisiert und freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Das verwendete razemische Equol wurde von Fluka (Schweiz) bezogen. Aus einem Teil der Substanzen wurden zwei Isoflavonoid-Gemische (Mix R und Mix S) hergestellt. Hierbei orientierte sich die Zusammensetzung der Gemische an in der Literatur beschriebenen mittleren relativen Isoflavonoid-Gehalten im menschlichen Blutplasma (**Tabelle 2**). Der Mix R bestand aus 64 % Genistein, 29 % Daidzein und 7 % razemischem Equol. Zur Herstellung von Mix S wurde das Equol-Razemat äquimolar durch S-Equol ersetzt. Die ausgewiesenen Konzentrationen der Gemische entsprechen der jeweils enthaltenen Gesamtkonzentration an Isoflavonoiden. Die beiden endogenen Steroidhormone Dihydrotestosteron und 17 β -Östradiol wurden von Sigma bezogen. Das in einigen Untersuchungen als Positivkontrolle eingesetzte Zinksulfat

(ZnSO₄) stammt von Merck. Die Testsubstanzen (außer Zinksulfat) wurden in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst. Zinksulfat wurde in Wasser gelöst und für Versuche – aus Gründen der Vergleichbarkeit – mit DMSO versetzt (Endkonzentration: 0,1 %). Aus allen Testsubstanzen (außer S-Equol und Mix S) wurden 100 mM Stammlösungen hergestellt. Im Fall von S-Equol musste auf eine vorhandene Stammlösung von 10 mM zurückgegriffen werden. Im Fall von Mix S konnte so lediglich eine 50 mM Stammlösung hergestellt werden. Die meisten Substanzen wurden bis 80 µM getestet (0,1 % DMSO in allen Konzentrationen), Mix S wurde bis 40 µM getestet (0,1 % DMSO in allen Konzentrationen). Für den direkten Vergleich von S-Equol und dem racemischen Equol wurde bis 20 µM (0,2 % DMSO in allen Konzentrationen) getestet.

Tabelle 2

Relative Isoflavonoid-Konzentrationen im menschlichen Plasma

| Quelle ^a | Genistein | Daidzein | Equol |
|-----------------------------|-----------|----------|-------|
| Akaza <i>et al.</i> (2002) | 73 % | 22 % | 5 % |
| Hong <i>et al.</i> (2002) | 61 % | 33 % | 6 % |
| Morton <i>et al.</i> (1997) | 71 % | 25 % | 3 % |
| Morton <i>et al.</i> (2002) | 62 % | 31 % | 7 % |
| | 56 % | 33 % | 11 % |
| Mittelwert ^b | 64 % | 29 % | 7 % |

^a Daten der gesunden Kontrollpopulationen

^b Rundungsfehler wurden korrigiert

3.1.3 Verwendete Lösungen, Reagenzien und Kits

Aufgrund ihres Umfangs befindet sich die Liste der verwendeten Lösungen, Reagenzien und Kits im Anhang A.

3.1.4 Verwendete Laborgeräte sowie Arbeitsmittel

Aufgrund ihres Umfangs befindet sich die Liste der verwendeten Laborgeräte und Arbeitsmittel im Anhang A.

3.1.5 Verwendete Software und Datenbanken

In diesem Kapitel ist nur solche Software aufgeführt, die keinen integralen Bestandteil eines Auswertungssystems darstellt. Die innerhalb von Laborgroßgeräten verwendete Software wird an entsprechender Stelle im Anhang A erwähnt.

Für die Ermittlung günstiger Primer-Sonden-Kombinationen für die Real-Time PCR wurde das Programm PrimerDesign Version 2.0 (Applied Biosystems, USA) herangezogen. Die Sequenzierung der PCR-Produkte wurde mit der Software Chromas Version 1.45 ausgewertet (Freeware der Griffith University, Australien). Alle Kalkulationen, statistischen Analysen und Diagramme wurden unter Verwendung der Programme GraphPad Prism Version 4.0 (Graph Pad, USA) oder MS Excel 2002 (Microsoft, USA) erstellt.

Die für das Designen der PCR-Primer und für die Analyse der Promotorregion von Metallothionein 1X verwendeten DNA-Sequenzen stammen aus Einträgen der NCBI GeneBank des National Center for Biotechnology Information (www.ncbi.nlm.nih.gov) der USA und werden an entsprechender Stelle zitiert.

3.2 Methoden

3.2.1 Kultivierung der Zelllinien

Routinemäßige Zellkultur

LNCaP und LAPC-4 Zellen wurden als Adhäsionskulturen in Zellkulturflaschen (25 cm² bzw. 75 cm²) kultiviert. Als Zellkulturmedium für die LNCaP Zellen diente RPMI-1640, welches mit 10 % fötalem Kälberserum (FCS), 2 mM L-Glutamin sowie 1 % Penicillin-Streptomycin supplementiert wurde. Die Kultivierung der LAPC-4 Zellen erfolgte in IMDM, supplementiert mit 10 % FCS, 2 mM L-Glutamin, 1 % Penicillin-Streptomycin sowie 2 nM Miboleron.

Zweimal pro Woche erfolgte ein Mediumwechsel (5 ml für 25 cm² Flaschen und 15 ml für 75 cm² Flaschen). Hierfür wurde das alte Medium vollständig abgesaugt und durch vorgewärmtes, frisches Medium ersetzt. Die Zellen wurden in einem Brutschrank unter

einer konstanten Atmosphäre von 5 % CO₂ und einer Luftfeuchte von 95 % bei 37 °C kultiviert.

Subkonfluente Kulturen wurden im Abstand von 1 – 2 Wochen passagiert, d. h. geteilt und auf neue Kulturflaschen verteilt, wobei die Zellkulturflaschen in jedem Fall nur einmal verwendet werden konnten. Hierfür wurden das Medium vollständig entfernt und die Zellen für 2 min mit Trypin/Versen-Lösung inkubiert (3 ml für 25 cm² Flaschen und 5 ml für 75 cm² Flaschen). Danach wurden die Lösung abgesaugt, die Zellen in frisches, vorgewärmtes Medium aufgenommen und zentrifugiert (3 min, 900 U/min). Anschließend wurden der Medienüberstand entfernt, die Zellen erneut in zunächst 1 ml frisches Medium aufgenommen und mit Hilfe der hierfür verwendeten Pipette gründlich resuspendiert. Diese Maßnahme diente dazu, die zur Clusterbildung neigenden Zellen zu vereinzeln, um die Ausbildung eines gleichmäßigen Monolayers zu fördern. Die Suspension wurde danach auf das gewünschte Volumen eingestellt. Diese Suspension wurde zur erneuten Aussaat verwendet. Für das routinemäßige Teilen der Kulturen erfolgten die Aussaaten in einer maximalen Verdünnung von 1:10.

Zellkultur für Versuche

Innerhalb von Versuchen erfolgten die Aussaaten in der für das jeweilige Experiment erforderlichen – und dort spezifizierten – Zelldichte. Hierfür wurden die Zellzahl und Vitalität der zuvor geernteten Zellen mit Hilfe einer Neubauerkammer bestimmt (siehe Kap. 3.2.2). Die Aussaaten erfolgten entweder in Zellkulturflaschen (25 cm² bzw. 75 cm²), 6-Well-Platten oder 96-Well-Mikrotiterplatten. Nach einer Anwachsphase von 48 -72 h (in Abhängigkeit des Versuchsprotokolls) wurden die Kulturmedien abgesaugt und durch entsprechende Versuchsmedien ersetzt. Im Fall der LNCaP Zellen bestand das Versuchsmedium aus phenolrotfreiem RPMI-1640, welches mit 10 % aktivkohle-gefiltertem FCS (CCS), 2 mM L-Glutamin und 1 % Penicillin-Streptomycin supplementiert wurde. Für das Versuchsmedium der LAPC-4 Zellen wurde phenolrotfreies IMDM verwendet und mit 10 % CCS, 2 mM L-Glutamin und 1 % Penicillin-Streptomycin supplementiert. Den Versuchsmedien wurde kein Miboleron zugesetzt. Bevor die entsprechenden Behandlungen – je nach Experiment – erfolgten, wurde den Zellen eine Adaptationzeit von 24 h gewährt.

3.2.2 Zellzahl- und Vitalitätsbestimmung (Trypanblau-Ausschluss mit Neubauerkammer)

Die Bestimmung von Zellzahl und Vitalität erfolgte mit bereits geernteten Zellen in Suspension. Hierfür wurden 20 µl einer Zellsuspension mit 20 µl Trypanblau vermischt und auf eine Neubauerkammer aufgetragen. Im Anschluss wurden die Zellzahl sowie die Vitalität der Zellen durch manuelles Auszählen unter dem Mikroskop ermittelt, wobei letale Zellen – aufgrund der gestörten Membranintegrität – den Farbstoff Trypanblau aufnehmen und blau erscheinen; vitale Zellen bleiben im Gegensatz dazu ungefärbt (Pool-Zobel *et al.*, 1994). Die Zellvitalität ergibt sich damit aus dem Verhältnis der Anzahl ungefärbter Zellen und der Gesamtanzahl gezählter Zellen.

Gleichzeitig wurde die Zelldichte der Suspension ermittelt. Die Neubauerkammer besitzt vier markierte Großquadrate. Aufgrund des definierten Kammervolumens ergibt die in einem Großquadrat bestimmte Zellzahl multipliziert mit dem Faktor 10^4 – unter weitere Berücksichtigung der Verdünnung – die Zelldichte, in Zellen pro ml. Die absolute Zellzahl wurde unter Einbeziehung des Volumens der untersuchten Zellsuspension berechnet.

3.2.3 Zellwachstumsassay (DAPI Assay)

Der hier verwendete DAPI-Assay diente zum Abschätzen des Zellwachstums. Diese Endpunktbestimmung erfolgt über die Menge vorhandener DNA nach einer definierten Inkubationszeit und unterscheidet sich damit von anderen Wachstumsassays (z. B. dem BrdU-Assay), in denen die Zellproliferation häufig während oder nach der Inkubation mit Testsubstanzen über einen gewissen Zeitraum bestimmt wird. Aufgrund ihrer Eigenschaften lassen die verschiedenen Assays unterschiedliche Aussagen über eine Beeinflussung des Zellwachstums zu. Der hier verwendete DAPI-Assay erlaubt Aussagen über die relative Anzahl von Zellen in einer Probe zum Zeitpunkt des Inkubationsendes, bezogen auf eine Vergleichsprobe (Kontrolle). Voraussetzung für eine sinnvolle Anwendung dieses Assays ist die Wahl einer geeigneten Inkubationszeit. Diese sollte ein zweimaliges Teilen der Kontrollzellpopulation sicherstellen. Andernfalls können mögliche Effekte nicht ausreichend sensitiv detektiert werden.

Bestimmung der Verdopplungszeiten unter Versuchsbedingungen

Zellen wurden in verschiedenen Dichten (5000 – 12.500 Zellen pro Well) in 96-Well-Mikrotiterplatten ausgesät. Nach 48 h wurden die Zellen auf das entsprechende Versuchsmedium umgestellt. In diesem Medium wurden die Zellen für bis zu 96 h inkubiert. Alle 24 h wurde das Medium einer Platte durch Absaugen entfernt und die Zellen für 5 min mit 100 µl Methanol fixiert. Der entstehende Niederschlag wurde getrocknet. Die Bestimmung des Zellwachstums erfolgte indirekt über die im Well verbliebene Menge an DNA, indem jedem Well 100 µl einer 20 µM Lösung des Fluorochroms 4',6'-Diamidino-2-Phenylindol-Hydrochlorid-Lösung (DAPI) zugesetzt wurden. Die Mikrotiterplatten wurden im Brutschrank über Nacht aufbewahrt und anschließend mit Hilfe des Multidetektions-Readers GENios bei 360/465 nm ausgelesen. Die Kalkulation der Verdopplungszeiten erfolgte über ein nichtlineares Regressionsmodell der Software GraphPad Prism 4.0, welches speziell für Wachstumskinetiken entwickelt wurde und die Verdopplungszeiten automatisch berechnete. Für die Analysen wurden drei von einander unabhängige Wachstumskinetiken erstellt.

Untersuchungen zur Modulation des Zellwachstums durch Testsubstanzen

Zellen wurden in einer Dichte von 8000 Zellen pro Well in 96-Well-Mikrotiterplatten ausgesät. Nach 48 h wurden die Zellen auf das entsprechende Versuchsmedium umgestellt. Nach weiteren 24 h erfolgte die Inkubation mit 0,001 – 80 µM der Testsubstanzen. Aufgrund der zuvor ermittelten Verdopplungszeiten wurde für beide Zelllinien eine Inkubationszeit von 96 h gewählt. Im Anschluss wurden die Medien entfernt und die Zellen durch Zugabe von 100 µl Methanol für 5 min fixiert; der entstandene Niederschlag wurde getrocknet. Das Zellwachstum wurde relativ, anhand der im Well verbliebenen DNA-Menge bestimmt. Hierfür wurden 100 µl einer 20 µM DAPI-Lösung aufgetragen. Die Mikrotiterplatten wurden im Brutschrank über Nacht aufbewahrt und anschließend mit Hilfe des Multidetektions-Readers GENios bei 360/465 nm ausgelesen. Die dargestellten Ergebnisse entsprechen der prozentualen DNA-Menge bezogen auf die Lösungsmittelkontrolle (0,1 % DMSO) und werden dem relativen Zellwachstum gleichgesetzt. Alle Versuche wurden mindestens dreimal von einander unabhängig durchgeführt.

3.2.4 Zytotoxizitätsbestimmung (MTT Assay)

Die möglichen Effekte auf die Mitochondrienaktivität wurden mit dem CellTiter96-Kit (Promega) untersucht. Das hierfür eingesetzte Substrat 3-(4,5-Dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-Diphenyl-Tetrazoliumbromid (MTT) wird in Mitochondrien zu einem blauen wasserunlöslichen Formazansalz umgesetzt und ist ein Indikator ihrer metabolischen Aktivität. Eine Beeinträchtigung dieser metabolischen Aktivität kann als zytotoxisches Ereignis bewertet werden (Mosmann, 1983). Um eine Beeinflussung über das Zellwachstum (Änderung der Anzahl metabolisch aktiver Zellen) zu vermeiden, wurden die Zellen für lediglich 24 h mit den Testsubstanzen inkubiert. Diese Zeitspanne liegt deutlich unterhalb der ermittelten Verdopplungszeiten beider Zelllinien.

Die Zellen wurden in einer Dichte von 8000 Zellen pro Well in 96-Well-Mikrotiterplatten ausgesät und nach 48 h auf Versuchsmedium umgestellt. Nach weiteren 24 h erfolgte die Inkubation mit 0,001 – 80 μM der Testsubstanzen, ebenfalls für 24 h. Im Anschluss daran wurden das Medium – inklusive der Testsubstanz – entfernt und die Zellen mit 100 μl frischem Versuchsmedium plus 15 μl MTT-Lösung (*dye solution*) für 4 h inkubiert. Der sich bildende blaue Niederschlag wurde anschließend durch die Zugabe eines Detergenz (*solubilization/stop solution*) über Nacht gelöst. Die colorimetrische Bestimmung der Farbintensität des gebildeten Produktes erfolgte durch das Auslesen der Mikrotiterplatten mit dem Multidetektions-Reader GENios bei 570 nm (Referenzwellenlänge: 650 nm). Der Vergleich der Ergebnisse erfolgte relativ zur DMSO-Kontrolle und wird als Mitochondrienaktivität bezeichnet. Alle Versuche wurden dreimal von einander unabhängig durchgeführt.

3.2.5 Alkalische Einzelzellmikrogelelektrophorese (Comet Assay)

Der Comet Assay ist eine Methode zur Bestimmung von DNA-Strangbrüchen in Einzelzellen und wurde in der vorliegenden Arbeit verwendet, um die Testsubstanzen hinsichtlich ihres genotoxischen Potentials zu charakterisieren. Weitere Untersuchungen beschäftigten sich mit möglichen antigenotoxischen Eigenschaften von Isoflavonoiden. Hierfür wurden die Zellen – im Anschluss an die Inkubation mit Isoflavonoiden – oxidativ geschädigt. Die DNA wird im Comet Assay elektrophoretisch aufgetrennt,

wobei Teilabschnitte einer geschädigten DNA im Agarosegel wandern, die intakte DNA dagegen nicht. Nach Anfärbung der DNA zeigen sich daher unter dem Mikroskop charakteristische, kometenähnliche Strukturen der einzelnen Zellen. Der Kometenkopf wird dabei von weitgehend ungeschädigter DNA gebildet, während die mehr oder weniger starke Ausprägung eines Schweifs, ein Indiz für die Schädigung der DNA ist (Collins *et al.*, 1997). Der Grad der DNA-Schädigung ergibt sich so aus dem Fluoreszenzanteil des Kometenschweifs am Gesamtsignal des Kometen (*tail intensity*).

Alle Comet-Assay-Experimente folgten überwiegend dem hier beschriebenen Standardprotokoll für den alkalischen Comet Assay. Dieser detektiert neben Doppel- auch Einzelstrangbrüche der DNA und ist damit sensitiver als der neutrale Comet Assay. Die für spezifische Versuche notwendigen Ergänzungen und Abweichungen werden im Anschluss entsprechend ausgewiesen (**Abbildung 4**).

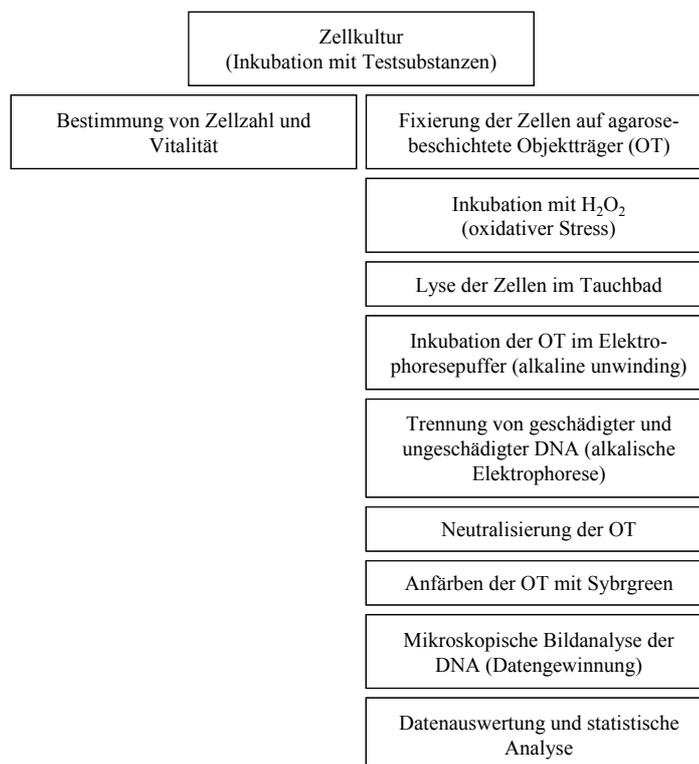


Abbildung 4: Fließschema für die Durchführung des Comet Assay. Die Darstellung zeigt die wichtigsten Teilschritte am Beispiel der Untersuchung von antigenotoxischen Effekten nach der Vorinkubation mit Genistein und einer anschließenden Induktion von DNA-Strangbrüchen durch H_2O_2 .

Standardprotokoll für Zellkultur und Inkubation mit Testsubstanzen

Für die Versuche wurden $7,5 \times 10^6$ Zellen in 75 cm^2 Kulturflaschen ausgesät. In einigen Fällen wurden auch 25 cm^2 Flaschen verwendet und entsprechend $2,5 \times 10^6$ Zellen

ausgesät. Nach 48 h erfolgte ein Mediumwechsel auf die entsprechenden Versuchsmedien. Nach weiteren 24 h wurden die Zellen geerntet und deren Zellzahl sowie Vitalität bestimmt. Für Kurzzeitbehandlungen (bis 60 min) wurden die Zellen in 1,5 ml Tubes aliquotiert (1×10^6 Zellen) und mit 1 ml der entsprechenden Testlösung inkubiert, wobei die Testlösungen frisch, durch Verdünnung der entsprechenden Testsubstanz in phenolrotfreiem RPMI-1640 hergestellt wurde. Im Anschluss an die Inkubation wurden die Zellen zentrifugiert (2000 U/min, 5 min) und mit phenolrotfreiem RPMI-1640 gewaschen. Die Zellzahl und Vitalität wurden erneut bestimmt. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (2000 U/min, 5 min) wurde das entstandene Pellet in 200 μ l einer 37 °C warmen *low-melting* Agarose (LMA, 0,7 %) aufgenommen. Jede Probe wurde dreifach mit einem Volumen von jeweils 30 μ l Zellsuspension auf zuvor mit 85 μ l *normal-melting* Agarose (NMA, 0,5 %) beschichtete angeraute Objektträger aufgetragen und mit einer zweiten Schicht der LMA bedeckt.

Untersuchungen zu möglichen genotoxischen Wirkungen der Testsubstanzen

Zur Bestimmung des genotoxischen Potentials der Testsubstanzen wurden die zuvor geernteten Zellen in Tubes aliquotiert und für 60 min mit je 80 μ M einer der betreffenden Substanzen in phenolrotfreiem RPMI-1640 bei 37 °C und 450 U/min inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zentrifugiert, gewaschen und die Zellzahl sowie Vitalität bestimmt. Die Zellen wurden wie beschrieben auf Objektträger fixiert.

Vergleich der relativen Empfindlichkeiten der Zelllinien gegenüber oxidativem Stress

Um ein geeignetes genotoxisches Versuchmodell zu etablieren, mit dessen Hilfe im Anschluss nach möglichen antigenotoxischen Wirkungen von Isoflavonoiden gesucht werden sollte, erfolgte zunächst ein Vergleich der Empfindlichkeit der Zelllinien gegenüber oxidativem Stress (nach Induktion mit H_2O_2). Hierfür wurden geerntete und aliquotierte Zellen mit 5 - 150 μ M H_2O_2 (in PBS) für 5 min bei 4 °C behandelt und anschließend zentrifugiert. Die Pellets wurden mit PBS gewaschen und die Zellzahl sowie die Vitalität erneut ermittelt. Die Zellen wurden wie beschrieben auf Objektträger aufgetragen.

Untersuchungen zu möglichen antigenotoxischen Wirkungen von Genistein

Die Untersuchungen zu möglichen antigenotoxischen Effekte erfolgten mit Genistein. In einem Experiment wurden geerntete und aliquotierte Zellen für 60 min mit 0,01 –

30 μM Genistein in phenolrotfreiem RPMI-1640 bei 37 °C und 450 U/min vorinkubiert, danach zentrifugiert und gewaschen. Die Zellzahl und Vitalität wurden bestimmt und die Zellen wie beschrieben auf Objektträger fixiert.

In einem weiteren Experiment erfolgte eine 24 h Vorinkubation mit Genistein. Hierfür wurden die Zellen in 25 cm² Kulturflaschen ausgesät und nach 48 h auf Versuchsmedium umgestellt. Nach weiteren 24 h erfolgte die Vorinkubation mit 0,01 – 30 μM Genistein (in Versuchsmedium) im Brutschrank. Die Zellen wurden nach 24 h geerntet gewaschen sowie die Zellzahl und Vitalität ermittelt. Anschließend wurden die Zellen aliquotiert und wie beschrieben auf Objektträger aufgetragen, wobei in diesem Fall alle Proben doppelt so oft – also sechsfach – aufgetragen wurden.

Eine Hälfte diente als Kontrolle und wurde nicht weiter behandelt; in der anderen Hälfte wurde oxidativer Stress durch eine Behandlung mit H₂O₂ vermittelt. Die Induktion von oxidativem Stress erfolgte – im Gegensatz zu dem oben genannten Protokoll – nicht in Tubes sondern in einem Tauchbad. Hierdurch erfolgte ein auf allen Objektträgern vergleichbarer oxidativer Angriff, da alle Versuchsansätze zur gleichen Zeit mit derselben Lösung behandelt wurden. Die eine Hälfte der Objektträger wurde somit zusätzlich für 5 min bei 4 °C in 19 μM H₂O₂ (in PBS) getaucht und anschließend für 1 min bei 4 °C in einem PBS-Tauchbad gewaschen.

In einem anderen Experiment sollten die möglichen antigenotoxischen Effekte von Genistein mit Hilfe einer zweiten Quelle von oxidativem Stress untersucht werden. Aufgrund der vorangegangenen Experimente wurden geerntete Zellen für 60 min mit entweder 1 μM Genistein oder 0,1 % DMSO in phenolrotfreiem RPMI-1640 bei 37 °C und 450 U/min vorinkubiert, anschließend zentrifugiert (5 min, 2000 U/min) und gewaschen. Die Induktion von oxidativem Stress erfolgte für beide Vorinkubationen durch die Behandlung mit 250 - 1000 μM Hämoglobin (15 min, 37 °C, 450 U/min) in phenolrotfreiem RPMI-1640. Anschließend wurden die Zellen erneut zentrifugiert, mit PBS/BSA gewaschen und die Zellzahl sowie Vitalität bestimmt. Die Zellen wurden wie beschrieben auf die Objektträger aufgetragen.

Standardprotokoll der Einzelzellmikroelektrophorese und Datenauswertung

Die weiteren Schritte erfolgten unabhängig von den Vorbehandlungen für alle Versuche identisch. Die Objektträger wurden für 60 min mit einer Lyselösung bei 4 °C behandelt.

Um die DNA-Einzelstrangbrüche in Doppelstrangbrüche zu überführen, wurde zusätzlich eine Inkubation mit dem alkalischen Elektrophoresepuffer (20 min, bei 4 °C) durchgeführt. Im Anschluss erfolgte in diesem Puffer die elektrophoretische Trennung von intakter und geschädigter DNA (20 min, 25 V, 300 mA, 4 °C). Nach der Elektrophorese wurden die Objektträger dreimal je 5 min mit Neutralisationspuffer gespült und die DNA mit Sybrgreen Mouting-Medium angefärbt (Schaeferhenrich *et al.*, 2003).

Die Messung der Objektträger erfolgte über ein Auswertungssystem bestehend aus einem Mikroskop, einer CCD-Kamera sowie der Software Komet Version 4.0 Imaging and Analysis System (siehe Anhang A). Als Messgröße diente die Fluoreszenz der migrierten – und damit geschädigten – DNA im Vergleich zur Fluoreszenz der GesamtdNA (*tail intensity in %*). Alle Proben wurden dreifach auf Objektträger aufgetragen und durch Messung von je 50 Zellen ausgewertet. Die Mittelwerte dieser Dreifachbestimmung bildeten die Grundlage für die Berechnung der Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Reproduktionen.

3.2.6 Multiple Genexpressionsanalyse (cDNA-Macroarray)

Es wurde ein umfangreiches Screening durchgeführt, um nach vermittelnden Zielgenen der durch Genistein ausgelösten Wirkungen in Prostatazellen zu suchen. Die hierfür verwendeten cDNA-Macroarrays von SuperArray (USA) wurden entsprechend der thematischen Ausrichtung dieser Arbeit gewählt und ermöglichten die Untersuchung von insgesamt 192 spezifischen Genen der Biotransformation (GEArray Q series Human Drug Metabolism Gene Array, HS-011) und Stressantwort (GEArray Q series Human Stress & Toxicity PathwayFinder Gene Array, HS-012). Unter den enthaltenen Genen befanden sich auch solche Gene, die an der zellulären Abwehr von oxidativem Stress beteiligt sind (eine vollständige Liste der untersuchten Gene befindet sich im Anhang A).

Bei der hier durchgeführten cDNA-Macroarray-Analyse wird die mRNA der behandelten Zellen zunächst in cDNA umgeschrieben und anschließend mittels PCR amplifiziert, wobei die Produkte während der PCR mit Biotin gelabelt werden. Diese cDNA-Sonden binden an ihre komplementären Gensequenzen (Spots) auf den Membranen und können über ein Detektionssystem (z. B. streptavidin-gekoppelte Alkalische Phosphatase in Verbindung mit einem entsprechenden Substrat) visualisiert und ausgewertet werden (**Abbildung 5**).

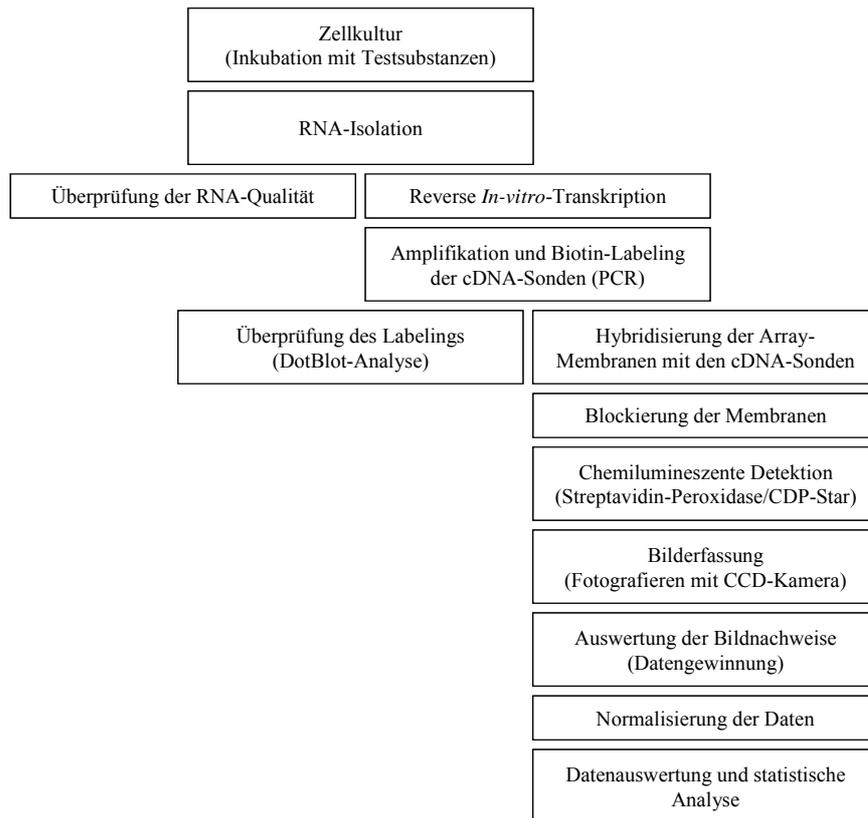


Abbildung 5: Fließschema für die Durchführung der cDNA-Microarray-Analyse.

Zellkultur und Inkubation mit Genistein

Pro Versuchsansatz wurden 1×10^6 LAPC-4 Zellen in 25 cm^2 Kulturflaschen ausgesät. Höhere Zellzahlen erschienen ungünstig, da die Zellen zur Clusterbildung neigen und eine eingeschränkte Vergleichbarkeit der einzelnen Versuchsansätze befürchtet wurde. Nach der sonst verwendeten Anwachsphase von 48 h wurde – bei der gewählten Zelldichte – ein beachtlicher Anteil von Zellen beobachtet, die ihre gewohnte Zellmorphologie noch nicht vollständig entwickelt hatte. Da auch dies möglicherweise die Vergleichbarkeit der Versuchsansätze beeinträchtigt hätte, wurde die Anwachsphase um 24 h verlängert, was einerseits zu ausreichenden Zellzahlen führte und andererseits charakteristisch geformte und überwiegend als Monolayer wachsende LAPC-4-Zellen ergab. Nach somit 72 h erfolgte ein Mediumwechsel auf das Versuchsmedium, nach weiteren 24 h die Inkubation mit $1 \mu\text{M}$ oder $10 \mu\text{M}$ Genistein bzw. der Lösungsmittelkontrolle (0,1 % DMSO). Die Zellen wurden für weitere 24 h im Brutschrank inkubiert. Die gewählte Inkubationszeit orientierte sich an den vorangegangenen Comet-Assay-Experimenten, in denen eine 24 h Inkubation mit Genistein die deutlichste antigentoxische Wirkung zeigte (vgl. Kap. 4.3.5).

Isolation und Quantifizierung der RNA

Die Zellen wurden geerntet, zentrifugiert (2000 U/min, 5 min) und anschließend zweimal mit PBS gewaschen. Die Isolation der RNA erfolgte mit Hilfe des RNeasy Mini Kits (Qiagen), entsprechend den Empfehlungen des Herstellers. Bei dieser Spin-Column-Methode werden die Zellen zunächst chemisch sowie physikalisch lysiert. Das Lysat wird auf eine Silicagel-Säule aufgetragen und in mehreren Wasch- und Zentrifugationsschritten aufgereinigt. Schließlich wird die RNA in RNase freiem Wasser gelöst und in einem letzten Zentrifugationsschritt von der Säule eluiert, wobei die DNA auf der Säule verbleibt.

Eine Quantifizierung der gewonnenen RNA erfolgte (nach 1:100 Verdünnung) mit dem Eppendorf Biophotometer durch die Messung der optischen Dichte (OD) bei 260 nm. Darüber hinaus wurde die Reinheit der RNA-Lösung durch den Vergleich mit der OD bei 280 nm (Protein), 230 nm (phenolische Verunreinigungen) sowie 320 nm (Trübung) überprüft. Von jeder RNA-Lösung wurden 3 µg zur weiteren Kontrolle auf ein denaturierendes Agarosegel aufgetragen und für ca. 60 min elektrophoretisch bei 70 V getrennt. Neben der Überprüfung der ermittelten RNA-Gehalte durch den Vergleich der verschiedenen Bandenstärken konnten so eine Kontamination mit DNA sowie die Degradation der RNA ausgeschlossen werden. Anschließend wurde die RNA bei -20 °C gelagert.

Reverse In-vitro-Transkription (cDNA-Synthese)

Aus den RNA-Proben wurden die für den cDNA-Macroarray benötigten cDNA-Kopien angefertigt. Das hierfür verwendete Protokoll der Reversen *In-vitro*-Transkription folgte den Empfehlungen des Array-Herstellers. Von jeder Probe wurden 3 µg Gesamt-RNA eingesetzt, wobei aufgrund der verwendeten Oligo-dT-Primer lediglich der mRNA-Anteil mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase in die entsprechenden cDNA-Sequenzen übersetzt wurde (20 µl Gesamtvolumen pro Ansatz). Nach 3 min bei 70 °C und 10 min bei 37 °C erfolgte die Synthese der cDNA für 25 min bei 37 °C. Um das RNA-Template zu hydrolysieren und die Reverse Transkriptase zu inaktivieren, wurden die Ansätze in einem abschließenden Schritt für 5 min bei 85 °C inkubiert. Die Proben wurden bei -20°C gelagert.

Amplifikation und Ampo-Labeling (nicht radioaktive Version)

Die cDNA-Transkripte wurden über eine PCR amplifiziert und gleichzeitig mit Biotin-16-UTP gelabelt. Alle notwendigen Reagenzien wurden den cDNA-Microarray Kits HS-011 bzw. HS-012 (SuperArray, USA) entnommen und entsprechend den Angaben des Herstellers verwendet (50 µl Gesamtvolumen pro PCR-Ansatz). Das thermische Protokoll der PCR entsprach dem von SuperArray empfohlenen Standardprotokoll: Denaturierung (5 min, 85 °C), 30 Zyklen bestehend aus Denaturierung (1 min, 85 °C), Annealing und Elongation (1 min, 72 °C) sowie – zur Vervollständigung aller zuvor nur teilweise synthetisierten Stränge – einem abschließenden Elongationsschritt (5 min, 72 °C). Nach Zugabe einer Stop-Lösung wurden die PCR-Produkte sofort auf Eis gekühlt.

Die Qualität des Biotin-Labelings wurde durch einen Dotblot-Test überprüft. Hierfür wurden die cDNA-Sonden mit destilliertem Wasser verdünnt (1:80, 1:320, 1:1280 und 1:5120) und auf positiv-geladene Nylonmembranen gespottet. Zur Visualisierung wurde das später eingehend beschriebene Detektionssystem mit CDP-Star benutzt. Ein detektierbares Signal bei einer Verdünnung von 1:5120 oder 1:1280 wurde als ausreichendes Labeling gewertet. Die cDNA-Sonden wurden für max. 48 h bei -20°C gelagert.

Hybridisierung der Array-Membranen

Die Hybridisierung und Detektion folgten entsprechend der Vorgaben von SuperArray. Die Arraymembranen HS-011 bzw. HS-012 wurden angefeuchtet und mit einer Hybridisierungslösung, unter Zusatz von Lachssperma-DNA (GEAprehyb-Lösung), in den mitgelieferten Hybridisierungstubes bei 60 °C für 40 min vorhybridisiert. Danach erfolgte die Hybridisierung ebenfalls mit Hybridisierungslösung, unter Zusatz von Lachssperma-DNA und jeweils einer der zuvor synthetisierten cDNA-Sonden (GEAhyb-Lösung) für 16 h bei 60°C im Hybridisierungsöfen (Rotation: 9 U/min). Im Anschluss wurden die Membranen bei 60 °C für jeweils zweimal 15 min mit den Waschlösungen 1 und 2 gewaschen (Rotation: 20 U/min).

Detektion der Signale

Als Detektionssystem wurde der Chemiluminescent Detection Kit für GEArrays (SuperArray, USA) verwendet. Alle Schritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Membranen wurden zunächst in einem Hybridisierungsöfen für 40 min mit GEAblocking Solution Q inkubiert (Rotation: 20 U/min). Im Anschluss wurden die

Membranen für 10 min mit einem Binding Buffer und der Alkalischen Phosphatase inkubiert (Rotation: 9 U/min). Hierbei wurden die komplementär-gebundenen Biotin-gelabelten cDNA-Sonden auf den Membranen mit einer streptavidin-gekoppelten Alkalischen Phosphatase konjugiert. Die Membranen wurden viermal für 5 min mit Buffer F gewaschen und abschließend zweimal mit Buffer G gespült. Das nun zugesetzte Substrat (CDP-Star) wurde durch die Aktivität der Alkalischen Phosphatase umgesetzt und führte zu einer detektierbaren Chemilumineszenz in der entsprechenden Region der gebundenen cDNA-Sonden. Die Signale wurden mit dem CCD-Camera-System LAS-1000/Diana grafisch erfasst.

Quantifizierung und Normalisierung der Signale

Die Quantifizierung der chemilumineszenten Signale erfolgte mit Hilfe der Image Analysis Software AIDA Array Version 3.50, wobei der Membranhintergrund um jeden einzelnen Spot von der Software individuell subtrahiert wurde. Die Normalisierung der gewonnenen Daten erfolgte durch die Bildung eines Quotienten aus dem Rohdatenwert des zu normalisierenden Spots und dem mittleren Rohdatenwert aller von SuperArray ausgewiesenen Spots für Housekeeping-Gene (endogene Kontrollen) derselben Membran. Diese zehn Spots repräsentierten die Glyceraldehyde-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), Cyclophilin A (PPIA), Ribosomales Protein L13a (RPL13A) und β -Aktin (ACTB). Die Zuverlässigkeit der Normalisierung wurde mit Hilfe von Scatterplot-Grafiken überprüft (**Abbildung 30, Anhang B**).

Definition für differentiell-exprimierte Gene

Alle Versuche wurden dreimal von einander unabhängig durchgeführt. Als Grundlage für die Feststellung einer signifikanten Modulation der Genexpression wurden die normalisierten Daten jeweils einer Behandlung (entweder 1 μ M oder 10 μ M Genistein) mit den normalisierten Daten der Lösungsmittelkontrolle (0,1 % DMSO) mit Hilfe des ungepaarten zweiseitigen *t*-Tests verglichen, wobei eine sich ergebende Signifikanz ($p < 0,05$) als differentielle Expression des jeweiligen Gens gewertet wurde.

3.2.7 TaqMan Real-Time PCR

Für die Untersuchungen mittels TaqMan Real-Time PCR wurden erneut Proben hergestellt, d. h. wurde nicht auf die RNA-Proben aus den Makroarray-Versuchen zurückgegriffen (**Abbildung 6**). Die Versuche wurden zum einen durchgeführt, um die Ergebnisse der cDNA-Makroarrays zu verifizieren, zum anderen sollten die ermittelten Modulationen hinsichtlich ihres zeitlichen Verlaufs charakterisiert werden. Darüber hinaus erfolgten weitere Versuche mit dem Ziel, den Signalweg dieser durch Genistein ausgelösten Effekte auf die Expression dieser Gene zu identifizieren. Alle Versuche wurden dreimal von einander unabhängig durchgeführt.

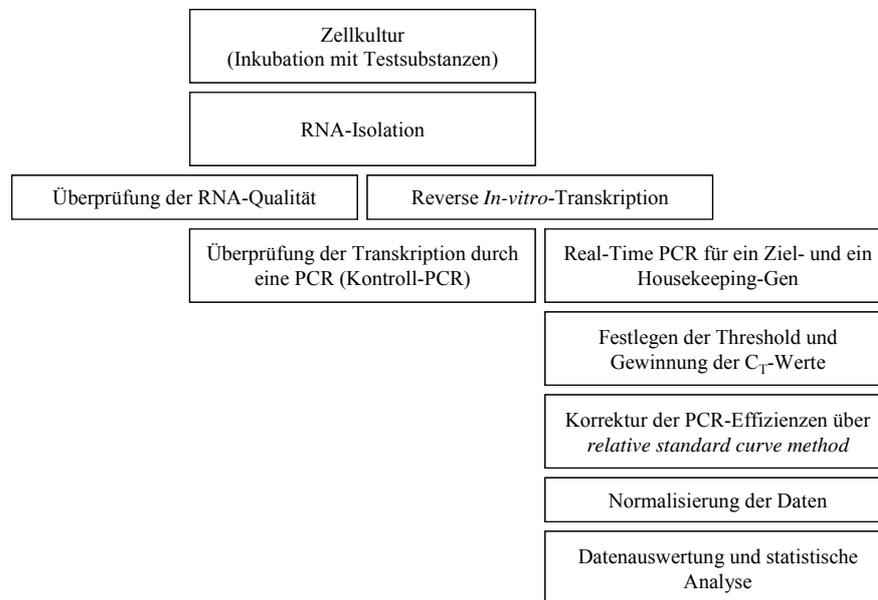


Abbildung 6: Fließschema für die Durchführung der TaqMan Real-Time PCR.

Zellkultur und Inkubation mit Testsubstanzen

LAPC-4 Zellen wurden in einer Dichte von $0,5 \times 10^6$ pro Well in 6-Well-Platten ausgesät. Nach 72 h erfolgte der Mediumwechsel auf das Versuchsmedium. Nach weiteren 24 h wurden die Zellen mit Genistein oder 17β -Östradiol inkubiert. Die Inkubationsdauer sowie die eingesetzten Konzentrationen variierten zwischen den einzelnen Versuchen.

Analog den zuvor durchgeführten cDNA-Makroarray-Versuchen wurden LAPC-4 Zellen für zunächst 24 h mit 0,1 – 30 μ M Genistein inkubiert. Als Kontrolle diente eine Inkubation mit 0,1 % DMSO. Um den Einfluss der Inkubationsdauer zu ermitteln,

wurden die Zellen in einer weiteren Versuchsreihe für 4 – 48 h mit 30 μM Genistein inkubiert. Als Kontrolle wurde hier eine 48 h Behandlung mit 0,1 % DMSO gewählt. Die so gewonnenen Erkenntnisse legten eine weitere Untersuchung der Dosis-Wirkungs-Beziehung nach einer Inkubationszeit von 12 h nahe.

In einem abschließenden Versuch wurden die Zellen für 12 h mit 0,3 bzw. 3 μM 17 β -Östradiol behandelt. Auf diesem Weg sollte untersucht werden, ob die durch Genistein ausgelösten Effekte ebenfalls durch ein Östrogen hervorgerufen werden. Dies würde möglicherweise auf eine ER-vermittelte, phytoöstrogene Wirkung von Genistein hinweisen. Aufgrund der – im Vergleich zu Genistein – höheren Affinität von 17 β -Östradiol zum in Prostatazellen überwiegend exprimierten ER β (Kuiper *et al.*, 1997; Lau *et al.*, 2000) wurden die Zellen entsprechend mit zehnfach bzw. einhundertfach geringere Konzentrationen an 17 β -Östradiol – als die zuvor effektivste Genistein-Konzentration (30 μM) – inkubiert.

Isolation und Quantifizierung der RNA

Nach der Inkubation wurden die Zellen zweimal mit PBS gespült. Anschließend wurde die RNA isoliert und quantifiziert (vgl. Kap. 3.2.6). Abweichend von dem dort aufgeführten Protokoll, wurde die Lyselösung nunmehr direkt auf die im Well befindlichen adhärennten Zell aufgetragen. Eine vorherige Zellernte mit Trypsin erfolgte somit nicht.

Reverse In-vitro-Transkription (cDNA-Synthese)

Die cDNA-Synthese erfolgte mit dem TaqMan Reverse Transcription Reagents Kit (Applied Biosystems, USA). Hierfür wurden 500 ng RNA jeder Probe mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase umgeschrieben (Gesamtvolumen pro Ansatz: 500 μl). Im Gegensatz zu der vorhergehenden Methode wurden Random Hexamer Primer verwendet, da die von Applied Biosystems empfohlene endogene Kontrolle nur für diese validiert ist. Das benutzte thermische Protokoll entsprach dem Standardprotokoll des Herstellers: 10 min bei 25 °C, 30 min bei 48 °C und 5 min bei 95 °C. Die Kontrolle der Synthese erfolgte mit einer konventionellen PCR und einem nicht-denturierenden Agarosegel für eines der untersuchten Gene. Als Negativkontrollen für diese Kontroll-PCR wurden Parallelansätze mit den entsprechenden RNA-Proben (ohne vorherige Reverse Transkription) mitgeführt. Die cDNA Produkte wurden bei -20°C gelagert.

Primerdesign und Kontrolle der Amplifikate

Für drei der im cDNA-Makroarray durch Genistein modulierten Gene, namentlich das Metallothionein 1X (MT1X), die Mikrosomale Glutathion-S-Transferase 1 (MGST1), sowie die Glutathionreduktase (GSR) erfolgten eine Reihe weiterer Untersuchungen. Die hierfür verwendeten PCR-Primer und TaqMan-Sonden – letztere waren mit VIC (6-Carboxy-Fluorescein) und TAMRA (6-Carboxy-N,N,N',N'-Tetra-Methylrhodamin) markiert – wurden mit Hilfe der Software PrimerDesign 2.0 entwickelt und von Invitrogen bzw. Applied Biosystems bezogen (**Tabelle 3**). Die Grundlagen hierfür bildeten die entsprechende cDNA Sequenzen aus der GeneBank des National Center for Biotechnology Information der USA (NCBI). Die erwarteten Produktlängen der Amplifikate wurden durch eine konventionelle PCR mit anschließender elektrophoretischer Trennung im nicht-denturierenden Agarosegel bestätigt. Zusätzlich erfolgte eine Sequenzierung mittels BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, USA), welche mit Hilfe des ABI Prism 3100 Genetic Analyzer ausgewertet wurde. Die dargestellten Abbildungen (**Abbildung 31, Anhang B**) wurden mit der Software Chromas Version 1.45 erstellt und zeigen ebenfalls eine gute Übereinstimmung mit den erwarteten Sequenzen.

Tabelle 3

PCR-Primer und TaqMan-Sonden für die Real-Time PCR

| | MT-1X | MGST-1 | GSR |
|-------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|---|
| NCBI-Eintrag | NM_005952.2 | NM_145764.1 | NM_000637.2 |
| Sense-Primer ^a | 5'-CTT CTC CTTG CCT CGA AAT GGA-3' | 5'-GCC ATC CTG CAC TTC AGA CTA-3' | 5'-AAT TGG CGT GTT ATT AAG GAA AAG C-3' |
| Antisense-Primer ^a | 5'-AGC AGC AGC TCT TCT TGC AG-3' | 5'-TTC AGC AAC CTG TAA GCC ATG-3' | 5'-TCT ATA TGG GAC TTG GTG AGA TTG T-3' |
| TaqMan-Sonde ^b | 5'-CCC AAC TGC TCC TGC TCG CCT GTT-3' | 5'-TCG GAG CAC GGA TCT ACC ACA CCA-3' | 5'-TGC CTA TGT GAG CCG CCT GAA TGC C-3' |
| Fragmentlänge | 120 bp | 143 bp | 89 bp |

^a von Invitrogen

^b von Applied Biosystems

Quantitative TaqMan Real-Time-PCR

Die Analysen erfolgten in 96-Well-Mikrotiterplatten mit dem Thermal Cycler GeneAmp 5700, entsprechend den Empfehlungen des Herstellers Applied Biosystems. Pro Well wurden hierfür 2 µl cDNA-Template mit 10 µl 2x TaqMan Universal PCR Master Mix, je 2 µl Sense- und Antisense-Primer (9 µM Stammlösung), 2 µl der TaqMan-Sonde (2,5 µM Stammlösung) und 2 µl destilliertem Wasser verwendet. Ein

PCR-Ansatz hatte damit ein Gesamtvolumen von 20 μl . Als endogene Kontrolle wurde ACTB gewählt. Pro Well wurden hier 2 μl cDNA-Template mit 10 μl des 2x TaqMan Universal PCR Master Mixes, 1 μl Human ACTB Endogenous Control und 7 μl destilliertem Wasser vermischt.

Auf jeder 96-Well-Mikrotiterplatte wurde eine serielle 1:20 Standardverdünnungsreihe mitgeführt (unverdünnte cDNA und daraus hergestellte 1:20, 1:400, 1:8000 Verdünnungen). Weiterhin enthielt jede Platte Negativkontrollen ohne Template. Die Analysen der auf eine Platte aufgetragenen Negativkontrollen, Standards und Proben erfolgten jeweils für ein betreffendes Zielgen und das Housekeeping-Gen. Alle Kontrollen, Standards und Proben wurden doppelt aufgetragen (Doppelbestimmung).

Das verwendete PCR-Protokoll des Thermal Cyclers entsprach dem von Applied Biosystems empfohlenen Standardprotokoll: Aktivierung (10 min, 95 °C) sowie 40 Zyklen aus jeweils Denaturierung (15 sec, 95 °C) und Annealing/Extension (1 min, 60 °C).

Datenauswertung

Die Thresholds der Signale wurden entsprechend der Empfehlungen von Applied Biosystems festgelegt. Für die weitere Datenauswertung wurden die Mittelwerte dieser doppelt bestimmten C_T -Werte berechnet. Anhand der Standardgeraden wurden die Effizienzen der Amplifikationen zwischen dem untersuchten Zielgen und dem Housekeeping-Gen ACTB verglichen, indem ihre C_T -Werte voneinander paarweise subtrahiert (ΔC_T) und grafisch gegen die logarithmierten Verdünnungsfaktoren aufgetragen wurden. Als Maß für die Vergleichbarkeit der Effizienzen von Ziel- und Housekeeping-Gen diente der Anstieg der Trendlinie. Dieser sollte bei miteinander vergleichbaren Effizienzen einen Betrag von $< 0,1$ annehmen. Für keines der Zielgene wurde eine mit ACTB vergleichbare Effizienz ermittelt. Aus diesem Grund erfolgte die Weiterverarbeitung der Rohdaten (C_T -Werte) mit Hilfe der *relative standard curve method*. Diese setzt keine vergleichbaren Effizienzen voraus. Aus den je zwei Standardgeraden – Zielgen und ACTB – wurde über deren Geradengleichungen jedem C_T -Wert der Proben ein entsprechender Verdünnungsfaktor des Standard-Templates zugeordnet. Dadurch wurden die unterschiedlichen Effizienzen korrigiert. Anschließend erfolgte eine Normalisierung, bei der jeder effizienz-korrigierte Datenwert eines Zielgenes durch seinen korrespondierenden Wert des Housekeeping-Gens dividiert wurde. Die normalisierten Daten wurden abschließend ins Verhältnis zur

Kontrollbehandlung (0,1 % DMSO) gesetzt; sie entsprechen somit der relativen Genexpression, bezogen auf die Lösungsmittelkontrolle.

3.2.8 Immunzytochemische Detektion von Metallothioneinen

Den Abschluss der Untersuchungen bildeten Experimente zum möglichen Einfluss von Genistein auf die Proteinexpression von Metallothioneinen. Aufgrund von Hinweisen aus der Literatur, in denen eine zellzyklusabhängige Translokation dieser Proteine zwischen dem Zellplasma und Zellkern berichtet wurde (Levadoux-Martin *et al.*, 2001), erfolgten die Untersuchungen mit Hilfe einer *In-situ*-Technik. Metallothioneine schützen die DNA vor oxidativen Schäden. Die subzelluläre Lokalisation dieser Proteine beeinflusst wahrscheinlich diese Wirkung, wobei eine Lokalisation im Kern einen besonders hohen Schutz vor oxidativ-induzierten DNA-Schäden bietet (Levadoux-Martin *et al.*, 2001).

Die Versuchsdurchführung erfolgte in Anlehnung an die von Levadoux-Martin *et al.* (2001) verwendete Methode zur immunzytochemischen Bestimmung von Metallothioneinen, wobei das hier verwendete Protokoll aufgrund des sich unterscheidenden Detektionssystems modifiziert wurde (**Abbildung 7**). Hierbei werden die behandelten Zellen zunächst fixiert, permeabilisiert und mit einem primären Antikörper (gegen Metallothioneine gerichtet) inkubiert. Anschließend erfolgt die Inkubation mit einem biotinylierten sekundären Antikörper (gegen den primären Antikörper gerichtet). Dieser bindet in einem nächsten Schritt eine streptavidin-gekoppelte Peroxidase, welche nach Zugabe des Chromogens Diaminobenzidin (DAB) sowie eines Substrats (H_2O_2) zur Bildung eines rostfarbenen Niederschlags führt. Diese hochauflösende Färbung erlaubt Aussagen über die intrazelluläre Lokalisation sowie die Expressionshöhe der Metallothioneine in den untersuchten Zellen.

Zellkultur und Inkubation

LAPC-4 Zellen wurden in einer Dichte von 1×10^5 pro Well in 6-Well-Platten ausgesät. In den Wells befanden sich sterile Deckgläser, auf deren Oberfläche die Zellen anwachsen. Nach 72 h erfolgte der Mediumwechsel auf Versuchmedium. Nach weiteren 24 h wurden die Zellen für 12 h mit 1 - 30 μ M Genistein, 0,3 μ M 17 β -Östradiol, 50 μ M $ZnSO_4$ (Positivkontrolle) oder 0,1 % DMSO (Lösungsmittelkontrolle) inkubiert. Im Anschluss wurden die auf den Deckgläsern angewachsenen Zellen zweimal mit PBS

gewaschen und über Nacht mit 4 % Formaldehyd in PBS im Kühlschrank fixiert. Die Zellen wurden durch eine Behandlung mit Methanol (30 min) permeabilisiert.

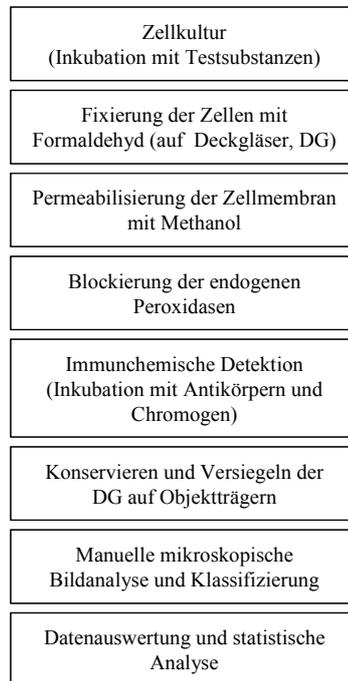


Abbildung 7: Fließschema für die Durchführung der Immunzytochemischen Detektion.

Immunchemische Detektion

Für die sich anschließenden Schritte wurde der Kit UltraVision Detection Systems HRP/DAB (Lab Vision, USA) entsprechend den Empfehlungen des Herstellers verwendet. Die Deckgläser wurden zweimal mit PBS gewaschen und für 10 min mit Hydrogen Peroxide Block behandelt. Pro Ansatz wurden hierfür 40 µl Lösung auf Parafilm gegeben und mit jeweils einem Deckglas (Zellen auf der Unterseite) abgedeckt. Auf die gleiche Weise erfolgte die anschließende Behandlung mit dem 1:50 in PBS verdünnten Primärantikörper Maus-Anti-Metallothionein (60 min). Nun erfolgten sukzessive die Behandlungen mit den weiteren Kit-Bestandteilen, dem Sekundärantikörper Biotinylated Goat Anti-Mouse (10 min), Streptavidin-Peroxidase (10 min) sowie dem Chromogen Diaminobenzidin (DAB) zusammen mit dem Substrat H₂O₂ (15 min). Zwischen den einzelnen Inkubationen wurden die Deckgläser jeweils zweimal mit PBS gewaschen. Nach der Inkubation mit dem Chromogen wurden die Deckgläser viermal mit destilliertem Wasser gewaschen, mit einem konservierenden Mounting-Medium versetzt und mit Nagellack auf Objektträgern fixiert.

Mikroskopische Auswertung und Bewertung

Die Betrachtung der Objektträger erfolgte mit Hilfe eines Auswertungssystems, bestehend aus dem Phasenkontrastmikroskop Axiovert 100M, einer CCD-Kamera und der Software MetaMorph (siehe Anhang A). Pro Deckglas wurden 500 Zellen im Okular manuell ausgezählt und bewertet. Jede Zelle wurde einer von drei Klassen zugeordnet: keine Färbung (Klasse L), moderate Färbung (Klasse M) oder intensive Färbung (Klasse H). Darüber hinaus wurde der Anteil von Zellen mit deutlich-konzentrierter Kernfärbung ermittelt.

Zur Bewertung der Metallothionein-Expression wurde ein Expression-Score definiert. Hierfür wurden die Zellen der Klasse L mit 1 Punkt bewertet. Die Zellen der Klassen M und H erhielten jeweils eine doppelt so hohe Punktzahl von 2 bzw. 4. Die Punkte einer Probe wurden addiert. Bei einer Auswertung von 500 Zellen ergibt dies einen Minimalwert von 500 Punkten und einem Maximalwert von 2000 Punkten. Die Summe aller Punkte einer Probe wird als Expression-Score bezeichnet und zur Abschätzung der Höhe der Proteinexpression verwendet.

3.2.9 Statistische Analyse und grafische Darstellung

Die Ergebnisse wurden mit Hilfe der Software GraphPad Prism Version 4.0 statistisch ausgewertet. Allen Analysen lagen mindestens drei voneinander unabhängige Wiederholungen zugrunde. Für die Daten wurde eine Normalverteilung angenommen und dementsprechend parametrische Tests gewählt. Die im Ergebnisteil bzw. im Anhang gezeigten Abbildungen und Tabelle verweisen auf das jeweils zugrunde gelegte statistische Testverfahren.

Die Grafiken wurden ebenfalls mit GraphPad Prism, die Tabellen mit Microsoft Excel Version 2000 erstellt. Die bei den cDNA-Makroarray-Versuchen gezeigten Scatterplot-Grafiken wurden ebenfalls in Excel generiert.

Ein Teil der Daten wurde mit dem zweiseitigen ungepaarten t -Test auf Signifikanz untersucht. Hierbei erfolgt der paarweise Vergleich der Mittelwerte zweier Gruppen (Behandlung und Kontrolle) bezüglich eines Faktors. Diese Daten werden vorzugsweise in Tabellen, unter Angabe ihrer entsprechenden p -Werte aufgelistet.

Andere Daten wurden mit Hilfe der One-way ANOVA und Dunnett's Posttest ausgewertet. Diese Analysen erfolgten überwiegend zur statistischen Bewertung von Dosis-

Wirkungs-Beziehungen oder Kinetiken. Hierbei werden mehr als zwei Gruppen (Kontrolle und verschiedene Behandlungen) auf die Verschiedenheit ihrer Mittelwerte bzgl. eines Faktors getestet. Der benutzte Dunnett Posttest erlaubt den paarweisen Vergleich der einzelnen Gruppen mit einer definierten Kontrollgruppe (hier DMSO).

Einige Daten wurden mit Hilfe der Two-way ANOVA und Bonferroni's Posttest untersucht. In diesem Fall werden mehr als zwei Gruppen auf die Verschiedenheit ihrer Mittelwerte bzgl. zweier Faktoren getestet. In den hier durchgeführten Tests vergleicht der verwendete Bonferroni Posttest jeweils für jede Gruppe (hier Konzentration) die Mittelwerte von Kontrolle und Behandlung auf eine signifikante Differenz.

Bei allen Tests wurde ein signifikanter Unterschied bei $p < 0,05$ angenommen. Die Signifikanzen sind in den Abbildungen und Tabellen ausgewiesen und werden ggf. in den Legenden erläutert.

Für die Ergebnisse des Wachstumsassays wurden darüber hinaus IC_{50} -Werte berechnet. IC_{50} -Werten sind Konzentrationen von Testsubstanzen, bei denen eine Verminderung der untersuchten Messgröße um 50 % eintritt. Dieser Parameter ermöglicht den Vergleich der Effektivitäten verschiedener Testsubstanzen, z. B. bei der Reduktion des Zellwachstums. Die IC_{50} -Werte wurde in dieser Arbeit mit Hilfe einer nicht-linearer Regressionsanalyse bestimmt, wobei das verwendet Regressionsmodell jeweils bestmöglich an den entsprechenden Verlauf des zu analysierenden Graphen angepasst wurde.

Die Wachstumskinetiken der Zelllinien wurden ebenfalls mit Hilfe einer nicht-linearer Regressionsanalyse ausgewertet. Das hierfür verwendete Regressionsmodell für exponentielles Wachstum berechnete aus den Rohdaten automatisch die mittleren Verdopplungszeiten beider Zelllinien.

4 Ergebnisse

4.1 Effekte von Isoflavonoiden auf das Zellwachstum

Die Zellwachstumsrate stellt einen unspezifischen jedoch äußerst komplex regulierten zellulären Endpunkt dar. Eine Beeinflussung des Wachstums ist daher gut zur ersten Abschätzung der biologischen Aktivitäten von Testsubstanzen geeignet. In der vorliegenden Arbeit wurden Effekte auf das Zellwachstum indirekt über den Vergleich der DNA-Gehalte verschieden-inkubierten Zellpopulationen ermittelt. Zunächst erfolgte jedoch eine Charakterisierung der beiden Zellmodelle bzgl. ihrer Verdopplungszeiten und Wachstumsantworten auf endogene Steroidhormone unter den gewählten Versuchsbedingungen.

4.1.1 Charakterisierung der Zelllinien hinsichtlich ihrer Verdopplungszeiten

Um eine günstige Kombination aus Zelldichte und Inkubationszeit für die folgenden Wachstumsversuche abzuleiten, wurde das Wachstum der Zelllinien in Abhängigkeit der Zelldichte für bis zu 96 h untersucht.

Die mittlere Verdopplungszeit der LAPC-4 Zellen variierte zwischen 51 - 65 h. Für LNCaP Zellen wurden signifikant kürzere Verdopplungszeiten von 37 - 51 h bestimmt (**Abbildung 8**). Ein Zusammenhang zwischen der Aussaatdichte und der Verdopplungszeit ergab sich für keine der beiden Zelllinien, obgleich eine Erhöhung der Ausgangszellzahl das Wachstum von LNCaP Zellen tendenziell beschleunigte.

Der hier verwendete DAPI-Assay bestimmt das Wachstum mittels Endpunktmessung über den DNA-Gehalt einer Zellpopulation. Die durch Testsubstanzen vermittelten Effekte werden somit kumulativ erfasst. Um aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten, sollte die gewählte Inkubationszeit möglichst ein zweimaliges Teilen der Kontrollzellen (Bezugsgröße) gewährleisten. Im konkreten Fall bedeutet das, nur eine Inkubationszeit von 96 h ermöglicht die sinnvolle Bestimmung von Effekten auf das Wachstum beider Zelllinien.

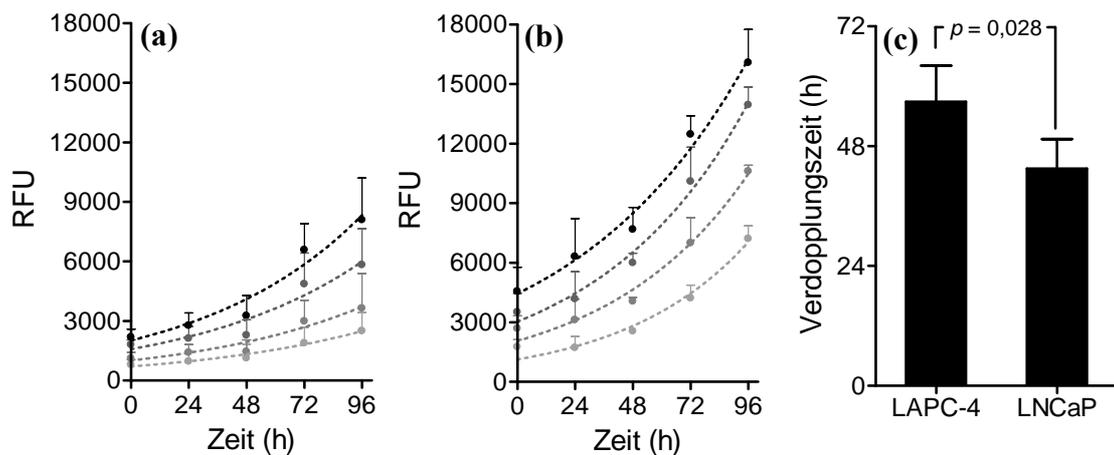


Abbildung 8. Wachstumskinetiken und Verdopplungszeiten der Zelllinien. LAPC-4 (a) und LNCaP Zellen (b) wurden in verschiedenen Dichten (5000, 7500, 10000 und 12500 Zellen pro Well, hellgraue bis schwarze Punkte) in 96-Well-Mikrotiterplatten ausgesät und nach 48 h auf Versuchsmedium umgestellt. Nach weiteren 0 – 96 h wurde die im Well befindliche DNA mit dem Fluorochrom DAPI angefärbt. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte + SEM der relativen Fluoreszenzeinheiten (RFU). Die gestrichelten Linien entsprechen den nicht-linearen Regressionskurven für ein exponentielles Wachstum ($n = 3$). Die gezeigten Verdopplungszeiten (c) sind Mittelwerten + SEM und wurden aus den mittleren Verdopplungszeiten der verschiedenen Aussaatdichten gewonnen (der p-Wert wurde mit ungepaartem zweiseitigem t-Test ermittelt).

4.1.2 Charakterisierung der Zelllinien hinsichtlich ihrer Wachstumsantworten auf die Behandlungen mit Dihydrotestosteron und 17β -Östradiol

Die Behandlung mit endogenen Steroidhormonen diente dem Vergleich der Zelllinien sowie der Überprüfung der Versuchsbedingungen und sollte insbesondere die Detektierbarkeit wachstumsfördernder Aktivitäten sicherstellen. Ein sicheres Feststellen oder Ausschließen solcher Effekte nach den Behandlungen mit Isoflavonoiden wird maßgebend für die Beurteilung ihrer biologischen Aktivitäten sein und darüber hinaus wichtige Erkenntnisse über eine mögliche Vermittlung von unerwünschten Wachstumsvorteilen in Tumorzellen liefern.

Die Inkubation mit 17β -Östradiol hatte keine Stimulation des Wachstums in LAPC-4 Zellen zur Folge. Konzentrationen von 20 - 80 μM verminderten das Zellwachstum (Abbildung 9a). Im Gegensatz dazu führte die Behandlung von LNCaP Zellen in einem

Konzentrationsbereich von 1 nM - 1 μ M zu einem Anstieg des Wachstums um bis zu 94 %. Dieser wachstumsfördernde Effekt verminderte sich ab einer Konzentration von 5 μ M. Das Zellwachstum fiel jedoch nicht signifikant unter das der Kontrollzellen.

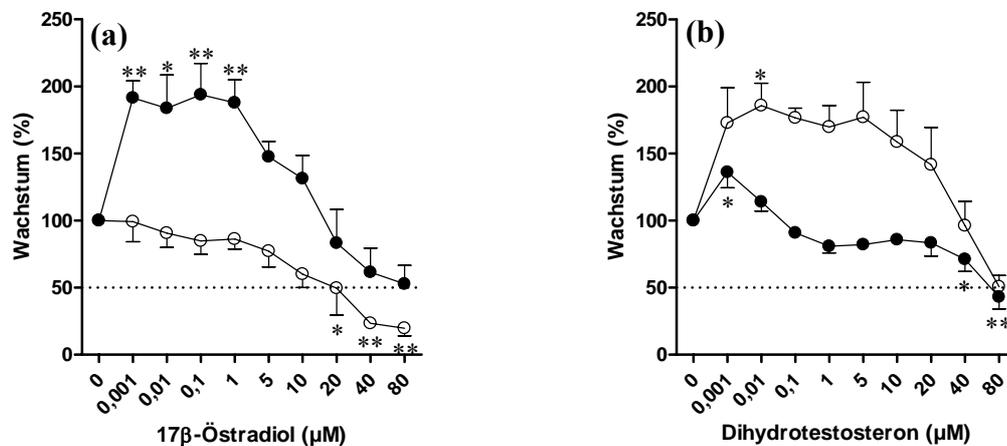


Abbildung 9: Wachstumsantworten von LNCaP Zellen (schwarz) und LAPC-4 Zellen (weiß) auf die Behandlungen mit 17 β -Östradiol (a) und Dihydrotestosteron (b). Die Zellen wurden für 96 h mit den Testsubstanzen inkubiert. Anschließend wurde das Wachstum über die Messung des DNA-Gehaltes bestimmt. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte \pm SEM und entsprechen dem relativen Wachstum, bezogen auf die Kontrolle 0,1 % DMSO (0 μ M). Die Signifikanz wurde im Vergleich zur Kontrolle getestet (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; One-way ANOVA, Dunnett's Posttest, $n \geq 3$).

Dihydrotestosteron verstärkte das Wachstum von LAPC-4 Zellen um 86 % (bei 10 nM). Eine signifikante Wachstumshemmung wurde nicht beobachtet (Abbildung 9b). Das Wachstum von LNCaP Zellen verstärkte sich durch 1 nM Dihydrotestosteron um 36 %. Konzentrationen von 40 - 80 μ M hemmten dagegen das Wachstum dieser Zellen.

4.1.3 Effekte von Genistein und dessen Darmmetaboliten auf das Zellwachstum

Genistein verminderte das Wachstum von LAPC-4 Zellen ab einer Konzentration von 20 μ M und das von LNCaP Zellen ab 10 μ M (Abbildung 10a). Das Ausmaß dieser Wachstumshemmung war in beiden Zelllinien vergleichbar, wie die mittels nicht-linearer Regression ermittelten IC₅₀-Werte von 39,3 μ M (LAPC-4) und 39,7 μ M (LNCaP) verdeutlichen.

Dihydrogenistein beeinflusste das Wachstum von keiner der beiden Zelllinien (Abbildung 10b). Bei einer Konzentration von 80 μ M verminderte 6'-Hydroxy-O-

DMA das Wachstum von LNCaP Zellen um 38 %. Ein signifikanter Einfluss auf das Wachstum von LAPC-4 Zellen wurde nicht ermittelt (**Abbildung 10c**). Weder Genistein noch Dihydrogenistein oder Hydroxy-*O*-DMA förderten das Wachstum der beiden Zelllinien.

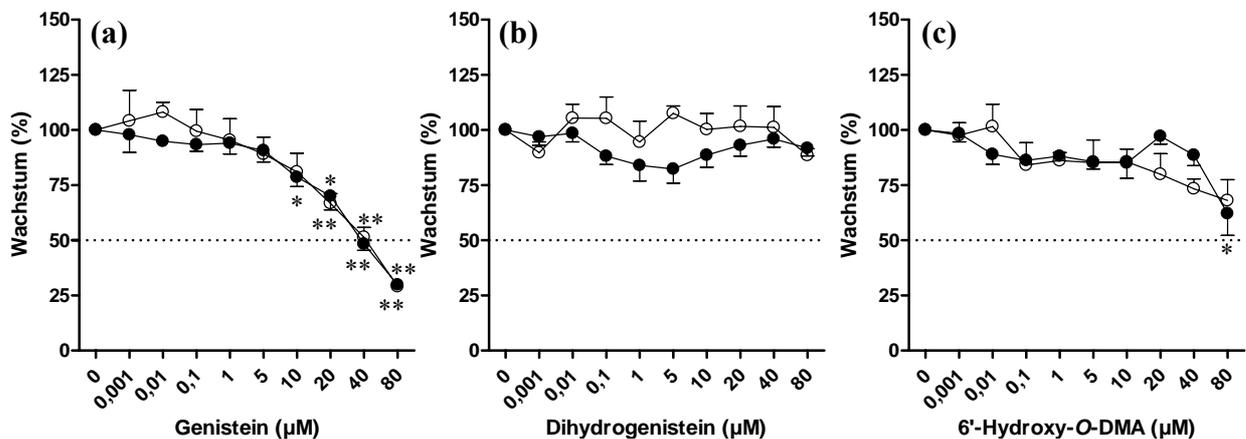


Abbildung 10: Wachstumsantworten von LNCaP Zellen (schwarz) und LAPC-4 Zellen (weiß) auf die Behandlungen mit Genistein (a) und seinen reduktiven Metaboliten Dihydrogenistein (b) und 6'-Hydroxy-*O*-DMA (c). Die Zellen wurden für 96 h mit den Testsubstanzen inkubiert. Anschließend wurde das Wachstum über die Messung des DNA-Gehaltes bestimmt. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte \pm SEM und entsprechen dem relativen Wachstum, bezogen auf die Kontrolle 0,1 % DMSO (0 μM). Die Signifikanz wurde im Vergleich zur Kontrolle getestet (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; One-way ANOVA, Dunnett's Posttest, $n \geq 3$).

4.1.4 Effekte von Daidzein und dessen Darmmetaboliten auf das Zellwachstum

Nach der Inkubation mit 40 - 80 μM Daidzein verminderte sich das Wachstum von LAPC-4 Zellen um bis zu 47 %. In LNCaP Zellen führte eine Konzentration von 80 μM Daidzein zu einer Wachstumshemmung um 36 % (**Abbildung 11a**). Das Ausmaß der Effekte erlaubte jedoch keine Ermittlung von IC_{50} -Werten.

Dihydrodaidzein nahm keinen Einfluss auf das Zellwachstum (**Abbildung 11b**). Ab einer Konzentration von 20 μM verminderte *O*-DMA das Wachstum von LAPC-4 Zellen ($\text{IC}_{50} = 45,2 \mu\text{M}$). Effekte auf das Wachstum von LNCaP Zellen wurden dagegen nicht beobachtet (**Abbildung 11c**). Equol hemmte das Wachstum von LAPC-4 Zellen ab 5 μM ($\text{IC}_{50} = 35,1 \mu\text{M}$) und das von LNCaP Zellen ab 10 μM ($\text{IC}_{50} = 53,8 \mu\text{M}$)

(Abbildung 11d). Weder Daidzein noch Dihydrodaidzein, O-DMA oder Equol fördern das Zellwachstum der beiden Zelllinien.

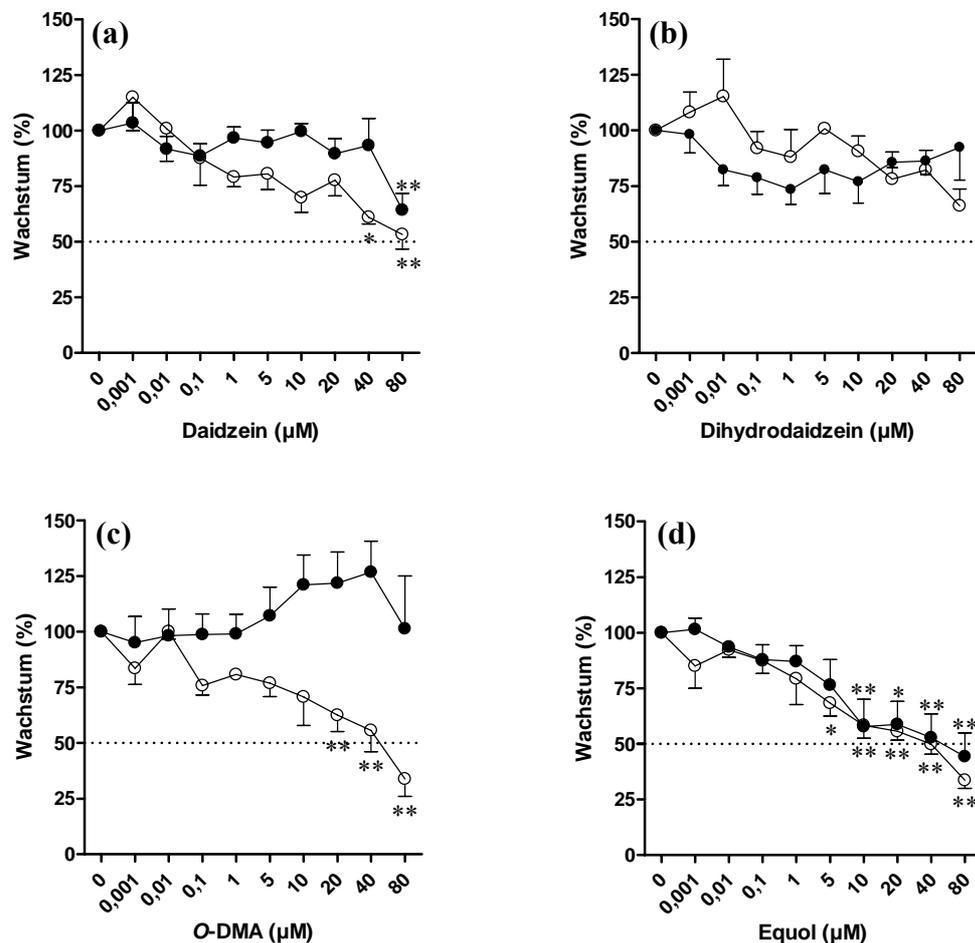


Abbildung 11: Wachstumsantworten von LNCaP Zellen (schwarz) und LAPC-4 Zellen (weiß) auf die Behandlungen mit Daidzein (a) und seinen reduktiven Metaboliten Dihydrodaidzein (b), O-DMA (c) und Equol (d). Die Zellen wurden für 96 h mit den Testsubstanzen inkubiert. Anschließend wurde das Wachstum über die Messung des DNA-Gehaltes bestimmt. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte \pm SEM und entsprechen dem relativen Wachstum, bezogen auf die Kontrolle 0,1 % DMSO (0 μ M). Die Signifikanz wurde im Vergleich zur Kontrolle getestet (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; One-way ANOVA, Dunnett's Posttest, $n \geq 3$).

Equol besitzt ein chirales Zentrum und kann in R- oder S-Konformation vorliegen. Die zuvor erwähnten Untersuchungen wurden mit einem Razemat durchgeführt (enthielt die beiden Enantiomere in einem Verhältnis von 1:1), da anfänglich nur dieses verfügbar war. Im menschlichen Darmflora bildet jedoch ausschließlich S-Equol (Setchell *et al.*, 2005). Versuche mit diesem physiologisch-relevanten Enantiomer wurden zu einem späteren Zeitpunkt ermöglicht. Hierbei wurden die beiden Equol-Präparate (Razemat

und S-Equol) hinsichtlich ihrer Wirkungen auf das Wachstum der beiden Zelllinien miteinander verglichen. Diese Untersuchungen sollten also Erkenntnisse über den Einfluss der Stereoisomerie auf die biologische Aktivität von Equol in Prostatazellen liefern.

S-Equol verminderte das Wachstum von LAPC-4 Zellen ab einer Konzentration von 2,5 μM (bei 20 μM um 43 %). In LNCaP Zellen wurde eine Hemmung ab 10 μM (bei 20 μM um 23 %) ermittelt (**Abbildung 12a**). Das Razemat führte zu vergleichbaren Effekten und reduzierte das Wachstum von LAPC-4 Zellen ab 5 μM (bei 20 μM um 42 %). In LNCaP Zellen verminderte sich das Wachstum bei einer Konzentration von 20 μM um 18 % (**Abbildung 12b**). IC_{50} -Werte konnten aufgrund des eingeschränkten Konzentrationsbereiches (bis 20 μM , vgl. Kap. 3.1.2) nicht ermittelt werden. Keines der beiden Equol-Präparate förderte das Wachstum der Zelllinien.

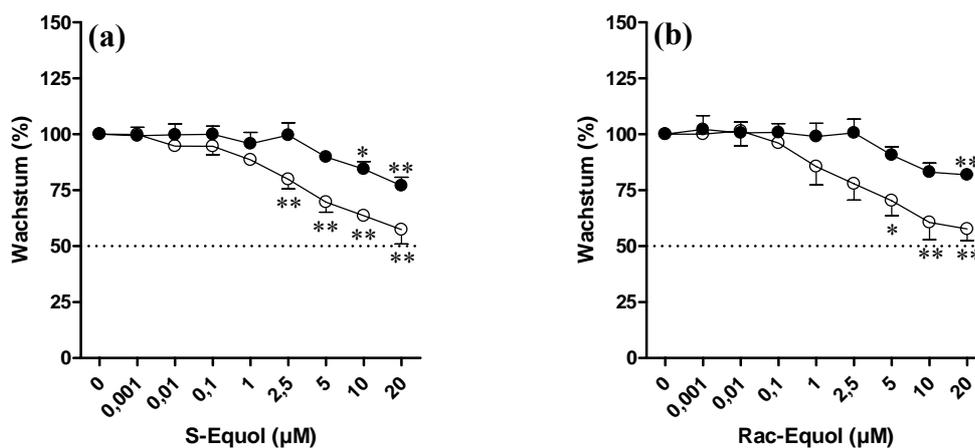


Abbildung 12: Wachstumsantworten von LNCaP Zellen (schwarz) und LAPC-4 Zellen (weiß) auf die Behandlungen mit S-Equol (a) und racemischem (Rac-) Equol (b). Die Zellen wurden für 96 h mit den Testsubstanzen inkubiert. Anschließend wurde das Wachstum über die Messung des DNA-Gehaltes bestimmt. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte \pm SEM und entsprechen dem relativen Wachstum, bezogen auf die Kontrolle, 0,2 % DMSO (0 μM). Die Signifikanz wurde im Vergleich zur Kontrolle getestet (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; One-way ANOVA, Dunnett's Posttest, $n \geq 3$).

4.1.5 Effekte der synthetischen Isoflavonoid-Gemische auf das Zellwachstum

Die gleichzeitige Behandlung mit mehreren Isoflavonoiden stellt eine Annäherung an die Exposition *in vivo* dar. Das hierfür verwendete Gemisch bestand aus 64 % Genistein, 29 % Daidzein und 7 % Equol. Die Verhältnisse der Isoflavonoide zueinander wurden aus in der Literatur beschriebenen Konzentrationen im menschlichen Blut abgeleitet (siehe Kap. 3.1.2). Aufgrund der erwähnten Chiralität von Equol wurden zwei Gemische hergestellt, die jeweils eines der beiden Equol-Präparate enthielten (Mix R mit racemischen Equol, Mix S mit S-Equol).

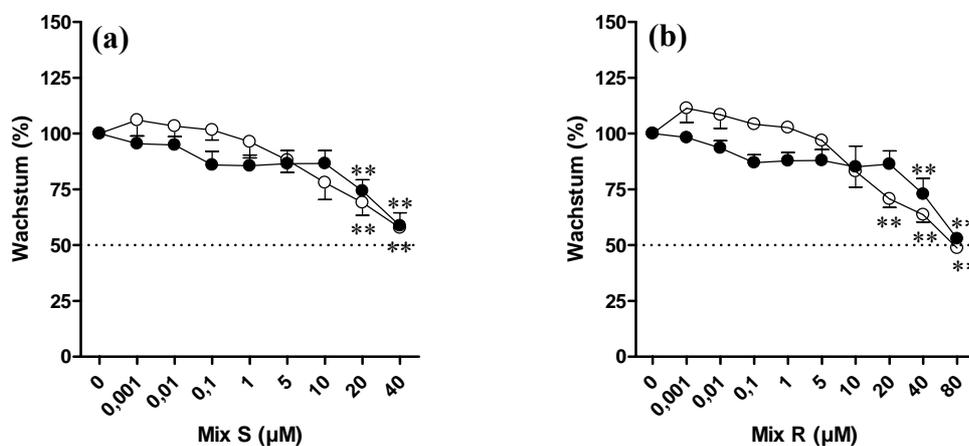


Abbildung 13: Wachstumsantworten von LNCaP Zellen (schwarz) und LAPC-4 Zellen (weiß) auf die Behandlungen mit Mix S (a) und Mix R (b). Die Zellen wurden für 96 h mit den Substanzgemischen inkubiert. Anschließend wurde das Wachstum über die Messung des DNA-Gehaltes bestimmt. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte \pm SEM und entsprechen dem relativen Wachstum, bezogen auf die Kontrolle 0,1 % DMSO (0 μM). Die Signifikanz wurde im Vergleich zur Kontrolle getestet (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; One-way ANOVA, Dunnett's Posttest, $n \geq 3$).

Ab einer Konzentration von 20 μM verminderte Mix S das Wachstum von sowohl LAPC-4 (max. 42 % bei 40 μM) als auch LNCaP Zellen (max. 41 % bei 40 μM). Diese Effekte erlaubten jedoch keine Bestimmung von IC_{50} -Werten (**Abbildung 13a**). Der Mix R verminderte das Wachstum von LAPC-4 Zellen ab 20 μM ($\text{IC}_{50} = 62,0 \mu\text{M}$). In LNCaP Zellen wirkten Konzentrationen ab 40 μM wachstumshemmend (max. 47 % bei 80 μM), wobei dies keine Bestimmung von IC_{50} -Werten erlaubte (**Abbildung 13b**). Keines der beiden Gemische verstärkte das Wachstum der Zelllinien.

4.2 Effekte von Isoflavonoiden auf die Mitochondrienaktivität

Zur Abgrenzung der ermittelten antiproliferativen Aktivitäten von zytotoxischen Effekten wurden die beiden Prostatazelllinien in diesem Kapitel mit Isoflavonoiden inkubiert und anschließend – mit Hilfe des MTT-Assays – auf eine mögliche Beeinflussung ihrer Mitochondrienaktivität hin untersucht. Die hierfür gewählte Inkubationszeit von 24 h liegt deutlich unterhalb der ermittelten Verdopplungszeiten der beiden Zelllinien. Ein substantieller proliferativer Einfluss auf die untersuchte Mitochondrienaktivität wurde so vermieden.

4.2.1 Charakterisierung der Zelllinien hinsichtlich ihrer Mitochondrienaktivitäten nach Androgen- und Östrogenbehandlung

17 β -Östradiol verminderte die Mitochondrienaktivität in LAPC-4 Zellen in einem Konzentrationsbereich von 5 - 20 μ M um bis zu 21 %. In LNCaP Zellen ergab sich dagegen keine Modulation (**Abbildung 14a**). Eine Behandlung mit Dihydrotestosteron führte zu keiner signifikanten Beeinflussung der Mitochondrienaktivitäten beider Zelllinien. Lediglich 80 μ M führten zu einer tendenziellen Abnahme der Aktivität in LNCaP Zellen (**Abbildung 14b**).

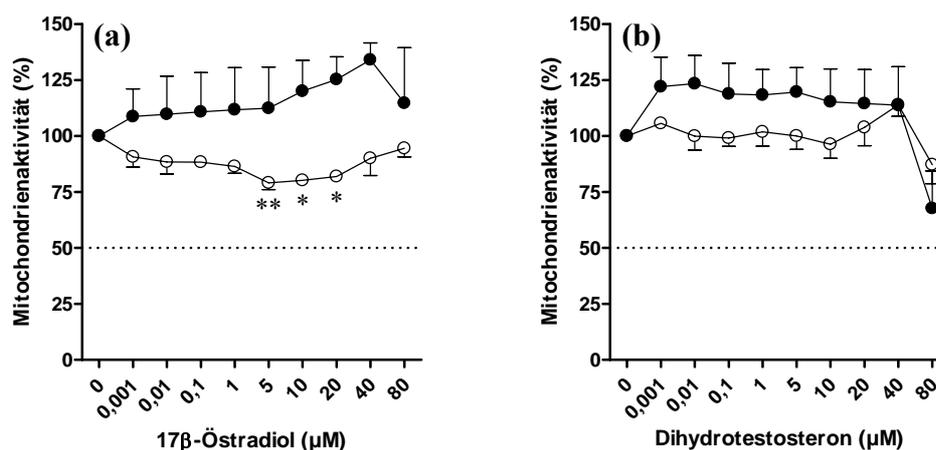


Abbildung 14: Mitochondrienaktivitäten von LNCaP Zellen (schwarz) und LAPC-4 Zellen (weiß) nach Behandlungen mit 17 β -Östradiol (a) und Dihydrotestosteron (b). Die Zellen wurden für 24 h mit den Testsubstanzen inkubiert. Die Mitochondrienaktivität wurde über die Bildung des MTT-Formazansalzes bestimmt. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte \pm SEM und entsprechen der relativen Mitochondrienaktivität, bezogen auf die Kontrolle 0,1 % DMSO (0 μ M). Die Signifikanz wurde im Vergleich zur Kontrolle getestet (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; One-way ANOVA, Dunnett's Posttest, $n \geq 3$).

4.2.2 Effekte ausgewählter Isoflavonoide auf die Mitochondrienaktivität

Auf der Grundlage der Ergebnisse des DAPI-Assays (siehe Kapitel. 4.1.3 – 4.1.5) erfolgte eine Vorauswahl von biologisch-aktiven Isoflavonoiden, die nun im dem MTT-Assay untersucht wurden (Genistein, O-DMA, razemisches Equol und S-Equol). Die Behandlungen erfolgten im gleichen Konzentrationsbereich wie zuvor im DAPI-Assay. Keine der Substanzen beeinflusste die mitochondriale Aktivität von LNCaP oder LAPC-4 Zellen signifikant (**Abbildung 15**).

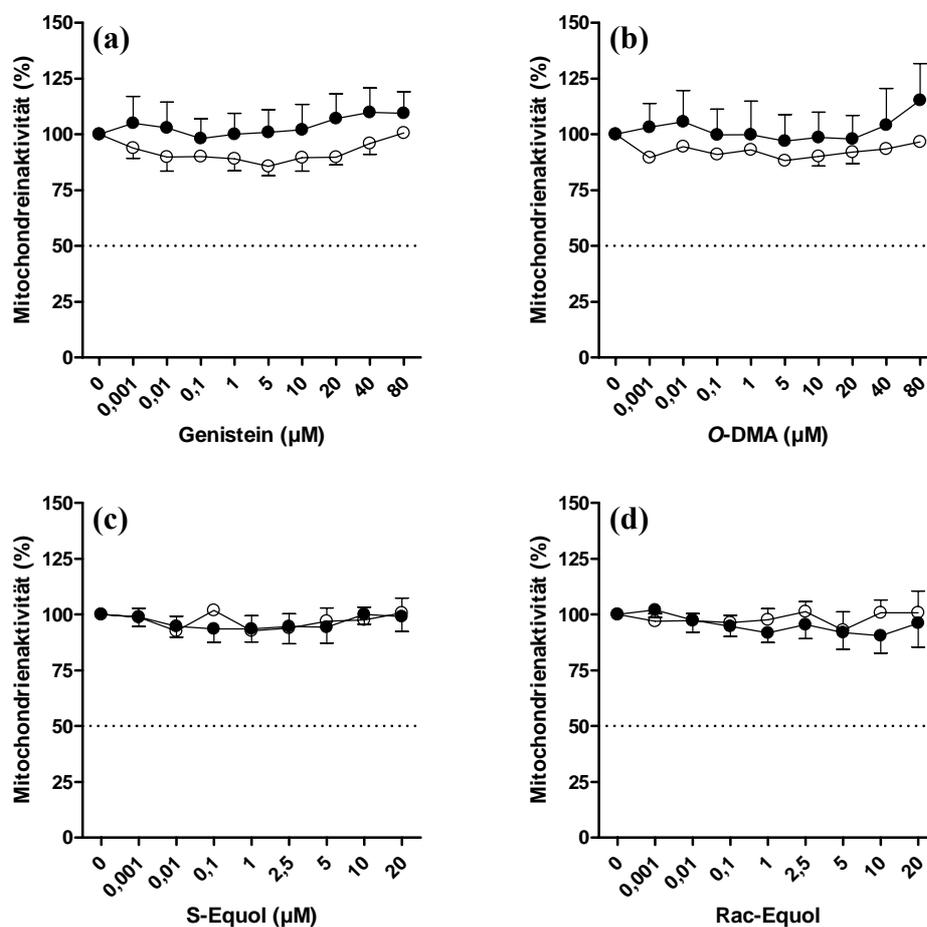


Abbildung 15: Mitochondrienaktivitäten von LNCaP Zellen (schwarz) und LAPC-4 Zellen (weiß) nach Behandlungen mit den Isoflavonoiden Genistein (a), O-DMA (b) sowie S-Equol (c) und razemischem (Rac-) Equol (d). Die Zellen wurden für 24 h mit den Testsubstanzen inkubiert. Die Mitochondrienaktivität wurde über die Bildung des MTT-Formazansalzes bestimmt. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte \pm SEM und entsprechen der relativen Mitochondrienaktivität, bezogen auf die Kontrolle 0,1 % (a, b) bzw. 0,2 % (c, d) DMSO (0 μ M). Die Signifikanz wurde im Vergleich zur Kontrolle getestet (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; One-way ANOVA, Dunnett's Posttest, $n \geq 3$).

4.2.3 Effekte synthetischer Isoflavonoid-Gemische auf die Mitochondrienaktivität

Auch die beiden Isoflavonoid-Gemische wurden hinsichtlich ihres Einflusses auf die Mitochondrienaktivität untersucht. In LAPC-4 Zellen führten 40 μM Mix S zu einem Anstieg der Mitochondrienaktivität um 16 %. Effekte auf die Mitochondrienaktivität von LNCaP Zellen wurden dagegen nicht beobachtet (**Abbildung 16a**). Konzentrationen von 1 μM und 5 μM Mix R verminderten die Mitochondrienaktivität von LNCaP Zellen um bis zu 13 %. Mix R hatte jedoch keinen Einfluss auf die Mitochondrienaktivität von LAPC-4 Zellen. (**Abbildung 16 b**).

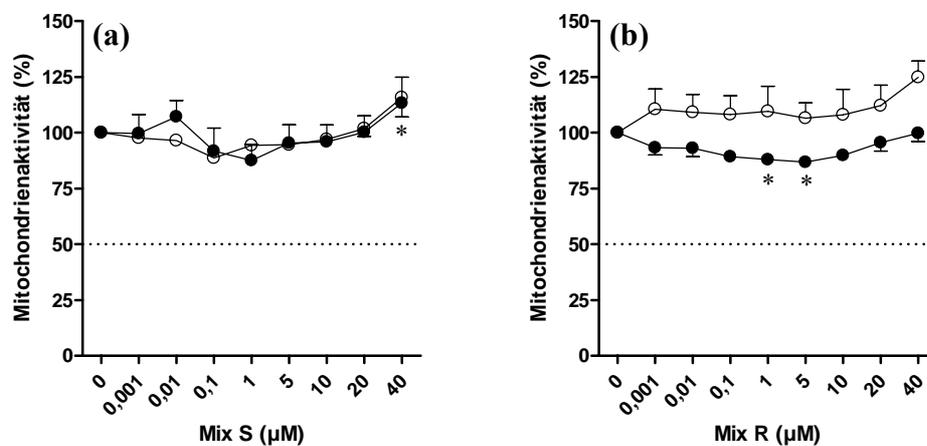


Abbildung 16: Mitochondrienaktivitäten von LNCaP Zellen (schwarz) und LAPC-4 Zellen (weiß) nach Behandlungen mit Mix S (a) und Mix R (b). Die Zellen wurden für 24 h mit den Substanzgemischen inkubiert. Die Mitochondrienaktivität wurde über die Bildung des MTT-Formazansalzes bestimmt. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte \pm SEM und entsprechen der relativen Mitochondrienaktivität, bezogen auf die Kontrolle 0,1 % DMSO (0 μM). Die Signifikanz wurde im Vergleich zur Kontrolle getestet (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; One-way ANOVA, Dunnett's Posttest, $n \geq 3$).

4.3 Effekte von Isoflavonoiden auf die DNA-Integrität

Der Comet Assay detektiert DNA-Strangbrüche in Einzelzellen und wurde hier verwendet, um die Isoflavonoide hinsichtlich ihres genotoxischen aber auch antigenotoxischen Potentials zu untersuchen. Der Assay lässt keine Aussagen über die Mutagenität der Testsubstanzen zu, er liefert jedoch wichtige Erkenntnisse über eine möglicherweise gleichsam schädliche Beeinträchtigung der DNA-Integrität (Collins *et al.*, 1997)

4.3.1 Charakterisierung der Zelllinien hinsichtlich der Induktion von DNA-Schäden durch Androgen- und Östrogenbehandlung

17 β -Östradiol erhöhte in LNCaP Zellen die Basalrate an DNA-Schäden gegenüber der Kontrolle um 78 % ($p < 0,001$). Dihydrotestosteron führte in diesen Zellen tendenziell zu einem Anstieg um 58 %. Dieser Effekt verfehlte jedoch ein signifikantes Niveau ($p = 0,051$). In LAPC-4 Zellen erhöhte 17 β -Östradiol das Ausmaß von DNA-Strangbrüchen um 71 % ($p = 0,029$). Eine Behandlung dieser Zellen mit Dihydrotestosteron hatte eine Zunahme der DNA-Schäden um 36 % ($p = 0,013$) zur Folge (**Tabelle 4**).

Tabelle 4

Wirkung der Steroidhormone auf die DNA-Integrität

| Hormone | LNCaP | | LAPC-4 | |
|-----------------------|---------------------|------------------|---------------|-------|
| | TI (%) ^a | p ^b | TI (%) | p |
| DMSO ^c | 5,0 \pm 0,4 | | 5,6 \pm 0,1 | |
| 17 β -Östradiol | 8,9 \pm 0,1 | <0,001 | 9,6 \pm 1,4 | 0,029 |
| Dihydrotestosteron | 7,9 \pm 1,1 | 0,051 | 7,6 \pm 0,6 | 0,013 |

^a TI (Tail Intensity): Mittelwerte \pm SEM in Prozent DNA im Kometenschweif; bestimmt mittels Comet Assay nach 60 min Behandlung mit 80 μ M.

^b p -Werte stammen aus ungepaartem zweiseitigem t -Test durch Vergleich des jeweiligen Hormons mit der Lösungsmittelkontrolle ($n = 4$)

^c Lösungsmittelkontrolle (0,1 % DMSO)

4.3.2 Effekte der Isoflavonoide auf die Rate an DNA-Schäden

Im Gegensatz zu den beiden endogenen Steroidhormonen Dihydrotestosteron und 17 β -Östradiol führten weder die Soja-Isoflavonoide Genistein und Daidzein noch ihre reduktiven Metabolite zu einem signifikanten Anstieg der Basisrate an DNA-Strangbrüchen, weder in LNCaP noch LAPC-4 Zellen (**Tabelle 5**).

Tabelle 5

Wirkung der Isoflavonoide auf die DNA-Integrität

| Isoflavone | LNCaP | | LAPC-4 | |
|---------------------------|---------------------|-----------------------|-----------|----------|
| | TI (%) ^a | <i>p</i> ^b | TI (%) | <i>p</i> |
| DMSO ^c | 4,8 ± 0,4 | | 4,3 ± 0,3 | |
| Genistein | 7,3 ± 2,3 | 0,343 | 5,9 ± 1,7 | 0,410 |
| Dihydrogenistein | 6,2 ± 1,4 | 0,396 | 5,1 ± 0,7 | 0,324 |
| 6'-Hydroxy- <i>O</i> -DMA | 6,1 ± 1,7 | 0,521 | 4,4 ± 0,5 | 0,873 |
| Daidzein | 4,6 ± 0,5 | 0,770 | 4,1 ± 0,6 | 0,762 |
| Dihydrodaidzein | 4,5 ± 0,5 | 0,726 | 3,9 ± 0,4 | 0,510 |
| <i>O</i> -DMA | 4,9 ± 0,7 | 0,884 | 4,5 ± 0,5 | 0,715 |
| Equol | 5,3 ± 0,3 | 0,383 | 4,4 ± 0,4 | 0,745 |

^a TI (Tail Intensity): Mittelwerte ± SEM in Prozent DNA im Kometenschweif; bestimmt mittels Comet Assay nach 60 min Behandlung mit 80 µM.

^b *p*-Werte stammen aus ungepaartem zweiseitigem *t*-Test durch Vergleich des jeweiligen Isoflavonoids mit der Lösungsmittelkontrolle (n = 3)

^c Lösungsmittelkontrolle (0,1 % DMSO)

4.3.3 Effekte von Genistein auf das Ausmaß der durch oxidativen Stress induzierten DNA-Schäden

Da sich kein genotoxisches Potential der Isoflavonoide in Prostatazellen ergab, folgten in diesem Kapitel weitere Versuche, mit dem Ziel, mögliche antigenotoxischen Effekte des mengenmäßig bedeutendsten Isoflavonoids Genistein zu bestimmen. Zu diesem Zweck wurde in Prostatazellen oxidativer Stress induziert, welcher einen deutlichen Anstieg von DNA-Strangbrüchen zur Folge hat. Mit diesem Modell sollte eine – mit dem Risikofaktor Alter einhergehende – Zunahme von oxidativem Stress und dessen Folgen für die DNA-Integrität von Prostatazellen simuliert werden. Die Induktion von DNA-Schäden erfolgte über die beiden physiologisch-relevanten Oxidantien H₂O₂ und Hämoglobin (komplexierte Eisenionen), die in Zellen zur Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) führen (Henle & Linn, 1997) und bereits erfolgreich *in vitro* zur Induktion von DNA-Strangbrüchen eingesetzt wurden (Glei *et al.*, 2002). Zunächst wurden LNCaP und LAPC-4 Zellen jedoch hinsichtlich ihrer Empfindlichkeit gegenüber oxidativem Stress miteinander verglichen.

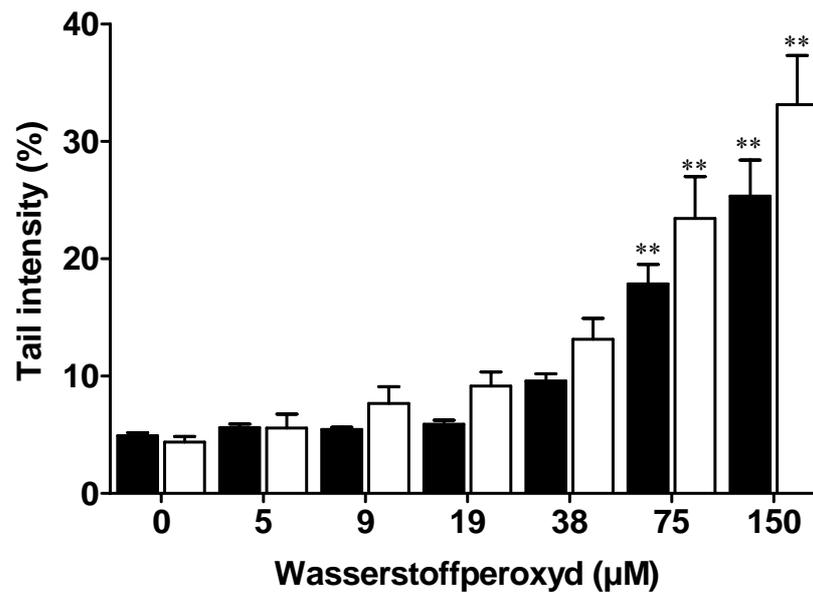


Abbildung 17: Vergleich der Empfindlichkeiten von LNCaP Zellen (schwarz) und LAPC-4 Zellen (weiß) gegenüber H_2O_2 -induzierten DNA-Schäden. Die Zellen wurden für 5 min bei 4 °C mit 5 - 150 μM H_2O_2 bzw. zur Kontrolle mit PBS (0 μM) behandelt. Anschließend erfolgte die Bestimmung der Rate an DNA-Strangbrüchen mit Hilfe des alkalischen Comet Assays. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte \pm SEM und entsprechen dem relativen Fluoreszenzsignal der in den Kometenschweif migrierten (und damit geschädigten) DNA bezogen auf das Gesamtfluoreszenzsignal. Die Signifikanz wurde im Vergleich zur Kontrolle (0 μM) getestet (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; One-way ANOVA, Dunnett's Posttest, $n=3$). Der Vergleich der Zelllinien miteinander erfolgte mittels Two-way ANOVA und Bonferroni's Posttest, $n=3$).

4.3.4 Charakterisierung der Zelllinien bezüglich ihrer relativen Empfindlichkeit gegenüber oxidativem Stress

Konzentration von 75 - 150 μM H_2O_2 induzierten in beiden Zelllinien deutlich DNA-Strangbrüche. Dabei wiesen LAPC-4 Zellen eine tendenziell höhere Empfindlichkeit gegenüber H_2O_2 auf (**Abbildung 17**). Der statistische Vergleich der beiden Dosis-Wirkungs-Beziehungen ergab jedoch keinen signifikanten Unterschied zwischen den Zelllinien. Für alle weiteren Untersuchungen wurde deshalb eine identische Empfindlichkeit der beiden Zelllinien gegenüber oxidativem Stress angenommen.

4.3.5 Effekte von Genistein auf das Ausmaß wasserstoffperoxyd-induzierter DNA-Schäden

Um einen vergleichbaren oxidativen Angriff in allen Zellen zu gewährleisten, erfolgte die Induktion von DNA-Schäden in diesem Kapitel, indem die Zellen in ein H₂O₂-Bad getaucht wurden. So wurde ein – mit der effektiv-genotoxischen Konzentration 75 µM H₂O₂ aus Kapitel 4.3.4 – vergleichbares Ausmaß an DNA-Schäden bereits mit 19 µM H₂O₂ erreicht und deshalb im Folgenden verwendet.

Die 60 min Vorinkubation mit 1 µM Genistein verminderte das Ausmaß H₂O₂-induzierter DNA-Schäden in LAPC-4 Zellen um 36 %. Konzentrationen von 10 - 30 µM hatten dagegen keinen Effekt (**Abbildung 18a**). In LNCaP Zellen reduzierten 0,1 µM und 1 µM Genistein das Ausmaß H₂O₂-induzierter DNA-Schäden um 26 % bzw. 32 %. Ab einer Konzentration von 10 µM verminderte sich dieser Effekt und verschwand bei 30 µM vollständig (**Abbildung 18b**). Ohne die anschließende Behandlung mit H₂O₂ beeinflusste Genistein weder die Basalrate an DNA-Schäden (**Abbildung 18**), noch die Zellvitalität im Trypanblau-Test (Daten nicht gezeigt).

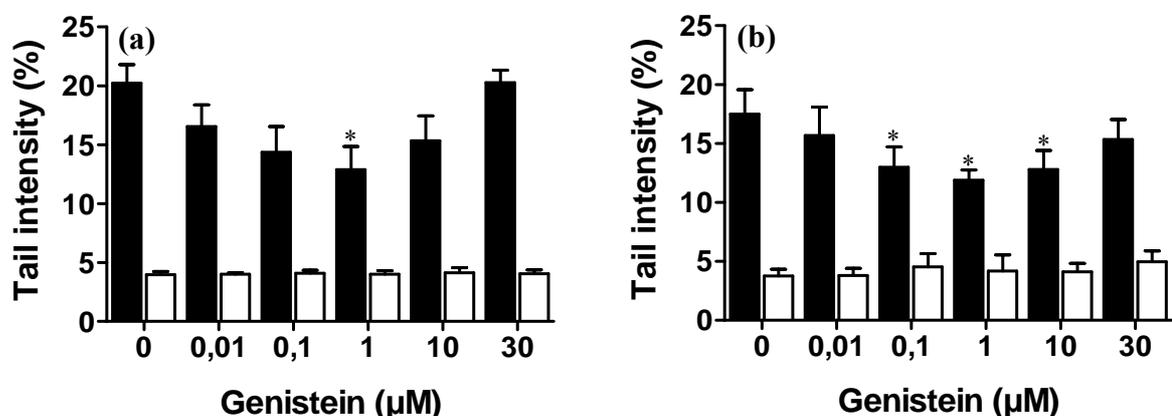


Abbildung 18: Effekt einer 60 min Inkubation mit Genistein auf das Ausmaß H₂O₂-induzierter DNA-Schäden in LAPC-4 (a) und LNCaP Zellen (b). Die Zellen wurden für 60 min bei 37 °C mit 0,01 - 30 µM Genistein vorinkubiert und anschließend für 5 min bei 4 °C mit 19 µM H₂O₂ behandelt (schwarze Säulen). Ein Teil der vorinkubierten Zellen wurden zur Kontrolle nicht mit H₂O₂ behandelt (weiße Säulen). Die Bestimmung der DNA-Strangbrüche erfolgte mit Hilfe des alkalischen Comet Assays. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte ± SEM und entsprechen dem relativen Fluoreszenzsignal der in den Kometenschweif migrierten und damit geschädigten DNA bezogen auf das Gesamtfluoreszenzsignal. Die Signifikanz wurde im Vergleich zur Kontrolle 0,1 % DMSO (0 µM) getestet (* p < 0,05; ** p < 0,01; One-way ANOVA, Dunnett's Posttest, n ≥ 3).

Um einen möglichen Einfluss der Inkubationsdauer auf diesen antigenotoxischen Effekt festzustellen, wurden LAPC-4 Zellen zusätzlich für 24 h mit Genistein vorinkubiert. In diesem Versuch verminderten 1 - 30 μM Genistein das Ausmaß H_2O_2 -induzierter DNA-Schäden ($\text{IC}_{50} = 16,7 \mu\text{M}$). Die Vorinkubation mit Genistein führte weder zu einer Induktion von DNA-Strangbrüchen (**Abbildung 19**), noch zu einem Abfall der Zellvitalität (Daten nicht gezeigt).

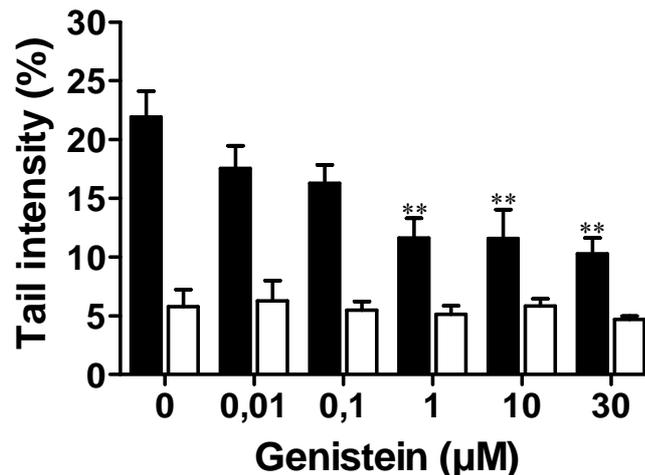


Abbildung 19: Effekt einer 24 h Vorinkubation mit Genistein auf das Ausmaß H_2O_2 -induzierter DNA-Schäden in LAPC-4 Zellen. Die Zellen wurden für 24 h bei 37 °C mit 0,01 - 30 μM Genistein vorinkubiert und anschließend für 5 min bei 4 °C mit 19 μM H_2O_2 behandelt (schwarze Säulen). Ein Teil der vorinkubierten Zellen wurde zur Kontrolle nicht mit H_2O_2 behandelt (weiße Säulen). Die Bestimmung der DNA-Strangbrüche erfolgte mit Hilfe des alkalischen Comet Assays. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte \pm SEM und entsprechen dem relativen Fluoreszenzsignal der in den Kometenschweif migrierten und damit geschädigten DNA bezogen auf das Gesamtfluoreszenzsignal. Die Signifikanz wurde im Vergleich zur Kontrolle 0,1 % DMSO (0 μM) getestet (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; One-way ANOVA, Dunnett's Posttest, $n=3$).

4.3.6 Effekte von Genistein auf das Ausmaß hämoglobin-induzierter DNA-Schäden

Die zuvor ermittelten antigenotoxischen Aktivitäten von Genistein wurden anhand einer weiteren Quelle des oxidativen Stresses überprüft. Hierfür wurden LAPC-4 Zellen für 60 min mit 1 μM Genistein oder der Lösungsmittelkontrolle (0,1 % DMSO) vorinkubiert. Im Anschluss erfolgte eine Induktion von oxidativem Stress mit Hilfe von

Hämoglobin. Die hier eingesetzte Genistein-Konzentration entwickelte nach 60 min im vorangegangenen Kapitel die deutlichste antigenotoxische Wirkung. Lediglich bei 1000 μM Hämoglobin wurde eine signifikante Induktion DNA-Schäden ermittelt. Diese wurden durch 1 μM Genistein um 33 % reduziert (**Abbildung 20**).

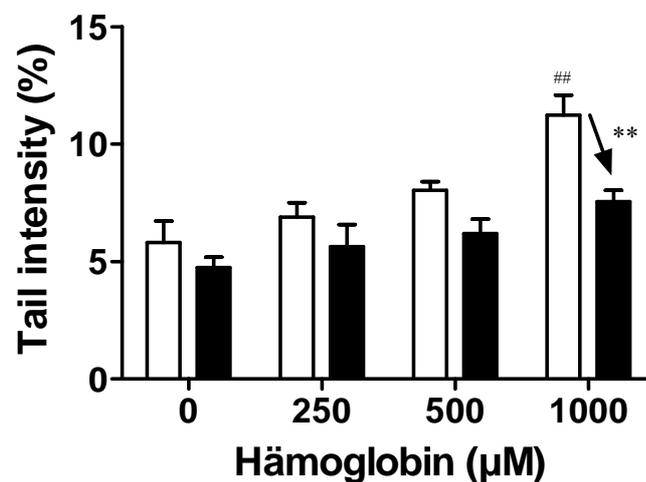


Abbildung 20: Effekt von Genistein auf das Ausmaß hämoglobin-induzierter DNA-Schäden in LAPC-4 Zellen. Die Zellen wurden für 60 min bei 37 °C mit 1 μM Genistein (schwarze Säulen) oder 0,1 % DMSO (weiße Säulen) vorinkubiert und anschließend für 15 min bei 37 °C mit 250 - 1000 μM Hämoglobin oder zur Kontrolle mit RPMI-1640 (0 μM) behandelt. Die Detektion der DNA-Strangbrüche erfolgte mit Hilfe des alkalischen Comet Assays. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte \pm SEM und entsprechen dem relativen Fluoreszenzsignal der in den Kometenschweif migrierten und damit geschädigten DNA bezogen auf das Gesamtfluoreszenzsignal. Die Signifikanz der Hämoglobinschädigung wurde im Vergleich zur RPMI-Kontrolle (0 μM) getestet (^{##} $p < 0,01$; One-way ANOVA, Dunnett's Posttest, $n = 3$). Der Einfluss der Genistein-Behandlung wurde im Vergleich zur DMSO-Kontrolle getestet (^{**} $p < 0,01$; Two-way ANOVA, Bonferroni's Posttest, $n = 3$).

4.4 Effekte von Genistein auf die Gen- und Proteinexpression

Die ermittelten antigenotoxischen Effekte von Genistein werden möglicherweise über dessen Einfluss auf die Expression antioxidativer Enzymsysteme vermittelt. Deshalb erfolgten in diesem Abschnitt Untersuchungen mit dem Ziel, mögliche Effekte auf die Expression solcher Gene zu identifizieren, wobei ein besonderes Augenmerk auf den Enzymsystemen lag, die unter mechanistischen Gesichtspunkten eine potentieller Bedeutung für die ermittelten antigenotoxischen Eigenschaften von Genistein besitzen.

Tabelle 6

Multiple Genexpressionsanalyse nach Behandlung mit 1 μ M Genistein^a

| Spotname | Kontrolle ^b | Behandlung | <i>p</i> ^c |
|---|------------------------|----------------|---------------------------------|
| MYST Histon-Acetyltransferase 2 | 72,8 \pm 4,6 | 52,4 \pm 5,4 | 0,008 \downarrow ^d |
| Schadenspezifisches DNA-Bindungsprotein 1 | 31,0 \pm 3,2 | 24,0 \pm 2,8 | 0,046 \downarrow |
| Nicotinamid-N-Methyltransferase | 28,0 \pm 2,3 | 19,1 \pm 3,1 | 0,016 \downarrow |

^a cDNA Makroarray-Analyse (HS11 und HS12) in LAPC-4 Zellen nach 24 h Inkubation mit 1 μ M Genistein (Behandlung) oder 0,1 % DMSO (Kontrolle)

^b Normalisierte Mittelwerte \pm SD der Chemilumineszenzsignale der einzelnen Spots

^c *p*-Werte stammen aus zweiseitigem ungepaartem *t*-Test durch Vergleich von Behandlung und Kontrolle (n = 3).

^d Richtung des Effekts (\uparrow , Hochregulation; \downarrow , Runterregulation)

4.4.1 Effekte von Genistein auf die Expression von Genen der Biotransformation und Stressantwort (cDNA-Makroarray)

Um den Einfluss von Genistein auf die Genexpression zu bestimmen, wurden LAPC-4 Zellen für 24 h mit 1 μ M und 10 μ M Genistein inkubiert. Sowohl die Inkubationszeit als auch die eingesetzten Konzentrationen wurden aus den vorangegangenen Comet-Assay-Versuchen abgeleitet. Die beiden verwendeten cDNA-Makroarrays wurden spezifisch auf die Fragestellung hin ausgewählt und erlaubten die Analyse von jeweils 96 Genen der Biotransformation und Stressantwort.

Eine qualitativ gute Normalisierung der Daten ergab sich durch die Division der Rohdaten der einzelnen Spots einer Membran durch den Mittelwert aller durch die Herstellerfirma SuperArray ausgewiesenen Housekeeping-Gene derselben Membran. Im Anhang befinden sich Scatterplot-Grafiken, welche die Normalisierung der Daten illustrieren (**Abbildung 30, Anhang B**).

Durch die Behandlung mit 1 μ M Genistein ergab sich eine verminderte Genexpression für die MYST Histon-Acetyltransferase 2 (1,4-fach, *p* = 0,008), die Nicotinamid-N-Methyltransferase (1,5-fach, *p* = 0,016) sowie das Schadenspezifische DNA-Bindungsproteins 1 (1,3-fach, *p* = 0,046) (**Tabelle 6**).

Die Behandlung mit 10 μ M Genistein induzierte dagegen 19 Gene (**Tabelle 7**). Einige dieser Gene üben in Zellen Funktionen aus, die in einem möglichen Zusammenhang mit

den beobachteten antigenotoxischen Effekten von Genistein stehen. Drei der durch 10 μ M Genistein induzierten Gene, namentlich die Glutathion Reduktase (1,3-fach, $p = 0,048$), die Mikrosomale Glutathion-S-Transferase 1 (1,5-fach, $p = 0,024$) und das Metallothionein 1X (1,3-fach, $p = 0,014$), wurden in der Folge näher betrachtet.

Tabelle 7

Multiple Genexpressionsanalyse nach Behandlung mit 10 μ M Genistein^a

| Spotname | Kontrolle ^b | Behandlung | p ^c |
|---|------------------------|------------------|-------------------------------|
| Acetyl-Coenzyme A Acetyltransferase 2 | 244,5 \pm 39,6 | 400,8 \pm 83,1 | 0,042 \uparrow ^d |
| Epoxidhydrolase 2, zytoplasmatisch | 243,6 \pm 12,1 | 306,0 \pm 20,1 | 0,010 \uparrow |
| Glutathion S-Transferase M3 | 173,1 \pm 10,0 | 226,0 \pm 27,5 | 0,035 \uparrow |
| Metallothionein 1X | 168,8 \pm 23,1 | 226,5 \pm 5,5 | 0,014 \uparrow |
| N-acetyltransferase 5 | 141,7 \pm 24,7 | 191,7 \pm 16,0 | 0,042 \uparrow |
| Epoxidhydrolase 1, mikrosomal | 125,1 \pm 5,6 | 187,9 \pm 15,2 | 0,003 \uparrow |
| Metallothionein 1L | 122,8 \pm 13,6 | 170,5 \pm 19,7 | 0,026 \uparrow |
| Glutathionreduktase | 111,4 \pm 15,3 | 149,5 \pm 17,8 | 0,048 \uparrow |
| Mikrosomale Glutathion S-Transferase 1 | 101,3 \pm 18,0 | 147,1 \pm 13,4 | 0,024 \uparrow |
| Caspase 8 | 24,0 \pm 2,7 | 38,6 \pm 5,7 | 0,016 \uparrow |
| DnaJ (Hsp40) homolog, A1 | 23,5 \pm 4,0 | 32,4 \pm 3,5 | 0,044 \uparrow |
| Cholin-Acetyltransferase | 22,9 \pm 4,7 | 32,1 \pm 1,0 | 0,029 \uparrow |
| DNA Reparaturprotein XRCC4 | 13,0 \pm 0,3 | 15,9 \pm 1,5 | 0,032 \uparrow |
| DNA-Schaden-induzierbares Transcript 3 | 10,6 \pm 1,2 | 19,1 \pm 2,4 | 0,005 \uparrow |
| Hitzeschockprotein (70 kD) 4 | 8,6 \pm 1,0 | 12,6 \pm 0,9 | 0,007 \uparrow |
| Prostaglandin-Endoperoxidsynthase 2 (Cox-2) | 7,1 \pm 0,6 | 10,0 \pm 0,8 | 0,007 \uparrow |
| Tumornekrosefaktor (TNF- α) | 3,3 \pm 0,5 | 4,8 \pm 0,6 | 0,038 \uparrow |
| ATP-Bindungskassette C1 | 1,6 \pm 0,1 | 1,2 \pm 0,0 | 0,007 \uparrow |
| ATP-Bindungskassette B1 | 0,4 \pm 0,4 | 1,5 \pm 0,3 | 0,015 \uparrow |

^a cDNA Makroarray-Analyse (HS11 und HS12) in LAPC-4 Zellen nach 24 h Inkubation mit 10 μ M Genistein (Behandlung) oder 0,1 % DMSO (Kontrolle)

^b Normalisierte Mittelwerte \pm SD der Chemilumineszenzsignale der einzelnen Spots

^c p -Werte stammen aus zweiseitigem ungepaartem t -Test durch Vergleich von Behandlung und Kontrolle ($n = 3$).

^d Richtung des Effekts durch die Behandlung (\uparrow , Hochregulation; \downarrow , Runterregulation)

4.4.2 Effekte von Genistein auf die Genexpression der Glutathionreduktase, der Mikrosomalen Glutathion-S-Transferase 1, und des Metallothioneins 1X (TaqMan Real-Time PCR)

Die in diesem Kapitel durchgeführten Expressionsanalysen in LAPC-4 Zellen dienten zur Verifizierung der zuvor ermittelten Induktion der Glutathion Reduktase (GSR), der Mikrosomalen Glutathion-S-Transferase 1 (MGST-1), und des Metallothioneins 1X (MT-1X). Weiterhin sollten Erkenntnisse über die Kinetiken und Mechanismen der durch Genistein vermittelten Regulationen gewonnen werden.

Die Standardgeraden aller Real-Time PCR-Experimente wiesen eine gute Linearität auf und resultierten in Regressionskoeffizienten zwischen 0,98 und über 0,99. Der paarweise Vergleich der Standardgeraden ergab, dass die Amplifikationen der Zielgene und des Housekeeping-Genes ACTB unterschiedliche Effizienzen aufwiesen (Daten nicht gezeigt), weswegen für die Auswertung der Ergebnisse die hierfür geeignete *relative standard curve method* herangezogen wurde.

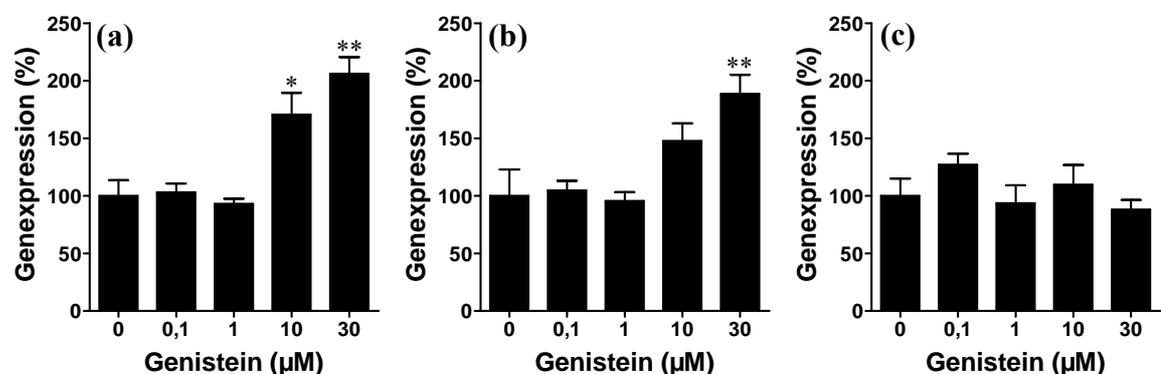


Abbildung 21: Einfluss von Genistein auf die Genexpression von Metallothionein 1X (a), Mikrosomale Glutathion-S-Transferase 1 (b) und Glutathionreduktase (c) in LAPC-4 Zellen. Die Zellen wurden für 24 h mit 0,1 – 30 µM Genistein inkubiert. Die Bestimmung der Genexpression erfolgte durch quantitative TaqMan Real-Time PCR mit Hilfe der *relative standard curve method*. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte \pm SEM und entsprechen der relativen Genexpression bezogen auf die Kontrolle 0,1 % DMSO (0 µM). Die Signifikanz wurde im Vergleich zur Kontrolle (0 µM) getestet (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; One-way ANOVA, Dunnett's Posttest, $n = 3$).

In LAPC-4 Zellen führte die Inkubation mit 10 μ M und 30 μ M Genistein nach 24 h zu einer 1,7- bzw. 2,1-fachen Induktion der Genexpression von MT-1X (**Abbildung 21a**). Eine Konzentration von 30 μ M Genistein resultierte außerdem in einem 1,9-fachen Anstieg der Genexpression von MGST-1 (**Abbildung 21b**). Ein Einfluss von Genistein auf die Genexpression der GSR bestätigt sich nicht (**Abbildung 21c**)

Für die Untersuchungen zur Zeitabhängigkeit dieser Genregulationen wurden LAPC-4 Zellen für 4, 8, 12, 24 und 48 h mit 30 μ M Genistein inkubiert. Als Bezugsgröße dienten Zellen, die für 48 h mit 0,1 % DMSO behandelt wurden.

Nach 8 h stieg die Genexpression von MT-1X auf das 5,4-fache, nach weiteren 4 h sogar auf das 6,3-fache. Im weiteren Verlauf fiel die Expression jedoch rasch ab und erreichte 24 h nach Inkubationsbeginn fast das Kontrollniveau. Nach 4 h wurde eine 2,9-fache Reduktion der Genexpression der MGST-1 ermittelt. In der Folge stieg die Expression jedoch an und resultierte nach 48 h in einer 1,7-fachen Induktion. Für die GSR ergab sich eine 2,7-fache Induktion nach 12 h. Dieses Expressionsniveau blieb im Gegensatz zu MT-1X für weitere 36 h weitestgehend erhalten (**Abbildung 22**).

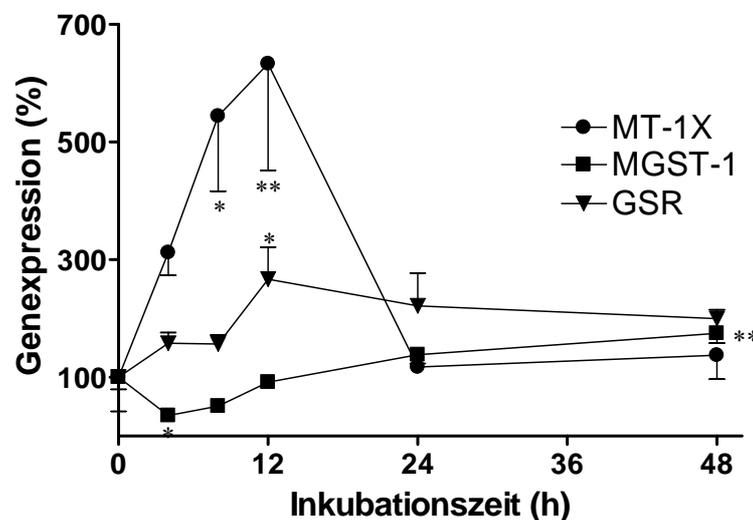


Abbildung 22: Kinetiken der Genexpression von Metallothionein 1X (MT-1X), Mikrosomale Glutathion-S-Transferase 1 (MGST-1) und Glutathionreduktase (GSR) in LAPC-4 Zellen nach Inkubation mit Genistein. Die Zellen wurden mit 30 μ M Genistein für 4 - 48 h inkubiert. Die Bestimmung der Genexpression erfolgte durch quantitative TaqMan Real-Time PCR mit Hilfe der relative standard curve method. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte \pm SEM und entsprechen der relativen Genexpression bezogen auf die Lösungsmittelkontrolle DMSO. Die Signifikanz wurde im Vergleich zur Kontrolle 0,1 % DMSO (0 h) getestet (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; One-way ANOVA, Dunnett's Posttest, $n = 3$).

Aufgrund des ermittelten engen Zeitfensters der MT-1X-Induktion wurden die Untersuchungen zur dosisabhängigen Modulation der MT-1X-Genexpression in LAPC-4 Zellen noch einmal nach 12 h Inkubation durchgeführt. Hier induzierten 30 μM Genistein die Expression von MT-1X auf das 3,9-fache. Bereits ab 1 μM konnte dieser Effekt als Trend beobachtet werden.

Da die Behandlung mit 30 μM Genistein zu einer sehr deutlichen Induktion führte, wurden weniger stark ausgeprägte Effekt bei geringeren Konzentrationen durch die One-way ANOVA (und Dunnett's Posttest) möglicherweise unterbewertet. Deshalb wurde hier zusätzlich ein *t*-Test durchgeführt. Dieser ermittelte signifikante Induktionen in einem Konzentrationsbereich von 1 - 30 μM Genistein (**Abbildung 23a**).

Um erste Erkenntnisse zu gewinnen, über welchen Mechanismus Genistein die Genexpression von MT-1X reguliert, wurde ebenfalls der Einfluss eines Östrogens auf die Expression dieses Genes untersucht. Im Gegensatz zu Genistein verminderten 0,3 μM 17 β -Östradiol die Expression von MT-1X um 50 %. Dieser Effekt wurde nach einer Inkubation mit 3 μM 17 β -Östradiol jedoch nicht beobachtet (**Abbildung 23b**).

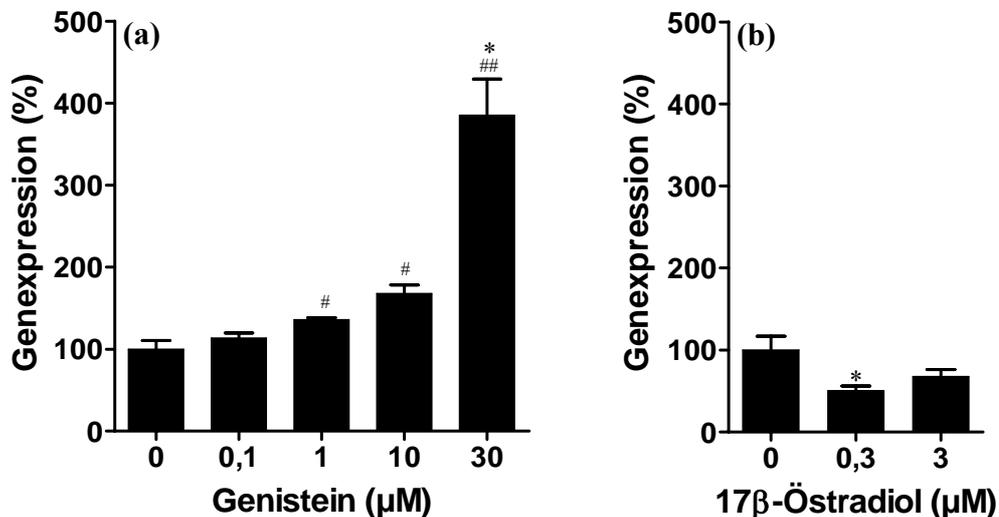


Abbildung 23: Genexpression von Metallothionein 1X (MT-1X) nach Inkubation mit Genistein (a) und 17 β -Östradiol (b). Die Zellen wurden für 12 h mit 0,1 - 30 μM Genistein bzw. 0,3 und 3 μM 17 β -Östradiol inkubiert. Die Bestimmung der Genexpression erfolgte durch quantitative TaqMan Real-Time PCR mit Hilfe der relative standard curve method. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte \pm SEM und entsprechen der relativen Genexpression bezogen auf die Lösungsmittelkontrolle (0 μM). Die Signifikanz wurde im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle (0 μM) getestet (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; One-way ANOVA, Dunnett's Posttest, $n = 3$; Nur (a): # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$; ungepaarter zweiseitiger *t*-Test).

4.4.3 Effekte von Genistein auf die Proteinexpression von Metallothioneinen

Abschließend stellte sich die Frage, ob die beobachtete Induktion der Genexpression von MT-1X gleichsam zu einem Anstieg der Metallothion-Expression auf Proteinebene führt. In CHO Ovarienzellen des Chinesischen Hamsters beobachteten Levadoux-Martin *et al.* (2001) eine nukleäre Anreicherung von Metallothioneinen in der S-Phase des Zellzyklus, welche die Empfindlichkeit der Zellen gegenüber oxidativ-induzierten DNA-Schäden stärker verminderte als eine zytosolische Lokalisation. Die intrazelluläre Lokalisation von Metallothioneinen ist also zellzyklusabhängig und beeinflusst wahrscheinlich ihre protektiven Wirkungen gegenüber oxidativ-induzierten DNA-Schäden. Aus diesem Grund erfolgten die Untersuchungen zum Einfluss von Genistein auf die Proteinexpression von Metallothioneinen mit Hilfe einer immunzytochemischen Detektionstechnik *in situ* (**Abbildung 24**).

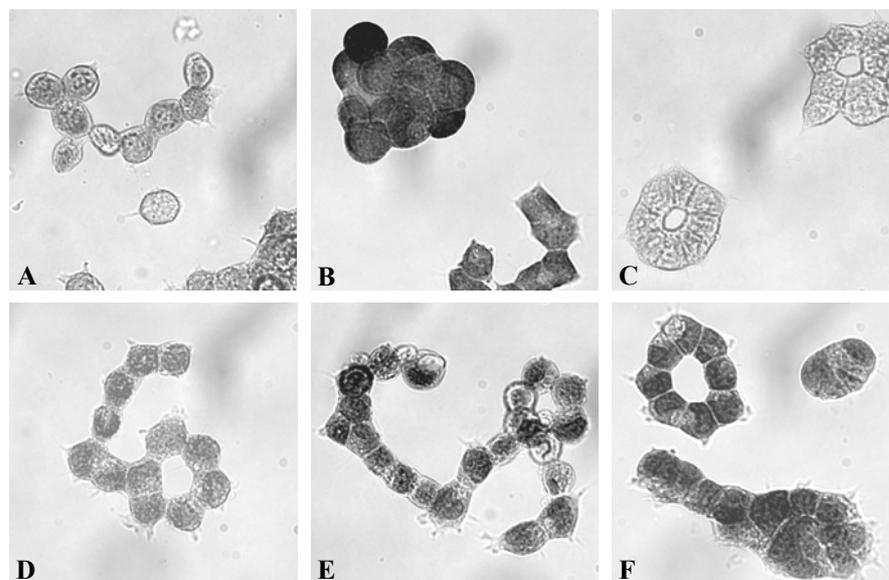


Abbildung 24: Immunzytochemische Detektion von Metallothioneinen in LAPC-4 Zellen. Die Zellen wurden für 12 h mit 0,1 % DMSO (A), 50 µM Zinksulfat (B), 0,3 µM 17β-Östradiol (C), 1 µM Genistein (D), 10 µM Genistein (E) und 30 µM Genistein (F) behandelt und anschließend in Formaldehyd-Lösung fixiert. Nach der Inkubation mit einem Metallothionein-Antikörper erfolgte die Detektion über ein Biotin-Steptavidin-Peroxidase-System mit Hilfe des Chromogens Diaminobenzidin (DAB). Die Schwarz-Weiß-Aufnahmen zeigen repräsentative Zellen im Phasenkontrastmikroskop bei 400-facher Vergrößerung. Die Schwärzungen entsprechen den Metallothioneinen und bildeten unter dem Mikroskop einen deutlich rostfarbenen Kontrast zum Zellhintergrund.

Es erwies sich als zweckmäßig, die Proteinexpression in LAPC-4 Zellen durch eine mikroskopische Auswertung manuell zu ermitteln (**Abbildung 24**) und eine Einteilung in drei Klassen vorzunehmen: keine Färbung (Klasse L), geringe bis mäßige Färbung (Klasse M) und intensive Färbung (Klasse H). Um mögliche Effekte abschätzen zu können, wurde ein Expression-Score definiert (vgl. Kapitel 3.2.8). Weiterhin wurde der Anteil an Zellen mit deutlich konzentrierter Kernfärbung erfasst.

Die 12 h Inkubation mit 0,1 % DMSO ergab 2 % intensiv gefärbter Zellen (Klasse H). Im Vergleich dazu stieg der Anteil an Zellen dieser Klasse durch die Behandlung mit 50 μM ZnSO_4 (Positivkontrolle) auf 34 %, was einen 1,6-fachen Anstieg des Expression-Scores – verglichen mit DMSO – ergab. Die Inkubation mit 10 μM Genistein führte zu einer tendenziellen Induktion, die jedoch die Signifikanz verfehlte. Durch die Inkubation mit 30 μM Genistein stieg der Anteil an Zellen der Klasse H auf 17 %. Dies resultierte in einem 1,4-fachen Anstieg des Expression-Scores. Die Behandlung mit 0,3 μM 17 β -Östradiol führte dagegen zu weniger als 1 % Zellen der Klasse H. Ein Einfluss auf den Expression-Score wurde nicht ermittelt (**Abbildung 25**).

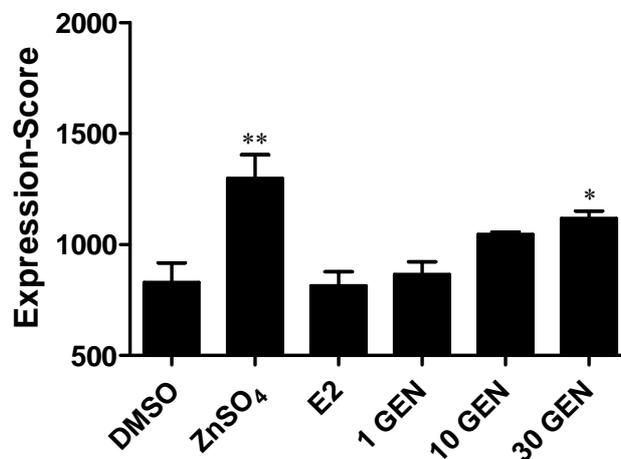


Abbildung 25: Einfluss von 0,1 % DMSO, 50 μM Zinksulfat (ZnSO_4), 0,3 μM 17 β -Östradiol (E2) und 1 – 30 μM Genistein (GEN) auf die Proteinexpression von Metallothioneinen LAPC-4 Zellen. Die Zellen wurden für 12 h inkubiert und anschließend immunzytochemisch angefärbt. Die Bewertung der Expression erfolgte durch das manuelle Auszählen von 500 Zellen pro Ansatz und der Zuordnung zu einer von drei Klassen: keine Färbung (Klasse L), moderate Färbung (Klasse M) und intensive Färbung (Klasse H). Zellen der Klasse L wurden mit 1 Punkt bewertet, Zellen der Klasse M mit 2 Punkten und Zellen der Klasse H mit 4 Punkten. Der Expression-Score entspricht der Gesamtpunktzahl einer Probe. Die gezeigten Werte sind Mittelwerte \pm SEM. Die Signifikanz wurde im Vergleich zur DMSO-Kontrolle getestet (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ One-way ANOVA, Dunnett's Posttest, $n = 3$).

Unabhängig von den Behandlungen wurde bei der Mehrzahl der ausgewerteten Zellen eine über das gesamte Zellvolumen gleich verteilte Färbung ermittelt. Lediglich 10 - 20 % der Zellen besaßen eine deutlich konzentrierte Färbung im Zellkern. Keiner der Versuchsansätze veränderte die intrazelluläre Lokalisation der Färbung signifikant (**Abbildung 26**).

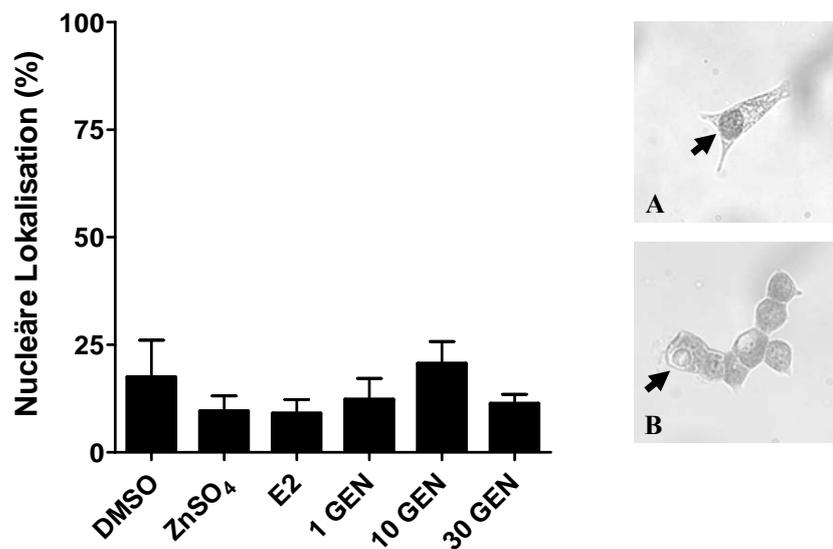


Abbildung 26: Einfluss von 0,1 % DMSO, 50 μ M Zinksulfat ($ZnSO_4$), 0,3 μ M 17 β -Östradiol (E2) und 1 – 30 μ M Genistein (GEN) auf die intrazelluläre Lokalisation von Metallothioneinen in LAPC-4 Zellen. Die Zellen wurden für 12 h inkubiert und anschließend immunzytochemisch angefärbt. Das Diagramm vergleicht den Anteil von Zellen mit Metallothionein-Anreicherung im Nukleus. Die gezeigten Werte sind Mittelwerte \pm SEM und entsprechen dem Prozentsatz deutlich kerngefärbter Zellen, bezogen auf die Gesamtanzahl ausgewerteter Zellen. Die Signifikanz wurde im Vergleich zur DMSO-Kontrolle mittels One-way ANOVA getestet ($n = 3$). Die Bildnachweise zeigen Zellen mit deutlicher Schwärzung des Nukleus (A) bzw. ohne Schwärzung des Nukleus (B) bei 400-facher Vergrößerung. Die Schwärzungen entsprechen den Metallothioneinen und bildeten unter dem Mikroskop einen deutlich rostfarbenen Kontrast zum Zellhintergrund.

5 Diskussion

Das Prostatakarzinom ist gegenwärtig die häufigste maligne Erkrankung deutscher Männer (Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland, 2004). Auch in anderen Ländern der westlichen Welt, wie z. B. Großbritannien oder den USA, tritt diese Tumorform stark gehäuft auf (Quinn & Babb, 2002). Die zur Entwicklung eines Prostatakarzinoms führenden Prozesse sind nur unzureichend bekannt. Ein wichtiger Risikofaktor ist das Lebensalter. In Deutschland liegt der Zeitpunkt der Diagnose heute bei 71 Jahren und damit rund fünf Jahre über dem Altersdurchschnitt für maligne Erkrankungen (Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland, 2004). Wahrscheinlich begünstigen altersbedingte Veränderungen der Prostata die Entartung des Gewebes. So ist die Prostata zunehmend oxidativem Stress ausgesetzt, der zu einem altersabhängigen Anstieg von mutagenen, oxidativen DNA-Schäden führt und so die strukturelle Integrität der DNA von Prostatazellen beeinträchtigt (Malins *et al.*, 2001). Möglicherweise werden diese Veränderungen der Redox-Verhältnisse durch eine altersbedingte Abnahme der zellulären antioxidativen Schutzsysteme ausgelöst oder zumindest begünstigt (Bostwick *et al.*, 2000; Ghatak & Ho, 1996). Die Verminderung des oxidativen Stresses erscheint somit als sinnvolle Strategie für die Chemoprävention des Prostatakarzinoms.

Im Gegensatz zu den Ländern der westlichen Welt tritt das Prostatakarzinom in vielen asiatischen Ländern deutlich seltener auf. Migrationsstudien ergaben jedoch ein Ansteigen der Inzidenzraten von asiatischen Einwanderern auf das Niveau ihres westlichen Zuzugslandes (Shimizu *et al.*, 1991; Gomez *et al.*, 2003). Dies zeigte, dass Lifestyle-Faktoren, wie z. B. die Ernährungsweisen, von substantieller Bedeutung für das seltene Auftreten dieser Tumorform in Asien sind. Die asiatische Ernährung unterscheidet sich deutlich von der westlichen Kulturen; sie ist kohlenhydratreicher, fettärmer und überwiegend vegetabil (Denis *et al.*, 1999). Der Proteinbedarf wird häufig über Hülsenfrüchte gedeckt, wobei der Sojabohne in weiten Teilen Asiens eine herausragende Bedeutung zukommt. Aufgrund ihres äußerst hohen Isoflavonoid-Gehaltes ergeben sich deutliche Unterschiede zwischen den in Asien und Europa üblicherweise verzehrten Mengen dieser Gruppe sekundärer Pflanzeninhaltsstoffe. Während in Asien bis zu 100 mg Isoflavonoide pro Tag aufgenommen werden (Ho *et al.*, 2000), sind es in Europa selten mehr als 1 mg pro Tag (van Erp-Baart *et al.*, 2003). Gleichsam unter-

scheiden sich die im Blut nachgewiesenen Konzentrationen um den Faktor 10 und mehr (Morton *et al.*, 2002). Aufgrund der hohen Exposition in Ländern mit geringem Prostatakarzinomrisiko wurde eine Schutzwirkung von Isoflavonoiden vermutet. Tatsächlich sind Isoflavonoide vielversprechende Kandidaten für die Chemoprävention des Prostatakarzinoms und werden derzeit u. a. in einer umfangreichen Phase-II-Studie des National Cancer Instituts der USA auf ihre Wirksamkeit hin getestet (Parnes *et al.*, 2004). Die molekularen Mechanismen einer möglichen Chemoprävention durch Isoflavonoide sind bisher kaum bekannt.

Diese Arbeit beschäftigte sich zunächst mit dem Vergleich der biologischen Aktivitäten der Soja-Isoflavonoide Genistein und Daidzein mit denen ihrer im menschlichen gebildeten Darm gebildeten reduktiven Metabolite in Prostatazellen. Es wird vermutet, dass sich diese Metabolite hinsichtlich ihrer möglichen präventiven aber auch toxischen Eigenschaften von ihren Vorstufen unterscheiden. Da Genistein in diesen Untersuchungen eine besonders hohe biologische Aktivität aufwies, wurde in einem zweiten Teil nach weiteren chemopräventiven Wirkungen dieses Isoflavonoids gesucht.

In dieser Arbeit wurden Isoflavonoide in einem weiten Konzentrationsbereich zwischen 1 nM und 80 µM getestet. Dieser sollte sich an der Situation *in vivo* orientieren. Durch eine sojareiche Kost werden im Blut üblicherweise Gesamtkonzentrationen bis zu 1 µM Isoflavonoide erreicht (Morton *et al.*, 2002); vereinzelt treten auch höhere Konzentrationen auf. Eine Supplementation von Soja-Isoflavonoiden kann jedoch die Plasmakonzentrationen einiger Isoflavonoide kurzzeitig bis auf 30 µM ansteigen lassen (Bloedon *et al.*, 2002). Allerdings zirkulieren nur 1 - 13 % der Isoflavonoide in freier Form im Blut (Bloedon *et al.*, 2002; Miltyk *et al.*, 2003). Eine *in vitro* Studie berichtet jedoch auch über bis zu 50 % freie Isoflavonoide (Nagel *et al.*, 1998). Der Rest liegt an Proteine gebunden vor und ist wahrscheinlich weitgehend physiologisch-inaktiv. Andererseits scheinen einige Isoflavonoide in der Prostata angereichert zu werden. So wurde eine gegenüber dem Blut 45-fach höhere Equol-Konzentration (max. 13,5 µM) in der Prostataflüssigkeit bestimmt (Morton *et al.*, 1997). Dieselbe Arbeitsgruppe bestätigte eine in der Prostataflüssigkeit deutlich erhöhte Equol-Konzentration (16-fach über Plasma, max. 9,8 µM) innerhalb einer Interventionsstudie mit Sojamilch und berichteten darüber hinaus über eine Anreicherung von Daidzein (5,3-fach über Plasma, max. 29,8 µM), Dihydrodaidzein (13,3-fach über Plasma, max. 10,6 µM) und O-DMA

(3,8-fach über Plasma, max. 1,2 μM). Eine Aufkonzentrierung von Genistein wurde dagegen nicht ermittelt (Hedlund *et al.*, 2005). In der Summe ergab sich in der Prostataflüssigkeit eine – im Vergleich zum Blutplasma – vierfach höhere mittlere Konzentration an Isoflavonoiden, mit einem Maximalwert von 47,5 μM .

Es fällt somit schwer, für diese Substanzen eine obere Expositionsgrenze für *In-vitro*-Untersuchungen in Prostatazellen zu definieren. Für toxikologische Fragestellungen wären zudem Sicherheitszuschläge zu berücksichtigen.

Deshalb sollten die Isoflavonoide bis zu einer Konzentration von 100 μM getestet werden. Bei dieser Konzentration bildeten jedoch einige Substanzen Niederschläge in der Zellkultur. Auf ein Anheben der Lösungsmittelkonzentration von 0,1 % DMSO wurde verzichtet, da dies möglicherweise Artefakte zur Folge gehabt hätte. Deshalb erfolgten die Untersuchungen bis zu einer Konzentration von 80 μM ; hier traten keine Niederschläge auf.

5.1 Wachstumsfördernde bzw. wachstumshemmende Aktivitäten von Isoflavonoiden in Prostatazellen

In ersten Versuchen wurden die Zelllinien hinsichtlich ihrer Wachstumseigenschaften unter Versuchsbedingungen, insbesondere im Hinblick auf ihre Verdopplungszeiten charakterisiert. Für LNCaP Zellen wurden Verdopplungszeiten von 37 - 51 h bestimmt, wobei eine höhere Aussaatdichte tendenziell zu einer höheren Verdopplungszeit führte. Die Verdopplungszeiten von LAPC-4 Zellen lagen mit 51 - 65 h signifikant über denen von LNCaP Zellen. Ein Zusammenhang zwischen der Teilungsrate und der Aussaatdichte wurde hier nicht ermittelt.

Auf der Grundlage dieser kinetischen Untersuchungen wurde ein Einfluss der Testsubstanzen auf das Wachstum beider Zelllinien nach einer Inkubationszeit von 96 h bestimmt. Um Wachstumsantworten mit dem DAPI-Assay detektieren zu können, müssen sich die Zellen innerhalb der Inkubationszeit mindestens einmal, besser aber zweimal teilen. Kürzere Inkubationszeiten als 96 h hätten dies, insbesondere für LAPC-4 Zellen nicht gewährleistet. Längere Inkubationszeiten wurden ebenfalls ausgeschlossen, da hierfür ein Mediumwechsel während der Inkubation notwendig gewesen wäre, der die Interpretation der Ergebnisse erschwert hätte.

Die Untersuchungen zum Einfluss der Testsubstanzen auf das Zellwachstum von Prostatazellen dienten dem Vergleich der biologischen Aktivitäten der pflanzlichen Isoflavonoide mit ihren bisher kaum untersuchten Darmmetaboliten. Hierbei sollten sowohl wachstumsfördernde als auch wachstumshemmende Effekte berücksichtigt werden. Ein Wachstumsvorteil von Tumorzellen wäre hierbei als ungünstig zu bewerten, ließe jedoch Schlüsse über steroidhormonrezeptor-vermittelte Wirkungen zu. Im Gegensatz dazu würde eine Verminderung des Zell-Turnovers auf möglicherweise chemopräventive Wirkungen hindeuten, da sich hierdurch die Empfindlichkeit der Zellen gegenüber Mutagenen verringert. Zudem würde die weitere Progression bereits entartete Zellen gehemmt. Um die Wachstumsantworten der Zelllinien unter den gewählten experimentellen Bedingung zu charakterisieren und so, die möglicherweise durch Isoflavonoide vermittelten Effekte besser bewerten zu können, erfolgten zunächst Versuche mit den endogenen Steroidhormonen Dihydrotestosteron und 17β -Östradiol.

Effekte von Steroidhormonen

Dihydrotestosteron stimulierte das Wachstum von LAPC-4 (10 nM) und LNCaP Zellen (1 nM), wobei der Effekt in LAPC-4 Zellen deutlich ausgeprägter war. Die Inkubation mit 17β -Östradiol führte zu keinem verstärkten Wachstum von LAPC-4 Zellen, in LNCaP Zellen stimulierte 17β -Östradiol das Wachstum dagegen deutlich (1 nM – 1 μ M). Sehr hohe Konzentrationen (> 40 μ M) beider Hormone verminderten das Zellwachstum. Diese Ergebnisse belegen somit die Sensitivität der gewählten Versuchsbedingungen im Hinblick auf die Detektierbarkeit von wachstumsfördernden und wachstumshemmenden Effekten. Dihydrotestosteron stimulierte das Wachstum beider Zelllinien, was als ein Beleg für die Androgen-Sensitivität der Zellmodelle gewertet werden kann. Allerdings unterschieden sich die Zelllinien grundlegend in ihren Wachstumsantworten auf 17β -Östradiol. Die ermittelte Wachstumsförderung in LNCaP Zellen wurde bereits in früheren Studien berichtet. Diese vermuteten, dass die T877A AR-Mutation der LNCaP Zellen für diesen Effekt verantwortlich ist (Arnold *et al.*, 2004; Schuurmans *et al.*, 1991). Die Mutation erhöht die Rezeptoraffinität gegenüber 17β -Östradiol, während sie die Affinität gegenüber dem physiologischen Liganden Dihydrotestosteron vermindert (Suzuki *et al.*, 2003). Die Tatsache, dass 17β -Östradiol in der vorliegenden Arbeit keine wachstumsfördernden Effekte in LAPC-4 Zellen (Wildtyp-AR) auslöste, bekräftigt den postulierten Einfluss der T877A AR-Mutation auf die östrogen-vermittelte Stimulation des Wachstums von LNCaP Zellen.

Effekte der Isoflavonoide

Isoflavonoide besitzen Bindungsaffinitäten zum AR, wenn auch nur äußerst gering (Beck *et al.*, 2003). Der mutierte AR-Rezeptor bindet jedoch eine Vielzahl von Substanzen mit deutlich erhöhter Affinität als der Wildtyp-Rezeptor (Sack *et al.*, 2001). Deshalb wird vermutet, dass die T877A Mutation auch die Affinität gegenüber Isoflavonoiden beeinflusst (Maggiolini *et al.*, 2002). Die Untersuchungen dieser Arbeit belegen allerdings, dass weder die Soja-Isoflavonoide noch ihre reduktiven Metabolite das Wachstum von LNCaP oder LAPC-4 Zellen stimulieren. Eine Wachstumsförderung von androgen-abhängigen Prostatakarzinomzellen durch diese Substanzen ist demnach unwahrscheinlich. Auch Prostatakarzinome mit einer T877A AR-Mutation scheinen durch Isoflavonoide nicht im Wachstum begünstigt zu werden.

Die gewonnenen Erkenntnisse sind für die Beurteilung der Unbedenklichkeit dieser Substanzengruppe, im Hinblick auf einen möglichen späteren Einsatz in der Prävention oder aber auch der Therapie von Prostatakarzinomen, von großer Bedeutung. Sie stehen allerdings teilweise im Widerspruch zu früheren Arbeiten. Maggiolini *et al.* (2002) berichtete über eine Stimulation des Wachstums von LNCaP Zellen durch 1 - 100 nM Genistein und diskutierte einen Einfluss der T877A AR-Mutation. In der vorliegenden Arbeit wurden Genistein auch in diesen Konzentrationen untersucht, eine Stimulation des Wachstums von LNCaP Zellen ergab sich jedoch nicht. Eine mögliche Ursache für diese Unterschiede liefern die voneinander abweichenden Versuchsbedingungen beider Studien. Während Maggiolini *et al.* (2002) die Zellen in Medium mit 1 % CCS kultivierten, wurden die Medien in der vorliegenden Arbeit mit 10 % versetzt. Zudem erneuerten Maggiolini *et al.* (2002) das Medium täglich (verbunden mit einer täglich erneut durchgeführten Behandlung) und inkubierten für insgesamt 144 h. Möglicherweise wurden die wachstumsfördernden Effekte in der vorliegenden Arbeit durch Faktoren des Serums – bspw. Steroidhormone – überdeckt. Aus diesem Grund wurde einer Analyse des verwendeten Serums in Auftrag gegeben. Das Institut für Klinische Chemie und Labordiagnostik der Friedrich-Schiller-Universität Jena ermittelte < 26 pM 17 β -Östradiol, < 315 pM Testosteron (gesamt), < 0,8 pM Testosteron (frei) sowie 219 pM Dihydrotestosteron. Da die Medien mit 10 % Serum supplementiert wurden, ist von zehnfach-geringeren Hormonkonzentrationen in der Zellkultur auszugehen. Der Referenzbereich des hier wahrscheinlich bedeutendsten Steroidhormons Dihydrotestosteron liegt im menschlichen Plasma bei 0,8 - 4,1 nM (Horoszewicz *et al.*,

1983), also um ein vielfaches darüber. Ein substantieller Einfluss durch Steroidhormone kann daher wahrscheinlich ausgeschlossen werden. Zudem belegen die wachstumsfördernden Effekte von Dihydrotestosteron und 17β -Östradiol die Empfindlichkeit des hier verwendeten Wachstumsassays.

Es scheint daher, dass Isoflavonoide das Wachstum von Prostatazellen lediglich unter extrem-stringenten experimentellen Bedingungen *in vitro* stimulieren was die Frage nach der physiologischen Bedeutung solcher Effekte aufwirft. Die in der vorliegenden Arbeit gewählten Versuchsbedingungen sind gegenüber den Verhältnissen *in vivo* ebenfalls als stringent zu bezeichnen und führten zu stimulierenden Effekten von Steroidhormonen, nicht jedoch von Isoflavonoiden. Verglichen mit *In-vitro*-Untersuchungen, in denen die Zellkulturmedien mit CCS supplementiert werden, zirkulieren deutlich höheren Konzentrationen an Steroidhormone im Blutplasma. Wachstumsfördernde Effekte von Isoflavonoiden, wie sie Maggiolini *et al.* (2002) berichteten, würden deshalb *in vivo* wahrscheinlich von den Wirkungen der endogenen Steroidhormone vollständig überlagert, so dass sich hieraus keine Wachstumsvorteile von Prostatakarzinomen durch Isoflavonoide ableiten lassen.

Auf der anderen Seite hemmen mehrerer Isoflavonoide das Wachstum der Prostatazellen, zum Teil in physiologisch-relevanten Konzentrationen ($< 30 \mu\text{M}$). Das in Sojaprodukten mengenmäßig dominierende Isoflavonoid Genistein besitzt mit einem IC_{50} -Wert von $< 40 \mu\text{M}$ stärkere wachstumshemmenden Eigenschaften als das zweite wichtige Soja-Isoflavonoid Daidzein ($\text{IC}_{50} > 80 \mu\text{M}$), was mit früheren Berichten für LNCaP Zellen (Hedlund *et al.*, 2003; Mitchell *et al.*, 2000) und LAPC-4 Zellen (Hedlund *et al.*, 2003) übereinstimmt.

Die Exposition mit Isoflavonoiden ist jedoch weitaus komplexer. Die menschliche Darmflora bildet eine Reihe von reduktiven Metaboliten, die sich in den hier vorgestellten Untersuchungen deutlich von ihren Vorstufen unterscheiden. Im Gegensatz zu Genistein hemmten dessen reduktive Metabolite Dihydrogenistein und 6'-Hydroxy-O-DMA das Wachstum der Prostatazellen nicht bzw. äußerst gering. Es ist also davon auszugehen, dass der reduktive Metabolismus der menschlichen Darmflora zu einer Verminderung der antiproliferativen Wirkungen von alimentär zugeführtem Genistein in der Prostata führt.

Ein Teil der von Daidzein abgeleiteten reduktiven Metabolite hemmte hingegen das Prostatazellwachstum wesentlich effektiver als Daidzein selbst. Das stärkste antiproliferative Potential zeigte Equol (IC_{50} : 35,1 μ M in LAPC-4 Zellen). Equol besitzt, im Gegensatz zu Genistein und Daidzein, ein chirales Zentrum und kann in R- und S-Konformation vorliegen. Die menschliche Darmflora jedoch lediglich zur Bildung von S-Equol befähigt. Die biologische Bedeutung von R-Equol ist bisher unklar (Setchell *et al.*, 2005). In Ermangelung der reinen Enantiomere wurde für die Untersuchungen dieser Arbeit – wie auch für die überwiegende Mehrzahl der Publikation zu diesem Thema – zunächst ein Equol-Razemat verwendet. Die gegenüber Daidzein erhöhten antiproliferativen Eigenschaften von razemischem Equol in LNCaP und LAPC-4 Zellen wurden bereits zuvor beschrieben (Hedlund *et al.*, 2003).

Zu einem späteren Zeitpunkt konnten in der vorliegenden Arbeit zum ersten Mal auch Untersuchungen zur biologischen Aktivität des physiologisch relevanten Enantiomers S-Equol in Prostatazellen durchgeführt werden. Die Reinheit des hierfür verwendeten S-Equols sowie das Verhältnis von R- und S-Equol im razemischen Equol wurden am Institut für Organische Chemie der Universität Helsinki (Finnland) überprüft. Das verwendete S-Equol erwies sich als nahezu 100 % rein. Das razemische Equol enthielt R- und S-Equol im Verhältnis 1:1. Der direkte Vergleich des Einflusses von S-Equol und razemischem Equol auf das Prostatazellwachstum ergab ein fast identisches wachstumshemmendes Potential dieser beiden Präparate, was vermuten lässt, dass R- und S-Equol vergleichbare wachstumshemmenden Eigenschaften in Prostatazellen besitzen. Für das antiproliferative Potential in Prostatazellen ist die Stereoisomerie von Equol demnach wahrscheinlich ohne Bedeutung.

Die beiden untersuchten Zelllinien unterschieden sich ausschließlich in ihren Wachstumsantworten gegenüber dem von Daidzein abgeleiteten Darmmetabolit *O*-DMA. Während das Wachstum von LAPC-4 Zellen gehemmt wurde (IC_{50} : 45,2 μ M), blieb das Wachstum von LNCaP Zellen unbeeinflusst. Signifikante Unterschiede zwischen den Antworten beider Zelllinien ergaben sich ab einer Konzentrationen von 20 μ M *O*-DMA. Die vorliegende Arbeit berichtet damit zum ersten Mal über antiproliferative Eigenschaften von *O*-DMA in Prostatazellen. In der Literatur finden sich keine Anhaltspunkte, die zur Klärung der unterschiedlichen Empfindlichkeit der beiden Zelllinien gegenüber *O*-DMA beitragen. Aufgrund der bereits erwähnten sehr geringen Konzentrationen an Steroidhormon in den Versuchsmedien ist eine Wachstums-

hemmung in LAPC-4 Zellen aufgrund einer Verdrängung entsprechend mitogener Steroidhormone von ihren Rezeptoren unwahrscheinlich. Demzufolge bieten die verschiedenen AR-Phänotypen beider Zelllinien hier wahrscheinlich keinen Erklärungsansatz. Vielleicht unterscheiden sich die beiden Zelllinien hinsichtlich ihrer metabolischen Kompetenzen gegenüber *O*-DMA. Auch wenn diese Vermutung rein spekulativer Natur ist, erscheint sie als ein interessanter Ansatz für zukünftige Untersuchung. Hierbei sollten mögliche Unterschiede im Phase-I-, Phase-II- aber auch Phase-III-Metabolismus der Zelllinien in Betracht gezogen werden.

Der reduktive Metabolismus von Daidzein im menschlichen Dickdarm führt somit insgesamt eher zu einer Verstärkung der antiproliferativen Eigenschaften von alimentär-zugeführtem Daidzein in Prostatazellen. Dabei kommt Equol wahrscheinlich eine besondere Bedeutung zu. Eine signifikante Wachstumshemmung ergab sich in den hier durchgeführten Versuchen ab einer Konzentration von 2,5 μM (S-Equol in LAPC-4 Zellen). In einer kürzlich veröffentlichten humanen Interventionsstudie wurden in der Prostataflüssigkeit vergleichbare Equol-Konzentrationen von durchschnittlich 2,6 μM (max. 9,8 μM) nach dem einwöchigen Verzehr von Sojamilch bestimmt (Hedlund *et al.*, 2005). Demzufolge kann eine erhöhte Zufuhr von sojareichen Lebensmitteln zu Equol-Konzentrationen in der Prostata führen, die *in vitro* das Wachstum von Prostatakarzinomzellen signifikant hemmen.

In diesem Zusammenhang muss erwähnt werden, dass nicht alle Menschen in gleichem Umfang zur Bildung der reduktiven Metabolite befähigt sind. Nur ca. 30 - 40 % der Bevölkerung sind in der Lage Equol zu produzieren, was auf Unterschiede in der individuellen Zusammensetzung der Darmflora zurückzuführen ist (Lampe *et al.*, 1998; Rowland *et al.*, 2000). Allerdings kann die Fähigkeit zur Equol-Produktion durch die Ernährung beeinflusst werden. So scheint eine betont kohlenhydratreiche Ernährung die Etablierung von equol-bildenden Mikroorganismen zu begünstigen (Lampe *et al.*, 1998; Rowland *et al.*, 2000). Dies erklärt möglicherweise auch den gegenüber westlichen Ländern erhöhten Anteil von Equol-Produzenten in Asien (Akaza *et al.*, 2004).

Die hier ermittelte antiproliferative – und möglicherweise chemopräventive – Wirkung von Equol in Prostatazellen wäre demnach nur für einen Teil der Bevölkerung von direkter Bedeutung. Drei kürzlich publizierte Fall-Kontroll-Studien ermittelten, dass Patienten mit diagnostiziertem Prostatakarzinom seltener als entsprechende Kontrollpersonen zur Equol-Produktion befähigt waren (Ozasa *et al.*, 2004; Akaza *et al.*, 2002;

Akaza *et al.*, 2004). Diese epidemiologischen Daten lassen somit in der Tat eine mögliche Bedeutung von Equol für die Prävention des Prostatakarzinoms vermuten und zeigen die Komplexität der durch Isoflavonoide vermittelten Wirkungen, in der die Zusammensetzung der Darmflora unter Umständen eine Bedeutung für die biologischen Aktivitäten von Isoflavonoiden in Zielgeweben der Tumorentstehung wie der Prostata besitzt.

Die Literatur bietet vergleichsweise wenige Angaben über die im Blutplasma oder der Prostataflüssigkeit erreichbaren Konzentrationen an *O*-DMA. Im Gegensatz zu Equol existieren keine klaren Grenzen zwischen den Individuen, die zur Bildung von *O*-DMA befähigt sind und jenen die es nicht sind (Watanabe *et al.*, 1998). Vielmehr liegen hier die Unterschiede in den deutlich variierenden Mengen an gebildetem *O*-DMA. In einer kürzlich publizierten humanen Interventionsstudie differierten die Plasmakonzentrationen an *O*-DMA, nach zehnwöchigem Verzehr einer sojareichen Diät, interindividuell um das bis zu 1642-fache und stiegen durchschnittlich auf rund 200 nM (Wiseman *et al.*, 2004). Hedlund *et al.* (2005) ermittelten nach einer einwöchigen Intervention mit Sojamilch eine mittlere Konzentration 99 nM *O*-DMA (max. 367 nM) im Blutplasma und sogar durchschnittlich 250 nM (max. 1,2 µM) in der Prostataflüssigkeit.

Es ist jedoch festzustellen, dass sowohl die Exposition als auch die biologischen Aktivitäten von *O*-DMA in Prostatazellen bisher nur unzureichend untersucht wurden. Eine Konzentration von 20 µM *O*-DMA, die in der vorliegenden Arbeit das Wachstum von LAPC-4 Zellen hemmte, wurde *in vivo* bisher nicht beobachtet. Darüber hinaus existieren bislang keine epidemiologischen Untersuchungen zum Einfluss von *O*-DMA auf das Prostatakarzinomrisiko.

Effekte von Isoflavonoiden in Kombination

Die gleichzeitige Behandlung von Prostatazellen mit mehreren Isoflavonoiden stellt einen höheren Grad der Anpassung an die Bedingungen *in vivo* dar, unter denen Zellen gegenüber einer Vielzahl verschiedener Isoflavonoide und Metabolite zur gleichen Zeit exponiert sind. Die kombinierte Inkubation mit Genistein (65 %), Daidzein (29 %) und Equol (7 %) resultierte in wachstumshemmenden Effekte, die vom Ausmaß her durch die jeweils enthaltenen Konzentrationen an Genistein bestimmt gewesen sein dürften. Somit ergaben sich keine Kombinationseffekte. Aufgrund der vergleichsweise hohen

Exposition, in Verbindung mit einer hohen biologischen Aktivität, scheint Genistein unter den getesteten Isoflavonoiden eine dominierende Rolle in Bezug auf die vermuteten chemopräventiven Wirkungen von Sojaprodukten einzunehmen.

Die Hemmung des Prostatazellwachstums durch Genistein, *O*-DMA, S-Equol, racemisches Equol sowie durch die Isoflavonoid-Gemische ging nicht mit einer Störung der Mitochondrienaktivität einher. Da eine Beeinträchtigung dieser metabolischen Aktivität als Hinweis auf zytotoxische Ereignisse gewertet werden kann (Mosmann, 1983), lassen sich die beobachteten wachstumshemmenden Aktivitäten dieser Substanzen nicht auf zytotoxische Effekte zurückführen. Isoflavonoide hemmen das Wachstum von Prostatazellen möglicherweise über eine Verminderung der Zellneubildung, obwohl auch apoptotische Prozesse nicht vollständig ausgeschlossen werden können. Zukünftige Untersuchungen in diesem Bereich sollten versuchen, die zugrunde liegenden Mechanismen der hier vorgestellten wachstumshemmenden Effekte zu identifizieren, um das Verständnis über die biologischen Aktivitäten dieser Substanzen in Prostatazellen weiter zu verbessern.

5.2 Genotoxische Aktivitäten von Isoflavonoiden in Prostatazellen

Isoflavonoide stehen im Verdacht, die DNA-Integrität von Zellen zu beeinträchtigen. *In vitro* induzieren sie DNA-Strangbrüche und führen zur Bildung von Mikrokernen (Kulling & Metzler, 1997). In der vorliegenden Arbeit wurden die Isoflavonoide deshalb auch hinsichtlich einer möglichen Induktion von DNA-Strangbrüchen in LNCaP und LAPC-4 Zellen untersucht. Da Androgene und Östrogen ebenfalls im Verdacht stehen, DNA-Strangbrüche in Prostatazellen induzieren, erfolgten zunächst Untersuchungen mit Dihydrotestosteron und 17 β -Östradiol.

Effekte von Steroidhormonen

Die Steroidhormone induzierten in beiden Prostatazelllinien DNA-Strangbrüche, wobei die Behandlung mit Dihydrotestosteron in LNCaP Zellen die Signifikanz verfehlte und nur zu einer tendenziellen Schädigung führte. Obwohl die hier eingesetzte Konzentration von 80 μ M deutlich über dem physiologischen Level dieser beiden endogenen Steroidhormone liegt, lassen die Ergebnisse ein genotoxisches Potential dieser beiden

Hormone vermuten. Östrogene induzieren oxidativen Stress durch *redox cycling* und stehen im Verdacht die Entwicklung verschiedener Tumoren zu begünstigen (Ripple *et al.*, 1997). Die hier vorgestellten Ergebnisse scheinen dies zu unterstützen. Auch Androgene induzieren oxidativen Stress in androgenabhängigen Prostatazellen (Ripple *et al.*, 1997), was eine mögliche Erklärung für die hier beobachtete Induktion von DNA-Schäden durch Dihydrotestosteron darstellt.

Epidemiologische Studien ergaben jedoch überwiegend keinen oder sogar einen inversen Zusammenhang zwischen den Konzentrationen verschiedener im Blut zirkulierenden Androgene und Östrogene und dem Prostatakarzinomrisiko (Chen *et al.*, 2003; Dorgan *et al.*, 1998; Shaneyfelt *et al.*, 2000).

Effekte der Isoflavonoide

Weder die Soja-Isoflavonoide noch ihre reduktiven Metabolite induzierten in den Prostatazelllinien DNA-Schäden. Auf ein genotoxisches Potential dieser Substanzen kann daher nicht geschlossen werden. In einer früheren Studie führten die Inkubation mit $\geq 10 \mu\text{M}$ Genistein und $> 200 \mu\text{M}$ Equol zu DNA-Strangbrüchen in LNCaP Zellen (Mitchell *et al.*, 2000). Zumindest für Genistein stehen diese Befunde im scheinbaren Widerspruch zu den hier berichteten Ergebnissen.

In einer kürzlich veröffentlichten Arbeit induzierten oxidative Isoflavonoid-Metabolite – nicht jedoch die Isoflavonoide selbst – DNA-Schäden in MCF-7 Brustzellen (Murata *et al.*, 2004). Ein oxidativer Metabolismus von Isoflavonoiden in der menschlichen Leber wurde sowohl *in vitro* als auch *in vivo* beschrieben (Kulling *et al.*, 2001). Vielleicht werden Isoflavonoide auch in Prostatazellen metabolisch aktiviert und induzieren DNA-Schäden über ihre oxidativen Metabolite. In der Arbeit von Mitchell *et al.* (2000) wurden die DNA-Schäden nach einer 24 h Inkubation bestimmt, die Bildung von oxidativen Metaboliten wäre somit theoretisch möglich. Weiterführende Studien sollten sich deshalb auch mit dem genotoxischen Potential von oxidativen Isoflavonoid-Metabolite beschäftigen. Zudem sollte geklärt werden, ob Prostatazellen tatsächlich zur Oxidation von Isoflavonoiden befähigt sind.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand hingegen in der Bestimmung etwaiger direkter genotoxischer Effekte der Soja-Isoflavonoide oder ihrer reduktiven Metabolite. Aus diesem Grund wurde eine 60 min Inkubation gewählt. Es muss somit einschränkend festgestellt werden, dass die hier vorgestellten Ergebnisse keine Hinweise auf ein direktes genotoxisches Potential der untersuchten Isoflavonoide erkennen lassen.

In diesem Zusammenhang sollte ferner darauf hingewiesen werden, dass die durch Mitchell et al. (2000) erhobenen Befunde nicht auch unmittelbar auf ein mutagenes Potential der Isoflavonoiden hindeuten. Genistein hemmt einen Teil der katalytischen Funktion der Topoisomerase II (Polkowski & Mazurek, 2000). Dieses Enzym bindet kovalent an die DNA und induziert – um die Topologie des Chromatins für die DNA-Replikation und die Transkription zu modulieren – vorübergehend DNA-Strangbrüche. Genistein verhindert das Verschließen dieser Soll-Bruchstellen, indem es einen stabilen tertiären Komplex mit der DNA und der Topoisomerase II bildet, welcher die Zellteilung stoppt (Polkowski & Mazurek, 2000). Ein Auftreten von DNA-Strangbrüchen nach der Behandlung mit Isoflavonoiden könnte demnach auch über eine Inhibierung der Topoisomerase II vermittelt werden. Ein mutagenes Potential von Isoflavonoiden wurde in humanen Zellen bislang nicht beobachtet. In V79 Lungenfibroblasten des Chinesischen Hamsters wirkte Genistein allerdings auch schwach mutagen (Kulling & Metzler, 1997).

Letztlich stützen sich die Berichte über genotoxische Effekte von Isoflavonoiden bisher ausschließlich auf *In-vitro*-Befunde. Weder im Tierexperiment mit Mäusen und einer mittleren Plasmakonzentrationen von 9,2 µM Genistein (Record *et al.*, 1995) noch in einer humanen Interventionsstudie, in der Plasmakonzentrationen von bis zu 26,7 µM Genistein erreicht wurden (Miltyk *et al.*, 2003), ergaben sich negative Effekte auf die DNA-Integrität lymphatischer Gewebe. Insgesamt muss die Datenlage hinsichtlich des genotoxischen Potentials von Isoflavonoiden als unzureichend und uneinheitlich eingeschätzt werden.

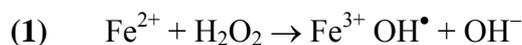
5.3 Antigenotoxische Aktivitäten von Genistein in Prostatazellen

Die Untersuchungen zur Modulation des Zellwachstums durch Isoflavonoide dienten vorrangig dem Vergleich der biologischen Aktivitäten der Testsubstanzen in Prostatazellen. Genistein und Equol zeigten hierbei in beiden Zelllinien die höchsten Aktivitäten. Da beim Menschen die Exposition mit Genistein wahrscheinlich dominiert, und da das physiologisch relevante S-Equol über weite Strecken dieser Arbeit nicht zur Verfügung stand, wurde im zweiten Teil der Arbeit nach weiteren chemopräventiven Wirkungen des Soja-Isoflavonoids Genistein gesucht.

Den Ausgangspunkt hierfür bildete der aktuelle Kenntnisstand bzgl. der spezifischen Besonderheiten der Prostatakarzinogenese (vgl. Kap. 1.1.2 und 1.1.3). Das Prostatakarzinom erweist sich als eine ausgesprochene Erkrankung des Alters und ist eng mit dem Auftreten von oxidativem Stress und oxidativen DNA-Schäden assoziiert (Malins *et al.*, 2001). Als mögliche Ursache wurde eine mit dem Alter einhergehende Abnahme einiger zellulärer antioxidativer Schutzsysteme in Prostatazellen diskutiert (Bostwick *et al.*, 2000; Ghatak & Ho, 1996).

Induktion von oxidativem Stress

Im Hinblick auf den etablierten Risikofaktor Alter und die damit verbundenen Veränderungen des Redox-Status der Prostata stellte sich die Frage, ob Genistein in der Lage ist, die DNA von Prostatazellen vor oxidativ-induzierten Schäden zu schützen. In der vorliegenden Arbeit wurden diese DNA-Schäden mit Hilfe der physiologisch relevanten Oxidantien H₂O₂ und Hämoglobin induziert. Beide Substanzen generieren oxidativen Stress in Form von ROS und führen experimentell zu einer oxidativen Schädigung der DNA (Glei *et al.*, 2002). Es wird angenommen, dass die so induzierten DNA-Schäden über die Fenton-Reaktion (**Gleichung 1**) bzw. das dort gebildete Hydroxylradikal (OH[•]) vermittelt werden (Henle & Linn, 1997).



Effekte von Genistein auf das Ausmaß oxidativ-induzierter DNA-Schäden

Nach 60 min Inkubation verminderten bereits Konzentrationen von 0,1 und 1 µM Genistein das Ausmaß H₂O₂-induzierter DNA-Schäden um bis zu 36 %. Die hier effektiven Konzentrationen liegen im Bereich der üblicherweise in asiatischen Ländern erreichten Genistein-Konzentrationen im Blutplasma; in westlichen Ländern werden solche Plasmakonzentrationen hingegen normalerweise nicht erreicht (Morton *et al.*, 2002). Die *in vitro* Ergebnisse lassen daher eine bisher unbekannte antigenotoxische – und möglicherweise chemopräventive – Wirkung von Genistein in Prostatazellen vermuten. Aufgrund der im Vergleich zum westlichen Kulturkreis deutlich höheren Exposition mit Isoflavonoiden wäre eine vergleichbare antigenotoxische Wirkung *in vivo* vermutlich auf asiatische Populationen begrenzt und könnte zum dort beobachteten geringeren Prostatakarzinomrisiko beitragen.

In diesem Teil der Untersuchungen beschränkte sich die antigenotoxische Aktivität von Genistein somit auf Isoflavonid-Konzentrationen, wie sie üblicherweise durch eine sojareiche Ernährung erreicht werden. Höhere Konzentrationen (10 - 30 μM), die ausschließlich durch die Supplementation von Isoflavonoid-Präparaten erreicht werden, zeigten dagegen eine deutlich verminderte bzw. keine antigenotoxische Wirkung. Eine direkte DNA-schädigende Wirkung von Genistein kann als Erklärung für die Abnahme des Schutzeffektes ausgeschlossen werden (vgl. Kap. 5.2), zumal die mitgeführten Kontrollen (Inkubation mit Genistein ohne anschließende Behandlung mit H_2O_2) ebenfalls keinen Hinweis auf eine Induktion von DNA-Strangbrüchen durch Genistein ergaben. Die Ursachen für die Abnahme der antigenotoxischen Aktivität bei höheren Konzentrationen an Genistein bleiben deshalb ungeklärt.

Die antigenotoxische Wirkung von Genistein wurde mit Hilfe eines zweiten Oxidants bestätigt. Die zuvor effektivste antigenotoxische Konzentration von 1 μM Genistein verminderte die hämoglobin-vermittelten DNA-Schäden in LAPC-4 Zellen um 33 %.

Auch eine 24 h Vorinkubation mit Genistein verminderte in LAPC-4 Zellen das Ausmaß H_2O_2 -induzierter DNA-Schäden. Hier führten 1 - 30 μM Genistein zu einer Reduktion der DNA-Strangbrüche um bis zu 50 %. Ein zweigeteilter Dosis-Wirkungs-Zusammenhang ergab sich hier nicht. Daher ist die nach 60 min beobachtete Abnahme der antigenotoxischen Kapazität bei hohen Genistein-Konzentrationen vermutlich ein zeitlich eng begrenzter Effekt.

Ähnliche antigenotoxische Wirkungen von Genistein wurden *in vitro* bereits für andere Gewebe berichtet. Konzentrationen von 0,01 – 1 μM Genistein verminderten das Ausmaß H_2O_2 -induzierter DNA-Schäden in humanen primären Lymphozyten (Sierens *et al.*, 2001). In Übereinstimmung mit den hier vorgestellten Ergebnissen mit Prostatazellen zeigten Konzentrationen von $\geq 10 \mu\text{M}$ Genistein ebenfalls keine antigenotoxische Wirkung. Eine weitere Arbeit mit humanen primären Lymphozyten berichtete, dass 0,01 – 2,5 μM Genistein zu einer Abnahme von oxidativen DNA-Schäden führten (Foti *et al.*, 2005). Darüber hinaus verringerten 0,01 – 1 μM Genistein das Ausmaß H_2O_2 -induzierter DNA-Schäden in menschlichen Spermien. Konzentrationen über 10 μM hatten wiederum eine Abnahme dieses Effektes zur Folge (Sierens *et al.*, 2002).

Der in der vorliegenden Arbeit nach 60 min ermittelte zweigeteilte Effekt von Genistein auf die DNA-Integrität von Prostatazellen steht damit möglicherweise in einem

mechanistischen Zusammenhang mit den soeben genannten Effekten in Lymphozyten und Spermien, in denen vergleichbare Konzentrationen von Genistein ebenfalls eine antigenotoxische Wirkung auslösten, während diese Wirkung bei höheren Genistein-Konzentrationen nicht beobachtet wurde.

Auch erste *In-vivo*-Befunde lassen einen genistein-vermittelten Schutz der DNA gegenüber oxidativem Stress vermuten. Die subkutane Applikation von Genistein (10 μ M) schützte die Hautzellen von Mäusen vor DNA-Schäden, welche mit UVB und H₂O₂ induziert wurden (Wei *et al.*, 2002).

In einer humanen Interventionsstudie erhöhte eine dreiwöchige Supplementation mit Soja-Isoflavonoiden die Plasmakonzentration von Genistein auf ca. 2 μ M und führte gleichzeitig zu einer 50 %-igen Abnahme oxidativer DNA-Schäden in peripheren Lymphozyten (Djuric *et al.*, 2001). Eine weitere humane Interventionsstudie untersuchte den Einfluss von Sojamilch auf die DNA-Integrität in peripheren Lymphozyten männlicher Probanden. In dieser Studie stieg die mittlere Plasmakonzentrationen von Genistein binnen vier Wochen auf 1,3 μ M. Gleichzeitig verminderte sich das Ausmaß oxidativer DNA-Schäden um 60 % (Mitchell & Collins, 1999).

Es ist daher festzuhalten, dass Genistein bzw. Isoflavonoide in unterschiedlichen Geweben zu einer Verminderung von oxidativen bzw. oxidativ-induzierten DNA-Schäden *in vitro* und *in vivo* führen. In der vorliegenden Arbeit wurden diese antigenotoxischen Effekte erstmals auch in Prostatazellen beobachtet.

Antioxidative Wirkungen – wie z. B. das Radikalfangen – sind für diesen DNA-Schutz möglicherweise von zentraler Bedeutung. In der Literatur werden die direkten antioxidativen Eigenschaften von Genistein äußerst kontrovers diskutiert. Auf der einen Seite schützen Genistein und andere Isoflavonoide Lipoproteine (Hodgson *et al.*, 1996) sowie Fettsäuren (Patel *et al.*, 2001) effektiv vor einer radikal-induzierten Oxidation und vermindern die Bildung von radikal-induzierten DNA-Strangbrüche (Win *et al.*, 2002). Hierbei könnte die Hydroxylgruppe des B-Rings von Genistein als Wasserstoffdonator fungieren und so ein Einfangen von Radikalen ermöglichen (Patel *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2003). Andere Autoren bezweifeln allerdings die Radikalfänger-Eigenschaften von Genistein und anderen Isoflavonoiden (Guo *et al.*, 2002). Darüber hinaus gelten ein direkter Einfluss von Genistein auf den Redoxstatus von

Transitionsmetallionen, ein Chelatieren solcher Ionen durch Genistein sowie dessen Reaktion mit Peroxiden als eher unwahrscheinlich (Win *et al.*, 2002).

In den hier vorgestellten Untersuchungen erwiesen sich bereits geringe Konzentrationen als effektiv antigenotoxisch. Zudem wurden Genistein nach der Vorinkubation entfernt und die Zellen vor der weiteren oxidativen Behandlung gewaschen. Es ist daher fraglich, ob der von einigen Autoren vorgeschlagenen Radikalfänger-Wirkung von Genistein eine substantielle Bedeutung für die hier zu bewertenden Ergebnisse zukommen könnte.

Möglicherweise vermittelt Genistein in Prostatazellen auch antioxidative Wirkungen über die Induktion zellulärer Schutzsysteme. So verstärkt Genistein in LNCaP Zellen die Expression und Aktivität der Glutathion-Peroxidase, obgleich hierfür bedeutend höhere Konzentrationen von 100 μ M verwendet wurden (Suzuki *et al.*, 2002). Geringere Konzentrationen wurden von diesen Autoren leider nicht untersucht. Neben der Glutathion-Peroxidase stellen eine Vielzahl weiterer antioxidativer Enzyme mögliche Ziele für eine vermittelte zelluläre, antioxidative Wirkung von Genistein in Prostatazellen dar. Die im Folgenden durchgeführten Untersuchungen beschäftigten sich deshalb mit möglichen Effekten auf die Expression dieser Gene.

5.4 Effekte von Genistein auf die antioxidative Abwehr von Prostatazellen

Mit Hilfe zweier cDNA-Makroarrays erfolgten Analysen zum Einfluss von Genistein auf die Expression ausgewählter Gene der Biotransformation und Stressantwort in LAPC-4 Zellen (eine vollständige Liste der untersuchten Gene befindet sich im Anhang A). Die richtige Normalisierung der Rohdaten ist eine Grundvoraussetzung für die sinnvolle Datenanalyse. In den hier vorgestellten Experimenten erfolgte die Normalisierung der Rohdaten, indem der Datenwert eines jeden Spots durch den arithmetischen Mittelwert aller durch den Array-Hersteller ausgewiesenen Housekeeping-Spots derselben Membran dividiert wurden. Damit entsprechen die normalisierten Daten der relativen Chemilumineszenz, bezogen auf das mittlere Signal aller Housekeeping-Gene. Die Qualität der Normalisierung wurde durch die Darstellung im Scatterplot überprüft. Eine ebenfalls übliche Normalisierung über die mittlere Expression aller Spots (*global gene expression*) wurde, in Anbetracht der im Vergleich zu anderen cDNA-Arrays

geringen Anzahl an Spots sowie der funktionellen Verwandtschaft der gespotteten Gene, nicht erwogen. Als Bewertungsgrundlage für die Feststellung einer signifikanten Regulation diente der ungepaarte zweiseitige *t*-Test.

Analysen mittels cDNA Makroarray

Die Behandlung mit 1 μ M Genistein führte nach 24 h zu einer signifikanten Runterregulation von drei Genen. Den stärksten Effekt zeigte hierbei die Nicotinamid-N-Methyltransferase (1,5-fach). Die Ergebnisse gaben keinen Hinweis auf eine Modulation bekannter zellulärer antioxidativer Enzyme, was den Schluss nahe legt, dass die im Comet Assay durch 1 μ M Genistein nach 24 h ausgelöste Reduktion der H₂O₂-induzierten DNA-Schäden wahrscheinlich nicht über eine entsprechende Induktion dieser antioxidativen Enzymsysteme vermittelt wurde.

Es muss jedoch erwähnt werden, dass für alle die Genexpression betreffenden Untersuchungen eine um 24 h verlängerte Anwachsphase gewählt wurde (vgl. Kap. 3.2.5), was sowohl die Empfindlichkeit der Zelllinie gegenüber oxidativem Stress als auch das Expressionsmuster beeinflusst haben könnte.

Die Ergebnisse der Datenanalyse nach der Behandlung mit 10 μ M Genistein unterschieden sich deutlich von der zuvor besprochenen. Insgesamt neunzehn Gene wurden als differenziell exprimiert identifiziert, wobei sich für alle diese Gene eine Hochregulation ergab. Einige dieser Gene besitzen wichtige antioxidative Funktionen, bspw. die Mikrosomale Glutathion-S-Transferase 1 (1,5-fach). Sie könnten daher – aus rein mechanistischer Sicht – den oxidativen Stress in Zellen vermindern und zu einer Reduktion oxidativ-induzierter DNA-Schäden beitragen. Im Folgenden wurden drei dieser Zielgene näher betrachtet.

Die Glutathionreduktase (GSR) katalysiert die Regeneration des bedeutendsten intrazellulären Antioxidants Glutathion, genauer Glutathion-Sulphydryl (GSH), nach dessen Oxidation zum Glutathion-Disulfid (GSSG). Damit ist die GSR unmittelbar an der Aufrechterhaltung der GSH-Redox-Homöostase beteiligt. Mit 1 - 10 mM (abhängig vom Gewebe) liegt der überwiegende Teil des Glutathions in Form des reduzierten GSH vor (Rahman & MacNee, 2000). Unter oxidativem Stress ist die Balance des GSH/GSSG-Systems gestört, was zur Modulation redox-sensitiver Transkriptionsfaktoren wie z. B. NF- κ B führt und so Einfluss auf die Genexpression nimmt. Als Co-Substrat antioxidativer Enzyme, wie der Glutathion-Peroxidase oder den Glutathion-S-

Transferasen, nimmt GSH darüber hinaus eine wichtige Rolle bei der antioxidativen Abwehr ein (Rahman & MacNee, 2000). Daneben reagiert Glutathion auch direkt mit freien Radikalen, z. B. mit dem Hydroxylradikal (Quesada *et al.*, 1996). Die durch Genistein hervorgerufene Induktion der GSR stellt daher wahrscheinlich eine Unterstützung der zellulären Abwehr von oxidativem Stress dar.

In diesem Kontext ist auch die Aktivität der Mikrosomalen Glutathion-S-Transferasen von Bedeutung. Ähnlich wie die verwandten zytosolischen Isoformen besitzen die Mikrosomalen Glutathion S-Transferasen eine Peroxidase-Funktion, d. h. sie reduzieren Peroxide und verhindern so, dass reaktivere Spezies aus ihnen generiert werden (Prabhu *et al.*, 2004; Mosialou *et al.*, 1993). Bei diesen Peroxidase-Reaktionen wird GSH als Co-Substrat benötigt und oxidiert. Die hier durch Genistein hervorgerufene Induktion der Mikrosomalen Glutathion S-Transferase 1 (MGST-1) – besonders zusammen mit der Induktion der GSR – führt wahrscheinlich ebenfalls zu einer Stärkung der antioxidativen Abwehr von Prostatazellen.

Eine weitere interessante Gruppe antioxidativer Zielgene bilden die Metallothioneine. Diese niedermolekularen Proteine (< 7000 Da) bestehen aus ca. 60 Aminosäuren mit 18 – 23 hochgradig konservierten Cystein-Resten. Ähnlich wie das Tripeptid GSH besitzen Metallothioneine – aufgrund der Sulfhydrylgruppe von Cystein – umfangreiche Redox-Eigenschaften (Coyle *et al.*, 2002). Sie binden Schwermetallionen und andere zur Fenton-Reaktion befähigte Transitionsmetallionen (Theocharis *et al.*, 2003), reagieren hoch affin mit Superoxid-Anionen sowie Hydroxylradikalen und schützen das GSH vor Oxidation, unterstützen also die antioxidative Wirkung von GSH (Quesada *et al.*, 1996). Darüber hinaus verringern Metallothioneine effektiv das Ausmaß H₂O₂-induzierter DNA-Schäden (Levadoux-Martin *et al.*, 2001). Demnach könnte der durch Genistein hervorgerufene DNA-Schutz möglicherweise auch über eine Induktion von Metallothioneinen vermittelt worden sein. Von den beiden im cDNA-Makroarray signifikant induzierten Isoformen bildet lediglich das Metallothionein 1X (MT-1X) ein Protein, für das Metallothionein 1L wurde dagegen bisher kein Protein nachgewiesen (Coyle *et al.*, 2002).

Verifizierung und Charakterisierung der Effekte mit TaqMan Real-Time PCR

Für die drei genannten Zielgene (GSR, MGST-1 und MT-1X) erfolgten weitere Untersuchungen in LAPC-4 Zellen, um die Ergebnisse aus den cDNA-Makroarray-Analysen zu bestätigen und weitere Erkenntnisse über die Mechanismen der ermittelten

Regulationen zu gewinnen. Mittels TaqMan Real-Time PCR wurden zunächst Dosis-Wirkungs-Beziehungen zwischen Genistein und der Expression dieser Gene erstellt. Eine 24 h Inkubation mit Genistein hatte Induktionen der MGST-1 (1,9-fach bei 30 μ M) sowie des MT-1X (1,7-fach % bei 10 μ M und 2,1-fach bei 30 μ M) zur Folge; eine Induktion der GSR bestätigte sich nicht.

Die im Anschluss durchgeführten kinetischen Untersuchungen mit 30 μ M Genistein zeigten deutliche Unterschiede im zeitlichen Verlauf der Induktionen. Für die GSR ergab sich eine 2,7-fache Induktion nach 12 h, wobei das Expressionsniveau während der nächsten 36 h weitestgehend erhalten blieb. Auch die Expression des MT-1X zeigte ein Maximum nach 12 h (6,3-fache Induktion); allerdings fiel hier die Expression innerhalb der nächsten 12 h auf das Kontrollniveau zurück. Die kinetischen Untersuchungen zur Regulation der MGST-1 ergaben eine 2,9-fache Runterregulation nach 4 h, gefolgt von einer kontinuierlichen Zunahme der Expression, die nach 48 h zu einer 1,7-fachen Induktion über das Kontrollniveau führte. Die Ergebnisse lassen also für alle drei hier untersuchten Gene eine Induktion durch Genistein erkennen. Die teilweise unterschiedlichen Kinetiken deuten möglicherweise auf unterschiedliche Mechanismen der Regulationen hin.

Unter Berücksichtigung der soeben vorgestellten kinetischen Daten erschien es sinnvoll, eine weitere Dosis-Wirkungs-Beziehung für das MT-1X zu erstellen, diesmal jedoch nach 12 h Inkubation. Nun induzierten 30 μ M Genistein die Expression von MT-1X ebenfalls deutlich (3,9-fach). Auch 1 μ M und 10 μ M zeigten jeweils eine Tendenz zur Induktion (1,4-fach bzw. 1,7-fach), verfehlten aber das Signifikanzniveau im Dunnett's Posttest. Da sich die Expression nach Inkubation mit 30 μ M deutlich in der Höhe von den anderen Konzentrationen unterschied, wurde eine Unterbewertung der kleineren Effekte durch die One-way ANOVA mit Dunnett's Posttest befürchtet und deshalb zusätzlich ein *t*-Test durchgeführt. Dieser ermittelte signifikante Induktionen in einem Konzentrationsbereich von 1 - 30 μ M Genistein.

Somit wurde gezeigt, dass Genistein die Expression von drei wichtigen Genen der zellulären antioxidativen Abwehr fördert. Jedes dieser Gene ist direkt oder indirekt an der Bekämpfung von oxidativen Stress beteiligt und unter mechanistischen Gesichtspunkten in der Lage, den intrazellulären oxidativen Druck auf die DNA zu mindern. Genistein wirkt demnach möglicherweise chemopräventiv, in dem es die Expression

dieser Gene in der Prostata induziert und so vor altersbedingten, radikal-induzierten oxidativen DNA-Schäden schützt.

Hinweis auf eine ER-vermittelte Modulation von MT-1X

Wie zuvor erwähnt, liefert die Literatur Hinweise, dass Metallothioneine effektiv vor oxidativen DNA-Schäden schützen. Diese Wirkungen beruhen höchstwahrscheinlich auf ihren Radikalfänger-Eigenschaften. Zudem zeigte Genistein das stärkste induktive Potential bei MT-1X. Deshalb wurde für dieses Gen ein möglicher Mechanismus der Regulation durch Genistein näher betrachtet. Hierfür erfolgten Untersuchungen zum Einfluss von 17 β -Östradiol auf die Expression von MT-1X. Sollte die beobachtete induktive Wirkung von Genistein über den ER vermittelt worden sein, würde sich möglicherweise durch dieses Östrogen eine ähnliche Aktivität ergeben. Aufgrund der – im Vergleich zu Genistein – höheren Affinität zwischen 17 β -Östradiol und dem in Prostatazellen exprimierten ER β (Kuiper *et al.*, 1998; Lau *et al.*, 2000) wurden hierfür entsprechend 10-fach und 100-fach geringere Konzentrationen von 17 β -Östradiol eingesetzt.

Interessanterweise verminderten 0,3 μ M 17 β -Östradiol die Genexpression von MT-1X um 50 %. Genistein und 17 β -Östradiol wirken also antagonistisch. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass Genistein die Expression von MT-1X über den ER β induziert. Um dies zweifelsfrei klären zu können, sind jedoch weiterführende Untersuchungen notwendig. Eine Beteiligung des ER β kann an dieser Stelle lediglich vermutet werden.

In Caco-2 Darmzellen induzierten 10 - 100 μ M Genistein die Genexpression von Metallothionein 2A (MT-2A), mit einem Maximum nach 48 h (Kameoka *et al.*, 1999). Auch Daidzein und Biochanin A führten in dieser Studie zu einer Induktion. Eine spätere Veröffentlichung dieser Arbeitsgruppe untersuchte, mit Hilfe eines Reportergen-Assays, den Mechanismus dieser Induktion. Die hierfür verwendete Promotorsequenz von MT-2A besitzt das *glucocorticoid response element* (GRE), das *metal response element* (MRE), das *antioxidant response element* (ARE), eine GC-reiche Region für die Bindung von Sp1 (GC-Box) sowie die TATA-Box, jedoch kein *estrogen response element* (ERE) (Hua *et al.*, 2003). Es wurde gezeigt, dass Genistein die Induktion von MT-2A über die GC-Box vermittelt. Diese induktive Wirkung wurde durch die Überexprimierung von ER β – jedoch nicht von ER α – verstärkt (Hua *et al.*, 2003).

In Caco-2 Zellen induziert Genistein demnach die Expression von MT-2A über eine GC-reiche Sp1-Bindungsstelle, die sonst überwiegend über die MAPK-Kaskade angesprochen wird, wobei der ER β diesen Effekt vermittelt bzw. verstärkt.

Die Promotorregionen der MT-1 Isoformen sind weniger komplex als die von MT-2A, sie enthalten lediglich das MRE, eine variable Anzahl von GC-Motiven sowie ein TATA-Element (Shworak *et al.*, 1993). Allerdings liefert die Literatur keine spezifischen Angaben bzgl. MT-1X. Die vorliegende Arbeit untersuchte deshalb *in silico* die Promotorregion von MT-1X (-500 bis +50 bp) hinsichtlich vorhandener regulatorischer Elemente (sog. Konsensus-Sequenzen) und ermittelte vier mögliche MRE, zwei mögliche GC-Boxen sowie eine TATA-Box; vollständige ERE und halbseitige ERE wurden nicht gefunden (**Abbildung 31, Anhang B**). Es ist daher wahrscheinlich, dass Genistein die Expression von MT-1X in Prostatazellen ebenfalls über den ER β und eine Sp1-Bindungsstellen induziert. Dieser ERE-unabhängige Signalweg reguliert eine größere Anzahl von Genen, wie z. B. den EGF-Rezeptor (Salvatori *et al.*, 2003), Cadhepsin D, den Progesteronrezeptor, das Hitzeschockprotein 27 (Sanchez *et al.*, 2002) sowie c-fos und bcl-2 (Saville *et al.*, 2000).

Untersuchungen an diesen Genen lieferten eine Reihe wichtiger Erkenntnisse über den Mechanismus dieses neuartigen Signalweges: Sowohl der ER α als auch der ER β interagieren mit Sp1 und verstärken oder hemmen – in Abhängigkeit des Gewebetypes und des Liganden – die Bindung von Sp1 an die GC-Box, ohne dabei selbst mit der DNA in Kontakt zu treten (Saville *et al.*, 2000). Der aktivierte ER fungiert somit als *enhancer* (Verstärker) oder *attenuator* (Dämpfer) der Sp1-vermittelten Genregulation. In einigen Fällen treten halbseitige ERE auf und verstärken diese Wirkung zusätzlich (Sanchez *et al.*, 2002). In ER β co-transfizierten LNCaP Prostatazellen verminderte 17 β -Östradiol die Transaktivierung in einem GC-Box-gekoppelten Reporter-gen-Assay (Saville *et al.*, 2000). Da Prostataepithelzellen üblicherweise den ER β exprimieren (Lau *et al.*, 2000), deutet dies auf eine ER β /Sp1-vermittelte Hemmung der Genexpression durch 17 β -Östradiol in Prostatazellen hin. Dies kann als weiterer Hinweis dafür gewertet werden, dass die in der vorliegenden Arbeit gezeigten antagonistischen Wirkungen von Genistein und 17 β -Östradiol auf die MT-1X-Genexpression über diesen ER β /Sp1-Mechanismus vermittelt werden.

Mit Hilfe eines Reporter-gen-Assays wurde in HeLa Zervixzellen eine ER β /Sp1-vermittelten Induktion der EGF-Rezeptor-Expression durch 17 β -Östradiol, Genistein

sowie Daidzein ermittelt. In diesem Fall wirkten die Phytoöstrogene als Östrogen-Agonisten (Salvatori *et al.*, 2003). Damit gehört Genistein wahrscheinlich zu den *selective estrogen receptor modulators* (SERM). Solche SERM, wie z. B. Tamoxifen und Raloxifen, besitzen sowohl östrogene- als auch antiöstrogene Eigenschaften, je nach betrachtetem Gewebe (Jordan *et al.*, 2001).

Zusammengenommen deuten die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit somit auf eine ER β /Sp1-vermittelte Hemmung der Genexpression von MT-1X durch 17 β -Östradiol in LAPC-4 Zellen hin, während Genistein in diesem Fall als Antagonist wirkt und die Expression von MT-1X über den gleichen Mechanismus stimuliert.

Effekte von Genistein und 17 β -Östradiol auf die Metallothionein-Proteinexpression

Die Regulation der Expression von Metallothioneinen erfolgt wahrscheinlich auf der Transkriptionsebene (Hua *et al.*, 2003). Um im vorliegenden Fall einen engeren Bezug zu möglichen funktionalen Konsequenzen der beobachteten Induktion von MT-1X herzustellen, wurde zusätzlich geprüft, ob die beobachtete Modulation auch tatsächlich auf die Proteinebene übersetzt wird bzw. genauer, ob Genistein und 17 β -Östradiol in LAPC-4 Zellen zu einer Modulation der Metallothionein-Polypeptide führen. Hierfür wurde ein Antikörper verwendet, der laut Herstellerangaben (DakoCytomation, Dänemark) gegen ein hoch-konserviertes Epitop der Metallothioneine gerichtet ist und die meisten Isoproteine bindet.

Metallothioneine liegen in der Zelle häufig im Zytoplasma vor, können aber auch in den Zellkern transloziert werden. Eine Anreicherung im Zellkern ist mit einem noch stärkeren Schutz der DNA vor oxidativen Angriffen verbunden (Levadoux-Martin *et al.*, 2001). Die Translokation in den Zellkern wird z. B. in der S-Phase des Zellzyklus beobachtet (Theocharis *et al.*, 2003). Aufgrund der zu diesem Zeitpunkt erhöhten Vulnerabilität der DNA wird hinter diesem Mechanismus ein DNA-Schutz während der Replikation vermutet (Coyle *et al.*, 2002). In der vorliegenden Arbeit wurden die möglichen Effekte auf die Proteinexpression von Metallothioneinen deshalb *in situ*, mit Hilfe einer immunzytochemischen Färbetechnik untersucht.

Zur Abschätzung der Proteinexpression wurden 500 Zellen pro Ansatz mikroskopisch ausgezählt und – entsprechend ihrer immungekoppelten DAB-Färbung – einer von drei Klassen zugeordnet (L: keine, M: mittlere, H: intensive Färbung). Die Anzahl der Zellen in der Klasse L wurde mit eins multipliziert, die Zellen der beiden anderen

Klassen wurden jeweils verdoppelt so hoch gewichtet – also mit zwei bzw. vier multipliziert. Die Summe aller Punkte einer Probe wurde als Expression-Score bezeichnet und bildete die Grundlage für den Vergleich der Metallothionein-Expression zwischen den verschiedenen Versuchsansätzen.

Die als Positivkontrolle mitgeführte Behandlung mit 50 μM ZnSO_4 führte nach 12 h zu einem um 56 % erhöhten Expression-Score. Dies ist größtenteils auf den deutlichen Anstieg der intensiv gefärbter Zellfraktion von 2 % (Kontrolle) auf 34 % zurückzuführen. Die Inkubation mit 30 μM Genistein führte zu einem signifikanten Anstieg des Expression-Scores um 35 %. Der Anteil intensiv gefärbter Zellen erhöhte sich dabei auf 17 %. 17β -Östradiol beeinflusste die Proteinexpression von Metallothioneinen dagegen nicht.

Die Untersuchungen belegen, dass Genistein die Konzentrationen von Metallothionein-Proteinen in LAPC-4 Zellen erhöht. Im Gegensatz zu den vorangegangenen Experimenten hatte 17β -Östradiol hier keinen Einfluss auf das Expressionsniveau, was möglicherweise auf die vergleichsweise geringe Gradation (drei Klassen) zurückzuführen ist. Zudem ist vorstellbar, dass nicht alle hier detektierbaren Metallothionein-Isoproteine auf die gleiche Weise bzw. in gleichem Umfang durch die Behandlungen angesprochen werden.

Für die hier ermittelte Induktion der Metallothioneine waren relativ hohe Genistein-Konzentrationen erforderlich. Im Vergleich dazu erwiesen sich 0,1 μM (nach 60 min) und 1 μM (nach 24 h) Genistein als effektiv antigenotoxisch im Comet Assay. In den immunzytochemischen Analysen führten 1 μM und 10 μM Genistein nach 12 h zu einem Anstieg des Expression-Scores um 4 % bzw. 26 %. Dieser verfehlte jedoch die Signifikanz, obgleich sich für Behandlung mit 10 μM ein Trend ergab. Aussagen darüber, ob Genistein über eine Induktion von Metallothioneinen zu dem beobachteten Schutz vor oxidativ-induzierten DNA-Schäden führt, lassen sich anhand der in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse nicht treffen. Hierfür sind zusätzliche Studien erforderlich, die bspw. eine quantitative Bestimmung der Induktion ermöglichen (z. B. Western Blot) und damit eine bessere Abschätzung der möglichen Bedeutung für den durch Genistein vermittelten Schutz vor oxidativ-induzierten DNA-Schäden erlauben.

Diese Arbeit untersuchte auch einen möglichen Einfluss von Genistein auf die intrazelluläre Lokalisation von Metallothioneinen. Genistein und 17β -Östradiol führen

bspw. binnen 60 min zu einer Induktion und vollständigen Translokation des AR in den Zellkern von LNCaP Prostatazellen (Maggiolini *et al.*, 2002). Der ER β ist möglicherweise in diesen Prozess involviert und wird im gleichen Zeitraum ebenfalls in den Zellkern transloziert (Maggiolini *et al.*, 2004). Es erscheint daher vorstellbar, dass Genistein gleichsam die intrazelluläre Lokalisation von Metallothioneinen in Prostatazellen beeinflusst und auch so vor oxidativ-induzierten DNA-Schäden schützt. Dieser vermutete Mechanismus könnte auch zur Erklärung der in dieser Arbeit bereits nach 60 min beobachteten antigenotoxischen Wirkung von Genistein beitragen.

Die Untersuchungen zeigten jedoch, dass weder Genistein noch eine der anderen Testsubstanzen die intrazelluläre Lokalisation der Metallothioneinen beeinflussen. Demnach wird die in dieser Arbeit beobachtete antigenotoxische Wirkung von Genistein wahrscheinlich nicht über eine Translokation von Metallothioneinen aus dem Zytoplasma in den Zellkern vermittelt. Dabei muss einschränkend festgestellt werden, dass sich die hier diskutierten Versuche an den Daten aus den kinetischen Untersuchungen zur Regulation von MT-1X auf der Transkriptionsebene orientierten; deshalb wurde eine 12 h Inkubation durchgeführt. Eine mögliche Translokation von Metallothioneinen nach 60 min Inkubation mit Genistein kann deshalb nicht ausgeschlossen werden, wird jedoch als eher unwahrscheinlich eingeschätzt.

6 Schlussfolgerungen und Ausblick

Aufgrund der Untersuchungen an den humanen Prostatazelllinien LNCaP und LAPC-4 lassen sich die wesentlichen Ergebnisse sowie die daraus abgeleiteten Schlussfolgerungen über die biologischen Aktivitäten von Isoflavonoiden in Prostatazellen wie folgt benennen:

- Hohe Konzentrationen an 17β -Östradiol und Dihydrotestosteron schädigen die DNA von Prostatazellen, in dem sie Strangbrüche induzieren. Die hier untersuchten Isoflavonoide verursachen dagegen keine DNA-Strangbrüche. Demzufolge geht eine Exposition mit Isoflavonoiden – im Gegensatz zu endogenen Steroidhormonen – nicht mit einem genotoxischen Risiko in Prostatazellen einher.
- Das Wachstum beider Zelllinien wird durch Dihydrotestosteron stimuliert. Darüber hinaus regt 17β -Östradiol das Wachstum von LNCaP Zellen an. Die untersuchten Isoflavonoide fördern das Wachstum dieser Zelllinien dagegen nicht. Isoflavonoide erhöhen somit – im Gegensatz zu endogenen Steroidhormonen – nicht das Risiko der Progression von Tumorzellen in der Prostata. Weiterhin kann darauf geschlossen werden, dass die in Prostatakarzinomen häufig auftretende T877A AR-Mutation keinen unerwünschten Wachstumsvorteil während einer Isoflavonoid-Exposition vermittelt.
- Das quantitativ dominierende Soja-Isoflavonoid Genistein hemmt das Wachstum beider Zelllinien. Die hierfür benötigten Konzentrationen liegen innerhalb der beim Menschen erreichbaren physiologischen Grenzen. Die aus Genistein im menschlichen Darm gebildeten Metabolite Dihydrogenistein und 6'-Hydroxy-O-DMA besitzen dagegen keine bzw. eine deutlich geringere wachstumshemmende Aktivität. Daraus folgt, dass das aus der Sojabohne stammende Genistein direkt und nicht über seine im Darm entstehenden Metabolite zu diesen potentiell chemopräventiven Wirkungen in Prostatazellen führt.
- Das zweite mengenmäßig bedeutende Soja-Isoflavonoid Daidzein wirkt in beiden Zelllinien weniger stark wachstumshemmend als Genistein. Die von Daidzein abgeleiteten Metabolite Equol und O-DMA (letzteres nur in LAPC-4 Zellen) inhibieren das Zellwachstum jedoch stärker als ihre pflanzliche Vorstufe. Somit

wirkt Daidzein hier eher indirekt chemopäventiv, über seine im Darm gebildeten Metabolite. Aus den Ergebnissen kann weiterhin geschlossen werden, dass der individuellen Mikroflora – bzw. ihrer metabolischen Kompetenz zur Produktion von Equol und *O*-DMA – eine gewisse Bedeutung für die Chemoprävention des Prostatakarzinoms durch die Substanzgruppe zukommt.

Die unterschiedlichen Antworten der beiden Zelllinien auf *O*-DMA machen jedoch deutlich, dass die hier *in vitro* gewonnenen Erkenntnisse nicht uneingeschränkt und allgemein auf die Situation *in vivo* übertragbar sind. Sie sollten eher als eine wichtige Basis für spätere Untersuchungen *in vivo* gesehen werden.

- Razemisches Equol und S-Equol hemmen das Wachstum von Prostatazellen in vergleichbarem Umfang. Demnach hat die Stereoisomerie von Equol keinen Einfluss auf diese Art der biologischen Aktivität in Prostatazellen.
- Die kombinierte Inkubation mit einem physiologisch-relevanten Verhältnis von 64 % Genistein, 29 % Daidzein und 7 % Equol hemmt das Wachstum beider Zelllinien. Der Vergleich dieser Effekte mit den Resultaten nach den Behandlungen mit den einzelnen Substanzen lässt auf eine hauptsächliche Wirkung von Genistein schließen. Aufgrund seiner vergleichsweise hohen Plasmakonzentration und der hohen biologischen Aktivität dürfte Genistein in Prostatazellen *in vivo* eine dominierende Rolle unter den Isoflavonoiden zukommen.
- Die wachstumshemmenden Effekte von Genistein, *O*-DMA, razemischem Equol, S-Equol sowie dem Isoflavonoidgemisch gehen nicht mit einer Beeinträchtigung der Mitochondrienaktivität einher, was darauf hindeutet, dass keine zytotoxischen Effekte für die Verminderung des Zellwachstums verantwortlich sind.

Die Untersuchungen zur Modulation des Zellwachstums durch Isoflavonoide ergaben somit, dass das mengenmäßig dominierende Soja-Isoflavonoid Genistein in beiden Zelllinien eine hohe biologische Aktivität besitzt. Mit dieser Substanz wurden deshalb weiterführende Untersuchungen durchgeführt. Diese lieferten zusätzliche Erkenntnisse über chemopräventive Wirkungen von Genistein in Prostatazellen:

- Eine Vorinkubation mit Genistein vermindert in beiden Zelllinien das Ausmaß oxidativ-induzierter DNA-Strangbrüche. Die hierfür notwendigen Konzentrationen

liegen im Bereich der üblichen Plasmakonzentrationen asiatischer Populationen, sie werden also über eine sojareiche Kost erreicht. Im Alter vermindert Genistein möglicherweise in Prostatazellen auch über diesen Mechanismus das Mutations- und damit das Krebsrisiko.

- Physiologische Konzentrationen an Genistein induzieren in LAPC-4 Zellen die Genexpression der Glutathionreduktase (GSR) sowie der Mikrosomalen Glutathion S-Transferase 1-(MGST-1). Da beide Enzyme wichtige Funktionen in der zellulären antioxidativen Abwehr besitzen, kann darauf geschlossen werden, dass die Förderung der Expression dieser Gene möglicherweise den oxidativen Stress in Prostatazellen vermindert und so einen Teil der o. g. antigenotoxischen Wirkungen von Genistein vermittelt.
- Genistein fördert in LAPC-4 Zellen auch die Transkription von Metallothionein 1X (MT-1X) und induziert darüber hinaus die Proteinexpression von Metallothioneinen. Aufgrund der ungewöhnlich hohen Anzahl von Thiolgruppen dieser Proteine besitzen diese Wirkungen wahrscheinlich ebenfalls das Potential, den oxidativen Stress in der Prostata zu verringern, und somit die DNA vor oxidativen Angriffen zu schützen.
- Im Gegensatz zu Genistein vermindert 17 β -Östradiol in LAPC-4 Zellen die Genexpression von MT-1X. Demzufolge wirkt Genistein hier dem Östrogen entgegen, also antiöstrogen. Zusammen mit Erkenntnissen aus der Literatur lässt sich vermuten, dass die Induktion von MT-1X durch Genistein über den ER β und SP1 vermittelt wird.
- Genistein nimmt in LAPC-4 Zellen keinen Einfluss auf die intrazelluläre Lokalisation der Metallothionein-Proteine. Deshalb ist eine Translokation dieser Proteine – z. B. aus dem Zellplasma in den Zellkern, also in unmittelbare Nähe zur DNA – kein Bestandteil der Wirkungen von Genistein in Prostatazellen und nicht an dessen o. g. antigenotoxischen Effekten beteiligt.

Die Untersuchungen zeigen also, dass physiologisch-relevante Konzentrationen der Isoflavonoide Genistein und Equol Wirkungen in menschlichen Prostatazellen besitzen, die möglicherweise helfen, die Entstehung von Karzinomen in der Prostata zu unter-

drücken. Damit deuten die hier vorgestellten Ergebnisse auf ein chemopräventives Potential dieser beiden Substanzen hin.

Der im menschlichen Dickdarm aus Daidzein gebildete Metabolit Equol hemmt das Wachstum von Prostatazellen in Konzentrationen, die unter der Voraussetzung einer günstigen Dickdarmflora über eine sojareiche Ernährung realisierbar sind. Eine sojareiche Kost verlangsamt demnach wahrscheinlich den Turnover von Prostatazellen, was deren Empfindlichkeit gegenüber Mutagenen vermindert und möglicherweise die Progression bereits maligner Foci unterdrückt. Die vorliegenden Ergebnisse lassen vermuten, dass der reduktive Metabolismus der menschlichen Darmflora – bzw. ihre individuelle Zusammensetzung – das chemopräventive Potential der Isoflavonoiden in Prostatazellen beeinflusst.

Genistein zeigt ähnlich wachstumshemmende Aktivitäten wie Equol. Die hierfür benötigten Konzentrationen werden *in vivo* über eine Supplementation von Isoflavonoiden erreicht. Bereits in geringeren Konzentrationen – wie sie über eine sojareiche Kost realisierbar sind – schützt Genistein darüber hinaus die DNA von Prostatazellen vor oxidativ-induzierter Schädigung. Genistein trägt möglicherweise so zur Erhaltung der DNA-Integrität von Prostatazellen bei und könnte insbesondere für die Bekämpfung des in der Prostata altersbedingt auftretenden oxidativen Stresses von Bedeutung sein. Die beobachteten antigenotoxischen Wirkungen sind mit einer Induktion von antioxidativen Schutzsystemen assoziiert, was vermuten lässt, dass Genistein seine günstigen Wirkungen auf die DNA-Integrität zumindest teilweise über die Förderung der zellulären antioxidativen Abwehr vermittelt.

Zusammengenommen liefert die vorliegende Arbeit eine Reihe von experimentellen Hinweisen für eine mögliche Bedeutung von Isoflavonoiden in der Chemoprävention sporadischer Prostatakarzinome. Ein Teil der beobachteten protektiven Wirkungen tritt in Konzentrationen auf, wie sie über eine sojareiche Ernährung im Blutplasma bzw. in der Prostataflüssigkeit des Menschen erreicht werden. Schädliche Wirkungen, wie z. B. eine Beschleunigung des Zellwachstums oder die Schädigung der DNA wurden nicht ermittelt. Es scheint daher möglich, dass ein häufiger Verzehr von Sojaprodukten über die aufgenommenen Mengen an Isoflavonoiden zu einer günstigen Beeinflussung des Prostatakarzinomrisikos führt und für einen Teil der in asiatischen Populationen deutlich geringeren Inzidenz dieser Erkrankung verantwortlich ist.

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit lassen einige Fragen offen bzw. werfen neue auf. In zukünftigen Untersuchungen sollten insbesondere die folgenden Punkte berücksichtigt werden:

- Isoflavonoide werden im menschlichen Organismus nicht nur reduziert, sondern auch oxidiert. Es ist bisher ungeklärt, ob Prostatazellen auch gegenüber diesen oxidativen Metaboliten exponiert sind bzw. diese sogar selbst bilden. Zur vollständigen Bewertung des genotoxischen Potentials von Isoflavonoiden sollten auch die möglichen Wirkungen dieser Metabolite in Prostatazellen betrachtet werden.
- Einige der Isoflavonoide wirken in Prostatazellen wachstumshemmend. Als ein zugrunde liegender Mechanismus wird die Inhibierung der Zellneubildung vermutet. Um allerdings noch präzisere Erkenntnisse über die Wirkungen von Isoflavonoiden in Prostatazellen zu gewinnen, sollte diese Annahme in weiteren Studien – z. B. mittels Durchflusszytometrie – geprüft werden. Darüber hinaus sollte ein möglicher Einfluss von apoptotischen Prozessen untersucht werden.
- Genistein schützt die DNA von Prostatazellen vor oxidativ-induzierten Schäden und induziert darüber hinaus die Genexpression von Enzymen und weiteren Proteinen der zellulären antioxidativen Abwehr. Um die chemopräventive Bedeutung dieser Wirkungen besser bewerten zu können, sollten zukünftigen Studien klären, ob der beobachtete Schutz vor DNA-Schäden tatsächlich über eines oder mehrere der hier näher betrachteten Gene vermittelt wird. Hierfür könnte bspw. der Einfluss von Genistein auf das Ausmaß oxidativ-induzierter DNA-Schäden in Prostatazellen untersucht werden, in denen zuvor jeweils eines dieser drei Gene durch Transfektion überexprimiert wurde.
- Im Fall von MT-1X wird die Induktion durch Genistein wahrscheinlich über den ER β vermittelt und auf Proteinebene übersetzt. Während eine Expression von ER β in LNCaP Zellen bekannt ist, kann dessen Expression in LAPC-4 Zellen lediglich vermutet werden. Neben der Bestimmung des Rezeptorstatus von LAPC-4 Zellen sollte geklärt werden, ob die durch Genistein ausgelöste Induktion der Genexpression von GSR und MGST-1 gleichfalls auf die Proteinebene übersetzt wird, und ob der ER β auch an der Regulation dieser beiden Enzyme beteiligt ist. Zur Beantwortung der letzten Fragestellung wären bspw. Reporter-gen-Assays geeignet.

7 Zusammenfassung

Einleitung: Mit rund einer halben Millionen Fällen pro Jahr ist das Prostatakarzinom die dritthäufigste Tumorform des Mannes weltweit. Rund 90 % aller Tumoren entwickeln sich sporadisch. Für diese Formen steigt das Risiko überdurchschnittlich stark mit dem Lebensalter an und geht mit einer Zunahme oxidativer DNA-Schäden einher. Daher spielt das Auftreten von oxidativem Stress wahrscheinlich eine wichtige Rolle bei der Entstehung sporadischer Prostatakarzinome. Asiatische Länder weisen für das Prostatakarzinom eine auffallend niedrige Inzidenzrate auf. Hierfür scheinen Lifestyle-Faktoren, wie die Ess- und Trinkgewohnheiten verantwortlich zu sein. Sojaprodukte bilden eine wichtige Grundlage der asiatischen Küche. In westlichen Kulturen, in denen Prostatakarzinome deutlich häufiger auftreten, findet Soja dagegen kaum Verwendung. Die Sojabohne enthält herausragend hohe Gehalte an einer Gruppe von Flavonoiden mit 3-Phenylchromanstruktur, den sog. Isoflavonoiden. Die Blutkonzentrationen dieser Substanzen liegen in der asiatischen Bevölkerung häufig um einen Faktor 10 und mehr über denen europäischer oder amerikanischer Populationen. Möglicherweise wirkt eine Exposition mit diesen Substanzen günstig auf das Prostatakarzinomrisiko. Isoflavonoide gehören zur den Phytoöstrogenen und besitzen *in vitro* u. a. antiproliferative, proapoptische und antiangiogene Eigenschaften; allerdings wurden auch genotoxische Effekte berichtet. Die in der Sojabohne dominierenden Isoflavonoide Genistein und Daidzein werden von der menschlichen Darmflora reduziert. Die biologischen Aktivitäten der so gebildeten Metabolite sind weitgehend unbekannt. Ein Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, die Wirkungen dieser Metabolite mit denen ihrer pflanzlichen Vorstufen in Prostatazellen zu vergleichen. Darüber hinaus erfolgten Untersuchungen mit dem Ziel, mögliche chemopräventive Aktivitäten von Isoflavonoiden zu ermitteln, um Hinweise auf eine Beeinflussung des Prostatakarzinomrisikos durch diese Substanzgruppe zu erhalten.

Materialien und Methoden: Für die Arbeit wurden zwei androgenabhängige Prostatakarzinomzelllinien verwendet (LNCaP und LAPC-4). Die biologischen Aktivitäten der Isoflavonoide wurden anhand von Effekten auf das Zellwachstum, über die gebildete Menge an DNA bestimmt. Zur Abgrenzung von zytotoxischen Wirkungen wurden ausgewählte Isoflavonoide mittels MTT-Assay auf eine mögliche Beeinträchtigung der Mitochondrienaktivität untersucht. Eine Bestimmung des genotoxischen Potentials der Testsubstanzen erfolgte mit dem Comet Assay. Darüber hinaus wurde dieser Assay

verwendet, um einen Einfluss von Genistein auf das Ausmaß H₂O₂- und hämoglobin-induzierter DNA-Schäden zu bestimmen. Effekte auf die Genexpression von LAPC-4 Zellen wurden mit zwei cDNA-Makroarrays untersucht. Mit Hilfe der TaqMan Real-Time PCR erfolgten weitere Expressionsanalysen für die Glutathionreduktase (GSR), die Mikrosomale Glutathion-S-Transferase 1 (MGST-1) und das Metallothionein 1X (MT-1X). Weiterhin wurde ein möglicher Einfluss von Genistein auf die Proteinexpression von Metallothioneinen mittels immunzytochemischer Detektion bestimmt.

Ergebnisse: Genistein verminderte das Wachstum von LNCaP und LAPC-4 Zellen (IC₅₀: 39,7 µM bzw. 39,3 µM). Dihydrogenistein und 6'-Hydroxy-O-DMA beeinflussten das Zellwachstum dagegen kaum. Daidzein hemmte das Wachstum beider Zelllinien, jedoch weniger stark als Genistein. Für Dihydrodaidzein wurde kein Effekt ermittelt. Die Zelllinien unterschieden sich in ihren Antworten auf O-DMA, eine Wachstumshemmung ergab sich nur in LAPC-4 Zellen (IC₅₀ = 45,2 µM). Equol hemmte das Wachstum beider Zelllinien mit IC₅₀-Werten von 53,8 µM (LNCaP) und 35,1 µM (LAPC-4). Untersuchungen mit S-Equol ergaben eine mit dem zuvor verwendeten razemischen Equol vergleichbare Aktivität. Keines der untersuchten Isoflavonoide beschleunigte das Zellwachstum oder beeinflusste die Mitochondrienaktivität. Eine Induktion von DNA-Schäden durch Isoflavonoide wurde ebenfalls nicht beobachtet. Nach 60 min verminderten 0,1 µM und 1 µM Genistein das Ausmaß H₂O₂-induzierter DNA-Schäden in LNCaP um bis 32 % und LAPC-4 Zellen um 36 %. Konzentrationen über 1 µM erwiesen sich als weniger effektiv. In LAPC-4 Zellen reduzierten 1 - 30 µM Genistein nach 24 h das Ausmaß H₂O₂-induzierter DNA-Schäden (IC₅₀ = 16,7 µM). Nach 60 min verminderte 1 µM Genistein außerdem das Ausmaß hämoglobin-induzierter DNA-Schäden um 33 %. Es wurde vermutet, dass Genistein diese Wirkungen über Effekte auf die Genexpression auslöst. Die Auswertung der cDNA-Makroarrays ergab u. a. eine in LAPC-4 Zellen durch Genistein ausgelöste Induktion von MT-1X, MGST-1 sowie GSR. Die Real-Time PCR-Untersuchungen zu den Dosis-Wirkungs-Beziehungen zwischen Genistein und diesen Genen bestätigte eine Induktion von MT-1X (1,7-fach bei 10 µM bzw. 2,1-fach bei 30 µM Genistein) und MGST-1 (1,9-fach bei 30 µM Genistein). Versuche zum zeitlichen Verlauf der Regulationen ermittelten Induktionsmaxima für MT-1X (6,3-fach) und GSR (2,7-fach) nach 12 h und MGST-1 (1,8-fach) nach 48 h. In einer daraufhin durchgeführten Untersuchung zum Einfluss verschiedener Genistein-Konzentrationen auf die Expression von MT-1X nach 12 h, führten 1 - 30 µM zu einer bis zu 3,9-fachen

Induktion. Dagegen verminderten 0,3 μM 17 β -Östradiol die Expression von MT-1X um 50 %. Dies wird als möglicher Hinweis auf eine ER-vermittelte Modulation der Expression von MT-1X durch Genistein gewertet. Die immunzytchemische Detektion ergab darüber hinaus eine durch Genistein vermittelte Induktion der Proteinexpression von Metallothioneinen. Im Vergleich zur DMSO-Kontrolle stieg hier die Anzahl intensiv gefärbter LAPC-4 Zellen – als Indikator einer erhöhten Metallothionein-Expression – nach einer 12 h Behandlung mit 30 μM Genistein deutlich von 2 % auf 17 % an. Ein Einfluss von 17 β -Östradiol ergab sich nicht. In 10 - 20 % der Zellen lagen die Metallothioneine nicht über die gesamte Zelle verteilt, sondern konzentriert im Kern vor. Die Behandlungen mit Genistein und 17 β -Östradiol beeinflussten diese intrazelluläre Verteilung nicht.

Schlussfolgerungen: Das Soja-Isoflavonoid Genistein vermindert deutlich das Wachstum der untersuchten Prostatazelllinien. Seine reduktiven Metabolite beeinflussen das Zellwachstum dagegen kaum. Die Metabolite Equol und O-DMA besitzen ein stärker wachstumshemmendes Potential als ihre pflanzliche Vorstufe Daidzein, wobei die Stereoisomerie von Equol für dessen biologische Aktivitäten in Prostatazellen wahrscheinlich ohne Bedeutung ist. Isoflavonoide beschleunigen weder das Wachstum von Prostatakarzinomzellen noch induzieren sie DNA-Strangbrüche in diesen Zellen. Somit ergeben sich Hinweise, dass einige Vertreter der Isoflavonoide möglicherweise das Tumorrisiko reduzieren, indem sie den Zell-Turnover vermindern oder das Wachstum bereits maligner Foci in der Prostata hemmen. Genistein schützt darüber hinaus die DNA von Prostatazellen vor oxidativ-induzierten Schäden. Dieser Effekt ist mit einer Induktion von wichtigen Genen der antioxidativen Abwehr assoziiert. Demnach vermindert Genistein möglicherweise das Tumorrisiko, indem es die antioxidative Abwehr von Prostatazellen stimuliert und so vor oxidativem Stress und der damit einhergehenden DNA-Schädigung schützt. Damit liefert die vorliegende Arbeit mehrere experimentelle Hinweise für eine chemopräventive Wirkung von Isoflavonoiden auf den Prozess der Prostatakarzinogenese. Ein Teil dieser Wirkungen tritt in Konzentrationen auf, wie sie über eine sojareiche Ernährung im Blutplasma bzw. in der Prostataflüssigkeit des Menschen erreicht werden. Es erscheint daher möglich, dass ein häufiger Verzehr von Sojaprodukten über die so aufgenommenen Mengen an Isoflavonoiden zu einer günstigen Beeinflussung des Prostatakarzinomrisikos führt und für einen Teil der in asiatischen Populationen deutlich geringeren Inzidenz dieser Erkrankung verantwortlich ist.

English Abstract

Investigation into chemopreventive activities of isoflavonoids from the soy bean (*Glycine max*) and their human gut-derived reductive metabolites in human prostate cells

Prostate cancer is one of the most frequent cancer-types in Western societies and predominately occurs in the elderly male. Beside age, ethnical affiliation, human race and other congenital factors affect prostate cancer risk. The age-related increase in the number of prostate cancer cases is associated with a progressive accumulation of oxidative DNA damage. But prostate cancer risk is much lower in many Asian countries where soy-food is an integral part of diet. Since soy-products are a very rich source of isoflavonoids, this sub-class of the flavonoids were proposed to have chemopreventive activities in prostate cells. Substantial evidence for this proposal, however, is still missing and the human gut microflora produces several reductive metabolites which have not been evaluated for there activities in prostate cells yet. This work compares the biological effects of the soy-isoflavonoids and their metabolites and explores novel chemopreventive activities in LNCaP and LAPC-4 prostate cells, focussing on possible antiproliferative and antioxidative effects. The soy-isoflavone genistein potently decreased growth of both cell lines, its metabolites dihydrogenistein and 6'-hydroxy-*O*-DMA did not or only marginally affect growth. In contrast, equol had much higher antiproliferative effects than its precursor, regardless of whether cells were incubated with racemic or the pure *S*-equol. *O*-DMA clear-cut decreased growth of LAPC-4 cells but had no effect in LNCaP cells. Dihydrodaidzein did not affect prostate cell growth. The isoflavonoids neither accelerated prostate cell growth nor did they induce DNA damage, as determined by the comet assay. Physiological genistein concentrations protected both cell lines from oxidative-induced DNA damage. In addition, cDNA-microarray analysis revealed that genistein furthermore induces genes involved in the cellular defence against oxidative stress in LAPC-4 cells. Real-time PCR confirmed inductions of microsomal glutathione *S*-transferase 1, glutathione reductase and metallothionein 1X. Genistein furthermore induced protein expression of metallothioneins, as determined by immuncytochemical staining. Taken together this work provides novel knowledge of biological activities of isoflavonoids in prostate cells *in vitro* and suggests a protective role of isoflavonoids in prostate cancer prevention.

Literaturverzeichnis

- AKAZA H., MIYANAGA N., TAKASHIMA N., NAITO S., HIRAO Y., TSUKAMOTO T., FUJIOKA T., MORI M., KIM W.J., SONG J.M. & PANTUCK A.J. (2004) Comparisons of percent equol producers between prostate cancer patients and controls: case-controlled studies of isoflavones in Japanese, Korean and American residents. *Jpn.J.Clin.Oncol.* **34**, 86-89.
- AKAZA H., MIYANAGA N., TAKASHIMA N., NAITO S., HIRAO Y., TSUKAMOTO T. & MORI M. (2002) Is daidzein non-metabolizer a high risk for prostate cancer? A case-controlled study of serum soybean isoflavone concentration. *Jpn.J.Clin.Oncol.* **32**, 296-300.
- ARBEITSGEMEINSCHAFT BEVÖLKERUNGSBEZOGENER KREBSREGISTER IN DEUTSCHLAND. Krebs in Deutschland. Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland. 4. überarbeitete, aktualisierte Auflage. 2004. Saarbrücken.
- ARNOLD J.T., LE H., MCFANN K.K. & BLACKMAN M.R. (2004) Comparative Effects of DHEA Versus Testosterone, Dihydrotestosterone and Estradiol on Proliferation and Gene Expression in Human LNCaP Prostate Cancer Cells. *Am.J.Physiol.Endocrinol.Metab*
- BARQAWI A., THOMPSON I.M. & CRAWFORD E.D. (2004) Prostate cancer chemoprevention: an overview of United States trials. *J.Urol.* **171**, S5-S8
- BECK V., UNTERRIEDER E., KRENN L., KUBELKA W. & JUNGBAUER A. (2003) Comparison of hormonal activity (estrogen, androgen and progestin) of standardized plant extracts for large scale use in hormone replacement therapy. *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* **84**, 259-268.
- BEKTIC J., BERGER A.P., PFEIL K., DOBLER G., BARTSCH G. & KLOCKER H. (2004) Androgen receptor regulation by physiological concentrations of the isoflavonoid genistein in androgen-dependent LNCaP cells is mediated by estrogen receptor beta. *Eur.Urol.* **45**, 245-251.
- BLOEDON L.T., JEFFCOAT A.R., LOPACZYNSKI W., SCHELL M.J., BLACK T.M., DIX K.J., THOMAS B.F., ALBRIGHT C., BUSBY M.G., CROWELL J.A. & ZEISEL S.H. (2002) Safety and pharmacokinetics of purified soy isoflavones: single-dose administration to postmenopausal women. *Am.J.Clin.Nutr.* **76**, 1126-1137.
- BONKHOF H. & REMBERGER K. (1998) [Morphogenesis of benign prostatic hyperplasia and prostatic carcinoma]. *Pathologe* **19**, 12-20.
- BOSTWICK D.G., ALEXANDER E.E., SINGH R., SHAN A., QIAN J., SANTELLA R.M., OBERLEY L.W., YAN T., ZHONG W., JIANG X. & OBERLEY T.D. (2000) Antioxidant enzyme expression and reactive oxygen species damage in prostatic intraepithelial neoplasia and cancer. *Cancer* **89**, 123-134.
- BOSTWICK D.G., BURKE H.B., DJAKIEW D., EULING S., HO S.M., LANDOLPH J., MORRISON H., SONAWANE B., SHIFFLETT T., WATERS D.J. & TIMMS B. (2004) Human prostate cancer risk factors. *Cancer* **101**, 2371-2490.
- CHAN J.M., GANN P.H. & GIOVANNUCCI E.L. (2005) Role of diet in prostate cancer development and progression. *J.Clin.Oncol.* **23**, 8152-8160.
- CHAN J.M., STAMPFER M.J., MA J., RIMM E.B., WILLETT W.C. & GIOVANNUCCI E.L. (1999) Supplemental vitamin E intake and prostate cancer risk in a large cohort of men in the United States. *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.* **8**, 893-899.
- CHEN C., WEISS N.S., STANCZYK F.Z., LEWIS S.K., DITOMMASO D., ETZIONI R., BARNETT M.J. & GOODMAN G.E. (2003) Endogenous sex hormones and prostate cancer risk: a case-control study nested within the Carotene and Retinol Efficacy Trial. *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.* **12**, 1410-1416.
- COLLINS A.R., DOBSON V.L., DUSINSKA M., KENNEDY G. & STETINA R. (1997) The comet assay: what can it really tell us? *Mutat.Res.* **375**, 183-193.
- COYLE P., PHILCOX J.C., CAREY L.C. & ROFE A.M. (2002) Metallothionein: the multipurpose protein. *Cell Mol.Life Sci.* **59**, 627-647.
- DAGNELIE P.C., SCHUURMAN A.G., GOLDBOHN R.A. & VAN DEN BRANDT P.A. (2004) Diet, anthropometric measures and prostate cancer risk: a review of prospective cohort and intervention studies. *BJU.Int.* **93**, 1139-1150.
- DENIS L., MORTON M.S. & GRIFFITHS K. (1999) Diet and its preventive role in prostatic disease. *Eur.Urol.* **35**, 377-387.
- DENMEADE S.R. & ISAACS J.T. (2002) A history of prostate cancer treatment. *Nat.Rev.Cancer* **2**, 389-396.

- DJAVAN B., THOMPSON I., MICHEL M.S., WALDERT M. & SEITZ C. (2004) [Chemoprevention of prostate cancer]. *Urologe A* **43**, 557-561.
- DJURIC Z., CHEN G., DOERGE D.R., HEILBRUN L.K. & KUCUK O. (2001) Effect of soy isoflavone supplementation on markers of oxidative stress in men and women. *Cancer Lett.* **172**, 1-6.
- DOERGE D.R., CHANG H.C., CHURCHWELL M.I. & HOLDER C.L. (2000) Analysis of soy isoflavone conjugation in vitro and in human blood using liquid chromatography-mass spectrometry. *Drug Metab Dispos.* **28**, 298-307.
- DORGAN J.F., ALBANES D., VIRTAMO J., HEINONEN O.P., CHANDLER D.W., GALMARINI M., MCSHANE L.M., BARRETT M.J., TANGREA J. & TAYLOR P.R. (1998) Relationships of serum androgens and estrogens to prostate cancer risk: results from a prospective study in Finland. *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.* **7**, 1069-1074.
- DUFFIELD-LILLICO A.J., DALKIN B.L., REID M.E., TURNBULL B.W., SLATE E.H., JACOBS E.T., MARSHALL J.R. & CLARK L.C. (2003) Selenium supplementation, baseline plasma selenium status and incidence of prostate cancer: an analysis of the complete treatment period of the Nutritional Prevention of Cancer Trial. *BJU.Int.* **91**, 608-612.
- ETMINAN M., TAKKOUCHE B. & CAAMANO-ISORNA F. (2004) The role of tomato products and lycopene in the prevention of prostate cancer: a meta-analysis of observational studies. *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.* **13**, 340-345.
- FELDMAN B.J. & FELDMAN D. (2001) The development of androgen-independent prostate cancer. *Nat.Rev.Cancer* **1**, 34-45.
- FOSTER C.S., BOSTWICK D.G., BONKHOFF H., DAMBER J.E., VAN DER K.T., MONTIRONI R. & SAKR W.A. (2000) Cellular and molecular pathology of prostate cancer precursors. *Scand.J.Urol.Nephrol.Suppl* 19-43.
- FOTI P., ERBA D., RISO P., SPADAFRANCA A., CRISCUOLI F. & TESTOLIN G. (2005) Comparison between daidzein and genistein antioxidant activity in primary and cancer lymphocytes. *Arch.Biochem.Biophys.* **433**, 421-427.
- GAO A.C. & ISAACS J.T. (2002) The molecular basis of prostate carcinogenesis. In *The molecular basis of human cancer*. 1 Ed. Eds Coleman WB & Tsongalis GJ. Totowa, NJ: Humana Press Inc.
- GHATAK S. & HO S.M. (1996) Age-related changes in the activities of antioxidant enzymes and lipid peroxidation status in ventral and dorsolateral prostate lobes of noble rats. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **222**, 362-367.
- GIOVANNUCCI E., RIMM E.B., LIU Y., STAMPFER M.J. & WILLETT W.C. (2002) A prospective study of tomato products, lycopene, and prostate cancer risk. *J.Natl.Cancer Inst.* **94**, 391-398.
- GIOVANNUCCI E., STAMPFER M.J., KRITHIVAS K., BROWN M., DAHL D., BRUFISKY A., TALCOTT J., HENNEKENS C.H. & KANTOFF P.W. (1997) The CAG repeat within the androgen receptor gene and its relationship to prostate cancer. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **94**, 3320-3323.
- GLEI M., LATUNDE-DADA G.O., KLINDER A., BECKER T.W., HERMANN U., VOIGT K. & POOL-ZOBEL B.L. (2002) Iron-overload induces oxidative DNA damage in the human colon carcinoma cell line HT29 clone 19A. *Mutat.Res.* **519**, 151-161.
- GOMEZ S.L., LE G.M., CLARKE C.A., GLASER S.L., FRANCE A.M. & WEST D.W. (2003) Cancer incidence patterns in Koreans in the US and in Kangwha, South Korea. *Cancer Causes Control* **14**, 167-174.
- GOODMAN G.E., SCHAFFER S., OMENN G.S., CHEN C. & KING I. (2003) The association between lung and prostate cancer risk, and serum micronutrients: results and lessons learned from beta-carotene and retinol efficacy trial. *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.* **12**, 518-526.
- GU F.L., XIA T.L. & KONG X.T. (1994) Preliminary study of the frequency of benign prostatic hyperplasia and prostatic cancer in China. *Urology* **44**, 688-691.
- GUO Q., RIMBACH G., MOINI H., WEBER S. & PACKER L. (2002) ESR and cell culture studies on free radical-scavenging and antioxidant activities of isoflavonoids. *Toxicology* **179**, 171-180.
- HAYES J.D., FLANAGAN J.U. & JOWSEY I.R. (2005) Glutathione transferases. *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.* **45**, 51-88.
- HEDLUND T.E., JOHANNES W.U. & MILLER G.J. (2003) Soy isoflavonoid equol modulates the growth of benign and malignant prostatic epithelial cells in vitro. *Prostate* **54**, 68-78.
- HEDLUND T.E., MARONI P.D., FERUCCI P.G., DAYTON R., BARNES S., JONES K., MOORE R., OGDEN L.G., WAHALA K., SACKETT H.M. & GRAY K.J. (2005) Long-term dietary habits affect soy isoflavone metabolism and accumulation in prostatic fluid in caucasian men. *J.Nutr.* **135**, 1400-1406.
- HEINONEN S.M., HOIKKALA A., WAHALA K. & ADLERCREUTZ H. (2003) Metabolism of the soy isoflavones daidzein, genistein and glycitein in human subjects. Identification of new metabolites having an intact isoflavonoid skeleton. *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* **87**, 285-299.

- HENLE E.S. & LINN S. (1997) Formation, prevention, and repair of DNA damage by iron/hydrogen peroxide. *J.Biol.Chem.* **272**, 19095-19098.
- HO S.C., WOO J.L., LEUNG S.S., SHAM A.L., LAM T.H. & JANUS E.D. (2000) Intake of soy products is associated with better plasma lipid profiles in the Hong Kong Chinese population. *J.Nutr.* **130**, 2590-2593.
- HODGSON J.M., CROFT K.D., PUDDEY I.B., MORI T.A. & BEILIN L.J. (1996) Soybean isoflavonoids and their metabolic products inhibit in vitro lipoprotein oxidation in serum. *The Journal of Nutritional Biochemistry* **7**, 664-669.
- HOLZBEIERLEIN J.M., MCINTOSH J. & THRASHER J.B. (2005) The role of soy phytoestrogens in prostate cancer. *Curr.Opin.Urol.* **15**, 17-22.
- HOROSZEWCZ J.S., LEONG S.S., KAWINSKI E., KARR J.P., ROSENTHAL H., CHU T.M., MIRAND E.A. & MURPHY G.P. (1983) LNCaP model of human prostatic carcinoma. *Cancer Res.* **43**, 1809-1818.
- HUA P., TSAI W.J. & KUO S.M. (2003) Estrogen response element-independent regulation of gene expression by genistein in intestinal cells. *Biochim.Biophys.Acta* **1627**, 63-70.
- HUANG X., CHEN S., XU L., LIU Y., DEB D.K., PLATANIAS L.C. & BERGAN R.C. (2005a) Genistein inhibits p38 map kinase activation, matrix metalloproteinase type 2, and cell invasion in human prostate epithelial cells. *Cancer Res.* **65**, 3470-3478.
- HUANG Y., CAO S., NAGAMANI M., ANDERSON K.E., GRADY J.J. & LU L.J. (2005b) Decreased circulating levels of tumor necrosis factor-alpha in postmenopausal women during consumption of soy-containing isoflavones. *J.Clin.Endocrinol.Metab* **90**, 3956-3962.
- IMAI Y., TSUKAHARA S., ASADA S. & SUGIMOTO Y. (2004) Phytoestrogens/flavonoids reverse breast cancer resistance protein/ABCG2-mediated multidrug resistance. *Cancer Res.* **64**, 4346-4352.
- JACOBSEN B.K., KNUITSEN S.F. & FRASER G.E. (1998) Does high soy milk intake reduce prostate cancer incidence? The Adventist Health Study (United States). *Cancer Causes Control* **9**, 553-557.
- JEMAL A., MURRAY T., WARD E., SAMUELS A., TIWARI R.C., GHAFOR A., FEUER E.J. & THUN M.J. (2005) Cancer statistics, 2005. *CA Cancer J.Clin.* **55**, 10-30.
- JORDAN V.C., GAPSTUR S. & MORROW M. (2001) Selective estrogen receptor modulation and reduction in risk of breast cancer, osteoporosis, and coronary heart disease. *J.Natl.Cancer Inst.* **93**, 1449-1457.
- KALLELA K., HEINONEN K. & SALONIEMI H. (1984) Plant oestrogens; the cause of decreased fertility in cows. A case report. *Nord.Vet.Med.* **36**, 124-129.
- KAMEOKA S., LEAVITT P., CHANG C. & KUO S.M. (1999) Expression of antioxidant proteins in human intestinal Caco-2 cells treated with dietary flavonoids. *Cancer Lett.* **146**, 161-167.
- KARAYI M.K. & MARKHAM A.F. (2004) Molecular biology of prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic.Dis.* **7**, 6-20.
- KLAUNIG J.E. & KAMENDULIS L.M. (2004) The role of oxidative stress in carcinogenesis. *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.* **44**, 239-267.
- KLEIN K.A., REITER R.E., REDULA J., MORADI H., ZHU X.L., BROTHMAN A.R., LAMB D.J., MARCELLI M., BELLDEGRUN A., WITTE O.N. & SAWYERS C.L. (1997) Progression of metastatic human prostate cancer to androgen independence in immunodeficient SCID mice. *Nat.Med.* **3**, 402-408.
- KUIPER G.G., CARLSSON B., GRANDIEN K., ENMARK E., HAGGBLAD J., NILSSON S. & GUSTAFSSON J.A. (1997) Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology* **138**, 863-870.
- KUIPER G.G., LEMMEN J.G., CARLSSON B., CORTON J.C., SAFE S.H., VAN DER SAAG P.T., VAN DER B.B. & GUSTAFSSON J.A. (1998) Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinology* **139**, 4252-4263.
- KULLING S.E., HONIG D.M. & METZLER M. (2001) Oxidative metabolism of the soy isoflavones daidzein and genistein in humans in vitro and in vivo. *J.Agric.Food Chem.* **49**, 3024-3033.
- KULLING S.E. & METZLER M. (1997) Induction of micronuclei, DNA strand breaks and HPRT mutations in cultured Chinese hamster V79 cells by the phytoestrogen coumestrol. *Food Chem.Toxicol.* **35**, 605-613.
- LAMPE J.W., KARR S.C., HUTCHINS A.M. & SLAVIN J.L. (1998) Urinary equal excretion with a soy challenge: influence of habitual diet. *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.* **217**, 335-339.

- LAU K.M., LASPINA M., LONG J. & HO S.M. (2000) Expression of estrogen receptor (ER)-alpha and ER-beta in normal and malignant prostatic epithelial cells: regulation by methylation and involvement in growth regulation. *Cancer Res.* **60**, 3175-3182.
- LEVADOUX-MARTIN M., HESKETH J.E., BEATTIE J.H. & WALLACE H.M. (2001) Influence of metallothionein-I localization on its function. *Biochem.J.* **355**, 473-479.
- LIGGINS J., BLUCK L.J., RUNSWICK S., ATKINSON C., COWARD W.A. & BINGHAM S.A. (2000) Daidzein and genistein contents of vegetables. *Br.J.Nutr.* **84**, 717-725.
- LIPPMAN S.M. & HONG W.K. (2002) Cancer prevention by delay. Commentary re: J. A. O'Shaughnessy et al., Treatment and Prevention of Intraepithelial Neoplasia: An Important Target for Accelerated New Agent Development. *Clin. Cancer Res.*, 8: 314-346, 2002. *Clin.Cancer Res.* **8**, 305-313.
- LIU J., CHANG S.K. & WIESENBORN D. (2005) Antioxidant properties of soybean isoflavone extract and tofu in vitro and in vivo. *J.Agric.Food Chem.* **53**, 2333-2340.
- MAGEE P.J. & ROWLAND I.R. (2004) Phyto-oestrogens, their mechanism of action: current evidence for a role in breast and prostate cancer. *Br.J.Nutr.* **91**, 513-531.
- MAGGIOLINI M., RECCHIA A.G., CARPINO A., VIVACQUA A., FASANELLA G., RAGO V., PEZZI V., BRIAND P.A., PICARD D. & ANDO S. (2004) Oestrogen receptor beta is required for androgen-stimulated proliferation of LNCaP prostate cancer cells. *J.Mol.Endocrinol.* **32**, 777-791.
- MAGGIOLINI M., VIVACQUA A., CARPINO A., BONOFIGLIO D., FASANELLA G., SALERNO M., PICARD D. & ANDO S. (2002) The mutant androgen receptor T877A mediates the proliferative but not the cytotoxic dose-dependent effects of genistein and quercetin on human LNCaP prostate cancer cells. *Mol.Pharmacol.* **62**, 1027-1035.
- MALINS D.C., JOHNSON P.M., WHEELER T.M., BARKER E.A., POLISSAR N.L. & VINSON M.A. (2001) Age-related radical-induced DNA damage is linked to prostate cancer. *Cancer Res.* **61**, 6025-6028.
- MILTYK W., CRACIUNESCU C.N., FISCHER L., JEFFCOAT R.A., KOCH M.A., LOPACZYNSKI W., MAHONEY C., JEFFCOAT R.A., CROWELL J., PAGLIERI J. & ZEISEL S.H. (2003) Lack of significant genotoxicity of purified soy isoflavones (genistein, daidzein, and glycitein) in 20 patients with prostate cancer. *Am.J.Clin.Nutr.* **77**, 875-882.
- MITCHELL J.H. & COLLINS A.R. (1999) Effects of a soy milk supplement on plasma cholesterol levels and oxidative DNA damage in men--a pilot study. *Eur.J.Nutr.* **38**, 143-148.
- MITCHELL J.H., DUTHIE S.J. & COLLINS A.R. (2000) Effects of phytoestrogens on growth and DNA integrity in human prostate tumor cell lines: PC-3 and LNCaP. *Nutr.Cancer* **38**, 223-228.
- MORTON M.S., ARISAKA O., MIYAKE N., MORGAN L.D. & EVANS B.A. (2002) Phytoestrogen concentrations in serum from Japanese men and women over forty years of age. *J.Nutr.* **132**, 3168-3171.
- MORTON M.S., CHAN P.S., CHENG C., BLACKLOCK N., MATOS-FERREIRA A., BRANCHES-MONTEIRO L., CORREIA R., LLOYD S. & GRIFFITHS K. (1997) Lignans and isoflavonoids in plasma and prostatic fluid in men: samples from Portugal, Hong Kong, and the United Kingdom. *Prostate* **32**, 122-128.
- MOSIALOU E., ANDERSSON C., LUNDQVIST G., ANDERSSON G., BERGMAN T., JORNVALL H. & MORGENSTERN R. (1993) Human liver microsomal glutathione transferase. Substrate specificity and important protein sites. *FEBS Lett.* **315**, 77-80.
- MOSMANN T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J.Immunol.Methods* **65**, 55-63.
- MURATA M., MIDORIKAWA K., KOH M., UMEZAWA K. & KAWANISHI S. (2004) Genistein and daidzein induce cell proliferation and their metabolites cause oxidative DNA damage in relation to isoflavone-induced cancer of estrogen-sensitive organs. *Biochemistry* **43**, 2569-2577.
- NAGEL S.C., VOM SAAL F.S. & WELSHONS W.V. (1998) The effective free fraction of estradiol and xenoestrogens in human serum measured by whole cell uptake assays: physiology of delivery modifies estrogenic activity. *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.* **217**, 300-309.
- NTAIS C., POLYCARPOU A. & TSATSOU LIS A. (2003) Molecular epidemiology of prostate cancer: androgens and polymorphisms in androgen-related genes. *Eur.J.Endocrinol.* **149**, 469-477.
- OZASA K., NAKAO M., WATANABE Y., HAYASHI K., MIKI T., MIKAMI K., MORI M., SAKAUCHI F., WASHIO M., ITO Y., SUZUKI K., WAKAI K. & TAMAKOSHI A. (2004) Serum phytoestrogens and prostate cancer risk in a nested case-control study among Japanese men. *Cancer Sci.* **95**, 65-71.

- PARNES H.L., HOUSE M.G., KAGAN J., KAUSAL D.J. & LIEBERMAN R. (2004) Prostate cancer chemoprevention agent development: the National Cancer Institute, Division of Cancer Prevention portfolio. *J.Urol.* **171**, S68-S74
- PARNES H.L., THOMPSON I.M. & FORD L.G. (2005) Prevention of hormone-related cancers: prostate cancer. *J.Clin.Oncol.* **23**, 368-377.
- PATEL R.P., BOERSMA B.J., CRAWFORD J.H., HOGG N., KIRK M., KALYANARAMAN B., PARKS D.A., BARNES S. & RLEY-USMAR V. (2001) Antioxidant mechanisms of isoflavones in lipid systems: paradoxical effects of peroxy radical scavenging. *Free Radic.Biol.Med.* **31**, 1570-1581.
- POLKOWSKI K. & MAZUREK A.P. (2000) Biological properties of genistein. A review of in vitro and in vivo data. *Acta Pol.Pharm.* **57**, 135-155.
- POOL-ZOBEL B.L., LOTZMANN N., KNOLL M., KUCHENMEISTER F., LAMBERTZ R., LEUCHT U., SCHRODER H.G. & SCHMEZER P. (1994) Detection of genotoxic effects in human gastric and nasal mucosa cells isolated from biopsy samples. *Environ.Mol.Mutagen.* **24**, 23-45.
- PRABHU K.S., REDDY P.V., JONES E.C., LIKEN A.D. & REDDY C.C. (2004) Characterization of a class alpha glutathione-S-transferase with glutathione peroxidase activity in human liver microsomes. *Arch.Biochem.Biophys.* **424**, 72-80.
- QUESADA A.R., BYRNES R.W., KREZOSKI S.O. & PETERING D.H. (1996) Direct reaction of H₂O₂ with sulfhydryl groups in HL-60 cells: zinc-metallothionein and other sites. *Arch.Biochem.Biophys.* **334**, 241-250.
- QUINN M. & BABB P. (2002) Patterns and trends in prostate cancer incidence, survival, prevalence and mortality. Part I: international comparisons. *BJU.Int.* **90**, 162-173.
- RAHMAN I. & MACNEE W. (2000) Oxidative stress and regulation of glutathione in lung inflammation. *Eur.Respir.J.* **16**, 534-554.
- REBBECK T.R. (2002) Inherited susceptibility and prostate cancer risk. In *Comprehensive Toxicology*. Eds J.P.Vanden Heuvel, G.H.Perdew, W.B.Mattes & W.F.Greenlee. Elsevier Science.
- RECORD I.R., JANNES M., DREOSTI I.E. & KING R.A. (1995) Induction of micronucleus formation in mouse splenocytes by the soy isoflavone genistein in vitro but not in vivo. *Food Chem.Toxicol.* **33**, 919-922.
- REN M.Q., KUHN G., WEGNER J. & CHEN J. (2001) Isoflavones, substances with multi-biological and clinical properties. *Eur.J.Nutr.* **40**, 135-146.
- RIPPLE M.O., HENRY W.F., RAGO R.P. & WILDING G. (1997) Prooxidant-antioxidant shift induced by androgen treatment of human prostate carcinoma cells. *J.Natl.Cancer Inst.* **89**, 40-48.
- ROWLAND I.R., WISEMAN H., SANDERS T.A., ADLERCREUTZ H. & BOWEY E.A. (2000) Interindividual variation in metabolism of soy isoflavones and lignans: influence of habitual diet on equol production by the gut microflora. *Nutr.Cancer* **36**, 27-32.
- SACK J.S., KISH K.F., WANG C., ATTAR R.M., KIEFER S.E., AN Y., WU G.Y., SCHEFFLER J.E., SALVATI M.E., KRYSTEK S.R., Jr., WEINMANN R. & EINSPAHR H.M. (2001) Crystallographic structures of the ligand-binding domains of the androgen receptor and its T877A mutant complexed with the natural agonist dihydrotestosterone. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **98**, 4904-4909.
- SALVATORI L., PALLANTE P., RAVENNA L., CHINZARI P., FRATI L., RUSSO M.A. & PETRANGELI E. (2003) Oestrogens and selective oestrogen receptor (ER) modulators regulate EGF receptor gene expression through human ER alpha and beta subtypes via an Sp1 site. *Oncogene* **22**, 4875-4881.
- SANCHEZ R., NGUYEN D., ROCHA W., WHITE J.H. & MADER S. (2002) Diversity in the mechanisms of gene regulation by estrogen receptors. *Bioessays* **24**, 244-254.
- SARKAR F.H. & LI Y. (2002) Mechanisms of cancer chemoprevention by soy isoflavone genistein. *Cancer Metastasis Rev.* **21**, 265-280.
- SAVILLE B., WORMKE M., WANG F., NGUYEN T., ENMARK E., KUIPER G., GUSTAFSSON J.A. & SAFE S. (2000) Ligand-, cell-, and estrogen receptor subtype (alpha/beta)-dependent activation at GC-rich (Sp1) promoter elements. *J.Biol.Chem.* **275**, 5379-5387.
- SCHAEFERHENRICH A., BEYER-SEHLMAYER G., FESTAG G., KUECHLER A., HAAG N., WEISE A., LIEHR T., CLAUSSEN U., MARIAN B., SENDT W., SCHEELE J. & POOL-ZOBEL B.L. (2003) Human adenoma cells are highly susceptible to the genotoxic action of 4-hydroxy-2-nonenal. *Mutat.Res.* **526**, 19-32.
- SCHMITT E., METZLER M., JONAS R., DEKANT W. & STOPPER H. (2003) Genotoxic activity of four metabolites of the soy isoflavone daidzein. *Mutat.Res.* **542**, 43-48.

- SCHUURMANS A.L., BOLT J., VELDSCHOLTE J. & MULDER E. (1991) Regulation of growth of LNCaP human prostate tumor cells by growth factors and steroid hormones. *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* **40**, 193-197.
- SETCHELL K.D., BROWN N.M., ZIMMER-NECHEMIAS L., BRASHEAR W.T., WOLFE B.E., KIRSCHNER A.S. & HEUBI J.E. (2002) Evidence for lack of absorption of soy isoflavone glycosides in humans, supporting the crucial role of intestinal metabolism for bioavailability. *Am.J.Clin.Nutr.* **76**, 447-453.
- SETCHELL K.D., CLERICI C., LEPHART E.D., COLE S.J., HEENAN C., CASTELLANI D., WOLFE B.E., NECHEMIAS-ZIMMER L., BROWN N.M., LUND T.D., HANDA R.J. & HEUBI J.E. (2005) S-equol, a potent ligand for estrogen receptor beta, is the exclusive enantiomeric form of the soy isoflavone metabolite produced by human intestinal bacterial flora. *Am.J.Clin.Nutr.* **81**, 1072-1079.
- SHANEYFELT T., HUSEIN R., BUBLEY G. & MANTZOROS C.S. (2000) Hormonal predictors of prostate cancer: a meta-analysis. *J.Clin.Oncol.* **18**, 847-853.
- SHIMIZU H., ROSS R.K., BERNSTEIN L., YATANI R., HENDERSON B.E. & MACK T.M. (1991) Cancers of the prostate and breast among Japanese and white immigrants in Los Angeles County. *Br.J.Cancer* **63**, 963-966.
- SHWORAK N.W., O'CONNOR T., WONG N.C. & GEDAMU L. (1993) Distinct TATA motifs regulate differential expression of human metallothionein I genes MT-IF and MT-IG. *J.Biol.Chem.* **268**, 24460-24466.
- SIERENS J., HARTLEY J.A., CAMPBELL M.J., LEATHEM A.J. & WOODSIDE J.V. (2001) Effect of phytoestrogen and antioxidant supplementation on oxidative DNA damage assessed using the comet assay. *Mutat.Res.* **485**, 169-176.
- SIERENS J., HARTLEY J.A., CAMPBELL M.J., LEATHEM A.J. & WOODSIDE J.V. (2002) In vitro isoflavone supplementation reduces hydrogen peroxide-induced DNA damage in sperm. *Teratog.Carcinog.Mutagen.* **22**, 227-234.
- SIMARD J., DUMONT M., LABUDA D., SINNETT D., MELOCHE C., EL-ALFY M., BERGER L., LEES E., LABRIE F. & TAVTIGIAN S.V. (2003) Prostate cancer susceptibility genes: lessons learned and challenges posed. *Endocr.Relat Cancer* **10**, 225-259.
- SONODA T., NAGATA Y., MORI M., MIYANAGA N., TAKASHIMA N., OKUMURA K., GOTO K., NAITO S., FUJIMOTO K., HIRAO Y., TAKAHASHI A., TSUKAMOTO T., FUJIOKA T. & AKAZA H. (2004) A case-control study of diet and prostate cancer in Japan: possible protective effect of traditional Japanese diet. *Cancer Sci.* **95**, 238-242.
- SUZUKI H., UEDA T., ICHIKAWA T. & ITO H. (2003) Androgen receptor involvement in the progression of prostate cancer. *Endocr.Relat Cancer* **10**, 209-216.
- SUZUKI K., KOIKE H., MATSUI H., ONO Y., HASUMI M., NAKAZATO H., OKUGI H., SEKINE Y., OKI K., ITO K., YAMAMOTO T., FUKABORI Y., KUROKAWA K. & YAMANAKA H. (2002) Genistein, a soy isoflavone, induces glutathione peroxidase in the human prostate cancer cell lines LNCaP and PC-3. *Int.J.Cancer* **99**, 846-852.
- THEOCHARIS S.E., MARGELI A.P. & KOUTSELINIS A. (2003) Metallothionein: a multifunctional protein from toxicity to cancer. *Int.J.Biol.Markers* **18**, 162-169.
- THOMPSON I.M., GOODMAN P.J., TANGEN C.M., LUCIA M.S., MILLER G.J., FORD L.G., LIEBER M.M., CESPEDES R.D., ATKINS J.N., LIPPMAN S.M., CARLIN S.M., RYAN A., SZCZEPANEK C.M., CROWLEY J.J. & COLTMAN C.A., Jr. (2003) The influence of finasteride on the development of prostate cancer. *N.Engl.J.Med.* **349**, 215-224.
- VALSTA L.M., KILKKINEN A., MAZUR W., NURMI T., LAMPI A.M., OVASKAINEN M.L., KORHONEN T., ADLERCREUTZ H. & PIETINEN P. (2003) Phyto-oestrogen database of foods and average intake in Finland. *Br.J.Nutr.* **89 Suppl 1**, S31-S38
- VAN BOKHOVEN A., CAIRES A., MARIA M.D., SCHULTE A.P., LUCIA M.S., NORDEEN S.K., MILLER G.J. & VARELLA-GARCIA M. (2003a) Spectral karyotype (SKY) analysis of human prostate carcinoma cell lines. *Prostate* **57**, 226-244.
- VAN BOKHOVEN A., VARELLA-GARCIA M., KORCH C., JOHANNES W.U., SMITH E.E., MILLER H.L., NORDEEN S.K., MILLER G.J. & LUCIA M.S. (2003b) Molecular characterization of human prostate carcinoma cell lines. *Prostate* **57**, 205-225.
- VAN ERP-BAART M.A., BRANTS H.A., KIELY M., MULLIGAN A., TURRINI A., SERMONETA C., KILKKINEN A. & VALSTA L.M. (2003) Isoflavone intake in four different European countries: the VENUS approach. *Br.J.Nutr.* **89 Suppl 1**, S25-S30
- VIRTAMO J., PIETINEN P., HUTTUNEN J.K., KORHONEN P., MALILA N., VIRTANEN M.J., ALBANES D., TAYLOR P.R. & ALBERT P. (2003) Incidence of cancer and mortality following alpha-tocopherol and beta-carotene supplementation: a postintervention follow-up. *JAMA* **290**, 476-485.

- WATANABE S., YAMAGUCHI M., SOBUE T., TAKAHASHI T., MIURA T., ARAI Y., MAZUR W., WAHALA K. & ADLERCREUTZ H. (1998) Pharmacokinetics of soybean isoflavones in plasma, urine and feces of men after ingestion of 60 g baked soybean powder (kinako). *J.Nutr.* **128**, 1710-1715.
- WEBBER M.M., BELLO D. & QUADER S. (1997) Immortalized and tumorigenic adult human prostatic epithelial cell lines: characteristics and applications Part 2. Tumorigenic cell lines. *Prostate* **30**, 58-64.
- WEI H., ZHANG X., WANG Y. & LEBWOHL M. (2002) Inhibition of ultraviolet light-induced oxidative events in the skin and internal organs of hairless mice by isoflavone genistein. *Cancer Lett.* **185**, 21-29.
- WIN W., CAO Z., PENG X., TRUSH M.A. & LI Y. (2002) Different effects of genistein and resveratrol on oxidative DNA damage in vitro. *Mutat.Res.* **513**, 113-120.
- WISEMAN H., CASEY K., BOWEY E.A., DUFFY R., DAVIES M., ROWLAND I.R., LLOYD A.S., MURRAY A., THOMPSON R. & CLARKE D.B. (2004) Influence of 10 wk of soy consumption on plasma concentrations and excretion of isoflavonoids and on gut microflora metabolism in healthy adults. *Am.J.Clin.Nutr.* **80**, 692-699.
- WORLD CANCER RESEARCH FUND & AMERICAN INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH (1997) Prostate. In *Food, Nutrition and the Prevention of Cancer: A Global Perspective*. Anonymous American Institute for Cancer Research. pp. 310-323.
- ZHANG H.Y., WANG L.F. & SUN Y.M. (2003) Why B-ring is the active center for genistein to scavenge peroxy radical: a DFT study. *Bioorg.Med.Chem.Lett.* **13**, 909-911.

Liste der verwendeten Laborgeräte sowie Arbeitsmittel ¹

Allgemeine Laborgeräte

| | |
|---|------------------------|
| Analysenwaage (Sartorius Basic plus)..... | Sartorius, D |
| Magnetrührer (Combimag)..... | Fisher Scientific, D |
| Mikrowellengerät (HMT 700B)..... | Bosch, D |
| Sterile Werkbank (Herasafe H12)..... | Heraeus Instruments, D |
| Tischzentrifuge (CR 4.22)..... | Jouan, D |
| Thermomixer (Compact)..... | Eppendorf, D |
| Wärmeplatte (HP 9060)..... | Labotect, D |
| Wasserbad..... | GFL mbH, D |
| Zentrifuge (biofuge fresco)..... | Heraeus Instruments, D |
| Zentrifuge (biofuge pico)..... | Heraeus Instruments, D |

Zellkultur

| | |
|-----------------------------------|---------------------|
| Mikroskop (Axiovert 25)..... | Carl Zeiss Jena, D |
| Brutschrank (Steri Cult 200)..... | Forma Scientific, D |

DAPI-Assay

| | |
|------------------------------------|---|
| Multidetektions-Reader GENios..... | Tecan, CH |
| <i>Software:</i> | <i>X-Fluor Version 4.0</i> |
| <i>Einstellungen:</i> | <i>Fluoreszenz (Ex.: 360nm / Em.: 465 nm)</i> |
| | <i>Bottom Reading</i> |
| | <i>Multiple Reads per Well (4x4)</i> |
| | <i>Gain 60</i> |
| | <i>37 °C</i> |

MTT-Assay

| | |
|------------------------------------|--|
| Multidetektions-Reader GENios..... | Tecan, CH |
| <i>Software:</i> | <i>X-Fluor Version 4.0</i> |
| <i>Einstellungen:</i> | <i>Absorption (Ex.: 570 nm / Ref.: 650 nm)</i> |
| | <i>Top Reading</i> |
| | <i>Single Reads per Well</i> |
| | <i>37 °C</i> |

Comet Assay

| | |
|---|---------------------|
| Elektrophoresekammer, horizontal..... | Biometra, D |
| Elektrophoreseeinheit (Power Pack P25)..... | Biometra, D |
| <i>Auswertungssystem:</i> | |
| Mikroskop (Axiolab HB50)..... | Carl Zeiss Jena, D |
| CCD-Kamera (4910 Series)..... | COHU, USA |
| Software Komet Version 4.0 (Imaging and Analysis System)..... | Kinetic Imaging, UK |

¹ In dieser Arbeit wurde auf die Verwendung der Symbole ® und ™ verzichtet. Es soll an dieser Stelle darauf hingewiesen werden, dass einige der hier benutzten Bezeichnungen eingetragene Marken und entsprechend gesetzlich geschützt sind.

² Verwendeter Ländercode: Dänemark (DK), Deutschland (D), Israel (IL), Großbritannien (UK), Japan (J), Schweiz (CH), Vereinigte Staaten von Amerika (USA)

cDNA Array

| | |
|--|--------------|
| Biophotometer..... | Eppendorf, D |
| Messparameter: <i>E</i> _{260/280} (Proteinverunreinigungen) | |
| <i>E</i> _{260/230} (Phenolische Verunreinigungen) | |
| <i>E</i> _{260/280} (Trübung) | |
| Thermocycler..... | Biometra, D |
| Elektrophoreseeinheit (Power Pack P25)..... | Biometra, D |
| Elektrophoresekammer, horizontal..... | Biometra, D |
| BioRad-Multimanagers..... | Bio-Rad, D |
| Hybridisierungssofen Compact Line OV4..... | Biometra, D |
| <i>Auswertungssystem:</i> | |
| CCD Camera System LAS-1000/Diana..... | FujiFilm, J |
| Image Analysis Software AIDA Array Version 3.50..... | Raytest, D |

TaqMan Real Time PCR

| | |
|------------------------------------|-------------------------|
| 3100 Genetic Analyzer..... | Applied Biosystems, USA |
| GeneAmp 5700 (Thermal Cycler)..... | Applied Biosystems, USA |

Immunzytochemische Detektion

| | |
|-------------------------------------|------------------------------|
| <i>Auswertungssystem:</i> | |
| Axiovert 100M Mikroskop..... | Carl Zeiss Jena, D |
| CCD-Kamera (RTE/CCD-1300-Y/HS)..... | Roper Scientific, D |
| Software MetaMorph 4.1.5..... | Universal Imaging Corp., USA |

Arbeitsmittel

| | |
|--|----------------------------|
| Pipettierhilfe (accu-jet)..... | Brand, D |
| Pipettenspitzen filter tip Gel (10 – 1000 µl)..... | Greiner, D |
| Pipetten (0,2 – 2000 µl)..... | Eppendorf, D |
| Mehrkanal-Luftpolsterpipette (Transferpipette)..... | Brand, D |
| Einweg-Pipetten (2 – 50 ml)..... | Fisher Scientific, D |
| 25 ml Zellkulturflaschen..... | Nunc, D |
| 75 ml Zellkulturflaschen..... | Nunc, D |
| Objektträger (rau, glatt)..... | Menzel, D |
| Deckgläser (24x24)..... | Menzel, D |
| 96-Well-Mikrotiterplatten (Real Time PCR)..... | Applied Biosystems, USA |
| 96-Well-Mikrotiterplatten, steril mit Deckel (Zellkultur)..... | Nunc, D |
| 6-Well-Platte, steril mit Deckel (Zellkultur)..... | Nunc, D |
| Reaktionsgefäße (0,2 - 2,0 ml)..... | Eppendorf, D |
| Reaktionsgefäße (15 ml, 50 ml)..... | Greiner, D |
| Zählkammer nach Neubauer..... | Fisher Scientific, D |
| Parafilm M..... | American National Can, USA |

Liste der verwendeten Lösungen, Reagenzien und Kits

| | |
|------------------------------|-----------|
| Dimethylsulfoxyd (DMSO)..... | Fluka, CH |
| Methanol..... | Roth, D |
| Ethanol..... | Roth, D |

Zellkultur

| | |
|-------------------------------|----------|
| <u>Kulturmedium für LNCaP</u> | |
| RPMI-1640..... | Gibco, D |

| | |
|--|---------------------------|
| 10 % FCS..... | Gibco, D |
| 2 mM L-Glutamin..... | Gibco, D |
| 1 % PenStrep-Mix..... | Gibco, D |
| <u>Kulturmedium LAPC-4</u> | |
| Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM)..... | Gibco, D |
| 10 % FCS | |
| 2 mM L-Glutamin..... | Gibco, D |
| 1 % PenStrep-Mix | |
| 2 nM Miboleron..... | Perkin Elmer, USA |
| <u>Versuchsmedium für LNCaP</u> | |
| RPMI-1640 (phenolrotfrei)..... | Gibco, D |
| 10 % CCS..... | Biological Industries, IL |
| 2 mM L-Glutamin | |
| 1 % PenStrep-Mix | |
| <u>Versuchsmedium LAPC-4</u> | |
| Iscove's Modified Dulbecco's Medium (phenolrotfrei)..... | Gibco, D |
| 10 % CCS | |
| 2 mM L-Glutamin | |
| 1 % PenStrep-Mix | |
| <u>PBS (Phosphatgepufferte Kochsalzlösung)</u> | |
| 137 mM NaCl..... | Fisher Scientific, D |
| 2,7 mM KCl..... | Fisher Scientific, D |
| 8,1 mM Na ₂ HPO ₄ | Roth, D |
| 1,5 mM KH ₂ PO ₄ | Fisher Scientific, D |
| pH 7,3 | |
| <u>PBS/BSA</u> | |
| 5 g/l BSA | Roche, CH |
| in PBS | |
| pH 7,3 | |
| Trypanblau-Lösung..... | Sigma, D |
| DAPI-Assay | |
| <u>DAPI-Lösung</u> | |
| 4',6'-Diamidino-2-Phenylindol-Hydrochlorid..... | Sigma, D |
| Stammlösung: 3 mM in Methanol | |
| Gebrauchslösung: 20 µM in PBS | |
| MTT-Assay | |
| <u>CellTiter96 Reagents (MTT-Assay).....</u> | Promega, UK |
| Dye Solution | |
| Solubilization/Stop Solution | |
| Comet Assay | |
| <u>LMA-Lösung, 0,7 %</u> | |
| 7 g/l Low-Melting Agarose (Sea Plaque GTC)..... | Cambrex, UK |
| gelöst in PBS | |
| <u>NMA-Lösung, 0,5 %</u> | |
| 5g/l Normal-Melting Agarose (Sea Kem HGT)..... | Cambrex, UK |
| gelöst in PBS | |
| <u>Lyselösung</u> | |
| 10 mM Tris-HCl..... | Sigma, D |

| | |
|---|----------------------|
| 100 mM Na ₂ EDTA..... | Fluka, CH |
| 2.5 M NaCl..... | Fisher, D |
| 10% DMSO | |
| 1% Triton X-100..... | VWR, D |
| pH 10 | |
| <u>Elektrophorese-Puffer</u> | |
| 1 mM Na ₂ EDTA | |
| 300 mM NaOH..... | Fisher Scientific, D |
| pH 13 | |
| <u>Neutralisations-Puffer</u> | |
| 4.2 M Tris-HCl | |
| 80 mM Tris-Base..... | Roth, D |
| pH 7,2 | |
| <u>SybrGreen Mounting-Medium</u> | |
| <i>Antifade-Puffer:</i> | |
| 2,5 g DABCO..... | Sigma, D |
| 50 ml TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8) | |
| 50 ml Glycerol..... | Sigma, D |
| <i>Mounting-Medium:</i> | |
| 1 µl SybrGreen..... | Sigma, D |
| 999 µl Antifade-Puffer | |
| RNA-Isolation | |
| <u>RNeasy Mini-Kit</u> | Qiagen, D |
| RNeasy Mini Spin Columns | |
| Collection Tubes (1,5 ml) | |
| Collection Tubes (2,0 ml) | |
| Buffer RLT | |
| Buffer RW1 | |
| Buffer RPE | |
| RNase-free Water | |
| QIAshredder..... | Qiagen, D |
| <u>Denaturierendes Agarosegel (RNA-Gel)</u> | |
| <i>MOPS-Stammlösung (10x):</i> | |
| 200 mM 4-(N-Morpholino)-propansulfonsäure..... | Sigma, D |
| 50 mM Na-Acetat..... | VWR, D |
| 10 mM Na ₂ EDTA | |
| in DMPC-H ₂ O | |
| <i>MOPS-Puffer (1x):</i> | |
| 10 % (v/v) 10x MOPS | |
| in DMPC-H ₂ O | |
| <i>RNA-Gel:</i> | |
| 15 g/l Agarose..... | Biozym, D |
| in 1x MOPS | |
| <u>RNA Auftragspuffer</u> | |
| <i>Stammlösung:</i> | |
| 0,07 % (w/v) Bromphenolblau..... | Roth, D |
| 7 % (w/v) Natriumdodecylsulfat (SDS)..... | Roth, D |
| 33 % (w/v) Glycerol | |

Gebrauchslösung:

| | |
|-------------------------------------|----------|
| 3,6 µl 10x MOPS | |
| 6,4 µl Formaldehyd (37 %) | Merck, D |
| 18 µl Formamid | Sigma, D |
| 4 µl RNA-Auftragspuffer Stammlösung | |
| 0,2 µl Ethidiumbromid | Sigma, D |

cDNA Array

Nicht-denaturierendes Agarosegel (DNA-Gel)

TAE-Puffer (1x):

| | |
|---------------------------|----------------------|
| 40 mM Tris-Base | |
| 1 mM Na ₂ EDTA | |
| 20 mM Essigsäure | Fisher Scientific, D |

DNA-Gel:

| | |
|---------------------------|----------|
| 15 g/l Agarose | |
| 1 µl/50 ml Ethidiumbromid | Sigma, D |

Non-radioactive AmpoLabeling LPR-Kit..... SuperArray, USA

- RT-Primer oligo dT (P)
- Reverse Transcriptase (RE)
- RNase inhibitor (RI)
- LPR Buffer (L)
- LPR DNA Polymerase (LE)
- 5x GEALabeling Buffer for Chemiluminescent Detection (BN)
- RNase free water (H₂O)

GEArray Q series Human Drug Metabolism Gene Array

| | |
|----------------------------|-----------------|
| <u>(HS-011)</u> | SuperArray, USA |
| Array Membranes | |
| Array related Primers (AF) | |
| Lachssperma-DNA | Invitrogen, D |

GEArray Q series Human Stress & Toxicity PathwayFinder Gene Array

| | |
|----------------------------|-----------------|
| <u>(HS-012)</u> | SuperArray, USA |
| Array Membranes | |
| Array related Primers (AF) | |
| Lachssperma-DNA | |

20x SSC-Lösung:

| | |
|-------------------------|----------|
| 175,5 g NaCl | |
| 88,2 g Na-Citrat | Merck, D |
| ad 1 l H ₂ O | |
| pH 7,0 | |

Wash Solution 1:

| | |
|-------------------------|--|
| 100 ml 20x SSC | |
| 50 ml SDS (20 %) | |
| ad 1 l H ₂ O | |

Wash Solution 2:

| | |
|------------------|--|
| 5 ml 20x SSC | |
| 25 ml SDS (20 %) | |

Chemiluminescent Detection Kit für GEArrays..... SuperArray, USA

- GEAblocking Solution Q
- AP-Streptavidin
- 5x Buffer F (5X Washing Buffer)
- Buffer G (AP Assay Buffer)

CDP-Star Substrate

TaqMan Real Time PCR

| | |
|--|-------------------------|
| <u>BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit</u> | Applied Biosystems, USA |
| Ready Reaction Mix | |
| pGEM-3Zf(+) double-strand DNA Control Template | |
| -21 M13 Control Primer (forward) | |
| 5x BigDye Terminator v1.1/3.1 Sequencing Buffer | |
| <u>TaqMan Reverse Transcription Reagents</u> | Roche, CH |
| MultiScribe Reverse Transcriptase | |
| RNase Inhibitor | |
| dNTP Mixture | |
| Random Hexamer Primers | |
| 10X RT Buffer | |
| MgCl ₂ Solution | |
| TaqMan Universal Master Mix..... | Applied Biosystems, USA |
| Human ACTB Endogenous Control (VIC/TAMRA)..... | Applied Biosystems, USA |

Immunzytochemische Detektion

Formaldehyd/PBS

4 ml Formaldehyd
ad 100 ml PBS

| | |
|---|----------------|
| <u>UltraVision Detection Systems HRP/DAB</u> | LabVision, USA |
| Hydrogen Peroxide Block | |
| Biotinylated Goat Anti-Mouse Antibody | |
| Streptavidin-Peroxidase | |
| DAB Chromogen | |
| DAB Substrate | |
| Primärantikörper Maus-Anti-Metallothionein, monoklonal, E9..... | DAKO, DK |
| <u>Mouting-Medium</u> | |
| 90 % (v/v) Glyzerol | |
| 9 % (v/v) PBS | |
| 1 % (v/v) Butylhydroxytoluol (10 mM Stammlösung in DMSO)..... | Fluka, CH |

Liste der gespotteten Gene auf dem cDNA Makroarray *GEArray Q series Human Drug Metabolism Gene Array (HS-011)*

| Spot-Nr. | Name | Symbol | GeneBank-ID |
|----------|--|---------|-------------|
| 1 | ATP-binding cassette, subfamily B, member 1 | ABCB1 | NM_000927 |
| 2 | ATP-binding cassette, subfamily B, member 4 | ABCB4 | NM_000443 |
| 3 | ATP-binding cassette, subfamily C, member 1 | ABCC1 | NM_004996 |
| 4 | ATP-binding cassette, subfamily C, member 2 | ABCC2 | NM_000392 |
| 5 | ATP-binding cassette, subfamily C, member 3 | ABCC3 | NM_003786 |
| 6 | ATP-binding cassette, subfamily C, member 5 | ABCC5 | NM_005688 |
| 7 | ATP-binding cassette, subfamily G, member 2 | ABCG2 | NM_004827 |
| 8 | Acetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1 | ACAT1 | NM_000019 |
| 9 | Acetyl-Coenzyme A acetyltransferase 2 | ACAT2 | NM_005891 |
| 10 | Choline acetyltransferase | CHAT | NM_020985 |
| 11 | Carbohydrate sulfotransferase 1 | CHST1 | NM_003654 |
| 12 | Carbohydrate sulfotransferase 2 | CHST2 | NM_004267 |
| 13 | Carbohydrate sulfotransferase 3 | CHST3 | NM_004273 |
| 14 | Carbohydrate sulfotransferase 4 | CHST4 | NM_005769 |
| 15 | Carbohydrate sulfotransferase 5 | CHST5 | NM_012126 |
| 16 | Carbohydrate sulfotransferase 6 | CHST6 | NM_021615 |
| 17 | Carbohydrate sulfotransferase 7 | CHST7 | NM_019886 |
| 18 | Carbohydrate sulfotransferase 8 | CHST8 | NM_022467 |
| 19 | Catechol-Omethyltransferase | COMT | NM_000754 |
| 20 | Carnitine acetyltransferase | CRAT | NM_000755 |
| 21 | Cerebroside sulfotransferase | CST | NM_004861 |
| 22 | Cytochrome P450, family 11, subfamily A, polypeptide 1 | CYP11A1 | NM_000781 |
| 23 | Cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide 1 | CYP1A1 | NM_000499 |
| 24 | Cytochrome P450, family 1, subfamily B, polypeptide 1 | CYP1B1 | NM_000104 |
| 25 | Cytochrome P450, family 24, subfamily A, polypeptide 1 | CYP24A1 | NM_000782 |
| 26 | Cytochrome P450, family 2, subfamily A, polypeptide 6 | CYP2A6 | NM_000762 |
| 27 | Cytochrome P450, family 2, subfamily B, polypeptide 6 | CYP2B6 | NM_000767 |
| 28 | Cytochrome P450, family 2, subfamily C, polypeptide 19 | CYP2C19 | NM_000769 |
| 29 | Cytochrome P450, family 2, subfamily C, polypeptide 8 | CYP2C8 | NM_000770 |
| 30 | Cytochrome P450, family 2, subfamily C, polypeptide 9 | CYP2C9 | NM_000771 |
| 31 | Cytochrome P450, family 2, subfamily D, polypeptide 6 | CYP2D6 | NM_000106 |
| 32 | Cytochrome P450, family 2, subfamily E, polypeptide 1 | CYP2E1 | NM_000773 |
| 33 | Cytochrome P450, family 2, subfamily F, polypeptide 1 | CYP2F1 | NM_000774 |
| 34 | Cytochrome P450, family 3, subfamily A, polypeptide 4 | CYP3A4 | NM_017460 |
| 35 | Cytochrome P450, family 3, subfamily A, polypeptide 5 | CYP3A7 | NM_000765 |
| 37 | Cytochrome P450, family 4, subfamily A, polypeptide 11 | CYP4A11 | NM_000778 |
| 38 | Cytochrome P450, family 4, subfamily B, polypeptide 1 | CYP4B1 | NM_000779 |
| 39 | Cytochrome P450, family 4, subfamily F, polypeptide 3 | CYP4F3 | NM_000896 |
| 40 | Cytochrome P450, family 7, subfamily A, polypeptide 1 | CYP7A1 | NM_000780 |
| 41 | Cytochrome P450, family 7, subfamily B, polypeptide 1 | CYP7B1 | NM_004820 |
| 42 | Cytochrome P450, family 8, subfamily B, polypeptide 1 | CYP8B1 | NM_004391 |
| 43 | Dihydrofolate acetyltransferase | DLAT | NM_001931 |
| 44 | Epoxide hydrolase 1, microsomal | EPHX1 | NM_000120 |
| 45 | Epoxide hydrolase 2, cytoplasmic | EPHX2 | NM_001979 |
| 46 | Glutathione S-transferase A1 | GSTA1 | NM_145740 |
| 47 | Glutathione S-transferase A3 | GSTA3 | NM_000847 |
| 48 | Glutathione S-transferase A4 | GSTA4 | NM_001512 |
| 49 | Glutathione S-transferase M2 (muscle) | GSTM2 | NM_000848 |
| 50 | Glutathione S-transferase M3 (brain) | GSTM3 | NM_000849 |
| 51 | Glutathione S-transferase M5 | GSTM5 | NM_000851 |
| 52 | Glutathione S-transferase pi | GSTP1 | NM_000852 |
| 53 | Glutathione S-transferase theta 1 | GSTT1 | NM_000853 |
| 54 | Glutathione S-transferase theta 2 | GSTT2 | NM_000854 |
| 55 | Histone acetyltransferase 1 | HAT1 | NM_003642 |
| 56 | MYST histone acetyltransferase 2 | MYST2 | NM_007067 |
| 57 | Carbohydrate sulfotransferase 10 | CHST10 | NM_004854 |
| 58 | Histamine Nmethyltransferase | HNMT | NM_006895 |
| 59 | Lung alpha/beta hydrolase 1 | LABH1 | NM_032604 |
| 60 | N-acetyltransferase 5 (ARD1 homolog, <i>S.cerevisiae</i>) | NAT5 | NM_016100 |
| 61 | Cytochrome P450, family 20, subfamily A, polypeptide 1 | CYP20A1 | NM_020674 |
| 62 | Leukotriene A4 hydrolase leukotriene A4 hydrolase | LTA4H | NM_000895 |
| 63 | Microsomal glutathione S-transferase 1 | MGST1 | NM_020300 |
| 64 | Microsomal glutathione S-transferase 2 | MGST2 | NM_002413 |
| 65 | Microsomal glutathione S-transferase 3 | MGST3 | NM_004528 |
| 66 | MYST histone acetyltransferase | MYST4 | NM_012330 |
| 67 | Metallothionein 1A (functional) | MT1A | NM_005946 |
| 68 | Metallothionein 1E (functional) | MT1E | BC009699 |
| 69 | Metallothionein 1G | MT1G | NM_005950 |
| 70 | Metallothionein 1H | MT1H | NM_005951 |

| Spot-Nr. | Name | Symbol | GeneBank-ID |
|----------|---|------------|-------------|
| 71 | Metallothionein 1L | MT1L | X97261 |
| 72 | Metallothionein 2A | MT2A | NM_005953 |
| 73 | Metallothionein 3 | MT3 | NM_005954 |
| 74 | Metallothionein 1X | MT1X | NM_005952 |
| 75 | N-acetyltransferase 1 | NAT1 | NM_000662 |
| 76 | Nicotinamide N-methyltransferase | NNMT | NM_006169 |
| 77 | Cytochrome P450 retinoid metabolizing protein | P450RAI- 2 | NM_019885 |
| 78 | P450 (cytochrome) oxidoreductase | POR | NM_000941 |
| 79 | Sulfotransferase, estrogenpreferring | STE | NM_005420 |
| 80 | Sulfotransferase family, cytosolic, 1A, member 1 | SULT1A1 | NM_001055 |
| 81 | Sulfotransferase family, cytosolic, 1A, member 2 | SULT1A2 | NM_001054 |
| 82 | Thyroid hormone sfotransferase | SULT1B1 | NM_014465 |
| 83 | Sulfotransferase family, cytosolic, 1C, member 1 | SULT1C1 | NM_001056 |
| 84 | Sulfotransferase family, cytosolic, 1C, member 2 | SULT1C2 | NM_006588 |
| 85 | Sulfotransferase family, cytosolic, 2A, member 1 | SULT2A1 | NM_003167 |
| 86 | Sulfotransferase family, cytosolic, 2B, member 1 | SULT2B1 | NM_004605 |
| 87 | Sulfotransferase family 4A, member 1 | SULT4A1 | NM_014351 |
| 88 | Thromboxane A synthase 1 | TBXAS1 | NM_001061 |
| 89 | Thiopurine Smethyltransferase | TPMT | NM_000367 |
| 90 | Tyrosylprotein sulfotransferase 1 | TPST1 | NM_003596 |
| 91 | Tyrosylprotein sulfotransferase 2 | TPST2 | NM_003595 |
| 92 | UDP glycosyltransferase 1 family, polypeptide A1 | UGT1A1 | NM_000463 |
| 93 | UDP glycosyltransferase 2 family, polypeptide A1 | UGT2A1 | NM_006798 |
| 94 | UDP glycosyltransferase 1 family, polypeptide A10 | UGT1A10 | NM_007120 |
| 95 | UDP glycosyltransferase 2 family, polypeptide B10 | UGT2B10 | NM_001075 |
| 96 | UDP glycosyltransferase 2 family, polypeptide B4 | UGT2B4 | NM_021139 |
| 97 | PUC18 Plasmid DNA | PUC18 | L08752 |
| 99 | PUC18 Plasmid DNA | PUC18 | L08752 |
| 100 | Blanc | Blanc | |
| 101 | Blanc | Blanc | |
| 102 | Blanc | Blanc | |
| 103 | Glyceraldehyde-3- phosphate dehydrogenase | GAPD | NM_002046 |
| 104 | Glyceraldehyde-3- phosphate dehydrogenase | GAPD | NM_002046 |
| 105 | Homo sapiens peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A) | PPIA | NM_021130 |
| 106 | Homo sapiens peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A) | PPIA | NM_021130 |
| 107 | Homo sapiens peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A) | PPIA | NM_021130 |
| 108 | Homo sapiens peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A) | PPIA | NM_021130 |
| 109 | Ribosomal protein L13a | RPL13A | NM_012423 |
| 110 | Ribosomal protein L13a | RPL13A | NM_012423 |
| 111 | Actin, beta b-Actin | ACTB | NM_001101 |
| 112 | Actin, beta b-Actin | ACTB | NM_001101 |

Liste der gespotteten Gene auf dem cDNA Makroarray *GEArray Q series Human Stress & Toxicity PathwayFinder™ Gene Array (HS-012)*

| Spot-Nr. | Name | Symbol | GeneBank-ID |
|----------|---|---------|-------------|
| 1 | Annexin A5 Annexin V | ANXA5 | NM_001154 |
| 2 | Ataxia telangiectasia mutated (groups A, C and D) | ATM | NM_000051 |
| 3 | BCL2-associated X protein Bax | BAX | NM_004324 |
| 4 | BCL2-like 1 Bcl-x | BCLX | NM_138578 |
| 5 | BCL2-like 2 Bcl-w | BCLW | NM_004050 |
| 6 | Caspase 1, apoptosis-related cysteine protease | CASP1 | NM_033292 |
| 7 | Caspase 10, apoptosis-related cysteine protease | CASP10 | NM_001230 |
| 8 | Caspase 8, apoptosis-related cysteine protease | CASP8 | NM_001228 |
| 9 | Catalase | CAT | NM_001752 |
| 10 | Cyclin C | CCNC | NM_005190 |
| 11 | Cyclin D1 (PRAD1: parathyroid adenomatosis 1) | CCND1 | NM_053056 |
| 12 | Cyclin G1 Cyclin G | CCNG1 | NM_004060 |
| 13 | Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 1A P21/Waf1/CIP1 | CDKN1A | NM_000389 |
| 14 | CHK2 checkpoint homolog (S. pombe) CHK2/RAD53 | CHEK2 | NM_007194 |
| 15 | Crystallin, alpha B Cryab | CRYAB | NM_001885 |
| 16 | Colony stimulating factor 2 (granulocyte-macrophage) | CSF2 | NM_000758 |
| 17 | Cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide 1 | CYP1A1 | NM_000499 |
| 18 | Cytochrome P450, family 1, subfamily B, polypeptide 1 | CYP1B1 | NM_000104 |
| 19 | Cytochrome P450, family 2, subfamily E, polypeptide 1 | CYP2E | NM_000773 |
| 20 | Cytochrome P450, , subfamily A, polypeptide 1 | CYP7A1 | NM_000780 |
| 21 | Cytochrome P450, family 7, subfamily , polypeptide 1 | CYP7B1 | NM_004820 |
| 22 | Damage-specific DNA binding protein 1, 127kDa | DDB1 | NM_001923 |
| 23 | DNA-damage-inducible transcript 3 GADD153(CHOP) | DDIT3 | NM_004083 |
| 24 | DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily A, member 1 Hsj2 | DNAJA1 | NM_001539 |
| 25 | DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 4 Hlj1 | DNAJB4 | NM_007034 |
| 26 | E2F transcription factor 1 | E2F1 | NM_005225 |
| 27 | Early growth response 1 Krox-24 | EGR1 | NM_001964 |
| 28 | Epoxide hydrolase 2, cytoplasmic | EPHX2 | NM_001979 |
| 29 | Excision repair cross-complementing rodent repair deficiency 1 | ERCC1 | NM_001983 |
| 30 | Excision repair cross-complementing rodent repair deficiency 3 | ERCC3 | NM_000122 |
| 31 | Excision repair cross-complementing rodent repair deficiency 4 | ERCC4 | NM_005236 |
| 32 | Excision repair cross-complementing rodent repair deficiency 5 | ERCC5 | NM_000123 |
| 33 | Flavin containing monooxygenase 1 | FMO1 | NM_002021 |
| 34 | Flavin containing monooxygenase 5 | FMO5 | NM_001461 |
| 35 | Growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha | GADD45A | NM_001924 |
| 36 | Growth arrest and DNA-damage-inducible, beta | GADD45B | NM_015675 |
| 37 | Glutathione peroxidase 1 | GPX1 | NM_000581 |
| 38 | Glutathione reductase | GSR | NM_000637 |
| 39 | Glutathione S-transferase M3 (brain) | GSTM3 | NM_000849 |
| 40 | Heme oxygenase (decycling) 1 HO-1/HEME1 | HMOX1 | NM_002133 |
| 41 | Heme oxygenase (decycling) 2 HEME2 | HMOX2 | NM_002134 |
| 42 | Heat shock transcription factor 1 Tcf5 | HSF1 | NM_005526 |
| 43 | Heat shock 105kDa/110kDa protein 1 HSP105B | HSPH1 | NM_006644 |
| 44 | Heat shock 70kDa protein 1A HSP70-1A | HSPA1A | NM_005345 |
| 45 | Heat shock 70kDa protein 1B | HSPA1B | NM_005346 |
| 46 | Heat shock 70kDa protein 1-like HSPA1L | HSPA1L | NM_005527 |
| 47 | Heat shock 70kDa protein 2 | HSPA2 | NM_021979 |
| 48 | Heat shock 70kDa protein 4 Hsp70 | HSPA4 | NM_002154 |
| 49 | Heat shock 70kDa protein 5 (glucose-regulated protein, 78kDa) | HSPA5 | NM_005347 |
| 50 | Heat shock 70kDa protein 6 (HSP70B') HSP70B | HSPA6 | NM_002155 |
| 51 | Heat shock 70kDa protein 8 | HSPA8 | NM_006597 |
| 52 | Heat shock 70kDa protein 9B (mortalin-2) Mortalin-2 | HSPA9B | NM_004134 |
| 53 | Heat shock 27kDa protein 1 HSP28/HSP27/Hsp25 | HSPB1 | NM_001540 |
| 54 | Heat shock 90kDa protein 1, alpha HSP90A/HSP86 | HSPCA | NM_005348 |
| 55 | Heat shock 90kDa protein 1, beta HSP90 b | HSPCB | NM_007355 |
| 56 | Heat shock 60kDa protein 1 (chaperonin) Chaperonin | HSPD1 | NM_002156 |
| 57 | Heat shock 10kDa protein 1 (chaperonin 10) Chaperonin 10 | HSPE1 | NM_002157 |
| 58 | Insulin-like growth factor binding protein 6 | IGFBP-6 | NM_002178 |
| 59 | Interleukin 18 (interferon-gamma-inducing factor) | IL-18 | NM_001562 |
| 60 | Interleukin 1, alpha | IL1A | NM_000575 |
| 61 | Interleukin 1, beta | IL1B | NM_000576 |
| 62 | Interleukin 6 (interferon, beta 2) | IL6 | NM_000600 |
| 63 | Lymphotoxin alpha (TNF superfamily, member 1) TNFB/LT | LTA | NM_000595 |
| 64 | Mdm2, transformed 3T3 cell double minute 2, p53 binding protein | MDM2 | NM_002392 |
| 65 | Macrophage migration inhibitory factor | MIF | NM_002415 |
| 66 | Metallothionein 1A (functional) | MT1A | NM_005946 |
| 67 | Metallothionein 1H metallothionein 1H | MT1H | NM_005951 |
| 68 | Metallothionein 2A Metallothionein 2A | MT2A | NM_005953 |
| 69 | Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer KBF1 | NFKB1 | NM_003998 |

| Spot-Nr. | Name | Symbol | GeneBank-ID |
|----------|---|----------|-------------|
| 70 | Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer, alpha | NFKBIA | NM_020529 |
| 71 | Homo sapiens inducible nitric oxide synthase (iNOS) | iNOS | AF049656 |
| 72 | Proliferating cell nuclear antigen | PCNA | NM_182649 |
| 73 | Prostate differentiation factor | PLAB | NM_004864 |
| 74 | (cytochrome) oxidoreductase POR | CYPOR | NM_000941 |
| 75 | Prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (G/H synthase) | Cox-2 | NM_000963 |
| 76 | RAD23 homolog A (S. cerevisiae) | RAD23A | NM_005053 |
| 77 | RAD50 (S. cerevisiae) homolog | RAD50 | NM_005732 |
| 78 | Chemokine (C-C motif) ligand 21 | CCL21 | NM_002989 |
| 79 | Chemokine (C-C motif) ligand 3 MIP-1a/SCYA3 | CCL3 | NM_002983 |
| 80 | Chemokine (C-C motif) ligand 4 MIP-1b | CCL4 | NM_002984 |
| 81 | Chemokine (C-X-C motif) ligand 10 SCYB10/IP 10 | CXCL10 | NM_001565 |
| 82 | Serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade E member 1 PAI-1 | SERPINE1 | NM_000602 |
| 83 | Superoxide dismutase 1, soluble (Cu/ZnSOD) | SOD1 | NM_000454 |
| 84 | Superoxide dismutase 2, mitochondrial IPO-B/MNSOD | SOD2 | NM_000636 |
| 85 | TNF Tumor necrosis factor (TNF superfamily, member 2) | TNFA | NM_000594 |
| 86 | Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1A | TNFR1 | NM_001065 |
| 87 | Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10 TRAIL | TNFSF10 | NM_003810 |
| 88 | Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 6 Fas ligand | TNFSF6 | NM_000639 |
| 89 | Tumor protein p53 (Li-Fraumeni syndrome) p53 | TP53 | NM_000546 |
| 90 | TNFRSF1A-associated via death domain | TRADD | NM_003789 |
| 91 | UDP glycosyltransferase 1 family, polypeptide A9 | UGT1A9 | NM_021027 |
| 92 | Uracil-DNA glycosylase | UNG | NM_003362 |
| 93 | X-ray repair complementing defective repair 1 | XRCC1 | NM_006297 |
| 94 | X-ray repair complementing defective repair 2 | XRCC2 | NM_005431 |
| 95 | X-ray repair complementing defective repair 4 | XRCC4 | NM_003401 |
| 96 | X-ray repair complementing defective repair 5 (80kDa) | XRCC5 | NM_021141 |
| 97 | PUC18 Plasmid DNA | PUC18 | L08752 |
| 98 | PUC18 Plasmid DNA | PUC18 | L08752 |
| 99 | PUC18 Plasmid DNA | PUC18 | L08752 |
| 100 | Blanc | Blanc | |
| 101 | Blanc | Blanc | |
| 102 | Blanc | Blanc | |
| 103 | Glyceraldehyde-3- phosphate dehydrogenase | GAPD | NM_002046 |
| 104 | Glyceraldehyde-3- phosphate dehydrogenase | GAPD | NM_002046 |
| 105 | Homo sapiens peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A) | PPIA | NM_021130 |
| 106 | Homo sapiens peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A) | PPIA | NM_021130 |
| 107 | Homo sapiens peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A) | PPIA | NM_021130 |
| 108 | Homo sapiens peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A) | PPIA | NM_021130 |
| 109 | Ribosomal protein L13a | RPL13A | NM_012423 |
| 110 | Ribosomal protein L13a | RPL13A | NM_012423 |
| 111 | Actin, beta b-Actin | ACTB | NM_001101 |
| 112 | Actin, beta b-Actin | ACTB | NM_001101 |

Karyotypisierung der Zelllinie LAPC-4

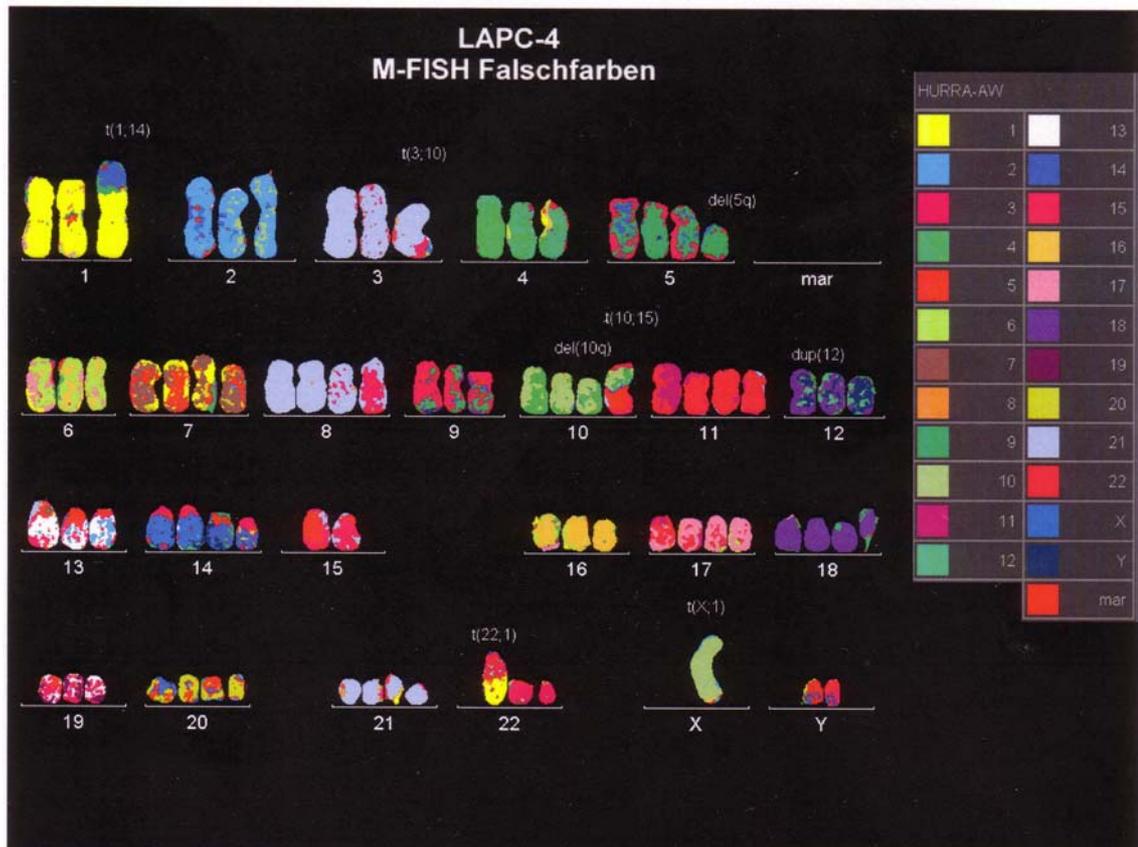


Abbildung 24: Karyotyp von LAPC-4 Zellen nach M-FISH.

Karyotyp: hypotetraploid

78(77-80)<4n>;-1;der(1)t(1;14);-2;-3;

der(8)t(3;10);-4;del(5q);-6;-9;del(10);der(10)t(10;15)dup(12);-13;-15;-15;-16;-19;-22;

der(22)t(22;1);-X;der(X)t(X;1)

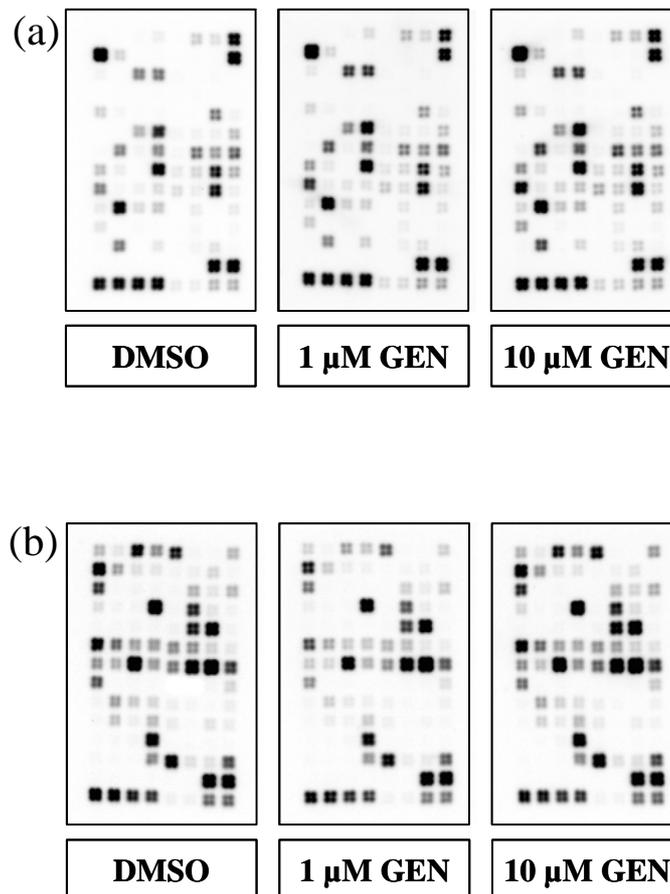
Repräsentative Bildnachweise der entwickelten cDNA Arrays

Abbildung 29: Repräsentative Aufnahmen der cDNA Makroarrays HS-011 (A) und HS-012 (B). LAPC-4 Zellen wurden für 24 h mit 0,1 % DMSO, 1 μM oder 10 μM Genistein (GEN) inkubiert. Die Spots repräsentieren jeweils ein Gen der Biotransformation bzw. Stressresponse. Eine Liste der gespotteten Gene befindet sich in Anhang A. Für die Darstellung wurden die Originalbilder invertiert, d. h. die chemolumineszenten Signale erscheinen hier als Schwärzung während der Hintergrund hell ist.

Scatterplots aus den Multiplen Genexpressionsanalysen

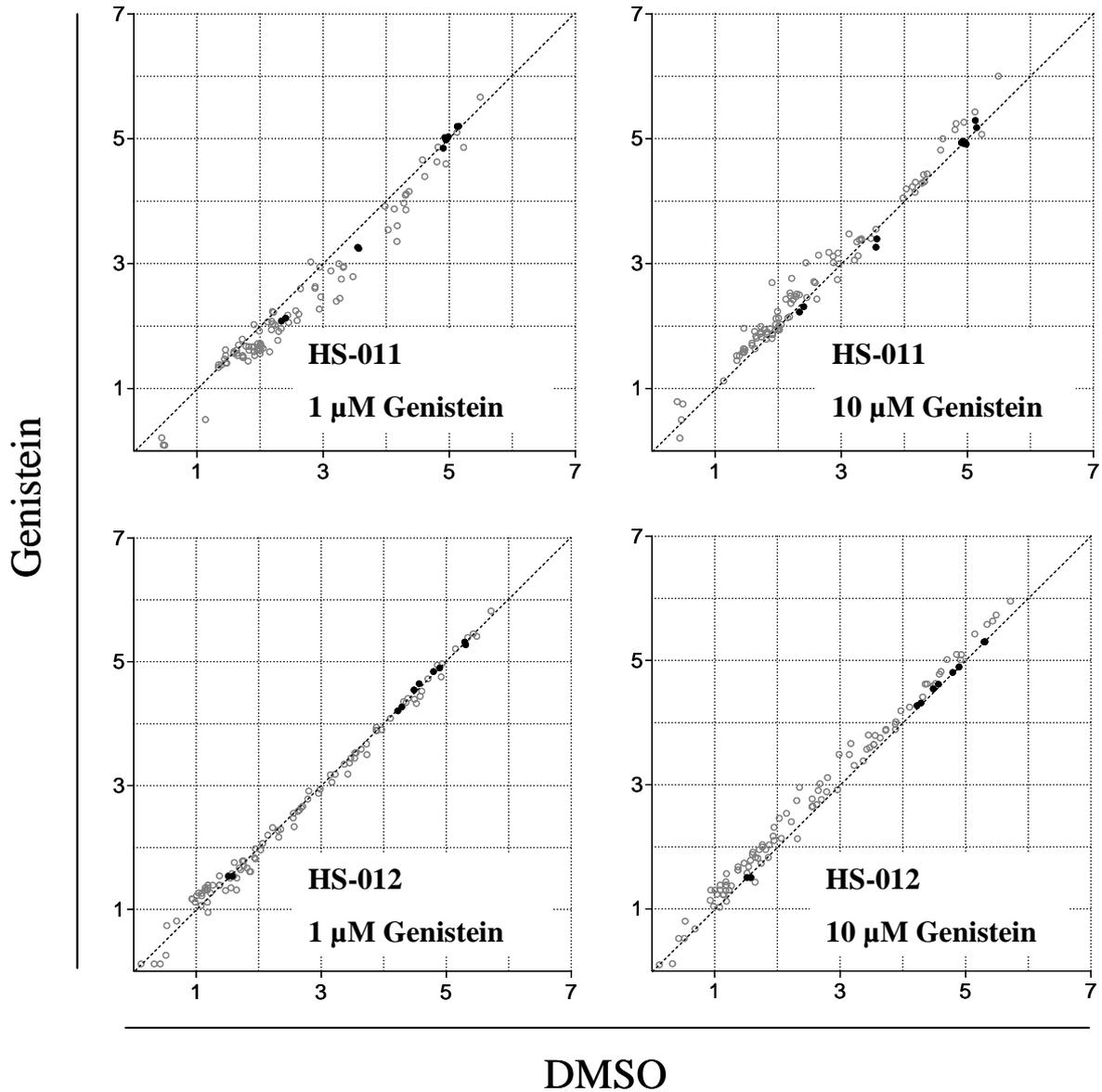


Abbildung 30: Scatterplots der normalisierten Daten aus den cDNA-Makroarray-Analysen für die Spots der Ziel- (weiß) und Housekeeping-Gene (schwarz). Kontrollen (0,1 % DMSO) und Behandlungen (1 μ M bzw. 10 μ M Genistein) wurden gegeneinander aufgetragen. Die dargestellten Werte entsprechen jeweils den mittleren logarithmierten Chemilumineszenz-Signalen aller auf einer Membran befindlichen Spots ($n=3$). HS-011: Human Drug Metabolism Gene Array; HS-012: Human Stress & Toxicity PathwayFinder Gene Array

Promotorsequenz von Metallothionein 1X (von -500 bis +50 bp)

>ref|NT_010498.15|Hs16_10655:10330081-10330630 Homo sapiens chromosome 16 genomic contig

(-500 bp)

5' -AGACATAAGAGAAACGTGGCCAACAGACCGAGGTGGGGACGGGGACAGGGACCGGCAATGCAGGAAA

TCCGAGTGTACATCCTCTGCCTCTCATTTGCACACTGCTCCCTCGCTATGCTCACCGCTCCCGCCGATC

MRE

CAGGGACGTGATCCAGGGACTCTGGGAAATGCAAAGCTACACACAGTGGAGCGGGGGCTGGGGGTGTGTA

GACCGCCGGGATTCCGAGTTTCCCGGCACGCCTAGGAGAGGGAGAGGCAGGCAATGTCAGGGAAATTGGG

CAGGCAAGACGCCAGGGACGCCACGTAAGTCCAGGTTCTCAACGAGGTGGAGCCAAAGGGGCAGGCCCGC

CGGTTGCGCCCGGCGCTGGGCTCACGGGTTGCTTGCACCCGGCCCCAGGATCGCGGGCGGTGCAGACTCAGCA

MRE

MRE

GC-Box

GGGCGGGTGCAAGGACGAGGCGGGGCCTTGCGCCCGGCCTCTTCCCGGACTTATAAAGAGAGCCGCCG

GC-Box

MRE

TATA-Box

GCTTCTGGGCTCCACCACGCTTTTTCATCTGTCCCGCTGCGTGTTCCTCTTGATCGGGAACT-3'

+1 bp → mRNA

(+50 bp)

Abbildung 31: Promotorregion des Gens Metallothionein 1X. Die Grafik enthält die Basenfolge gemäß der NCBI-Einträge NT_010498.15 (20.08.2004), X65607.1 (18.04.2005) sowie Locus Hs16_10655 (10330081-10330630); 16q13. Hervorgehoben sind die weiter unten aufgeführten Konsensussequenzen für das MRE (metal response element), die GC-Box sowie die TATA-Box.

Gefundene Elemente^{1,2}:

MRE (metal response element): 12 Basen, Kernsequenz: TGC(Pu)C(N)C
GC-Box (Sp1-Bindungsstelle): GGGCGG
TATA-Box: TATAAA

Nicht gefundene Elemente³:

ERE (estrogen response element): (Pu)GGTCA(NNN)TGACC(Py)
Halb-ERE: (Pu)GGTCA

¹ A: Adenin, G: Guanin, C: Cytosin, T: Thymin, N: unspezifische Base, Pu: Purinbase, Py: Pyrimidinbase, NNN: Promotorelement, NNN: mRNA-Region

² Konsensus-Sequenzen nach SAMSON S.L., PARAMCHUK W.J., SHWORAK N.W. & GEDAMU L. (1995) Functional analyses of the human metallothionein-IG gene. In vitro and in vivo studies. *J.Biol.Chem.* **270**, 25194-25199; SHWORAK N.W., O'CONNOR T., WONG N.C. & GEDAMU L. (1993) Distinct TATA motifs regulate differential expression of human metallothionein I genes MT-IF and MT-IG. *J.Biol.Chem.* **268**, 24460-24466

³ Konsensus-Sequenzen nach SANCHEZ R., NGUYEN D., ROCHA W., WHITE J.H. & MADER S. (2002) Diversity in the mechanisms of gene regulation by estrogen receptors. *Bioessays* **24**, 244-254.

Danksagung

Mein besonders herzlicher Dank gilt Frau Prof. Dr. Beatrice L. Pool-Zobel für ihr hohes Maß an Engagement bei der Leitung des Lehrstuhls für Ernährungstoxikologie der Friedrich-Schiller-Universität Jena sowie für das in mich gesetzte Vertrauen und die stete Förderung einer eigenverantwortlichen und analytischen Arbeitsweise. Ich habe sehr gern am Lehrstuhl gearbeitet und verlasse die Arbeitsgruppe in vielerlei Hinsicht bereichert.

Darüber hinaus möchte ich mich bei allen ehemaligen und jetzigen Mitarbeitern des Lehrstuhls bedanken. Ein herzliches Dankeschön geht dabei an Herrn PD Dr. Michael Gleis, für die angenehme Zusammenarbeit und bereitwillige Unterstützung in fachlichen Fragen sowie an Claudia Steiner, für eine gute gemeinsame Projektarbeit.

Vielen Dank an die Kommission der Europäischen Union für die Finanzierung der durchgeführten Untersuchungen innerhalb des EU-Projektes „Phytoprevent“ (Projekt-nummer: QLK-2000-00266) sowie während meines sechsmonatigen Marie Curie Development Host Fellowships (Projektnummer: HPMT-CT-2001-00287) an der University of Ulster in Coleraine. In diesem Zusammenhang möchte ich mich recht herzlich bei Herrn Prof. Dr. Ian R. Rowland sowie seinen Mitarbeitern (insbesondere Dr. Pamela J. Magee) für die warmherzige Aufnahme und vielfältige persönliche Unterstützung während meiner Zeit in Nordirland bedanken.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Charles L. Sawyers (University of California) für die Bereitstellung der Zelllinie LAPC-4 sowie Frau Prof. Dr. K. Wähälä (University of Helsinki) für die Bereitstellung des hier getesteten Metaboliten 6'-Hydroxy-*O*-DMA.

Diese Arbeit wäre nicht ohne die mentale Unterstützung vieler Freunde möglich gewesen. Vielen lieben Dank an Alexander, Christoph und Frank (sowie den anderen Mitgliedern von „Affront DHC“), Manuela, Marc, Mathias, Nikolina, Nina, Raju, Rafal, Sabine, Steffi, Tom, Thomas und alle die ich vergessen habe.

Mein letztes und herzlichstes Dankeschön gilt meinen Eltern für ihre liebevolle und großzügige Unterstützung seit nunmehr 29 Jahren.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Literatur angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quellen gekennzeichnet.

Die Arbeit wurde in gleicher oder ähnlicher Form bisher keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Jena, 13.12.2005

Marian Raschke