

## **DNA-PROTEKTIVE WIRKUNG ANTHOCYANREICHER BROMBEEREXTRAKTE**

Ute Boettler<sup>a</sup>, Melanie Esselen<sup>b</sup>, Melanie Hutter<sup>b</sup> und Doris Marko<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Universität Wien, Institut für Lebensmittelchemie und Toxikologie, 1090 Wien,  
Österreich

<sup>b</sup>Institut für Angewandte Biowissenschaften, Abteilung für Lebensmitteltoxikologie,  
Universität Karlsruhe, Adenauerring 20, 76131 Karlsruhe, Deutschland

Anthocyane gehören zur Klasse der sekundären Pflanzeninhaltsstoffe und kommen in verschiedensten Früchten und Gemüsen vor. Neben der Aufnahme der Anthocyane über diese natürlichen Quellen, werden sie in den letzten Jahren vermehrt in funktionellen Lebensmitteln und Nahrungsergänzungsmitteln eingesetzt [1]. Grund hierfür ist, dass anhand verschiedenster *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen gezeigt werden konnte, dass Anthocyane über ein chemopräventives und antikanzerogenes Potenzial zu verfügen scheinen. Ihre Wirkung scheint dabei über verschiedene, sich teilweise überschneidende Mechanismen bedingt zu sein. Zentral scheint dabei die Inhibierung von Rezeptortyrosinkinasen (RTKs), die Induktion von Apoptose sowie die Beeinflussung humaner Topoisomerasen die einen elementaren Beitrag an der Wirkung im entsprechenden Zielgewebe zu haben scheinen [2-3].

Topoisomerasen sind Enzyme, die den topologischen Zustand von DNA-Strukturen durch Einfügen von transienten Schnitten, Hindurchführen von anderen Strängen und Verschließen der Brüche im DNA-Rückgrat verändern. Sie sind damit in der Lage, zu entspiralisieren, ver- und entknoten bzw. ver- und entketten um letztendlich die DNA zu entspiralisieren [4]. Diese Fähigkeit ist elementar um Vorgänge wie Replikation, Transkription, Rekombination und Reparatur möglichen zu machen, da die DNA im Zellkern in hochkondensiertem chromosomalen Zustand vorliegt, wodurch das Ablesen ihrer genetische Information nicht möglich ist.

Gemeinsames Charakteristikum aller Topoisomerasen ist das Ausbilden eines kovalent gebundenen Enzym-DNA-Intermediates [5]. Prinzipiell kann man zwei Klassen von Topoisomerasen unterscheiden, Typ I- und Typ II-Isoformen. Während Typ I-Topoisomerasen vorübergehend einen Einzelstrangbruch in die DNA einführen und ein

kovalentes Enzym-DNA-Intermediat ausbilden, führen Typ II-Topoisomerasen transiente Doppelstrangbrüche in die DNA ein [4]. Im Gegensatz zu den Typ I-Topoisomerasen treten Typ II-Topoisomerasen nur als Homodimer auf und benötigen für ihre enzymatische Katalyse  $Mg^{2+}$  als Cofaktor und sind ATP-abhängig.

Die spezifische Hemmung von Topoisomerasen, um damit die Replikation bestimmter Zellen zu vermindern findet bereits in der Chemotherapie durch den Einsatz bestimmter Topoisomerasegifte wie Camptothecin oder Doxorubicin häufigen Einsatz.

Während bereits eine Vielzahl von verschiedenen Studien über die zellulären Effekte der freien Aglyka (Anthocyanidine) existieren und dadurch eine recht gute Charakterisierung ihrer biologischen Wirkung möglich ist, ist der Einfluss der glykosylierten Anthocyane und ihrer potenziellen Abbauprodukte bis heute noch wenig untersucht.

Um mehr über den Einfluss der glykosylierten Verbindungen zu erfahren, wurde ein komplexer, anthocyanreicher Extrakte aus Brombeeren, in dem Cyanidin-3-Glucosid das hauptsächlich vorkommende Anthocyan darstellt, untersucht. Im Vergleich dazu wurde die isolierte Verbindung Cyanidin-3-Glucosid sowie die postulierten Abbauprodukte die Protocatechusäure und Phloroglucinolaldehyd in die Untersuchungen mit einbezogen.

Mit Hilfe der Einzelzellgelelektrophorese (Comet Assay) wurde die DNA schädigende Wirkung durch DNA-Strangbrüchen untersucht. Weder der untersuchte Brombeerextrakt, noch die isolierte Einzelverbindung und die beiden Abbauprodukte Protocatechusäure und Phloroglucinolaldehyd bedingten ein vermehrtes Auftreten von DNA-Strangbrüchen nach 24 h Inkubation in der humanen Kolonkarzinomzelllinie HT29. Im Gegenteil dazu konnte sogar teilweise ein DNA-protektiver Effekt erfasst werden. So kam es durch 30 min Vorbehandlung der Zellen mit dem komplexen Extrakt in Konzentrationen von 1-100  $\mu\text{g/ml}$  Brombeerextrakt, bei nachfolgender Inkubation mit entweder CPT (Camptothecin) oder DOX (Doxorubicin) von 1 h zu einer signifikanten Verminderung der DNA-Strangbrüche. CPT ist ein selektives Topoisomerase I-Gift und führt daher zu Topoisomerase I-bedingten Strangbrüchen, während DOX als Positivkontrolle für Strangbrüche durch Hemmung der Topoisomerase-Isoformen II $\alpha$  und II $\beta$  herangezogen wurde [6].

Als Einzelverbindung zeigte auch Cyanidin-3-Glucosid das Potential signifikant CPT-induzierte DNA-Strangbrüche in einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  zu verhindern. Ein Einfluss von Cyanidin-3-Glucosid auf die zuvor gezeigte Gesamtwirkung des Brombeerextraktes als Hemmstoff von CPT-bedingten Strangbrüchen in HT29 Zellen scheint demnach wahrscheinlich.

Jedoch scheint Cyanidin-3-Glucosid nur einen Schutz vor dem Topoisomerase-I-Gift CPT zu bedingen, denn so kam es zwar auch bei Vorbehandlung der Zellen mit Cyanidin-3-Glucosid bei nachfolgender Co-Inkubation mit DOX zu einem leichten Rückgang der DNA-Strangbrüche, jedoch war diese bis zur höchsten eingesetzten Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  Cyanidin-3-Glucosid nicht signifikant.

Mithilfe des ICE (*in vivo* complex of enzyme)-Bioassay, lassen sich die durch Inkubation mit Topoisomerasegiften stabilisierte Topoisomerase/DNA-Komplexe in intakten Zellen nachweisen. Durch Ultrazentrifugation im Dichtegradienten und anschließende Fraktionierung wird die DNA von den freien Proteinen getrennt. Mittels spezifischer Antikörper können die Topoisomerasen nachfolgend chemoluminometrisch detektiert werden, was die gleichzeitige Erfassung von freier DNA und DNA, an die kovalent Topoisomerase gebunden ist erlaubt. Als Positivkontrollen wurden dabei erneut die beiden Topoisomerasegift CPT und DOX eingesetzt, die durch Stabilisierung des Topoisomerase-DNA-Intermediat die Religation des DNA-Segmentes verhindern [7]. Im Gegensatz zu CPT und DOX, führte Inkubation mit dem Brombeerextrakt bis zur einer Konzentration von 50  $\mu\text{g/ml}$  zu keine Stabilisierung des Topoisomerase/DNA-Intermediates und scheint daher nicht als Topoisomerasegift zu wirken.

Eine 30 minütige Vorbehandlung der Zellen mit dem Brombeerextrakt bei nachfolgender Inkubation CPT führten bereits ab einer Extraktkonzentration von 10  $\mu\text{g/ml}$  zu einer signifikanten Verminderung der Topoisomerase I/DNA-Intermediate und damit zu einer Verminderung der CPT-bedingten Topoisomerasegiftung. Dieser Effekt trat durch Erhöhung der Brombeerextraktkonzentration auf 50  $\mu\text{g/ml}$  noch deutlicher in Form einer Reduktion der Komplexe auf unter 20 % gegenüber der CPT-Kontrolle zutage. Demnach scheint der Extrakt als katalytischer Inhibitor der Topoisomerase I zu fungieren und dabei eine Verminderung der Topoisomerasegift-bedingten Komplexbildung zu bedingen.

In Anlehnung daran, wurde der Einfluss des Extraktes auf Zellen untersucht, die zusätzlich mit dem Topoisomerase II-Gift DOX behandelt wurden. Auch hier kam es durch Vorinkubation der HT29 Zellen mit dem Brombeerextrakt für 30 min zu einer signifikanten Verminderung der stabilisierten Topoisomerase II $\alpha$ / $\beta$ /DNA-Intermediate. Jedoch war die Potenz der Hemmung etwas schwächer als die zuvor erfasste Hemmung der Topoisomerasegiftung durch CPT. So zeigte sich erst bei der höchsten eingesetzten Extraktkonzentration von 50  $\mu$ g/ml ein signifikanter Effekt.

Zusammenfassend bedingte der untersuchte Brombeerextrakt bereits ab einer Konzentration von 1  $\mu$ g/ml eine DNA-protective Wirkung gegenüber der strangbrechenden Wirkung der Topoisomerasegifte CPT und DOX in HT29-Zellen (Comet Assay). Dabei scheint das Anthocyan Cyanidin-3-Glucosid einen Beitrag zu der erfassten protektiven Wirkung des Extraktes gegenüber Angriffen von CPT zu leisten, da auch die isolierte Verbindung zu einer signifikanten Verminderung der CPT-induzierten Strangbrüche führte. In weiterführenden Untersuchungen (ICE-Assay) konnte gezeigt werden, dass die DNA-protective Wirkung des Brombeerextrakts auf einer katalytischen Hemmung der Topoisomerasen I/II zu beruhen scheint und dabei die Menge an Topoisomerasegifte (CPT und DOX)-gebildeten Topoisomerase I/II $\alpha$ / $\beta$ -DNA-Intermediaten signifikant in konsumerrelevanten Konzentrationen zu vermindern scheint.

Es muss allerdings bedacht werden, dass es im Falle einer therapeutischen Anwendung von Topoisomerasegiften, wie z. B. in der Chemotherapie zu unerwünschten Effekten bei einer Co-Applikation mit einem solchen polyphenolreichen Extrakt kommen könnte. So könnte es zu einer unerwünschten Verminderung der angestrebten Wirkungen der Topoisomerasegifte kommen was zu einer Hemmung oder schlimmsten Falls zu einem Verlust der therapeutischen Anwendung führen könnte. In weiterführenden Untersuchungen soll deshalb dieser Aspekt näher betrachtet werden.

---

[1] Prior, R. L.; Wu, X. Anthocyanins: structural characteristics that result in unique metabolic patterns and biological activities. *Free Radic. Res.* **2006**, *40*, 1014-28

- [2] Kang, S. Y.; Seeram, N. P. ; Nair, M. G.; Bourquin, L. D. Tart cherry anthocyanins inhibit tumor development in Apc(Min) mice and reduce proliferation of human colon cancer cells. *Cancer Lett.* **2003**, *194*, 13-9
- [3] Chen, P. N.; Chu, S. C.; Chiou, H. L.; Chiang, C. L.; Yang, S. F.; Hsieh, Y. S. Cyanidin 3-glucoside and peonidin 3-glucoside inhibit tumor cell growth and induce apoptosis in vitro and suppress tumor growth in vivo. *Nutr. Cancer.* **2005**, *53*, 232–243
- [4] Osheroff N. DNA topoisomerases. *Biochimica et Biophysica Acta* . 1998, 1400: 1-2
- [5] Champoux J. J. DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism. *Annual review of biochemistry.* **2001**, *70*, 369-413
- [6] Bailly C.: Homocamptothecins: potent topoisomerase I inhibitors and promising anticancer drugs. *Critical reviews in oncology/hematology.* **2003**, *45*(1), 91-108
- [7] Pommier Y., Pourquier P., Fan Y., Strumberg D. Mechanism of action of eukaryotic DNA topoisomerase I and drugs targeted to the enzyme. *Biochimica et biophysica acta.* **1998**, *1400*(1-3), 83-105