

DIPLOMARBEIT / DIPLOMA THESIS

Titel der Diplomarbeit / Title of the Diploma Thesis

„Einfluss mikrobieller Darmmetaboliten von
Naturprodukten auf Wachstum und Stoffwechsel von
Darmkrebszellen“

verfasst von / submitted by

Elisabeth Maria Norden

angestrebter akademischer Grad / in partial fulfilment of the requirements for the degree of
Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2021 / Vienna, 2021

Studienkennzahl lt. Studienblatt /
degree programme code as it appears on
the student record sheet:

UA 449

Studienrichtung lt. Studienblatt /
degree programme as it appears on
the student record sheet:

Diplomstudium Pharmazie

Betreut von / Supervisor:

Assoz. Prof. PD Dr. Elke Heiß

Zusammenfassung

Tumorerkrankungen stellen die Medizin vor immer größere Herausforderungen. In den Industriestaaten findet man mittlerweile jeden dritten Tumor im Dickdarm, sowohl bei Frauen als auch bei Männern. Mit der Adaption des westlichen Lebensstils, steigt die Inzidenz für Darmkrebs auch im asiatischen Raum, wo traditionell viele polyphenolreiche Lebensmittel, wie Soja verzehrt werden. Da eine falsche Ernährung einen hohen Risikofaktor für Darmkrebs darstellt, stellt sich natürlich die Frage ob und wie Polyphenole aus der Nahrung die Darmgesundheit beeinflussen. Ihnen werden antiproliferative, antioxidative und antiinflammatorische Eigenschaften zugeschrieben. Die meisten natürlichen Vertreter sind glykosidisch gebunden und auch als Aglykon schlecht bioverfügbar, weshalb mikrobielle Darmmetaboliten ebendieser Verbindungen immer mehr Beachtung bekommen.

Da Polyphenole unzählige Verbindungen umfassen, wurden aus verschiedenen Untergruppen drei Substanzen ausgewählt. Urolithin A ist ein Metabolit der Ellagannine, wobei drei Metabotypen zur Produktion im Menschen definiert sind und nicht alle Urolithin A produzieren können. S-Equol entsteht aus dem Isoflavon Daidzin, während der Vorläufer von Enterolakton, Secoisolariciresinol-diglykosid, zu den Lignanen gezählt wird.

In dieser Arbeit sollte herausgefunden werden, ob Urolithin A, S-Equol und Enterolakton einen wachstumshemmenden Effekt auf Darmkrebszellen (HCT116) haben. Enterolakton und S-Equol zeigten nur sehr wenig antiproliferativen Einfluss, während Urolithin A das Wachstum mit einer IC_{50} von ca. 30 μM mindern konnte. Enterolakton zeigte bis 40 μM keine Aktivität, weshalb auf eine Ermittlung der IC_{50} -Werte verzichtet wurde. S-Equol scheint mit einer IC_{50} von ca. 40 μM weniger potent als Urolithin A zu sein. In der p53 knock-out Mutante derselben Zelllinie wurden höhere IC_{50} -Werte festgestellt, was darauf schließen lässt, dass der Wirkmechanismus p53-abhängig sein könnte. Naturstoffe sind nicht nur als potentielle neue eigenständige Wirkstoffe interessant. Es stellt sich auch die Frage, ob sie mit gängigen Krebstherapien kombiniert werden können und so niedrigere Dosierungen – und damit weniger unerwünschte Arzneimittelwirkungen – möglich sind. Hier wurden die Metabolite mit dem Zytostatikum Oxaliplatin auf eine Kombinationswirkung in HCT116 Zellen getestet. Urolithin A zeigte einen schwach additiven Effekt, während S-Equol in höheren Dosen sogar protektiv auf die Zellen wirkte.

Da S-Equol und Enterolakton bei den Viabilität-Assays wenig Aktivität zeigten, wurden weitere Untersuchungen bezüglich Zellzyklusphasenverteilung und Einfluss auf den zellulären Energiestoffwechsel auf Urolithin A beschränkt. Hier führt Urolithin A zu einem Arrest in der G2/M-Phase mit anschließender Akkumulation in der subG1-Phase und einem verringerten metabolischen Potential. Nach Behandlung mit Urolithin A konnten die Zellen nicht mehr so gut und flexibel auf metabolischen Stress reagieren wie die Kontrollzellen und betrieben vor

allem Glykolyse, wobei dieser Effekt von p53 abhängig zu sein scheint. In HCT116 p53 knock-out Zellen konnte dieser Effekt nicht mehr beobachtet werden, die Zellen waren in der Lage, Glykolyse und Zellatmung wesentlich zu steigern.

Abstract

Cancer diseases pose ever greater challenges for medicine. In industrialized countries, one in three tumours is now found in the colon, both in women and in men. With the adaptation of the Western lifestyle, the incidence of colon cancer is also increasing in Asia, where many foods rich in polyphenols such as soy are traditionally consumed. Since an improper diet is a high-risk factor for colon cancer, the question arises as to whether and how diet-derived polyphenols affect intestinal health. They are said to have antiproliferative, antioxidant and anti-inflammatory properties. Most of these naturally occurring compounds are glycosides and also as aglycons poorly bioavailable, which is why the microbial intestinal metabolites of these compounds are receiving more and more attention.

Since polyphenols comprise countless compounds, three substances were selected from different subgroups. Urolithin A is a metabolite of the ellagitannins, with three metabolotypes being defined for production in humans and not all of them can produce urolithin A. S-Equol is formed from the isoflavone daidzin, while the precursor of enterolactone, secoisolariciresinol diglycoside, is a lignan.

The aim of this work was to find out whether urolithin A, S-equol and enterolactone have a growth-inhibiting effect on HCT116 colon cancer cells. Enterolactone and S-equol showed only little antiproliferative influence, while urolithin A was able to reduce growth with an IC_{50} of approx. 30 μ M. Enterolactone showed no activity up to 40 μ M, which is why the IC_{50} values were not determined. S-Equol with an IC_{50} of approx. 40 μ M was less potent than urolithin A. In the p53 knock-out mutant of the same cell line, higher IC_{50} values were found, which suggests that the mechanism of action may be p53-dependent. Natural substances are not only interesting as potential new active components on their own. The question also arises whether they can be combined with common cancer therapies and thus lower dosages – and therefore fewer adverse drug reactions – might be possible. Here, the cytostatic agent oxaliplatin was tested for a combination effect with urolithin A and S-equol in HCT116 cells. Urolithin A showed a weak additive effect, while S-equol even had a protective effect on the cells in higher doses.

Since S-equol and enterolactone showed little activity in the viability assays, the investigations regarding cell cycle phase distribution and influence on cellular energy metabolism were limited to urolithin A. Here urolithin A leads to arrest in the G2/M-phase with subsequent accumulation in the subG1-phase and a reduced metabolic potential. After treatment with urolithin A, the cells were no longer able to react and adapt in the same manner to metabolic stress as control cells and mainly carried out glycolysis, although this effect seems to be dependent on p53. This effect could no longer be observed in HCT116 p53 knock-out cells; the cells were able to significantly increase glycolysis and cell respiration.

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich herzlich bei meiner Betreuerin Assoz. Prof. PD Dr. Elke H. Heiß bedanken, die mich während der gesamten Diplomarbeit begleitet hat. Sie hat mir in allen theoretischen sowie praktischen Fragen stets freundlich und geduldig weitergeholfen. Es war eine interessante und lehrreiche Erfahrung für mich.

Ich möchte mich auch bei Univ.-Prof. Dr. Verena M. Dirsch bedanken, dass ich meine Diplomarbeit in ihrer Arbeitsgruppe „Molecular Targets“ machen durfte. Des Weiteren ein großes Dankeschön an die gesamte Arbeitsgruppe für das angenehme und produktive Arbeitsklima.

Mein größter Dank gilt aber meinen Eltern, Geschwistern und Freunden, die mich während meines Studiums unterstützt haben. Vor allem meinem Vater, Mag. pharm. Andreas Norden, habe ich zu verdanken, dass ich dieses Studium absolvieren konnte. Auch meinem Freund danke ich für seine liebevolle Unterstützung während der letzten Phase meines Studiums.

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG.....	1
1.1. Urolithin A.....	1
1.2. Equol	3
1.3. Enterolakton	5
1.4. Kolonkrebs.....	7
1.4.1. Risikofaktoren.....	7
1.4.1.1. Risikofaktor familiäre Prädisposition	7
1.4.1.2. Risikofaktor Ernährung	8
1.5. Warburg Effekt.....	10
1.6. Tumorsuppressorgen TP53	12
1.7. Ziele der Arbeit	14
2. MATERIAL UND METHODEN	15
2.1. Material.....	15
2.1.1. Zellkultur und Zellpassage	15
2.1.2. Resazurin und Kristallviolett Assay	16
2.1.3. Durchflusszytometrie/ FACS-Analyse	17
2.1.4. Seahorse-Assay zur Ermittlung des metabolischen Phänotyps.....	18
2.2. Methoden.....	21
2.2.1. Zellkultur und Zellpassage.....	21
2.2.1.1. Durchführung der Zellpassage	21
2.2.2. Viabilität-Assays.....	22
2.2.2.1. Ermittlung der metabolischen Aktivität mittels Resazurin Assay	22
2.2.2.1.1. Durchführung des Resazurin Assays.....	22
2.2.2.2. Bestimmung der Zellmasse mittels Kristallviolett Assays.....	28
2.2.2.2.1. Durchführung des Kristallviolett Assays.....	28
2.2.2.3. Datenauswertung	28
2.2.3. Durchflusszytometrie/ FACS Analyse.....	29
2.2.3.1. Zellzyklusanalyse mittels Propidiumiodid-Färbung	31

2.2.3.1.1. Durchführung.....	31
2.2.4. Seahorse-Assay zur Bestimmung des metabolischen Phänotyps	32
2.2.4.1. Durchführung	33
2.2.4.2. Optimierung der Parameter mittels Seahorse Mito Stress Test	36
2.2.4.2.1. Zellzahloptimierung.....	37
2.2.4.2.2. Optimierung der FCCP-Konzentration	38
2.2.4.2.3. Optimale Beschichtung der Zellkulturplatten.....	38
2.2.4.2.4. Normalisierung	39
2.2.4.2.5. Datenauswertung und Statistik	39
3. ERGEBNISSE UND DISKUSSION.....	40
3.1. Optimierung von Parametern	40
3.1.1. Resazurin / Kristallviolett Assay	40
3.1.1.1. Zellzahloptimierung.....	40
3.1.2. Seahorse Phänotyp Test	42
3.1.2.1. Zellzahloptimierung.....	42
3.1.2.2. Beschichtung der Platten.....	43
3.1.2.3. Normalisierung	43
3.1.2.4. FCCP Konzentration.....	43
3.2. Effekt von Urolithin A, S-Equol, Enterolakton und Oxaliplatin auf das Wachstum und die Viabilität von HCT116 Zellen	44
3.3. Effekt von Urolithin A und Oxaliplatin auf den Zellzyklus von HCT116 WT Zellen	46
3.4. Kombinationswirkung von Urolithin A und S-Equol mit Oxaliplatin	50
3.4.1. Kombinationswirkung von Oxaliplatin und Urolithin A	50
3.4.2. Kombinationswirkung von Oxaliplatin und S-Equol	51
3.5. Effekt von Urolithin A auf das metabolische Potential von HCT116 WT Zellen.....	53
3.6. Rolles des Tumorsuppressor p53 bei der Behandlung mit Urolithin A.....	55
3.7. Fazit und Ausblick.....	58
4. Literaturverzeichnis	60
5. Anhang.....	66
5.1. Abkürzungsverzeichnis	66

5.2.	Abbildungsverzeichnis.....	69
5.3.	Tabellenverzeichnis.....	71
5.4.	Bildrechte	74

1. EINLEITUNG

1.1. Urolithin A

Ellagtannine gehören zu den hydrolysierbaren Tanninen, polyphenolische Verbindungen (siehe Abbildung 1), die u.a. in Beeren, Nüssen und auch exotischen Früchten, wie dem Granatapfel, vorkommen. Im menschlichen Körper werden sie von der Mikrobiota in bioverfügbare Verbindungen umgewandelt (1–3).

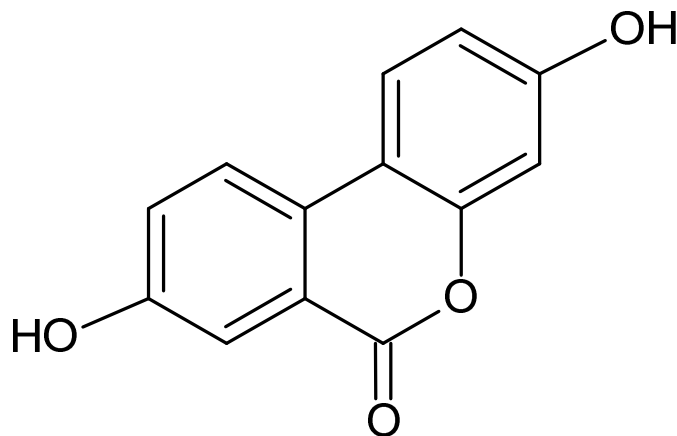


Abbildung 1: Struktur von Urolithin A (eigene Abbildung)

Nach Aufnahme über die Nahrung wird zunächst Ellagsäure abgespalten und durch die Mikrobiota im Darm in Urolithine umgewandelt, die eine bessere Absorption und damit Bioverfügbarkeit haben. Im ersten Schritt kommt es zur vorübergehenden Bildung eines Laktorings und anschließend zu stufenweiser Abspaltung der Hydroxylgruppen zu verschiedenen Urolithinen durch bakterielle Enzyme. Als Endprodukte entstehen Urolithin A (UroA), Urolithin B (UroB) und Isourolithin A (iUroA). Nach Durchlaufen des enterohepatischen Kreislaufs, zirkulieren Urolithine v.a. glukuronidiert im systemischen Kreislauf (2).

In mehreren Studien konnte beobachtet werden, dass nicht alle Individuen Urolithine im gleichen Ausmaß produzieren, was in einer Differenzierung in verschiedene Metabotypen resultierte. Nach einer Einteilung in „producer“ und „non-producer“ bzw. „responder“ und „non-responder“, konnten drei Metabotypen charakterisiert werden (2). Metabotype A produziert vorrangig UroA und dessen Konjugate, Metabotype B produziert daneben noch UroB und iUroA in nennenswerten Mengen, während Metabotype 0 keines der bekannten Urolithine produziert, siehe Abbildung 2 (4). Es ist aber bemerkenswert, dass Individuen des Metabotype

0, nach Exposition zu Granatapfelsaft, sehr wohl in der Lage sind, Urolithine zu produzieren. Diese Entwicklung scheint eher dosisabhängig und weniger zeitabhängig zu sein. Es konnte auch beobachtet werden, dass der Metabotyp B besonders oft in übergewichtigen gesunden Menschen und jenen, die am metabolischen Syndrom leiden, vorkommt. Das könnte mit einer Dysbiose, die diesen Krankheiten zugeschrieben wird, zusammenhängen (2,4).

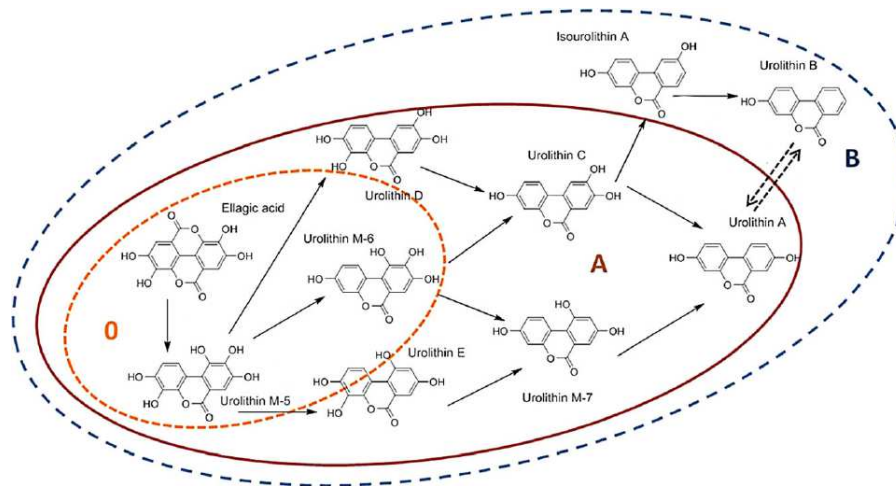


Abbildung 2: Urolithin Metabotypen: Metabotyp O (orange strichlierte Linie), Metabotyp A (rote Linie) Metabotyp B (blaue strichlierte Linie), modifiziert nach Tomás-Barberán et al. (2)

Die verschiedenen Phänotypen in der Urolithin-Produktion werden mit einer unterschiedlichen Zusammensetzung der Mikrobiota in Verbindung gebracht. Besonders wichtig scheint die Gattung *Gordonibacter* zu sein, obwohl man bemerken muss, dass die Besiedlung mit mehreren Bakteriengattungen und -stämmen eine Voraussetzung für die Urolithin-Produktion ist. *Gordonibacter* gehören zu den *Coriobacteriaceae*, die auch in der Equol-Produktion eine wichtige Rolle spielen (2).

Urolithinen wird eine Vielzahl von positiven Effekten zugeschrieben, u.a. sollen sie antioxidativ (2,3), entzündungshemmend (2,3,5) und antimikrobiell (3) wirken. Es konnte ein proapoptotischer Effekt auf verschiedene Krebszelllinien beobachtet werden (2,3,6,7), was vor allem in der Prävention von Krebs eine entscheidende Rolle spielen könnte. Aufgrund ihrer polyphenolischen Struktur haben sie ebenfalls eine gewisse Affinität zu Estrogen-Rezeptoren und könnten einen Einfluss auf den Hormonhaushalt haben (2,3,5).

1.2. Equol

Equol ist der mikrobielle Darmmetabolit des Isoflavons Daidzin bzw. dessen Aglykons Daidzein. Neben Genistin, ist Daidzin das am meisten in der Sojabohne vorkommende Isoflavon (8).

Aufgrund des glykosidischen Anteils ist Daidzin nur schwer absorbierbar. Deshalb setzen Glukosidasen aus der Bürstensaummukosa im Verdauungstrakt und auch Glukosidasen bakteriellen Ursprungs zunächst das Aglykon Daidzein frei, um die Bioverfügbarkeit zu erhöhen. Nach Durchlaufen des enterohepatischen Kreislaufs entsteht Dihydrodadzein als Intermediat, das im Dickdarm schließlich durch verschiedene Reduktasen (9) von Darmbakterien in Equol umgewandelt wird. Als Nebenprodukt entsteht auch O-Desmethylangolesin (O-DMA), von dem aber keine biologische Aktivität bekannt ist. Aufgrund des chiralen Zentrums am C3 (siehe Abbildung 3) gibt es 2 Enantiomere von Equol; die humane Darmflora stellt natürlicherweise nur S-(-)-Equol her (8–10).

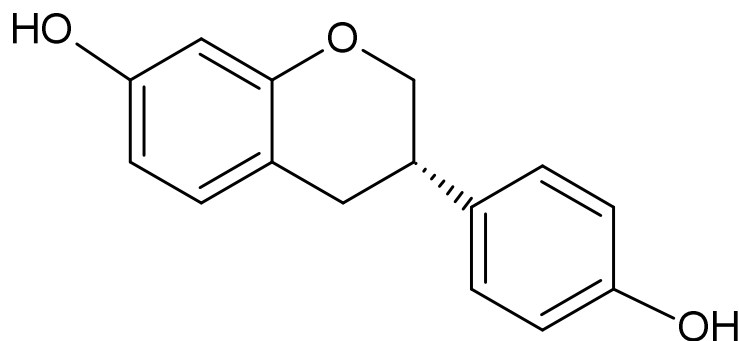


Abbildung 3: Struktur von S-Equol (eigene Abbildung)

Es wird ausgeschlossen, dass nur ein bestimmtes Bakterium Equol produziert, sondern man geht davon aus, dass eine Vielzahl von Bakterienstämmen daran beteiligt sind. Dazu gehören u.a. verschiedene Stämme von *Escherichia*, *Clostridium*, *Egerthella*, *Adlercruetzia*, *Asaccharobacter* und *Lactococcus* (10). Viele dieser Bakterienstämme gehören zur Familie der *Coriobacteria* (9).

Man konnte beobachten, dass nicht alle gesunde Erwachsene Equol überhaupt oder im gleichen Ausmaß produzieren, was zu der Unterscheidung von sogenannten „equol-producers“ und „non-producers“ führte. In den westlichen Industriestaaten ist der Anteil der „equol-producers“ mit 25 – 30% wesentlich geringer als in asiatischen Ländern, wo Soja und Sojaprodukte in der Ernährung eine größere Rolle spielen, mit 50 – 60%. Auch bei Vegetariern

liegt der Anteil an „equol – producer“ in diesem Bereich (8,10). Warum diese Unterschiede so signifikant sind, lässt sich nicht mit Sicherheit sagen. Eine unterschiedliche Zusammensetzung der Darmflora oder schon die vermehrte Aufnahme der Aglyka, wie sie in den meisten verarbeiteten Sojaprodukten vorkommen, könnte dazu beitragen (10).

Equol zeigt nicht nur eine höhere Affinität zum Estrogen-Rezeptor ER β als seine Vorstufe Daidzein, sondern auch eine längere Verweildauer im Körper und zählt zu den potentesten Isoflavonen (8–12). Equol zeigt estrogene, anti-estrogene und auch antioxidative Eigenschaften (10). Hedlund et. al konnten zeigen, dass Equol sowohl in gutartigen Prostataepithelzellen als auch in verschiedenen malignen Prostatazelllinien antiproliferative Effekte hat und zu einem Arrest des Zellzyklus in G0/G1 führt (12). Auch auf Magenkrebszellen hat Equol einen zeit- und dosisabhängigen Effekt. Es hemmt die Zellviabilität und induziert Apoptose und das Akkumulieren der Zellen in der G0/G1-Phase des Zellzyklus (11,13).

1.3. Enterolakton

Lignane sind Phytoöstrogene, die in einer Vielzahl von Lebensmitteln vorkommen. Besonders reich an Secoisolariciresinol-diglykosid (SDG), dem Vorläufer von Enterolakton, sind Leinsamen (14), neben Vollkornprodukten, Hülsenfrüchten, Obst, Gemüse und Wein (15). Nach der Nahrungsaufnahme wird SDG zunächst in sein Aglykon Secoisolariciresinol (SECO) deglykosyliert, um im Dickdarm von verschiedenen Bakterienstämmen in die Enterolignane Enterolakton und Enterodiol umgewandelt zu werden. Nicht nur SDG, sondern auch andere Lignane wie Lariciresinol, Pinoresinol und Matairesinol können direkt oder über Zwischenschritte in Enterolakton überführt werden, SDG ist aber das am meisten vorkommende pflanzliche Lignan (15,16).

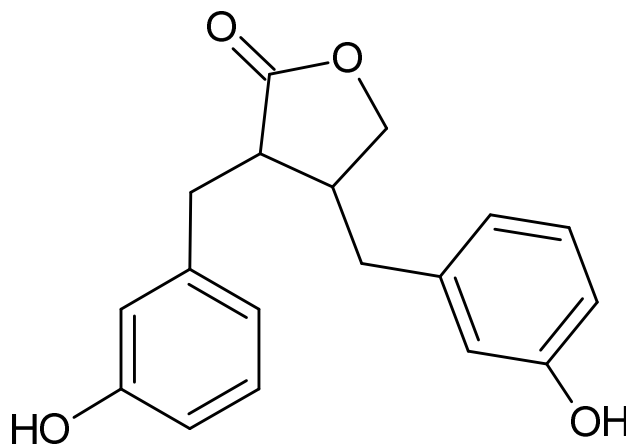


Abbildung 4: Struktur von Enterolakton (eigene Abbildung)

Um Enterolakton freizusetzen, ist ein ganzes Netzwerk an verschiedenen Bakteriengattungen notwendig einschließlich *Bacteroides*, *Clostridium*, *Eubacterium*, *Eggerthella lenta* und vielen anderen (15). Da die Zusammensetzung und Dichte der Mikrobiota von persönlichem Lebensstil (15), Alter (17), Geschlecht (16) und anderen Faktoren abhängt, kann es große individuelle Unterschiede in der Produktion von Enterolakton geben.

Enterolakton kann direkt über die Enterozyten aufgenommen werden oder es durchläuft den enterohepatischen Kreislauf und wird in Phase II glucuronidiert und sulfatiert und dann wiederum über die Galle sezerniert (14).

Enterolakton scheint einige positive Auswirkungen auf den Wirt zu haben. Unter anderem werden ihm antioxidative, estrogene sowie anti-estrogene (17) und entzündungshemmende Eigenschaften zugesprochen. Außerdem gibt es Hinweise, dass Enterolakton Angiogenese

und Metastasierung reduzieren kann (14,15). In Tiermodellen konnten bei Darm-, Lungen-, und Brustkrebs protektive Effekte beobachtet werden (14,15). In klinischen Studien kam man zu widersprüchlich Ergebnissen v.a. bei hormon-abhängigen Tumoren. Epidemiologischen Studien zufolge korrelieren hohe Enterolakton-Konzentrationen aber mit einem verringerten Krebsrisiko (15).

Aufgrund seiner strukturellen Ähnlichkeit mit endogenem Estrogen (siehe Abbildung 4) und den Einfluss auf das hormonelle System, sollten Schwangere, Stillende sowie Kinder vom übermäßigen Konsum von Leinsamen absehen (14).

1.4. Kolonkrebs

Zum Begriff Kolonkrebs werden Tumore in Dickdarm (Kolon) und Mastdarm (Rektum) gezählt. Als Synonyme werden kolorektales Karzinom (KRK) bzw. colorectal cancer (CRC) im englischsprachigen Raum verwendet. Tumore, die im Dünndarm auftreten, gehören nicht zu dieser Gruppe (18,19).

Kolonkrebs bzw. kolorektale Karzinome zählen zu den dritthäufigsten Tumorerkrankungen weltweit (20); die Inzidenz steigt ab dem 50. Lebensjahr stark (18). Pro Jahr erkranken ca. 40 000 Menschen in Österreich an malignen Tumoren, Kolonkrebs steht dabei an dritter Stelle, sowohl bei Männern (11% im Jahr 2017) als auch bei Frauen (10% im Jahr 2017)(21). Bei zwei Drittel der Patienten lässt sich der Tumor im Kolon lokalisieren, der restliche Anteil verteilt sich auf Tumore im Enddarm, den Übergang von Dick- und Enddarm bzw. den Analkanal (22). Die Prognose hängt vor allem von einer frühzeitigen Diagnose ab, da sich die meisten Karzinome aus gutartigen Polypen entwickeln (18).

1.4.1. Risikofaktoren

Zu den Hauptrisikofaktoren gehören eine familiäre Prädisposition und Fehl- bzw. Überernährung. Daneben zählen ein Mangel an Bewegung und v.a. abdominelles Übergewicht, sowie übermäßiger Nikotin- und Alkoholkonsum zu den Risikofaktoren, die vermieden werden sollten. Laut der S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom kann das Risiko durch regelmäßige sportliche Betätigung um bis zu 30% gesenkt werden (23).

Zu den nicht veränderbaren Risikofaktoren zählen das Alter und das Geschlecht. Die meisten Patienten sind über 50 Jahre alt, wobei mittlerweile eine Tendenz zum Auftreten in jüngeren Jahren besteht. Bezüglich des Geschlechtes kann man sagen, dass Männer häufiger betroffen sind als Frauen (18). Auch chronisch-entzündliche Darmerkrankungen wie Morbus Crohn und Colitis ulcerosa erhöhen das Karzinom-Risiko erheblich (23).

1.4.1.1. Risikofaktor familiäre Prädisposition

Das sporadisch auftretende kolorektale Karzinom entwickelt sich meist aufgrund einer genetischen Instabilität, in Kombination mit Umwelt- und Lebensstilfaktoren. Zwei Drittel aller

Fälle fallen in dieses Krankheitsbild. Mikrosatelliteninstabilität (MSI) und bestimmte Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNP) sind häufig mit erhöhter Tumorgenese assoziiert (24).

Bei 10 – 30% der Patienten liegt jedoch eine familiäre Prädisposition vor (20,25), ohne dass eine konkrete genetische Ursache bekannt ist (23). Verwandte ersten Grades haben ein 2- bis 3-fach höheres Risiko, das sich noch steigert, wenn mehrere Verwandte und dabei jene unter 60 Jahren betroffen sind (23).

Mutationen in der Keimbahn, tragen etwa zu 5% zu diesem Krankheitsbild bei (20,23). Dazu zählt das hereditäre kolorektale Karzinom ohne Polyposis (HNPCC), auch Lynch-Syndrom genannt, bei dem es u.a. zu Mutationen im MLH1-Gen oder MSH2-Gen kommt, die für DNS-Mismatch-Reparaturproteine kodieren (20,25,26). Adenomatöse Syndrome wie die familiäre adenomatöse Polyposis (FAP) oder die MUTYH-assoziiierter Polyposis (MAP), die mit einer zahlreichen Polypen-Bildung einhergehen, sind mit Mutationen im APC-Gen, einem Tumorsuppressorgen, bzw. im MUTYH-Gen assoziiert (20,23). Das MUTYH-Gen kodiert für eine Glycosylase, die ebenfalls bei DNS-Reparaturmechanismen von Bedeutung ist (27).

1.4.1.2. Risikofaktor Ernährung

Überernährung bzw. Fehlernährung kann das Risiko, einen Darmtumor zu entwickeln erheblich steigern. Nicht umsonst wird Darmkrebs am häufigsten mit einer falschen Ernährungsweise assoziiert. Hauptrisikofaktoren sind zu hoher Konsum von rotem bzw. stark verarbeiteten Fleisch und gesättigten Fettsäuren, eine positive Energiebilanz und zu geringer Konsum von frischem Gemüse und Ballaststoffen (28,29).

Beim Fleischkonsum kommt es vor allem darauf an, wie das Fleisch verarbeitet wird. Die Entstehung von Karzinogenen, wie z.B. polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen, durch zu starkes Erhitzen sollte vermieden werden. Durch einen hohen Fleischkonsum steigt auch die Eisenkonzentration im Darm. Diese könnte durch Radikalbildung ebenfalls zur Karzinogenese beitragen. Zu hoher Konsum von gesättigten Fettsäuren führt zu Veränderungen von sekundären Gallensäuren im Darm, die als Tumorpromotoren wirken können. Omega-3- und Omega-9-Fettsäuren scheinen eine vorbeugende Rolle in der Tumorentstehung zu spielen. Daher kann man sagen, dass vor allem die Zusammensetzung der Nahrungsfette eine Rolle spielt und nicht nur die Gesamtzufuhr (28).

Überernährung und eine positive Energiebilanz, beides Merkmale der „western style diet“, stellen ebenfalls Risikofaktoren dar. In Tierstudien konnte gezeigt werden, dass das

Krebsrisiko weniger von einem hohen Fettkonsum, als mehr von der gesamten Kalorienaufnahme abhängt (28).

In einer ausgewogenen Ernährungsweise dürfen ausreichend Ballaststoffe nicht fehlen. Deren Aufgabe ist es, sekundäre Gallensäuren und andere Karzinogene zu binden und auszuscheiden. Andere positive Nebeneffekte sind ein größeres Stuhlvolumen und eine verkürzte Darmpassage, die die Verweildauer von schädlichen Substanzen verkürzt. Verschiedene Ernährungsgesellschaften empfehlen eine Ballaststoff-Zufuhr von 30 g/Tag für Erwachsene (23,28–31).

Neben Vermeiden der Risikofaktoren sollten asymptomatische Personen ab einem Alter von 50 Jahren regelmäßig Vorsorgeuntersuchungen in Anspruch nehmen, wobei hier die endoskopischen Verfahren, wie die Koloskopie, empfohlen werden. Patienten mit familiärer Prädisposition sollten entsprechend früher regelmäßige Kontrollen durchführen lassen (23).

Die Inzidenz für Kolonkrebs ist im asiatischen Raum bedeutend geringer als in westlichen Industriestaaten, was oft auf eine polyphenolreiche Ernährung zurückgeführt wird (32), obwohl es in den letzten Jahren zu einer Trendumkehr kam – vermutlich durch die Adaption des westlichen Lebensstils (33,34). Im asiatischen Raum werden durchschnittlich bis zu 40 mg Isoflavonoide/ Tag durch Soja-Produkte aufgenommen (35), während in den USA nur bis zu 3 mg/ Tag konsumiert werden (36). Polyphenole sind aber schlecht bioverfügbar, da sie meist als Glykosid in der Pflanze vorliegen. Erst nach der Abspaltung des Zuckers, kann das Aglykon absorbiert und metabolisiert werden (35). Es liegt also nahe, dass nicht die Ausgangsubstanzen, sondern ihre Metaboliten für die biologische Wirkung verantwortlich sind.

Da Polyphenole unzählige pflanzliche Verbindungen einschließen, habe ich mich auf 3 Metaboliten aus verschiedenen Klassen der Polyphenole konzentriert. Das Isoflavon Daidzin kommt vor allem in der Sojabohne (*Glycine max*) und wird individuell unterschiedlich in Equol umgewandelt (9). Urolithine sind Metaboliten von Ellagttanninen, die zu den hydrolysierbaren Tanninen zählen (1). Lignane wie Secoisolariciresinol (SECO) werden zu Enterolakton bzw. Enterodiol metabolisiert (16).

1.5. Warburg Effekt

Während gesunde und differenzierte Zellen den Hauptanteil ihres Energiebedarfs durch oxidative Phosphorylierung, also maximale Produktion von Adenosintriphosphat (ATP) in den Mitochondrien (37), decken, kann man bei vielen Tumorzellen aerobe Glykolyse als Hauptquelle der Energiegewinnung beobachten. Das bei der Glykolyse gebildete Pyruvat wird, auch bei ausreichendem Sauerstoffangebot, nicht in die Mitochondrien eingeschleust, sondern zu Laktat reduziert (38,39). Diese Verschiebung des Metabolismus wird nach seinem Entdecker, Otto Warburg, Warburg Effekt genannt (39,40).

Gesunde Säugetierzellen nehmen Nährstoffe erst nach Stimulation durch Wachstumsfaktoren auf. Entartete Zellen können durch Mutationen in den entsprechenden Genen unabhängig von Wachstumsfaktoren Nährstoffe aufnehmen. Bereits 1924 konnte Otto Warburg beobachten, dass Krebszellen Glukose in verstärktem Ausmaß aufnehmen und besonders viel Laktat produzieren. Dies wurde später als Warburg Effekt bezeichnet. Warburg ging davon aus, dass die Zellen, aufgrund von funktionsuntüchtigen Mitochondrien, auf eine alternative Energiegewinnung angewiesen ist. Heute wissen wir, dass dies nicht der Fall sein muss. Tumorzellen betreiben unabhängig vom Sauerstoffangebot aerobe Glykolyse und produzieren zum Großteil Laktat, während auch oxidative Phosphorylierung ungehindert stattfinden kann (39,41,42).

Diese Umstellung des Metabolismus bringt einige Vorteile für den Tumor. Einerseits ist die ATP-Ausbeute der Glykolyse zwar geringer, durch die erhöhte Glykolyserate kann aber schneller ATP bereitgestellt werden als durch oxidative Phosphorylierung. Glukose und Glykolyse liefern zudem den Kohlenstoff für Intermediate, die für die de-novo-Synthese von Nukleotiden, Lipiden und Proteinen benötigt werden, um die erhöhte Zellteilungsrate zu ermöglichen. Aufgrund der erhöhten Laktatproduktion sinkt der pH-Wert im Tumorbereich, was mehrere Vorteile für den Tumor bringt. Durch Azidifizierung und gleichzeitige Verarmung der Tumorumgebung an Glukose wird auch das invasive Wachstum unterstützt, indem u.a. TILs, sogenannte Tumor infiltrating Lymphocytes, und tumor-supprimierende Makrophagen gehemmt werden. Durch den Warburg Effekt entzieht sich der Tumor dem effektiven Angriff durch das körpereigenen Immunsystem. Aerobe Glykolyse verschiebt auch das Redox-Potential der Zelle, was in veränderten NAD(P)H- und ROS-Spiegeln resultiert und weiterfolgend direkt an der Signaltransduktion beteiligt ist. Wachstumsfaktoren spielen dabei eine große Rolle, indem sie die Rate der aeroben Glykolyse direkt steuern können und so das Tumorstadium anregen (42).

Der Warburg Effekt wirft noch viele Fragen auf, trotzdem bleibt ein veränderter Metabolismus ein wichtiges Kennzeichen in der Entstehung und Entwicklung von Tumoren (41).

1.6. Tumorsuppressorgen TP53

Das Gen TP53 bzw. dessen Genprodukt p53 spielt eine wichtige Rolle als Tumorsuppressor und gilt als der „Hüter des Genoms“ (43–46). P53 kontrolliert nicht nur Zellwachstum und Apoptose, sondern kann regulierend in den Zellstoffwechsel eingreifen (44). Mehr als 50% aller humanen Tumore weisen Mutationen in diesem Gen auf (46,47).

Wird eine Zelle großem Stress, wie z.B. Strahlung, Entzug von Nährstoffen, Hypoxie oder DNS-Schäden, ausgesetzt, wird p53 stabilisiert und in der Zelle akkumuliert (43,44,47,48). Im Nukleus bindet es als Transkriptionsfaktor an die DNS und aktiviert eine Vielzahl an Genen, welche Zellzyklus, Apoptose, Differenzierung und DNS-Reparatur regulieren(45,47).

Kommt es zu Schäden an der DNS, stoppt p53 den Zellzyklus in der späten G1-Phase, um Zeit für die Reparatur zu gewinnen. Es bindet an den Promotor von p21, einem CDK-Inhibitor, der schließlich über Hemmung des Cyclin-D-CDK-4-Komplex den Zellzyklus anhält (49). Bei irreparablen Schäden kann p53 über Aktivierung des Bax-Gens Apoptose einleiten und so entartete Zellen rechtzeitig eliminieren (43,49).

Neben seiner Rolle als Tumorsuppressorgen nimmt p53 auch eine wichtige Rolle im zellulären Stoffwechsel ein (44,50).

Durch Regulation von Transkription und Translokation von Glukosetransportern beeinflusst p53 den Glukosestoffwechsel und somit die Entstehung von Diabetes. Darüber hinaus kann p53 die Glukoselevel im Körper positiv wie negativ regulieren. Über sein Zielgen TIGAR (TP53-induced glycolysis and apoptosis regulator) inhibiert p53 u.a. die Glykolyse, indem TIGAR durch seine Phosphataseaktivität den zellulären Gehalt an Fruktose-2,6-biphosphat und damit einen Aktivator der Glykolyse senkt. Über die Expression von SCO2, einer Cytochrom-c-oxidase, fördert p53 die oxidative Phosphorylierung, also die Zellatmung. (51).

Zellen mit niedriger p53 Aktivität weisen damit mehr Glykolyse und weniger Zellatmung auf. Dies ist ein Phänomen, das bei vielen entarteten Zellen zu beobachten ist und mit dem Warburg Effekt zusammenpasst (44).

Im inaktiven Zustand liegt p53 im Zytosol an MDM2 gebunden vor, was die DNS-Bindungsdomäne sterisch blockiert und zudem als Ubiquitinligase p53 für den proteolytischen Abbau markiert. MDM2 ist ein direktes Transkriptionsprodukt von p53 und bildet so eine negative Feedback-Schleife, die in niedrigen basalen Leveln von p53 im Zytosol resultiert (43,44).

Bis heute sind zwölf Isoformen von p53 bekannt, die einerseits durch 2 Promotorregionen im Gen, andererseits durch alternatives Splicing und alternative Translation der mRNA zustande

kommen. Weiters wird p53 durch verschiedene Enzyme posttranslational modifiziert und so in seiner Aktivität beeinflusst. Das komplexe Zusammenspiel von p53 Isoformen und anderen Proteinen ist von der Art des Gewebes, dem Zellstatus und verschiedenen Signalwegen abhängig und trägt zu den vielfältigen Aufgaben von p53 bei. Da p53 als Tetramer aktiv ist, kann es sowohl Homooligomere als auch Heterooligomere zwischen verschiedenen Isoformen ausbilden (45).

TP53 ist in mehr als 50% aller humanen Tumore mutiert, was nicht nur den Verlust als Tumorsuppressor bedeutet. Bei den meisten Mutationen von TP53 handelt es sich um eine Missense-Mutation, die als „gain of function“ bezeichnet werden kann, da sie p53 onkogene Eigenschaften verleiht (45–47). Diese Mutationen treten meistens innerhalb der DNS-Bindungsstelle auf, die für die Funktion als Transkriptionsfaktor maßgebend ist (46).

Tritt eine Mutation in der Keimbahn auf, kann das zum sogenannten Li-Fraumeni-Syndrom führen, bei dem bereits im jugendlichen Alter Tumore in nahezu allen Geweben auftreten (44,46,52).

Zwei weitere Proteine aus der gleichen Familie, p63 und p73, spielen eine wichtige Rolle in Entwicklung und Zelldifferenzierung (43,44).

1.7. Ziele der Arbeit

Ernährung und Gesundheit sind zweifelsohne eng miteinander verknüpft. Vor allem für die Entwicklung von Darmkrebs stellt Fehlernährung ein hohes Risiko dar. Daher rücken polyphenolreiche Lebensmittel, die reich an Ellagttanninen, Lignanen und Isoflavonoiden sind, immer mehr in den Fokus.

Ziel dieser Diplomarbeit war, das wachstumshemmende Potential von mikrobiellen Darmmetaboliten dieser Naturstoffe auf Darmkrebszellen zu untersuchen. Dafür wurde die Zelllinie HCT116 aus einem humanen kolorektalen Karzinom gewählt.

Die Testsubstanzen Urolithin A, S-Equol und Enterolakton sind mikrobielle Darmmetaboliten, deren Vorgänger zu der großen Gruppe der Polyphenole zählen. Es ist bekannt, dass Polyphenole, die in unzähligen pflanzlichen Lebensmitteln reichlich vorhanden sind, positive Eigenschaften besitzen. Da diese Verbindungen aber meist schlecht bioverfügbar sind, stellt sich die Frage, ob deren Metaboliten auch antiproliferative, antioxidative und antiinflammatorische Eigenschaften aufweisen. Zur Beantwortung dieser Fragestellung wurden Viabilität-Assays zur Ermittlung der metabolischen Aktivität und Biomasse durchgeführt. Zusätzlich wurden Zellzyklusuntersuchungen mittels PI-Färbung und FACS-Analyse gemacht.

Des Weiteren sollte der Einfluss der Testsubstanzen auf die antiproliferativen Effekte von Oxaliplatin untersucht werden. Bei Oxaliplatin handelt es sich um ein gängiges Chemotherapeutikum, das in der Standardtherapie des kolorektalen Karzinoms eingesetzt wird. Zu diesem Zweck wurde Oxaliplatin in den Viabilität-Assays mit verschiedenen Konzentrationen der Testsubstanz kombiniert.

Im Rahmen dieser Diplomarbeit sollte ebenfalls der Effekt von Urolithin A auf den zellulären Energiestoffwechsel, hinsichtlich Glykolyse und Zellatmung, untersucht werden. Dies wurde mit dem Phänotyp-Test des Seahorse XF24 Analyzer getestet.

Da das Tumorsuppressorgen TP53 in Darmtumoren oft mutiert ist, wurden sowohl Zellen vom Wildtyp als auch p53 knock-out Zellen in die Untersuchungen miteinbezogen.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Material

2.1.1. Zellkultur und Zellpassage

Tabelle 1: Verwendete Materialien in der Zellkultur

Substanzen und Lösungen	Hersteller/ Firma
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	Lonza Group Ltd. (Basel, Schweiz)
Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS)	Zusammensetzung siehe Tabelle 3
L-Glutamin	Lonza Group Ltd. (Basel, Schweiz)
Streptomycin/ Penicillin	Lonza Group Ltd. (Basel, Schweiz)
Trypsin	Gibco (Lofer, Österreich)
Fetal Bovine Serum (FBS)	Gibco (Lofer, Österreich)
Ethanol 70%	B. Braun (Maria Enzersdorf, Österreich)
Hexaquart plus 1%	B. Braun (Maria Enzersdorf, Österreich)
Gerät	Bezeichnung
Werkbank	Herasafe™ Biological Safety Cabinets
Inkubator	Hera Cell 150 Incubator
Mikroskop	Light Microscope Olympus CKX 31
Wasserbad	Julabo® SW23
Zell-Counter	Vi-Cell™ XR Cell Viability Analyzer
Zelllinie	Quelle
HCT116 Wildtyp	Bert Vogelstein, Johns Hopkins University, USA
HCT116 p53 knock-out	Bert Vogelstein, Johns Hopkins University, USA. T

Tabelle 2: Zusammensetzung Wachstumsmedium

Wachstumsmedium	Menge
DMEM	500 ml
FBS	50 ml
Streptomycin/ Penicillin 10 mg/ml	5 ml
L-Glutamin 200 mM	5 ml

Tabelle 3: Zusammensetzung PBS-Lösung

PBS-Lösung	Menge
MgCl ₂ ·6 H ₂ O	0,10 g
KH ₂ PO ₄	0,20 g
NaCl	8,0 g
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	0,10 g
KCl	0,20 g
Na ₂ HPO ₄	1,15 g
ddH ₂ O	auf 1 l

2.1.2. Resazurin und Kristallviolett Assay

Tabelle 4: Verwendetes Material beim Resazurin Assay

Substanzen/ Lösungen	Hersteller/ Firma
Wachstumsmedium	Zusammensetzung siehe Tabelle 2
PBS-Lösung	Zusammensetzung siehe Tabelle 3
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma Aldrich (Wien, Österreich)
Urolithin A	Santa Cruz (Dallas, USA)
S-Equol	Santa Cruz (Dallas, USA)
Enterolakton	Sigma Aldrich (Wien, Österreich)
Oxaliplatin	Sigma Aldrich (Wien, Österreich)
Resazurin-Natrium-Salz	Sigma Aldrich (Wien, Österreich)
Gerät	Bezeichnung
Werkbank	Herasafe™ Biological Safety Cabinets
Inkubator	Hera Cell 150 Incubator
Mikroskop	Light Microscope Olympus CKX 31
Wasserbad	Julabo® SW23
Mikroplatten-Leser	Tecan Spark™
Zelllinie	Quelle
HCT116 Wildtyp	Bert Vogelstein, Johns Hopkins University, USA
HCT116 p53 knock-out	Bert Vogelstein, Johns Hopkins University, USA. T

Tabelle 5: Zusammensetzung Resazurin-Lösung

Resazurin-Lösung (gebrauchsfertig)	Menge
Resazurin Stocklösung 100µg/mL	1,5 ml
• 1 mg Resazurin in 10 ml PBS	
DMEM Medium ohne FBS	13,5 ml

Tabelle 6: Verwendetes Material beim Kristallviolett Assay

Substanzen/ Lösungen	Hersteller/ Firma
PBS-Lösung	Zusammensetzung siehe Tabelle 3
Kristallviolett	Sigma Aldrich (Wien, Österreich)
Natriumcitrat	Sigma Aldrich (Wien, Österreich)
Ethanol	B. Braun (Maria Enzersdorf, Österreich)
Methanol	B. Braun (Maria Enzersdorf, Österreich)
Gerät	Bezeichnung
Mikroplatten-Leser	Tecan Sunrise™
Zelllinie	Quelle
HCT116 Wildtyp	Bert Vogelstein, Johns Hopkins University, USA
HCT116 p53 knock-out	Bert Vogelstein, Johns Hopkins University, USA. T

Tabelle 7: Zusammensetzung Kristallviolett-Lösung

Kristallviolett-Lösung (gebrauchsfertig)	Konzentration
Kristallviolett	0,5 %
Methanol	20 %
in ddH ₂ O	

2.1.3. Durchflusszytometrie/ FACS-Analyse

Tabelle 8: Verwendetes Material in der Durchflusszytometrie

Lösungen/ Substanzen	Hersteller/ Firma
Wachstumsmedium	Zusammensetzung siehe Tabelle 2
PBS-Lösung	Zusammensetzung siehe Tabelle 3
Accutase	Gibco (Lofer, Österreich)

DMSO	Sigma Aldrich (Wien, Österreich)
Urolithin A	Santa Cruz (Dallas, USA)
Oxaliplatin	Sigma Aldrich (Wien, Österreich)
Propidiumiodid-Lösung • Propidiumiodid (PI) • Triton X-100 • Natriumcitrat	Zusammensetzung siehe Tabelle 9 Sigma Aldrich (Wien, Österreich) Sigma Aldrich (Wien, Österreich) Sigma Aldrich (Wien, Österreich)
Gerät	Bezeichnung
Werkbank	Herasafe™ Biological Safety Cabinets
Inkubator	Hera Cell 150 Incubator
Zentrifuge	Heraeus™ Multifuge™ 1 S-R
Durchflusszytometer	FACSCalibur™
Zelllinie	Quelle
HCT116 Wildtyp	Bert Vogelstein, Johns Hopkins University, USA

Tabelle 9: Zusammensetzung Propidiumiodid-Lösung

Propidiumiodid-Lösung (gebrauchsfertig)	Konzentration
Propidiumiodid	50 µg/ml
Triton X-100	0,1 %
Natriumcitrat	0,1 %
in ddH ₂ O	

2.1.4. Seahorse-Assay zur Ermittlung des metabolischen Phänotyps

Tabelle 10: Verwendetes Material für den Seahorse-Assay

Substanz	Hersteller/ Firma
DMEM Pulver (ohne Glucose, Glutamin, Pyruvat und NaHCO ₃)	Sigma Aldrich (Wien Österreich)
NaCl	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Phenolrot	Sigma Aldrich (Wien, Österreich)
α-D-Glucose 96% wasserfrei	Sigma Aldrich (Wien, Österreich)
Pyruvat	Sigma Adrich (Wien, Österreich)
NaOH	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)

Seahorse Calibration Solution	Agilent Technologies (Santa Clara, USA)
Oligomycin	Agilent Technologies (Santa Clara, USA)
FCCP	Agilent Technologies (Santa Clara, USA)
Rotenon/ Antimycin A	Agilent Technologies (Santa Clara, USA)
Corning CellTak	VWR (Wien, Österreich)
Accutase	Sigma Aldrich (Wien, Österreich)
NaHCO ₃	Sigma Aldrich (Wien, Österreich)
Gelatine	Sigma Aldrich (Wien, Österreich)
Kollagen	Sigma Aldrich (Wien, Österreich)
Poly-L-Lysin	Sigma Aldrich (Wien, Österreich)
ddH ₂ O	
Gerät	Bezeichnung
Werkbank	Herasafe™ Biological Safety Cabinets
Inkubator	Hera Cell 150 Incubator
Zentrifuge	Heraeus™ Multifuge™ 1 S-R
Seahorse	Seahorse XFe24 Analyzer • XF24 Well Kulturplatten • XFe24 extrazellulärer Flux Test Kit • Labnet Mini Incubator
pH-Meter	HI2210 pH Meter
Zelllinie	Quelle
HCT116 Wildtyp	Bert Vogelstein, Johns Hopkins University, USA
HCT 116 p53 knock-out	Bert Vogelstein, Johns Hopkins University, USA

Tabelle 11: Zusammensetzung CellTak-Beschichtung

CellTak Beschichtung	Menge
CellTak	28 µl
1 N NaOH	14 µl
0,1 N NaHCO ₃	1,5 ml

Tabelle 12: Zusammensetzung Seahorse Basalmedium

Seahorse Basalmedium	Menge
DMEM in Pulverform	8,3g
ddH ₂ O	1 l
Phenolrot	3 ml
NaCl	3,7 g

Tabelle 13: Zusammensetzung Seahorse Assay Medium

Seahorse Assay Medium	Menge
Seahorse Basalmedium	100 ml
Glukose	180 mg
Pyruvat	11 mg
Glutaminlösung (200 mM)	2 ml

2.2. Methoden

2.2.1. Zellkultur und Zellpassage

Es wurde mit der humanen Zelllinie HCT116, Wildtyp (WT) sowie p53 knock-out (k.o.), gearbeitet. Dabei handelt es sich um epitheliale Zellen aus einem humanen Kolonkarzinom, die ein adhärentes Wachstum aufweisen und für diese Arbeit in DMEM / 10% Serum kultiviert wurden.

2.2.1.1. Durchführung der Zellpassage

Die Zellpassage erfolgte in einer Steril-Werkbank mit sterilen Materialien. Um eine Kontamination zu vermeiden, wurden sowohl die Werkbank, als auch alle Materialien und Gegenstände vor dem Einbringen mit 70%igem Ethanol desinfiziert. Das Passagieren erfolgte üblicherweise alle 2-3 Tage, also Montag, Mittwoch und Freitag. Zuerst wurden phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS), Trypsin und das Wachstumsmedium im Wasserbad auf 37°C erwärmt. Vor dem Passagieren wurden die Zellen mikroskopisch auf Kontaminationen oder Abnormalitäten untersucht. Nach Absaugen des alten Mediums wurden die Zellen mit 10 ml PBS gewaschen. Um die adhärenen Zellen von der Zellkulturflasche und aus dem Verband zu lösen, wurden 4 ml Trypsin aufgetragen und nach kurzem Schwenken ungefähr 3 Minuten im Brutschrank inkubiert. Zur Kontrolle wurden die Zellen nochmal unter dem Mikroskop untersucht. Daraufhin wurden 10 ml frisches Wachstumsmedium hinzugefügt und durch mehrmaliges Auf- und Abziehen in der Pipette die Zellen resuspendiert. Die Zellzahl sowie Zellviabilität wurden mit dem ViCell™ bestimmt und die gewünschte Menge an Zellsuspension in eine frische sterile Zellkulturflasche mit 15 ml Wachstumsmedium übergeführt. Nach neuerlicher Kontrolle unter dem Mikroskop wurde die Flasche bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Während montags und mittwochs jeweils 3×10^6 Zellen ausgesät wurden, wurden freitags nur $1,5 \times 10^6$ Zellen ausgesät, um eine Überwucherung übers Wochenende zu vermeiden.

2.2.2. Viabilität-Assays

2.2.2.1. Ermittlung der metabolischen Aktivität mittels Resazurin Assay

Resazurin oder *7-Hydroxy-3H-phenoxazin-3-on-10-oxid* ist ein blauer nicht-fluoreszierender Farbstoff, der zur Messung der metabolischen Aktivität und damit Zellviabilität und Wachstum von Säugetierzellen verwendet wird. Metabolisch aktive Zellen können durch Dehydrogenasen Resazurin zu Resorufin reduzieren. Die Umwandlung ist mit freiem Auge erkennbar und kann photometrisch oder fluorimetrisch quantifiziert werden. Resorufin ist ein pinker, fluoreszierender Farbstoff, der bei 535 nm angeregt und bei 590 nm detektiert werden kann.

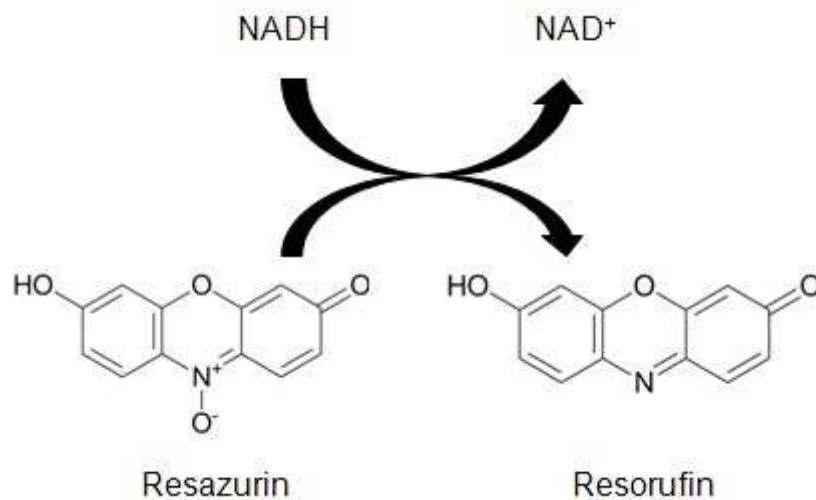


Abbildung 5: Reduktion von Resazurin zu Resorufin in lebenden Zellen (53)

2.2.2.1.1. Durchführung des Resazurin Assays

Die Darmkrebszellen, sowohl Wildtyp als auch p53 knock-out, wurden in 96-Well-Platten mit der gewünschten Zahl an Zellen (nach Optimierung 10 000) in 100 µl Wachstumsmedium pro Well ausgesät. Nach 24 Stunden wurden die Zellen mit verschiedenen Konzentrationen der zu testenden Substanzen und 0,1% DMSO in Wachstumsmedium als Kontrolle im Inkubator bei 37°C und 5 % CO₂ behandelt. Nach je 24, 48 und 72 Stunden wurde das Medium abgesaugt, 1-mal mit PBS gewaschen und 150 µl Resazurin-Lösung (10 µg/ml) aufgetragen. Nach 1, 2 und 3 Stunden wurde die Fluoreszenz bei 535 nm/ 590 nm im Tecan Spark™ vermessen.

2.2.2.1.1.1. Durchführung im Zuge der Zellzahloptimierung

Um die geeignete Zellzahl zu ermitteln, wurde der Resazurin Assay zunächst in verschiedenen Zellzahlen mit HCT116 WT Zellen durchgeführt. Als Kontrolle wurde 0,1% DMSO und als Testsubstanzen Urolithin A und Enterolakton in einer Konzentration von jeweils 40 µM verwendet siehe Tabelle 14 und Tabelle 15.

Tabelle 14: Pipettierschema I zur Zellzahloptimierung HCT116 WT; blau: leer; gelb 5 000 Zellen/Well; grün: 10 000 Zellen/Well; orange: 20 000 Zellen/Well; Spalte 2,5,8: 0,1% DMSO, Spalte 3,6,9: 40 µM Urolithin A (UroA), Spalte 4,7,10: 40 µM Enterolakton (EL)

		DMSO	UroA	EL	DMSO	UroA	EL	DMSO	UroA	EL		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												
	leer	5 000 Zellen/ Well			10 000 Zellen/ Well			20 000 Zellen/ Well			leer	

Tabelle 15: Pipettierschema II zur Zellzahloptimierung HCT116 WT; blau: leer; gelb 5 000 Zellen/Well; grün: 7 500 Zellen/Well; orange: 10 000 Zellen/Well; Spalte 2,5,8: 0,1% DMSO, Spalte 3,6,9: 40 µM Urolithin A (UroA), Spalte 4,7,10: 40 µM Enterolakton (EL)

		DMSO	UroA	EL	DMSO	UroA	EL	DMSO	UroA	EL		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												
	leer	5 000 Zellen/ Well			7 500 Zellen/ Well			10 000 Zellen/ Well			leer	

2.2.2.1.1.2. Einfluss verschiedener Konzentrationen von Urolithin A und S-Equol auf HCT116 WT Zellen

Um den direkten Effekt von Urolithin A und S-Equol auf HCT116 WT Zellen zu beobachten, wurden die Zellen mit jeweils einer Verdünnungsreihe der Testsubstanzen behandelt. Die Substanzen wurden laut Pipettierschema in Tabelle 16 aufgetragen. Urolithin A wurde in Konzentrationen von 5 – 40 µM aufgetragen. Bei S-Equol wurden zunächst die gleichen Konzentrationen genommen, bei der Wiederholung wurde die letzte Konzentration auf 80 µM erhöht.

Tabelle 16: Pipettierschema Einfluss unterschiedlicher Konzentrationen von UroA und S-Equol in HCT116 WT: blau: leer; gelb: 10 000 Zellen/well; Spalte 2,7: 0,1% DMSO, Spalten 3-6: Urolithin A in verschiedenen Konzentrationen; Spalten 8-11: S-Equol in verschiedenen Konzentrationen

		DMSO	Urolithin A µM				DMSO	S-Equol µM				
		0,1%	5	10	20	40	0,1%	5	10	20	40/80	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												
	leer	10 000 Zellen/ Well										leer

2.2.2.1.1.3. Kombinationswirkung von Oxaliplatin mit Enterolakton, S-Equol und Urolithin A in HCT116 WT Zellen

Um den Einfluss von Enterolakton, S-Equol und Urolithin A auf die Wirkung des Zytostatikums Oxaliplatin zu untersuchen, wurde folgende Resazurin Assays durchgeführt, siehe Tabelle 17 bis Tabelle 20. Für Oxaliplatin wurden Konzentrationen von 1,25 µM bis 10 µM gewählt, die alleine oder in Kombination mit den verschiedenen Testsubstanzen, auf die Zellen aufgetragen wurden. Enterolakton wurde nur in einer Konzentration von 20 µM getestet, während S-Equol in 5 µM, 20 µM und 80 µM und Urolithin A in 5 µM, 15 µM und 40 µM mit Oxaliplatin kombiniert wurden. Als Kontrolle wurde 0,1 % DMSO eingesetzt.

Bei Oxaliplatin handelt es sich um Platin-Analogen, das zur chemotherapeutischen Behandlung von Darmkrebs eingesetzt wird. Es bildet inter- und intramolekulare

Quervernetzung der DNS-Stränge und unterbricht Replikation und Transkription, worauf die Zelle den programmierten Zelltod einleitet (54).

Tabelle 17: Pipettierschema Kombinationswirkung Enterolakton mit Oxaliplatin in HCT116 WT: blau: leer; gelb: 10 000 Zellen/well; Spalte 2,7: 0,1% DMSO, Spalten 3-6: Oxaliplatin in verschiedenen Konzentrationen; Spalten 8-11: Oxaliplatin mit 20 µM Enterolakton

		DMSO	Oxaliplatin µM				DMSO	Oxaliplatin µM + 20 µM EL				
		0,1%	1,25	2,5	5	10	0,1%	1,25	2,5	5	10	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												
	leer	10 000 Zellen/ Well										leer

Tabelle 18: Pipettierschema Kombinationswirkung S-Equol mit Oxaliplatin in HCT116 WT: blau: leer; gelb: 10 000 Zellen/well; Spalte 2,7: 0,1% DMSO, Spalten 3-6: Oxaliplatin in verschiedenen Konzentrationen; Spalten 8-11: Oxaliplatin mit 20 µM Equol

		DMSO	Oxaliplatin µM				DMSO	Oxaliplatin µM + 20 µM S-Equol				
		0,1%	1,25	2,5	5	10	0,1%	1,25	2,5	5	10	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												
	leer	10 000 Zellen/ Well										leer

Tabelle 19: Pipettierschema Kombinationswirkung S-Equol mit Oxaliplatin in HCT116 WT: blau: leer; gelb: 10 000 Zellen/well; Spalte 2,7: 0,1% DMSO, Spalten 3-6,8-11: Oxaliplatin in verschiedenen Konzentrationen; 5 μ M S-Equol, 20 μ M S-Equol, 80 μ M S-Equol

		DMSO	Oxaliplatin μ M				DMSO	Oxaliplatin μ M				
		0,1%	1,25	2,5	5	10	0,1%	1,25	2,5	5	10	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												
	leer	10 000 Zellen/ Well										leer

Tabelle 20: Pipettierschema Kombinationswirkung Urolithin A mit Oxaliplatin in HCT116 WT: blau: leer; gelb: 10 000 Zellen/well; Spalte 2,7: 0,1% DMSO, Spalten 3-6,8-11: Oxaliplatin in verschiedenen Konzentrationen; 5 μ M UroA, 15 μ M UroA, 40 μ M Urolithin

		DMSO	Oxaliplatin μ M				DMSO	Oxaliplatin μ M				
		0,1%	1,25	2,5	5	10	0,1%	1,25	2,5	5	10	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												
	leer	10 000 Zellen/ Well										leer

2.2.2.1.1.4. Einfluss von Urolithin A und Oxaliplatin in HCT116 WT versus p53 k.o. Zellen

Um den Effekt von Urolithin A auf HCT116 p53 k.o. Zellen zu testen, wurde der Resazurin Assay mit Konzentrationen zwischen 5 μ M und 40 μ M Urolithin A durchgeführt. Zum Vergleich wurden die Zellen mit Oxaliplatin in Konzentrationen zwischen 1,25 μ M und 10 μ M behandelt sowie 0,1 % DMSO als Kontrolle. Es wurden sowohl p53 k.o. Zellen allein, als auch im direkten Vergleich mit WT Zellen auf einer Platte getestet, siehe Tabelle 21 und Tabelle 22.

Tabelle 21: Pipettierschema Einfluss von UroA auf HCT116 p53 k.o. im Vergleich mit Oxaliplatin: blau: leer; gelb: 10 000 Zellen/well; Spalte 2,7: 0,1% DMSO, Spalten 3-6: Oxaliplatin in verschiedenen Konzentrationen; Spalten 8-11: UroA in verschiedenen Konzentrationen

		DMSO	Oxaliplatin μM				DMSO	UroA μM				
		0,1%	1,25	2,5	5	10	0,1%	5	10	20	40	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												
	leer	10 000 Zellen/ Well										leer

Tabelle 22: Pipettierschema Einfluss von UroA und Oxaliplatin auf HCT116 WT und p53 k.o.: blau: leer; gelb: 10 000 Zellen/well; Spalte 2,7: 0,1% DMSO, Spalten 3-6: Oxaliplatin in verschiedenen Konzentrationen; Spalten 8-11: UroA in verschiedenen Konzentrationen; HCT116 WT, HCT116 p53 k.o.

		DMSO	Oxaliplatin μM				DMSO	UroA μM				
		0,1%	1,25	2,5	5	10	0,1%	5	10	20	40	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												
	leer	10 000 Zellen/ Well										leer

2.2.2.2. Bestimmung der Zellmasse mittels Kristallviolett Assays

Bei Kristallviolett handelt es sich um einen Triphenylmethanfarbstoff, der zur Anfärbung und Quantifizierung von Zellen verwendet wird. Während tote Zellen sich aus dem Verband lösen und im Überstand zu finden sind, verbleiben adhärente (vermutlich vitale) Zellen am Boden des Gefäßes und lassen sich durch Färbung von DNS und Proteinen quantifizieren. Somit kann die photometrische Vermessung bei einer Wellenlänge von 595 nm Hinweis auf die Zellproliferation und -lebensfähigkeit nach Substanzbehandlung geben.

2.2.2.2.1. Durchführung des Kristallviolett Assays

Der Kristallviolett Assay wurde anschließend zum Resazurin Assay auf denselben Platten durchgeführt. Die Pipettierschemas entsprechen also jenen des Resazurin Assays (siehe Tabelle 16 bis Tabelle 22). Nach Abkippen der Resazurin-Lösung wurden 100 µL Kristallviolett-Lösung pro Well pipettiert und 5 Minuten stehen gelassen. Nach Waschen mit Wasser und Trocknen der Platten über Nacht, wurde der Farbstoff mit 150 µL einer 0.1M Natriumcitrat/Ethanol-Lösung im Verhältnis 1:1 wieder gelöst und die Absorption bei 595 nm Wellenlänge im Sunrise™ vermessen.

2.2.2.3. Datenauswertung

Die mittlere inhibitorische Konzentration (IC₅₀) wurde mittels Curve Fitting bzw. sigmoidale dose response mit der Graph Pad Prism Software ermittelt und ist als Mittelwert ± Standardabweichung angegeben.

Zur Ermittlung der Kombinationswirkung von Urolithin A bzw. S-Equol mit Oxaliplatin wurde der Kombinationsindex (combinatorial index, CI) mit der Formel nach Chou et al. (55) errechnet (siehe Abbildung 6), wobei *a* und *b* die IC₅₀-Werte in Kombination und *A* und *B* die IC₅₀-Werte der Einzeldosen der Substanzen sind. Ist der Wert des CI ≥1,10 deutet das auf eine antagonistische Wirkung hin, bei einem CI ≤0,90 spricht man von einer synergistischen Wirkung. Im Bereich dazwischen liegt ein additiver Effekt vor.

$$CI = \frac{a}{A} + \frac{b}{B}$$

Abbildung 6: Formel zu Berechnung des Kombinationsindex

2.2.3. Durchflusszytometrie/ FACS Analyse

Bei der Durchflusszytometrie oder Fluorescence Activated Cell Sorter, kurz FACS, handelt es sich um eine laser-basierte Methode, bei der Zellpopulationen analysiert und aufgereinigt werden können. Die Zellen werden dabei in einem dünnen Flüssigkeitsstrahl durch einen Laser gelenkt, der die Zellen einzeln und nacheinander gemäß ihren Streulichteigenschaften und Fluoreszenzeigenschaften analysiert (und gegebenenfalls sortiert). Grundvoraussetzung dafür ist, dass sich die Zellen in einer Einzelzellsuspension befinden und mit einem Fluorochrom markiert sind.

Im Zuge der Lichtstreuung oder light scattering werden zwei Parameter analysiert; das Vorwärtstreulicht oder forward scatter (FSC) und das Seitenstreulicht oder side scatter (SSC). Der FSC hängt dabei von der Zellgröße ab, während beim SSC auch die Granularität einer Zelle erfasst wird. Über die Messung der Fluoreszenz können Zellen zusätzlich in verschiedene Subpopulationen eingeteilt und gegebenenfalls voneinander getrennt werden. In dieser Arbeit wurden mittels Propidiumiodid-Färbung Zellzyklusanalysen an einem Zelltyp (HCT116 WT) durchgeführt.

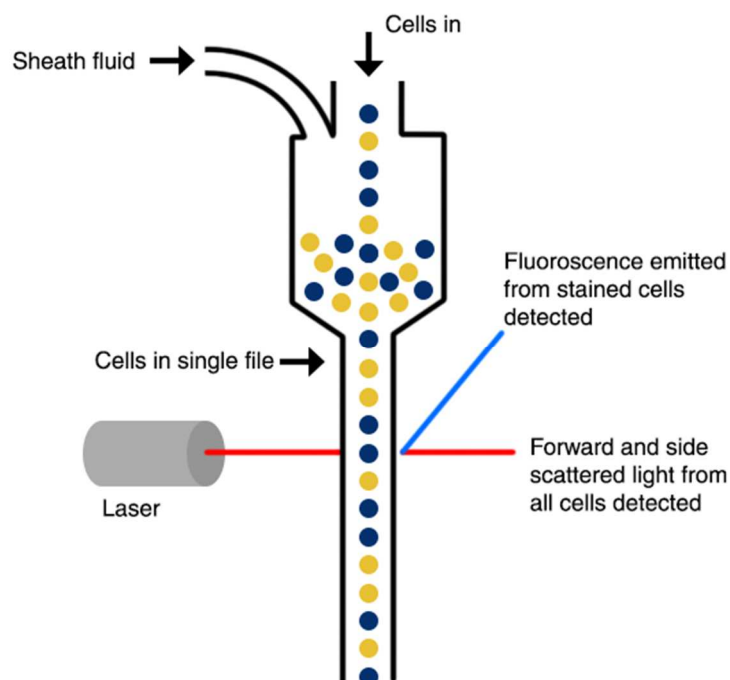


Abbildung 7: Prinzip eines Durchflusszytometers (56)

Die Darstellung der Daten kann in Form eines Histogramms oder eines Dot-Plots erfolgen. Bei der Darstellung in einem Histogramm wird die Häufigkeitsverteilung eines Parameters abgebildet. Dabei wird Intensität (z.B. eines gebundenen Fluoreszenzmarkers) der Anzahl der Zellen gegenübergestellt. Bei dem Dot-Plot handelt es sich um eine zweidimensionale Darstellung, bei der jeder Punkt eine einzelne Zelle darstellt und mittels zweier Parameter charakterisiert wird (z.B. SSC vs. FSC). So kann man Subpopulationen charakterisieren, identifizieren und über eine Kontrolle auch quantifizieren.

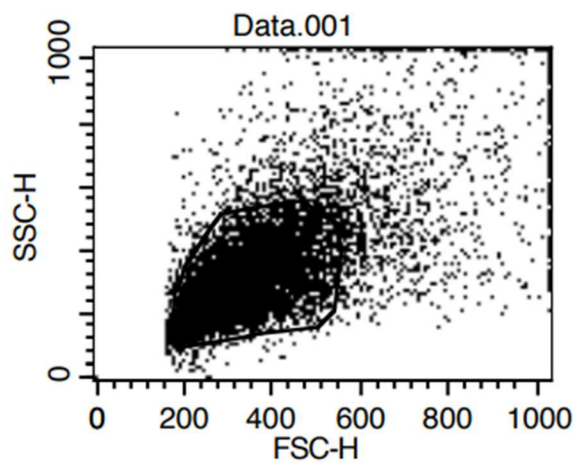


Abbildung 8: Darstellung als Dot-Plot

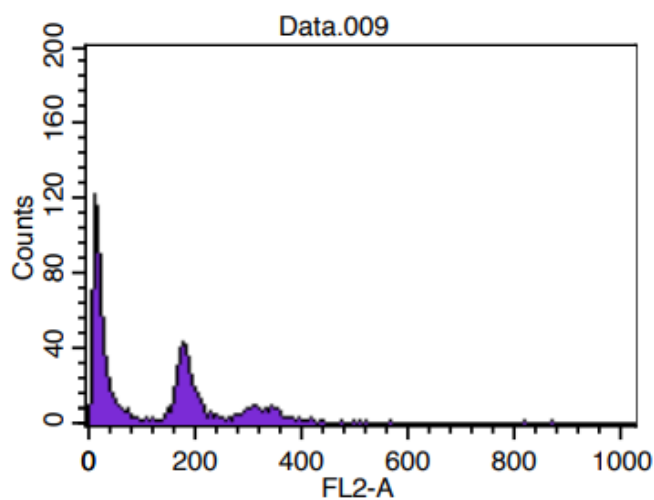


Abbildung 9: Darstellung als Histogramm

2.2.3.1. Zellzyklusanalyse mittels Propidiumiodid-Färbung

Die Zellzyklusanalyse wurde mittels der Propidiumiodid-Färbung durchgeführt. Propidiumiodid (PI) ist ein rot fluoreszierender Farbstoff, der bei 530 nm sein Anregungsmaximum und bei 626 nm sein Emissionmaximum hat. Bei der PI-Färbung wird ein Laser mit einer Wellenlänge von 488 nm verwendet, die Detektion erfolgt im FL-2 Kanal des FACSCalibur. PI schiebt sich zwischen die Basenpaare von DNS und RNS, es handelt sich also um einen interkalierenden Farbstoff. Durch Zugabe von RNasen kann verhindert werden, dass PI sich auch in RNS-Fragmente einlagert und zu falschen oder ungenauen Ergebnissen führt bei der Analyse des zellulären DNS-Gehaltes führt.

Die Intensität der emittierten Fluoreszenz ist direkt proportional zum Gehalt der DNS einer Zelle, wodurch man feststellen kann, in welcher Phase des Zellzyklus eine Zelle sich aktuell befindet. Die DNS wird im Laufe des Zellzyklus verdoppelt, bevor sie in der Mitose auf die Tochterzellen aufgeteilt wird. Daher haben Zellen, die sich in der G2-Phase befinden einen doppelt so hohen DNS-Gehalt wie Zellen, die gerade in der G1-Phase sind, was sich in einem doppelt so hohen Fluoreszenzsignal verdeutlicht. Zellen in der Synthese-Phase liegen in ihrem Fluoreszenzsignal dementsprechend zwischen den zwei G-Phasen-Peaks. DNS-Fragmente aus apoptotischen Zellen bzw. apoptotische Zellen selbst enthalten noch DNS-Reste, die als subG1-Peak im Histogramm erscheinen.

2.2.3.1.1. Durchführung

Zur Zellzyklusanalyse der HCT116 WT Zellen wurden 3 x 6-Well-Platten mit 250 000 Zellen pro Well in 3 ml Wachstumsmedium ausgesät und über Nacht bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert (siehe Tabelle 23). Am darauffolgenden Tag wurde das Medium zunächst abgesaugt und mit frischem Medium plus 0,1% DMSO als Kontrolle, 20 µM bzw. 40 µM Urolithin A und 5 µM bzw. 10 µM Oxaliplatin behandelt. Nach 24, 48 bzw. 72 Stunden wurde jeweils 1 Platte für die Durchflusszytometrie vorbereitet. Dazu wurde das Medium abgenommen und in einem FACS-Röhrchen gesammelt. Nach Waschen der Zellen mit 1 ml PBS, wurden die anhaftenden Zellen mit 1 ml Accutase abgelöst und nach Resuspendieren mit 1 ml Wachstumsmedium zu dem bereits gesammelten Medium ins FACS-Röhrchen überführt. Nach Zentrifugieren in der Heraeus™ Multifuge™ 1 S-R und Verwerfen des Überstandes, wurde nochmal mit 1 ml PBS gewaschen. Die Zellsuspension wurde erneut zentrifugiert und der Überstand verworfen. Dann wurden die Zellen mit 0,5 ml der PI-Färbelösung versetzt. Es wurden alle 3 Platten gemeinsam im Durchflusszytometer FACSCalibur™ vermessen und bis dahin im Kühlraum bei 4°C aufbewahrt.

Tabelle 23: Pipettierschema Durchflusszytometrie; A1 ,B1:0,1% DMSO, A2: Urolithin A 20 μ M, A3: Urolithin A 40 μ M, B2: Oxaliplatin 5 μ M, B3: Oxaliplatin 10 μ M

	1	2	3
A			
B			
	250 000 Zellen/ Well		

2.2.4. Seahorse-Assay zur Bestimmung des metabolischen Phänotyps

Zur Ermittlung der metabolischen Aktivität in HCT116 WT und p53 k.o. Zellen wurde ein Phänotyp-Test mittels Seahorse XFe24 Analysator durchgeführt.

Mitochondriale Respiration und Glykolyse sind die zwei Hauptstoffwechselwege einer Zelle, um deren Energieanforderung gerecht zu werden. Durch enzymatisch kontrollierte Redox- bzw. Oxidationsreaktionen entsteht ATP und es kommt zur Wärmefreisetzung.

Mit dem Seahorse XF Cell Energy Phenotype Test werden die Rate der mitochondrialen Respiration und der Glykolyse sowohl unter basalen/ physiologischen Konditionen als auch unter gestressten Bedingungen gemessen. Daraus kann man auf das metabolische Potential einer Zelle rückschließen, also inwieweit sie, wenn nötig, noch mit einer Anpassung des Energiestoffwechsels reagieren kann.

Es werden zwei Parameter gemessen, aus denen das metabolische Potential resultiert:

- **Oxygen Consumption Rate (OCR):** Der Sauerstoffverbrauch ist ein Indikator für die mitochondriale Respiration, mit erhöhtem Fluss von Elektronen zu O₂ im Rahmen der Zellatmung steigt die OCR an.
- **Extracellular acidification rate (ECAR):** Die Glykolyse mit ihren Endprodukten Pyruvat bzw. Lactat geht mit einer extrazellulären Erhöhung der Protonenkonzentration bzw. einem Abfall des pH-Wertes einher. So kann eine erhöhte ECAR als Messgröße für eine erhöhte Glykolyse-Rate gelten.

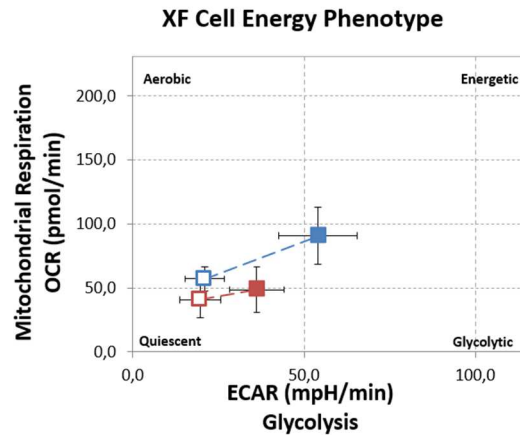


Abbildung 10: Metabolisches Profil des Seahorse Phänotyp Tests

Zu Beginn der Messung werden die Basislinie von OCR und ECAR als Referenz gemessen um den metabolischen Phänotyp unter normalen Bedingungen zu ermitteln. Nach Zugabe von geeigneten Stressoren, erhöhen die Zellen gezwungenermaßen das Ausmaß von Sauerstoffverbrauch und Glykolyse, man erkennt den gestressten Phänotyp. Aus dem prozentuellen Anstieg von OCR und ECAR kann man das metabolische Potential der Zelle ablesen. Es ist also eine Messgröße für die Fähigkeit der Zelle, auf Stress und wenn nötig mit einem veränderten Metabolismus zu reagieren.

Dieser Stress wird in Form von zwei Substanzen zugefügt; Oligomycin und Carbonylcyanid-4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazon (FCCP). Bei Oligomycin handelt es sich um ein Makrolidantibiotikum, das die ATP-Synthase hemmt und so die mitochondriale Respiration hemmt. Um die Energienachfrage aber dennoch zu decken, betreiben die Zellen kompensatorisch mehr Glykolyse zur ATP Gewinnung. FCCP ist ein Entkoppler der Atmungskette, der durch die Dissipation des Protonengradienten an der inneren Mitochondrienmembran den Sauerstoffverbrauch in die Höhe treibt.

2.2.4.1. Durchführung

Der Seahorse Phänotyp-Test wurde mit HCT116-Zellen vom Wildtyp und auch p53 k.o. Zellen durchgeführt. Zunächst wurden die WT Zellen und die p53 k.o. separat mit verschiedenen Konzentrationen FCCP (siehe Tabelle 24 und Tabelle 25) untersucht. Anschließend wurde noch ein Test mit WT und k.o. Zellen auf einer Zellkulturplatte gemeinsam durchgeführt (siehe Tabelle 26).

Die Zellen wurden zuerst in 10 cm Schalen zu 2×10^6 in 10 ml Wachstumsmedium über Nacht im Inkubator bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert und am nächsten Tag mit 0,1% DMSO als Kontrolle und 30 µM Urolithin A in 10 ml Wachstumsmedium behandelt. Am selben Tag wurden die Seahorse Platten beschichtet. Dazu wurde 50 µl pro Well der CellTak-Lösung (siehe Tabelle 11) pipettiert und für 20 Minuten stehen gelassen. Anschließend wurde mit sterilem Wasser gewaschen und für weitere 20 Minuten an der Luft trocken gelassen und dann im Kühlschrank bei 4°C gelagert. Weiters wurde die Kartusche für den Assay mit 1 ml Seahorse Calibration Solution pro Well hydratisiert und über Nacht im Inkubator bei 37°C gelagert.

Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen in die Seahorse Platten zu 100 000 Zellen pro Well in 100 µl Seahorse-Assay Medium ausgesät und auf die beschichtete Platte zentrifugiert. Die Zellen aus den 10 cm Schalen wurden dazu 2-mal mit PBS gewaschen, drei Minuten mit 3 ml Accutase inkubiert, ausgezählt und auf eine Konzentration von 1 Million/ ml eingestellt. Bei der Aussaat wurden die entsprechenden Hintergrund-Wells der Seahorse Platte ausgelassen (Pipettierschema siehe Tabelle 24). Nach der Zentrifugation wurden noch 400 µL Assay Medium zu den Wells pipettiert. Die Platte wurde dann für eine Stunde ohne CO₂ bei 37°C inkubiert.

Tabelle 24: Pipettierschema Seahorse Phänotyp Test HCT116 WT; Spalten 1-3: 0,1% DMSO, Spalten 4-6: 30 µM Urolithin A; Zeilen A, C: 1,0 µM Oligomycin, Zeile B: 0,5 µM FCCP, Zeile D: 1,0 µM FCCP; 100 000 Zellen/Well, leere Wells

	DMSO 0,1 %			UroA 30 µM			
	1	2	3	4	5	6	
A							Oligomycin 1,0 µM
B							FCCP 0,5 µM
C							Oligomycin 1,0 µM
D							FCCP 1,0 µM
	100 000 Zellen/ Well						

Tabelle 25: Pipettierschema Seahorse Phänotyp Test HCT116 p53 k.o.; Spalten 1-3: 0,1% DMSO, Spalten 4-6: 30 µM Urolithin A; Zeilen A, C: 1,0 µM Oligomycin, Zeile B: 0,5 µM FCCP, Zeile D: 1,0 µM FCCP; 100 000 Zellen/Well, leere Wells

	DMSO 0,1 %			UroA 30 µM			
	1	2	3	4	5	6	
A							Oligomycin 1,0 µM
B							FCCP 0,5 µM
C							Oligomycin 1,0 µM
D							FCCP 1,0 µM
	100 000 Zellen/ Well						

Tabelle 26: Pipettierschema Seahorse Phänotyp Test HCT116 WT und p53 k.o.; Spalten 1-3: 0,1% DMSO, Spalten 4-6: 30 µM Urolithin A; Zeilen A, C: 1,0 µM Oligomycin, Zeile B: 0,5 µM FCCP, Zeile D: 0,5 µM FCCP; 100 000 Zellen/Well, HCT116 WT,
HCT116 p53 k.o., leere Wells

	DMSO 0,1 %			UroA 30 µM			
	1	2	3	4	5	6	
A							Oligomycin 1,0 µM
B							FCCP 0,5 µM
C							Oligomycin 1,0 µM
D							FCCP 0,5 µM
	100 000 Zellen/ Well						

Das Assay Medium wurde für jeden Test frisch hergestellt und mit einem pH-Meter auf einen pH-Wert von 7.4 bei 37°C eingestellt. Im Vorfeld wurden für das Basalmedium die in Tabelle 12 genannten Bestandteile zunächst gelöst, steril filtriert und anschließend im Kühlschrank bei 4°C gelagert und zur Herstellung des Assay Mediums verwendet (siehe Tabelle 13).

In der Zwischenzeit wurden die Injektionslösungen mit 1,0 µM Oligomycin und 0,5 µM FCCP in Seahorse Assay Medium, jeweils Endkonzentration, vorbereitet und 56 µl in den entsprechenden Port im Seahorse XFe24 Analysator pipettiert. Nach Equilibrieren der Kartusche und CO₂-freien Inkubation, kann mit der Messung gestartet werden (default settings für Phänotyp Assay).

2.2.4.2. Optimierung der Parameter mittels Seahorse Mito Stress Test

Verschiedene Parameter wie optimale Zellzahl, FCCP-Konzentration oder Beschichtung der 24-Well-Kulturplatte wurden im Vorfeld mittels dem Seahorse Mito Stress Test ermittelt. Bei dem Mito Stress Test wird die OCR über einen gewissen Zeitraum gemessen, um die mitochondriale Funktion einer Zelle nach Zugabe verschiedener Stressoren zu beobachten. Hier wird zusätzlich zu Oligomycin und FCCP, noch eine Mischung aus Rotenon und Antimycin hinzugefügt.

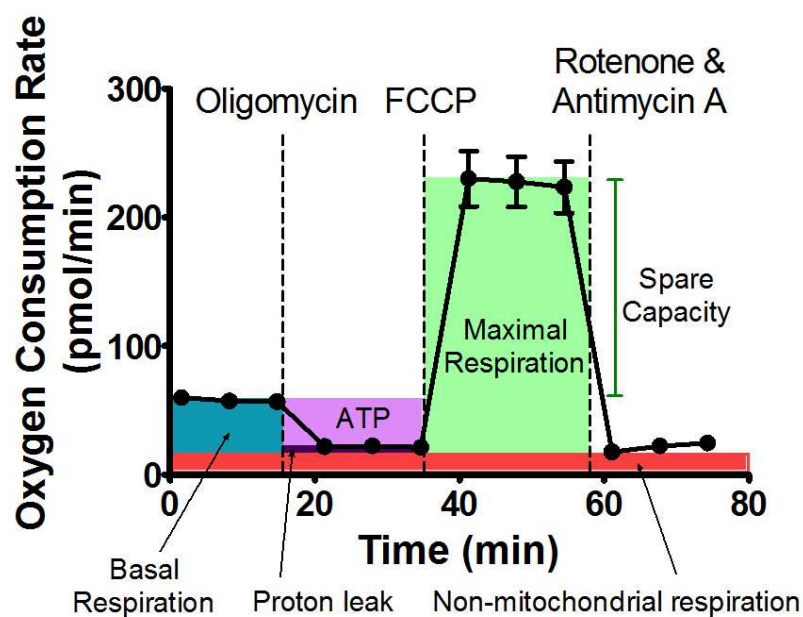


Abbildung 11: Seahorse Mito Stress Test Messprofil (57)

Messprofil des Seahorse Mito Stress Test (siehe Abbildung 11):

1. Basale Respiration: Die basale Respiration zeigt den Sauerstoffverbrauch unter normalen Bedingungen, um die ATP-Anforderungen unter Berücksichtigung des Protonenleaks in den Mitochondrien der Zelle zu erfüllen.
2. Nach Hinzufügen von Oligomycin, einem ATP-Synthase-Inhibitor, sinkt die OCR. Dieser Abfall spiegelt den Anteil des Sauerstoffverbrauchs wider, der direkt an die ATP-Produktion gekoppelt ist. Der verbleibende Anteil repräsentiert das Protonenleak.
3. Durch FCCP bricht der Protonengradient zusammen, der Sauerstoffverbrauch ist von der ATP-Produktion entkoppelt, steigt maximal an und zeigt nun die potentielle maximale Respiration. Die Differenz zur basalen Respiration ist also die freie

zusätzliche Atemkapazität, die wiederum als Indikator für die Flexibilität einer Zelle interpretiert werden kann.

4. Im letzten Schritt werden Rotenon und Antimycin als Stressoren hinzugefügt. Sie beide inhibieren Komplexe in der Elektronentransportkette, nämlich Komplex I und III, und legen die komplette mitochondriale Respiration lahm. Als Resultat sinkt die OCR rapide ab und bleibt auf einem niedrigen Level, was die nicht-mitochondriale Respiration, die durch anderweitige sauerstoffverbrauchende Enzyme zustande kommt, widerspiegelt.

2.2.4.2.1. Zellzahloptimierung

Zur Ermittlung der optimalen Zellzahl wurde eine 24-Well-Zellkulturplatte mit Gelatine beschichtet und HCT116 WT Zellen in einer Dichte von 10 000 bis 60 000 Zellen pro Well in 100 µl Wachstumsmedium ausgesät. Nach einer Stunde in der Arbeitsbank und 4 Stunden im Inkubator wurden jeweils 200 µl Wachstumsmedium hinzugefügt.

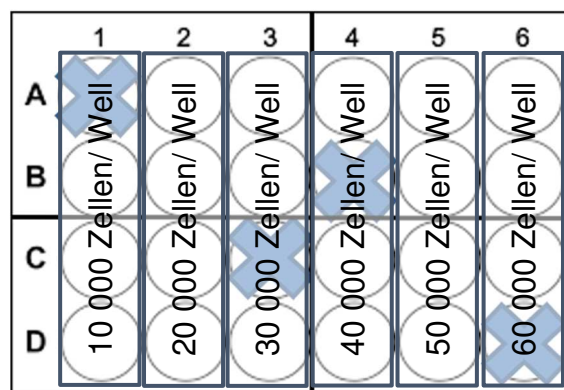


Abbildung 12: Schema Seahorse Mito Stress Test zur Zellzahloptimierung, 10 000 bis 60 000 Zellen/ Well, A1, B4, C3, D6: leere Wells

Am selben Tag wurde das Seahorse Gerät eingeschaltet, die Kartusche hydriert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am zweiten Tag wurden die Zellen mit dem Seahorse Assay Medium, das frisch hergestellt und auf einen pH-Wert von 7.4 bei 37°C eingestellt wurde, mit jeweils 1 ml 2-mal gewaschen. Dann wurden 500 µl Seahorse Assay Medium hinzugefügt. Während die Zellen eine Stunde ohne CO₂ inkubiert wurden, wurden die Lösungen der Stressoren in folgenden Konzentrationen (final im Test) hergestellt:

- Oligomycin 1 μM
- FCCP 1,5 μM
- Rotenon/ Antimycin 0,5 μM / 0,5 μM in Seahorse Assay Medium

Die Lösungen wurden in die entsprechenden Ports im Gerät pipettiert. Nach der CO_2 -freien Inkubation der Zellen und der Kalibration der Kartusche, wurde mit dem Test in den default settings (d.h. Zahl und Dauer der Zyklen) des Analyzers gestartet.

2.2.4.2.2. Optimierung der FCCP-Konzentration

Um die passende finale FCCP-Konzentration zu bestimmen, wurde der Seahorse Mito Stress Test wie oben beschrieben mit 50 000 Zellen pro Well und verschiedenen Konzentrationen von 0.5 μM , 1.0 μM , 1.5 μM und 2.0 μM FCCP durchgeführt.

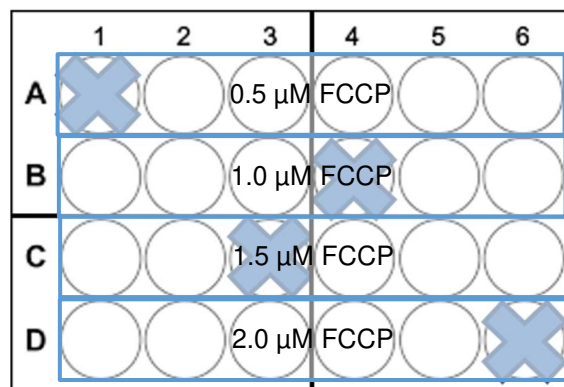


Abbildung 13: Behandlungsschema zur optimalen FCCP-Konzentration, Zeile A: 0.5 μM , Zeile B: 1.0 μM , Zeile C: 1.5, Zeile D: 2.0 μM FCCP, 50 000 Zellen/ Well, HCT116 WT, A1, B4, C3, D6: leere Wells

2.2.4.2.3. Optimale Beschichtung der Zellkulturplatten

Um eine möglichst gute Anlagerung der Zellen während der gesamten Seahorse Analyse zu gewährleisten, wurde eine geeignete Beschichtung gesucht. Dazu wurde der Seahorse Mito Stress Test wie oben beschrieben mit 50 000 Zellen pro Well durchgeführt und die Zellkulturplatte im Vorfeld beschichtet. Es wurden Kollagen (1 ml pro Well), Gelatine (500 μl pro Well) und Poly-L-Lysin (40 μl pro Well) verwendet. Schließlich wurden die Untersuchungen mit einer CellTak Beschichtung durchgeführt, bei der die Zellen nicht über Nacht anwachsen, sondern am Tag des Assay auf die Platten zentrifugiert werden.

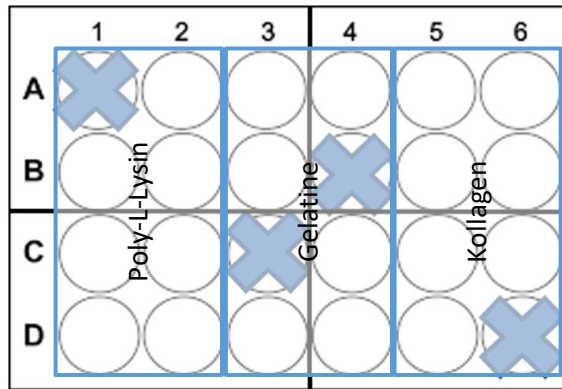


Abbildung 14: Schema zur optimalen Beschichtung, Spalten 1,2: Poly-L-Lysin, Spalten 3,4: Gelatine, Spalten 5,6: Kollagen, 50 000 Zellen/ Well, HCT116 WT, A1, B4, C3, D6: leere Wells

2.2.4.2.4. Normalisierung

Zur anschließenden Normalisierung der Daten des Seahorse Mito Stress Tests auf die tatsächlich vorhandene Zellmasse, wurde im Anschluss an die Messung im Seahorse XFe24 Analyzer der Kristallviolett Assay durchgeführt.

Da beim Phänotyp Test der Workflow verändert wurde und die Zellen schon vor der Aussaat auf die Zellkulturplatten mit den Testsubstanzen behandelt und ausgezählt wurden, wurde keine nochmalige Normalisierung durchgeführt. Die Ergebnisse sind daher die Werte für 100 000 Zellen pro Well.

2.2.4.2.5. Datenauswertung und Statistik

Die Ergebnisse wurden mit dem XF Energy Phenotype Test Report Generator mit der Seahorse Wave Software ermittelt.

Die Statistik für Experimente mit mindestens drei unabhängigen Replikaten wurde mit der Software MS Office Excel berechnet. Für den Vergleich zweier Gruppen wurde der T-Test durchgeführt, wobei nur Ergebnisse mit Unterschieden $p < 0,05$ als signifikant gewertet wurden.

3. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

3.1. Optimierung von Parametern

3.1.1. Resazurin / Kristallviolett Assay

3.1.1.1. Zellzahloptimierung

Der Resazurin Assay sowie der Kristallviolett Assay wurden auf denselben 96-Well-Platten durchgeführt. Um ein Überwuchern der Zellen bzw. eine Sättigung des Signals zu verhindern und trotzdem über ausreichend Zellen für ein aussagekräftiges Ergebnis zu verfügen, wurde im Vorfeld die optimale Zellzahl mit dem Resazurin Assay ermittelt. Es wurden 5 000, 7 500, 10 000 bzw. 20 000 Zellen pro Well ausgesät.

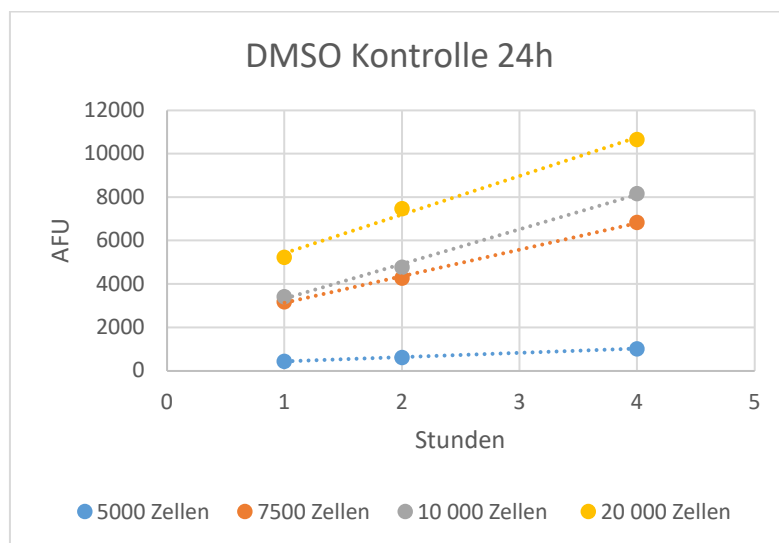


Abbildung 15: DMSO Kontrolle zur Zellzahloptimierung, 24 Stunden, AFU = arbitrary fluorescence units

Nach 24-stündiger DMSO-Behandlung im Brutschrank zeigten alle Zellzahlen über einen Messverlauf von 4 Stunden ein annähernd lineares Verhalten (siehe Abbildung 15) der Fluoreszenzintensität von Resorufin. Auch nach 48-stündiger und 72-stündiger Behandlung zeigte sich ein ähnliches Bild (siehe Abbildung 16 und Abbildung 17). Zwischen 10 000 und 20 000 Zellen pro Well konnte man keinen großen Unterschied in der Signalstärke feststellen. Die optimale Zellzahl würde zwischen 7 500 und 10 000 Zellen pro Well liegen. Die

Experimente wurden letztendlich mit 10 000 Zellen pro Well und 3 Stunden Inkubation mit Resazurin-Lösung durchgeführt.

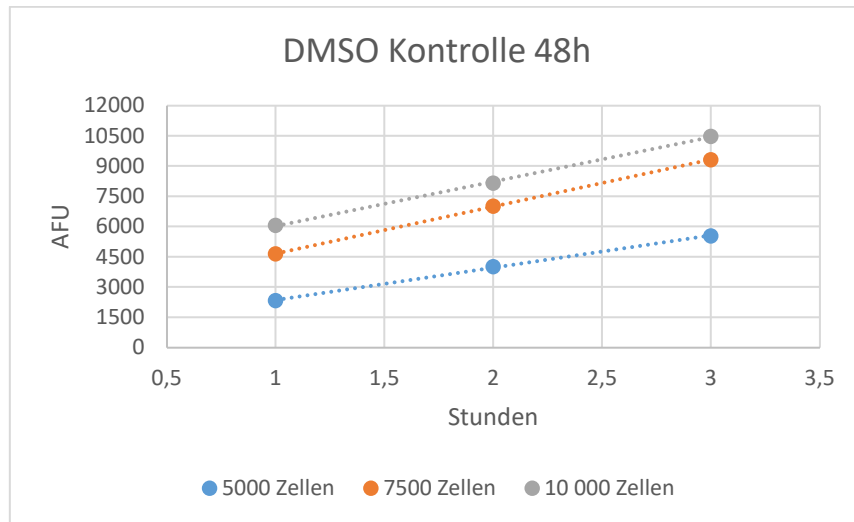


Abbildung 16: DMSO Kontrolle zur Zellzahloptimierung, 48 Stunden, AFU = arbitrary fluorescence units

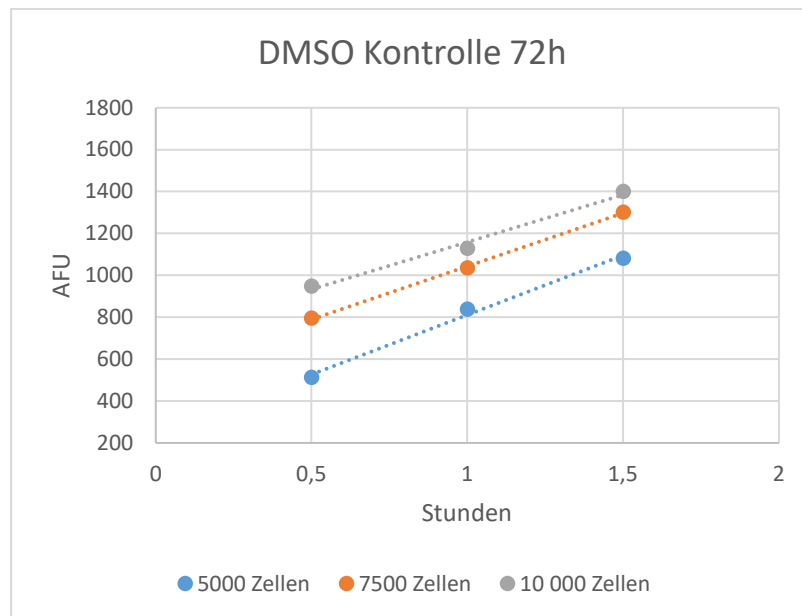


Abbildung 17: DMSO Kontrolle zur Zellzahloptimierung, 72 Stunden, AFU = arbitrary fluorescence units

3.1.2. Seahorse Phänotyp Test

3.1.2.1. Zellzahloptimierung

Zu Beginn wurde ein Seahorse Mito Stress Test zu Ermittlung der optimalen Zellzahl durchgeführt. Die Zellen wurden in einer Dichte von 10 000 bis 60 000 Zellen pro Well ausgesät und bis zum Assay 24 Stunden im Brutschrank inkubiert. Bis 30 000 Zellen konnte nur eine sehr niedrige basale Atmung gemessen werden, nach Zugabe der Stressoren lässt sich kaum eine Veränderung erkennen. Erst ab 40 000 Zellen ist die basale Atmung hoch genug, um einen Effekt der Stressoren messen zu können (siehe Abbildung 18). Die optimale Zellzahl liegt hier zwischen 40 000 und 60 000 Zellen pro Well. Für die Optimierung der weiteren Parameter wurden 50 000 Zellen pro Well ausgesät. Da es aber mit der Beschichtung der Platten, der langfristigen Anhaftung der Zellen in den Platten und dadurch bei der Normalisierung der Daten im weiteren Verlauf der Arbeit immer wieder Probleme gab (siehe unten), wurden schließlich die Zellen mit einer Dichte von 100 000 Zellen pro Well unmittelbar vor dem Assay auf die Platten zentrifugiert.

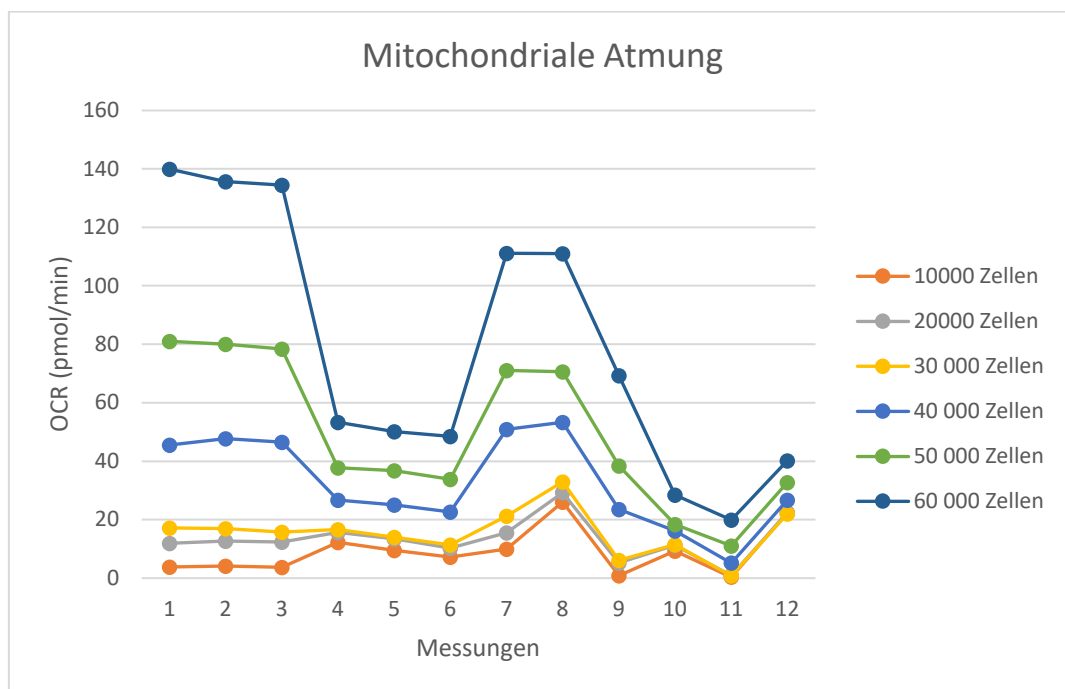


Abbildung 18: Zellzahloptimierung mit den Mito Stress Test, OCR = oxygen consumption rate

3.1.2.2. Beschichtung der Platten

Bei den ersten Versuchen wurde die Platte mit Gelatine beschichtet. Nach dem Mito Stress Test konnte man anhand der Kristallviolett-Färbung erkennen, dass sich die Zellen bei einigen Wells während des Assays abgelöst hatten. Ähnliche Ergebnisse konnte man auch bei der Beschichtung mit Poly-L-Lysin und Kollagen erkennen. Schließlich wurden die Zellen kurz vor dem Experiment auf eine Beschichtung mit CellTak Coating zentrifugiert, womit eine gute und gleichmäßige Anhaftung der Zellen erreicht wurde.

3.1.2.3. Normalisierung

Durch die erwähnten Probleme bei der Anhaftung der Zellen auf Gelatine, Poly-L-Lysin und Kollagen-beschichteten Platten, waren zum Teil nur mehr wenig und sehr unregelmäßig Zellen in den einzelnen Wells vorhanden. Der zur Normalisierung zunächst geplante Kristallviolett Assay war nicht sensitiv genug, um die Unterschiede verlässlich widerzuspiegeln. Auch die Normalisierung auf Proteinmenge pro Well mittels Bradford Assay zeigte Unterschiede nur unzureichend auf. Da das Bradford Assay auf der Bestimmung von Proteinen bzw. Aminosäuren basiert, könnte die Beschichtung der Platten selbst hier einer der Störfaktoren sein. Im weiteren Verlauf wurden deshalb die Seahorse Daten immer mit einer Zellzahl von 100 000 Zellen/ Well aufgenommen (die Zellzahl wurde kurz vor dem Assay bestimmt und entsprechend auf die Platten zentrifugiert, wo sie mittels CellTak auch die gesamte Dauer des Versuchs anhafteten).

3.1.2.4. FCCP Konzentration

Um die geeignete FCCP-Konzentration für HCT116 Zellen herauszufinden, wurde der Mito Stress Test mit verschiedenen Konzentrationen durchgeführt. Im Falle dieser Zelllinie führt eine FCCP-Konzentration zwischen 0,5 μM und 1,0 μM zu einem maximalen Sauerstoffverbrauch. Die im Seahorse Phänotyp Test dargestellten Ergebnisse, wurden deshalb mit einer Konzentration von 0,5 μM FCCP bestimmt.

3.2. Effekt von Urolithin A, S-Equol, Enterolakton und Oxaliplatin auf das Wachstum und die Viabilität von HCT116 Zellen

Um den Effekt von Urolithin A, S-Equol, Enterolakton und Oxaliplatin auf mögliches Zellwachstum und Viabilität zu untersuchen, wurden die metabolische Aktivität mittels Resazurin Assay und die Biomasse mittels Kristallviolett Assay bestimmt. Die IC_{50} -Werte sind in Tabelle 27 und Tabelle 28 dargestellt.

Urolithin A konnte die metabolische Aktivität zeit- und dosisabhängig mit einer IC_{50} von 30,2 μ M nach 48 Stunden hemmen. Nach 72 Stunden konnte mit 25,6 μ M eine etwas niedrigere IC_{50} festgestellt werden. Basierend auf der Bestimmung der Biomasse erreicht Urolithin A eine IC_{50} von 28,1 μ M nach 48 Stunden bzw. 22,4 μ M nach 72 Stunden.

S-Equol zeigte sowohl im Resazurin Assay als auch im Kristallviolett Assay bis 40 μ M wenig Aktivität, weshalb die Maximalkonzentration auf 80 μ M gesteigert wurde. Nach 48 Stunden konnte eine IC_{50} von 40,5 μ M im Resazurin Assay festgestellt werden. Nach 72 Stunden konnte dieser Wert nicht mehr festgestellt werden, was darauf hindeuten könnte, dass die Wirkung von S-Equol auf die Metabolisierung von Resazurin schon nach kurzer Zeit nachlässt. Im Kristallviolett Assay erreichte S-Equol eine IC_{50} von 33,5 μ M nach 48 Stunden bzw. 54,2 μ M nach 72 Stunden.

Im Zuge der Zellzahloptimierung zeigte Enterolakton mit einer Konzentration von 40 μ M keine wachstumshemmende Aktivität. Daher wurde die Ermittlung der IC_{50} -Werte auf Urolithin A und S-Equol beschränkt.

Als Positivkontrolle wurden die IC_{50} Werte von Oxaliplatin, einem Zytostatikum, herangezogen. Im Resazurin Assay erreichte Oxaliplatin eine IC_{50} von 5,0 μ M nach 48 Stunden bzw. 4,6 μ M nach 72 Stunden, während im Kristallviolett Assay geringere IC_{50} -Werte mit 2,4 μ M nach 48 Stunden bzw. 3,0 μ M festgestellt werden konnten.

Tabelle 27: IC_{50} -Werte ermittelt im Resazurin Assay, HCT116 WT, Werte als Mittelwert $\pm$ SD, n.d. = not determined, n=2

	IC_{50} (48h)	IC_{50} (72h)
Urolithin A	30,2 $\pm$ 2,1 μ M	25,6 $\pm$ 4,7 μ M
S-Equol	40,5 $\pm$ 5,0 μ M	n.d.
Oxaliplatin	5,0 $\pm$ 0,6 μ M	4,6 $\pm$ 1,0 μ M

Tabelle 28: IC₅₀-Werte ermittelt im Kristallviolett Assay, HCT116 WT, Werte als Mittelwert $\pm$ SD, n.d. = not determined, n=2

	IC ₅₀ (48h)	IC ₅₀ (72h)
Urolithin A	28,1 $\pm$ 0,9 μ M	22,4 $\pm$ 0,7 μ M
S-Equol	33,5 μ M	54,2 $\pm$ 5,7 μ M
Oxaliplatin	2,4 μ M	3,0 μ M

Urolithin A zeigte somit als einzige der Testsubstanzen zeit- und dosisabhängig antiproliferatives oder cytotoxisches Potential auf HCT116 Zellen mit IC₅₀-Werten < 30 μ M. Da die Experimente nur 2-mal durchgeführt werden konnten, muss die Reproduzierbarkeit in weiteren Versuchen bestätigt werden. Nichtsdestotrotz stimmen diese Ergebnisse mit bisherigen Studien überein, sowohl in der gleichen Zelllinie, als auch in anderen Darmkrebszelllinien (58,59). Interessanterweise sprechen nicht alle Zelllinien z.B. HT29 Zellen zeitabhängig auf Urolithin A an, allerdings gibt es dazu widersprüchliche Studienergebnisse (6,7).

Dass der Konsum von Ellagttannin-reichen Lebensmittel einen positiven Effekt auf die Darmgesundheit hat, ist laut der aktuellen Studienlage gesichert (1,2,60). Damit Urolithin A aber direkt antiproliferativ auf Darmkrebszellen wirken kann, sind natürlich ausreichend hohe Gewebespiegel erforderlich. Dazu gibt es zahlreiche Studien im Tiermodell, mehr humane Studien zur Bioverfügbarkeit und Gewebeverteilung sind daher unbedingt erforderlich.

3.3. Effekt von Urolithin A und Oxaliplatin auf den Zellzyklus von HCT116 WT Zellen

Um den Einfluss von Urolithin A und Oxaliplatin auf den Zellzyklus von HCT116 Zellen zu untersuchen, wurde eine Zellzyklusanalyse mit Propidiumiodid-Färbung und FACS-Analyse durchgeführt.

Nach 24 Stunden Behandlung mit 20 μM bzw. 40 μM Urolithin A, verringerte sich der prozentuelle Anteil der Zellen in S-Phase und G1-Phase, während die Zellen in der G2/M-Phase akkumulierten. Auch der Anteil der Zellen in der subG1-Phase erhöhte sich, was auf einen apoptotischen Effekt hinweisen könnte (siehe Abbildung 19).

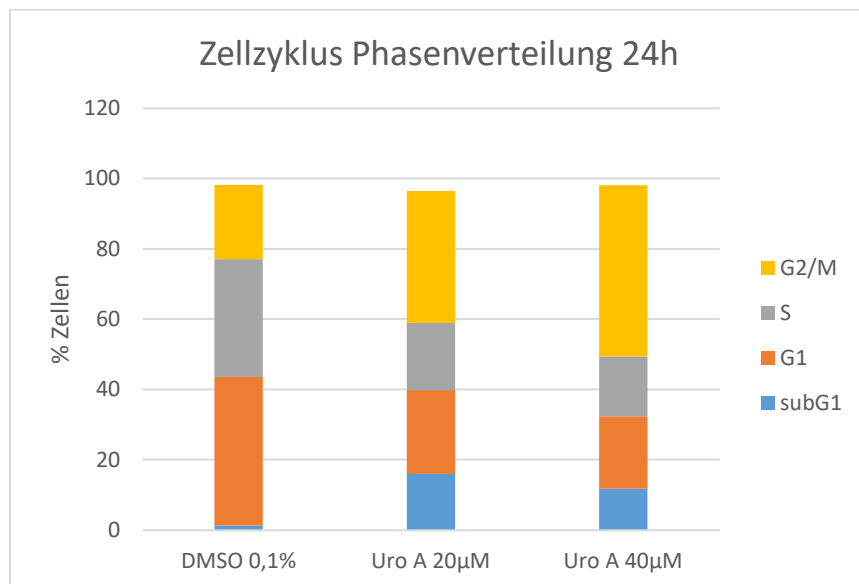


Abbildung 19: Zellzyklus Phasenverteilung nach 24h, HCT116 WT, UroA= Urolithin A, 0,1% DMSO als Kontrolle, n=2

Nach 48 Stunden lässt sich ein ähnlicher Effekt beobachten, der Anteil der Zellen in der G2/M-Phase und subG1-Phase steigt an, während immer weniger Zellen die G1-Phase bzw. S-Phase erreichen (siehe Abbildung 20). Nach Behandlung mit 40 μM Urolithin A über 48 Stunden fällt auf, dass ungefähr 10 % der Zellen nicht detektiert wurden, das darauf schließen lässt, dass sich immer mehr abgestorbene Zellen und Zellbestandteile in der Probe befinden, die auch nicht mehr im subG1-Peak auftauchen. Nach 72-stündiger Behandlung mit Urolithin A lässt sich keine Akkumulation in der G2/M-Phase mehr feststellen. Im Gegensatz dazu steigt der subG1-Peak (siehe Abbildung 21).

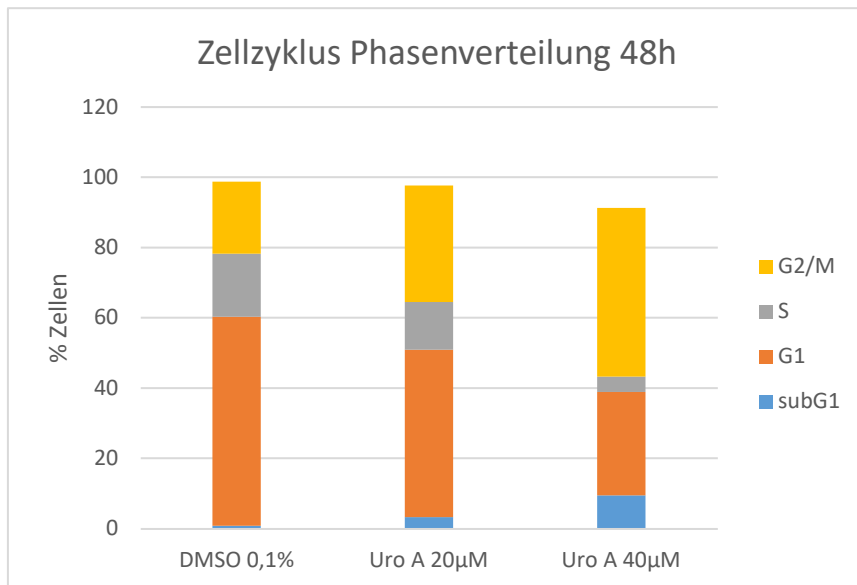


Abbildung 20: Zellzyklus Phasenverteilung nach 48h, HCT116 WT, UroA= Urolithin A, 0,1% DMSO als Kontrolle, n=2

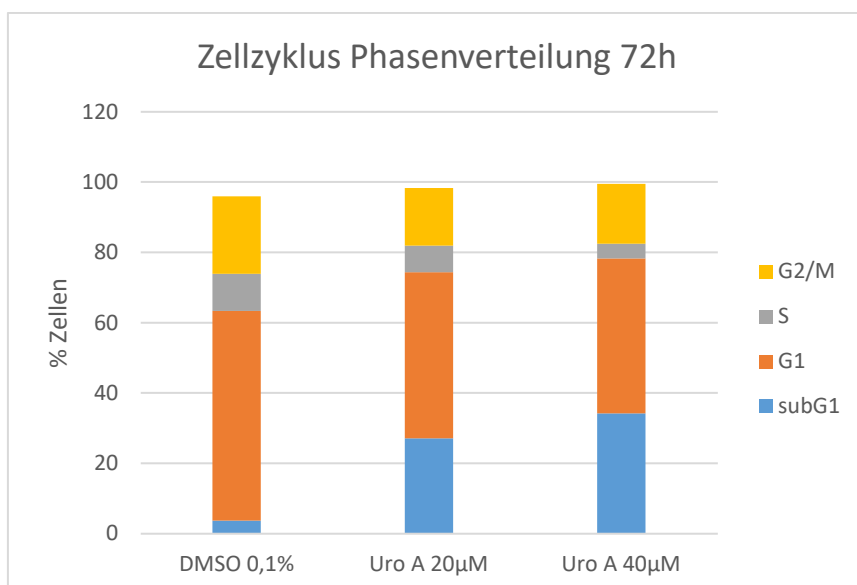


Abbildung 21: Zellzyklus Phasenverteilung nach 72h, HCT116 WT, UroA= Urolithin A, 0,1% DMSO als Kontrolle, n=2

Nach 24-stündiger Behandlung mit Oxaliplatin mit 5 µM bzw. 10 µM akkumulieren die Zellen ebenfalls in der G2/M-Phase, während der Anstieg in der subG1-Phase nicht so hoch ausfällt verglichen mit Urolithin A. Außerdem fällt auf, dass nur wenige Zellen nach Behandlung mit Oxaliplatin die S-Phase erreichen. Ein ähnliches Bild zeigt sich nach 48-stündiger Behandlung, obwohl die Akkumulation in der G2/M-Phase weniger ausgeprägt ist und mehr Zellen in der subG1-Phase zu finden sind. Nach 72 Stunden scheint der Effekt von Oxaliplatin schwächer

zu werden bzw. akkumulieren immer mehr Zellen in der subG1-Phase, siehe Abbildung 22 bis Abbildung 24.

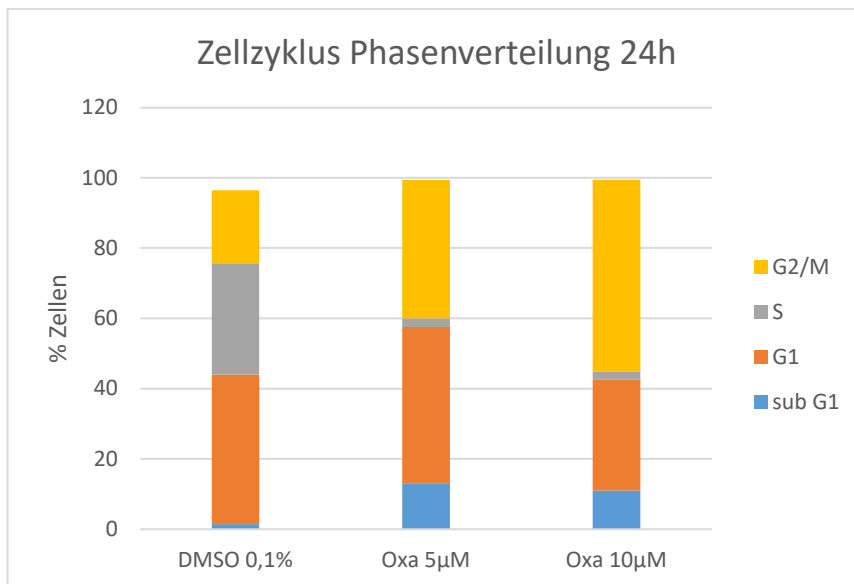


Abbildung 22: Zellzyklus Phasenverteilung nach 24h, Oxa = Oxaliplatin, 0,1% DMSO als Kontrolle, n=2

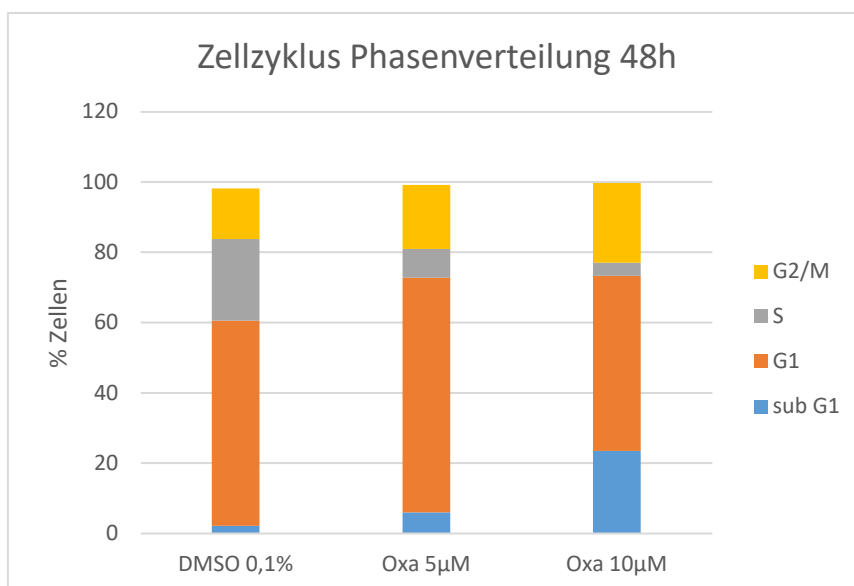


Abbildung 23: Zellzyklus Phasenverteilung nach 48h, Oxa = Oxaliplatin, 0,1% DMSO als Kontrolle, n=2

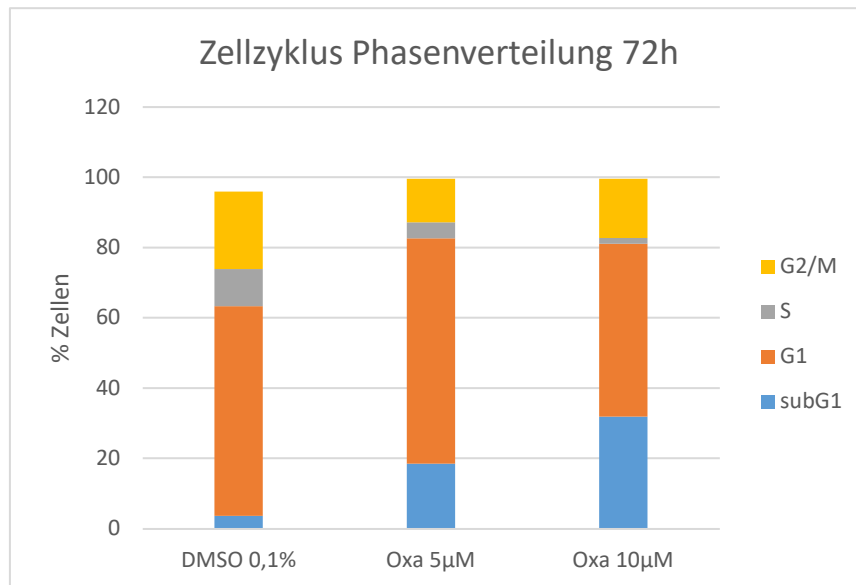


Abbildung 24: Zellzyklus Phasenverteilung nach 72h, Oxa = Oxaliplatin, 0,1% DMSO als Kontrolle, n=2

Die Zellzyklusanalyse ergab also, dass Urolithin A zu Akkumulation der Zellen in der G2/M-Phase und im weiteren Verlauf der subG1-Phase führt. Das könnte ein Hinweis darauf sein, dass Urolithin A nach G2/M-Arrest Apoptose-induzierend in Darmkrebszellen wirken kann. Dieser Effekt konnte auch in anderen Studien beobachtet werden (6,7). Wie genau Urolithin A zum G2/M-Arrest führt, muss in weiteren Studien noch abschließend geklärt werden.

Oxaliplatin scheint eine ähnliche Wirkung zu haben, es führt ebenfalls zur Akkumulation der der subG1-Phase, während die Zellen in der S-Phase stark verringert sind und vor allem nach 24 Stunden ein erhöhter G2/M-Anteil zu beobachten ist. Als bekannter Disruptor der Replikation und Transkription, führt Oxaliplatin zu Einleitung der Apoptose über Aktivierung des intrinsischen Weg (54).

3.4. Kombinationswirkung von Urolithin A und S-Equol mit Oxaliplatin

Als nächstes wurde auf eine mögliche Kombinationswirkung von Oxaliplatin mit verschiedenen Konzentrationen der Testsubstanzen im Resazurin Assay bzw. Kristallviolett Assay untersucht. Die Kombinationsindizes wurden nach 48 und 72 Stunden Behandlung errechnet. Nach 24 Stunden konnten keine IC₅₀-Werte ermittelt werden, daher konnte auch keine Kombinationswirkung errechnet werden.

3.4.1. Kombinationswirkung von Oxaliplatin und Urolithin A

Urolithin A wurde in einer Konzentration von 5 µM, 15 µM und 40 µM auf eine Kombinationswirkung mit Oxaliplatin getestet. Zur Berechnung wurde die zuvor ermittelte IC₅₀ von Urolithin A herangezogen. Die Kombination mit Urolithin A führte dosisabhängig zu geringeren IC₅₀-Werten von Oxaliplatin, siehe Tabelle 29. Die Berechnung des Kombinationsindex ergab, dass Urolithin A mit 5 µM und 15 µM nach 48 Stunden einen schwach additiven Effekt zu Oxaliplatin hat. Mit 40 µM Urolithin A konnte dieser Effekt nicht beobachtet werden, ebenso nicht nach 72 Stunden.

Tabelle 29: IC₅₀-Werte und CI für Oxaliplatin und Urolithin A (UroA) nach 48 und 72 Stunden, Resazurin Assay, Werte als Mittelwert ± SD

	48h		72h	
	IC ₅₀	CI	IC ₅₀	CI
Urolithin A	30,2 ± 2,1 µM		25,6 µM	
Oxaliplatin	2,9 ± 0,4 µM		2,7 ± 0,3 µM	
+ 5 µM UroA	2,7 ± 0,8 µM	1,09	3,2 ± 0,3 µM	1,38
+ 15 µM UroA	1,7 ± 0,3 µM	1,08	1,6 ± 0,3 µM	1,18
+ 40 µM UroA	0,6 ± 0,1 µM	1,53	0,6 ± 0,1 µM	1,78

Im Kristallviolett Assay konnte kein additiver Effekt beobachtet werden. Die Kombinationsindizes liegen sowohl nach 48 als auch nach 72 Stunden in allen Konzentrationen über 1,1, was auf eine schwach antagonistische Wirkung schließen lässt, siehe Tabelle 30.

Tabelle 30: IC₅₀-Werte und CI für Oxaliplatin und Urolithin A (UroA) nach 48 und 72 Stunden, Kristallviolett Assay, Werte als Mittelwert ± SD

	48h		72h	
	IC ₅₀	CI	IC ₅₀	CI
Urolithin A	28,1 ± 0,9 µM		22,4 ± 0,7 µM	
Oxaliplatin	2,4 ± 0,2 µM		2,5 ± 0,1 µM	
+ 5 µM UroA	2,5 ± 0,2 µM	1,22	2,5 ± 0,1 µM	1,22
+ 15 µM UroA	1,8 ± 0,1 µM	1,28	2,0 ± 0,2 µM	1,47
+ 40 µM UroA	0,7 ± 0,01 µM	1,72	0,6 ± 0,1 µM	2,07

3.4.2. Kombinationswirkung von Oxaliplatin und S-Equol

S-Equol wurde ebenfalls auf eine mögliche Kombinationswirkung mit Oxaliplatin getestet. Es wurden Konzentrationen von 5 µM bis 80 µM gewählt, da S-Equol schon im Vorfeld weniger Aktivität zeigte. Die Berechnung der Kombinationsindizes mit verschiedenen Konzentrationen S-Equol lässt, sowohl im Resazurin Assay, als auch im Kristallviolett Assay auf einen antagonistischen Effekt schließen. Die CI liegen weit über 1,1, zusätzlich steigen sie mit steigender S-Equol-Konzentration, siehe Tabelle 31 und Tabelle 32.

Tabelle 31: IC₅₀-Werte und CI für Oxaliplatin und S-Equol nach 48 und 72 Stunden, Resazurin Assay, Werte als Mittelwert ± SD

	48h		72h	
	IC ₅₀	CI	IC ₅₀	CI
S-Equol	40,5 ± 5,0 µM		54,2 ± 5,7 µM	
Oxaliplatin	3,0 ± 1,2 µM		2,1 ± 0,1 µM	
+ 5 µM S-Equol	4,3 ± 1,8 µM	1,56	4,4 ± 0,2 µM	2,19
+ 20 µM S-Equol	4,9 ± 1,1 µM	2,13	3,5 ± 0,4 µM	2,04
+ 80 µM S-Equol	4,8 ± 2,3 µM	3,58	2,9 ± 0,5 µM	2,86

Tabelle 32 : IC₅₀-Werte und CI für Oxaliplatin und S-Equol nach 48 und 72 Stunden, Kristallviolett Assay, Werte als Mittelwert ± SD

	48h		72h	
	IC ₅₀	CI	IC ₅₀	CI
S-Equol	33,5 µM		54,2 ± 5,7 µM	
Oxaliplatin	2,7 ± 1,6 µM		2,5 µM	
+ 5 µM S-Equol	3,1 ± 0,3 µM	1,30	5,3 µM	2,21
+ 20 µM S-Equol	3,2 ± 0,4 µM	1,78	4,5 µM	2,17
+ 80 µM S-Equol	3,8 ± 2,2 µM	3,80	2,7 µM	2,56

Nach 48 Stunden zeigte Urolithin A einen additiven Effekt zu Oxaliplatin, der nach 72 Stunden wieder nachzulassen scheint. Insbesondere niedrigere Konzentrationen (hier bis 15 µM) scheinen potenter zu sein, da bei 40 µM Urolithin A der CI mit 1,53 im Resazurin Assay auf einen antagonistischen Effekt hindeutet. In weiteren Studien nach dieser Diplomarbeit wurden deshalb auch geringere Urolithin A Konzentrationen (1-15 µM) in Kombination mit Oxaliplatin in HCT116 Zellen getestet, die sogar Synergie-Effekte mit Oxaliplatin offenbarten (61). Es scheint also eine Frage der Urolithin A-Dosis (und somit des betroffenen Targets) zu sein, wann positive oder negative Effekte einer Kombinationstherapie bzw. einer adjuvanten Diät im Zusammenhang mit Oxaliplatin zu erwarten sind. Auch in anderen Darmkrebszellen konnte eine additive Wirkung von Urolithin A z.B. auf 5-Fluorouracil beobachtet werden (5).

Bei der Kombination von Oxaliplatin mit S-Equol konnte keine additive Wirkung festgestellt werden. Bei kleinen Konzentrationen von Oxaliplatin im Bereich zwischen 1,25 µM bis 5 µM scheint S-Equol sogar einen schützenden Effekt auf die Zellen zu haben. Es ist also wahrscheinlicher, dass S-Equol einen antagonistischen Effekt auf Oxaliplatin hat. Unglücklicherweise wurden bei der Wiederholung des Experiments die 96-Well-Platten z.T. bakteriell kontaminiert, daher konnte im Kristallviolett Assay für 72 Stunden nur ein Wert ermittelt werden. Aus diesem Grund muss man diese Daten leider als wenig aussagekräftig ansehen und in anderen Studien genauer untersuchen.

3.5. Effekt von Urolithin A auf das metabolische Potential von HCT116 WT Zellen

Da entartete Zellen dafür bekannt sind, ihren Stoffwechsel zugunsten einer optimalen Energie- und Bausteingewinnung umzustellen, stellt sich natürlich auch die Frage, ob und wie Urolithin A den Metabolismus dieser Zellen beeinflussen kann. Um dies näher zu beleuchten, wurde der Seahorse Phänotyp Test mit 0,1% DMSO als Kontrolle und 30 μ M Urolithin A in HCT116 Zellen durchgeführt.

Abbildung 25 zeigt das respiratorische Potential nach der Behandlung mit DMSO und Urolithin A. In der DMSO-Kontrolle, sind die Zellen in der Lage, den Sauerstoffverbrauch nach Zugabe der Stressoren noch um ca. 70% zu erhöhen. Zellen, die mit Urolithin A behandelt wurden, können zwar auch die Zellatmung noch erhöhen, das Ausmaß ist aber wesentlich geringer und liegt im Mittel bei ca. 40%. Auch das glykolytische Potential der Urolithin A-behandelten Zellen ist beeinträchtigt (siehe Abbildung 26). Bei der Kontrolle sind die Zellen in der Lage, die Glykolyse, wenn nötig, noch um fast das 3-fache zu steigern, während die Urolithin A-Behandlung das glykolytische Potential signifikant auf das ca. 1,9-fache reduziert. Die geringere glykolytische Reserve der behandelten HCT116 Zellen geht einher mit einer bereits erhöhten basalen Glykolyserate (Daten nicht gezeigt), die sich nach Zugabe von Stressoren nicht mehr im selben Maße steigern lässt wie die der Kontrollzellen.

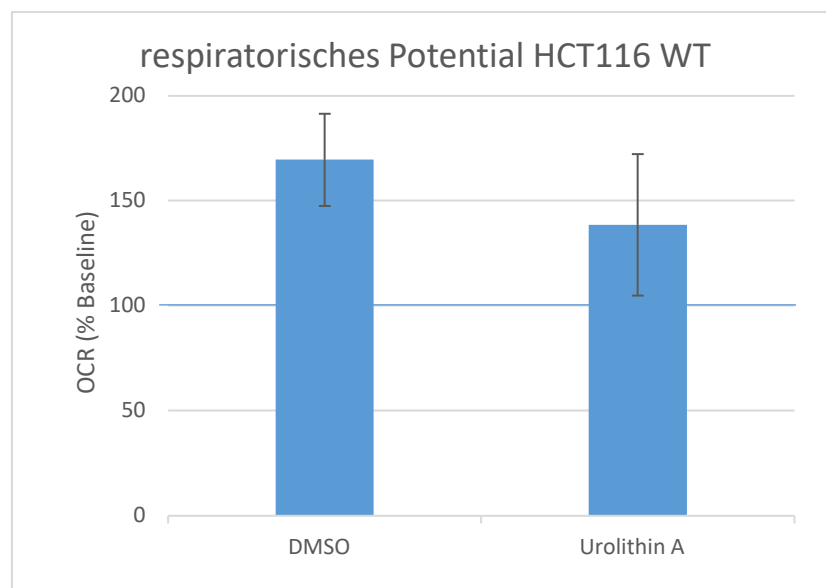


Abbildung 25: Respiratorisches Potential nach Behandlung mit 30 μ M Urolithin A, 0,1% DMSO als Kontrolle, HCT 116 WT, OCR= Oxygen Consumption Rate, n=3, Mittelwert $\pm$ SD, t-Test, * $p < 0,05$

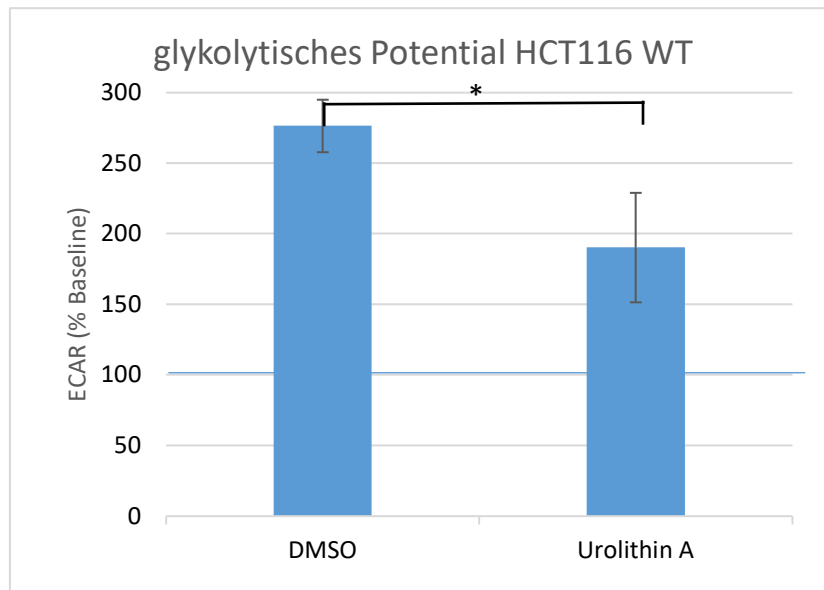


Abbildung 26: Glykolytisches Potential nach Behandlung mit 30 μ M Urolithin A, 0,1% DMSO als Kontrolle, HCT 116 WT, ECAR=extracellular acidification rate, n=3, Mittelwert $\pm$ SD, t-Test, * $p < 0,05$

Urolithin A scheint den Metabolismus von HCT116 WT Zellen merklich zu beeinflussen. Die mögliche erzwungene Steigerung der oxidativen Phosphorylierung und der glykolytischen Aktivität sind geringer als bei der DMSO-Kontrolle. Diese induzierte „metabolische Achillesferse“ könnte bei möglichen Kombinationstherapien ausgenutzt werden. Da auch schon der Precursor von Urolithin A, Ellagsäure, sehr unterschiedliche Effekte auf verschiedene Krebszelllinien zu haben scheint (62), stellt sich die Frage, ob und wie Urolithin A auch den zellulären Metabolismus in anderen Krebszellen und nicht transformierten Zellen beeinflussen kann.

3.6. Rolles des Tumorsuppressor p53 bei der Behandlung mit Urolithin A

Wie in der Einleitung schon erwähnt, spielt das Tumorsuppressorgen TP53 eine essentielle Rolle in der Entwicklung von Tumoren. Da der Großteil von Darmtumoren ein mutiertes bzw. nicht funktionsfähiges p53 Protein exprimiert, stellt sich die Frage, ob die Wirkung von Urolithin A von p53 abhängig ist. Dazu wurde sowohl der Resazurin Assay und Kristallviolett Assay als auch der Seahorse Phänotyp Test mit HCT116 p53 knock-out Zellen durchgeführt.

Im Resazurin Assay wurden für die p53 k.o. Zellen höhere IC₅₀-Werte ermittelt als für die WT Zellen (siehe Tabelle 33). Urolithin A erreichte eine IC₅₀ von 44,4 µM nach 48 Stunden bzw. 34,1 µM nach 72 Stunden. Der wachstumshemmende Effekt von Urolithin A scheint somit von p53 abhängig zu sein. Auch die Wirkung von Oxaliplatin steht in Abhängigkeit von p53. Die IC₅₀-Werte sind mit 10,6 µM nach 48 Stunden und 13,5 µM nach 72 Stunden mehr als 2-mal so hoch wie in den WT Zellen mit 5 µM nach 48 Stunden bzw. 4,6 µM nach 72 Stunden.

Tabelle 33: IC₅₀-Werte ermittelt im Resazurin Assay, HCT116 p53 k.o., Werte als Mittelwert ± SD, n.d. = not determined, n=2

	IC ₅₀ (48h)	IC ₅₀ (72h)
Urolithin A	44,4 ± 3,9 µM	34,1 ± 6,7 µM
Oxaliplatin	10,6 µM	13,5 µM

Auch im Kristallviolett Assay zeigt Urolithin A einen p53-abhängigen Effekt. Auch hier wurden mit 56,8 µM bzw. 46,5 µM wesentlich höhere IC₅₀-Werte ermittelt (siehe Tabelle 34). Oxaliplatin zeigt mit 7,4 µM nach 48 Stunden und 10,6 µM nach 72 Stunden mehr als 3-mal höhere Werte als in den WT Zellen mit 2,4 µM bzw. 3,0 µM.

Tabelle 34: IC₅₀-Werte ermittelt im Kristallviolett Assay, HCT116 p53 k.o., Werte als Mittelwert ± SD, n.d. = not determined, n=2

	IC ₅₀ (48h)	IC ₅₀ (72h)
Urolithin A	56,8 µM	46,5 µM
Oxaliplatin	7,4 µM	10,6 µM

Um zu sehen, ob die metabolischen Effekte von Urolithin A in einer Abhängigkeit von p53 stehen könnten, wurde der Seahorse Phänotyp Test auch mit HCT 116 p53 k.o. Zellen durchgeführt.

Im Wildtyp konnte man beobachten, dass Urolithin A das metabolische Potential von HCT116 Zellen vermindert. In den p53 k.o. Zellen konnte ein gegensätzliches Bild beobachtet werden. Der hemmende Effekt von Urolithin A scheint hier aufgehoben zu sein. Das respiratorische Potential ist höher verglichen mit der Kontrolle, während das glykolytische Potential beinahe unverändert bleibt in DMSO- bzw. Urolithin A-behandelten Zellen (siehe Abbildung 27 und Abbildung 28). Das metabolische Potential ist insgesamt höher als bei der Kontrolle und die Zellen gehen in einen energetischeren Zustand. Man kann also davon ausgehen, dass der Wirkmechanismus von Urolithin A, was den Zellmetabolismus betrifft, p53-abhängig ist bzw. in die Signalkaskade dieses Gens eingreift.

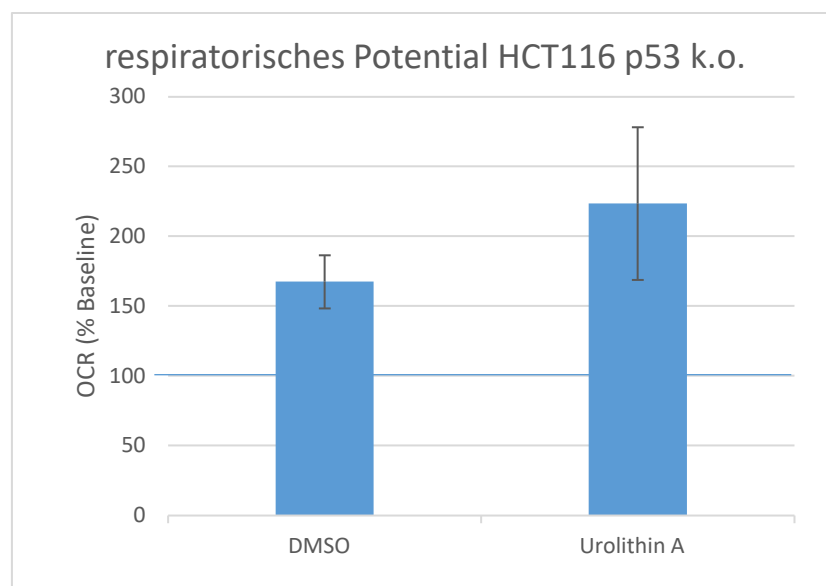


Abbildung 27: Respiratorisches Potential nach Behandlung mit 30 μ M Urolithin A, 0,1% DMSO als Kontrolle, HCT 116 p53 k.o., OCR= Oxygen Consumption Rate, n=3, Mittelwert $\pm$ SD, t-Test, *p < 0,05

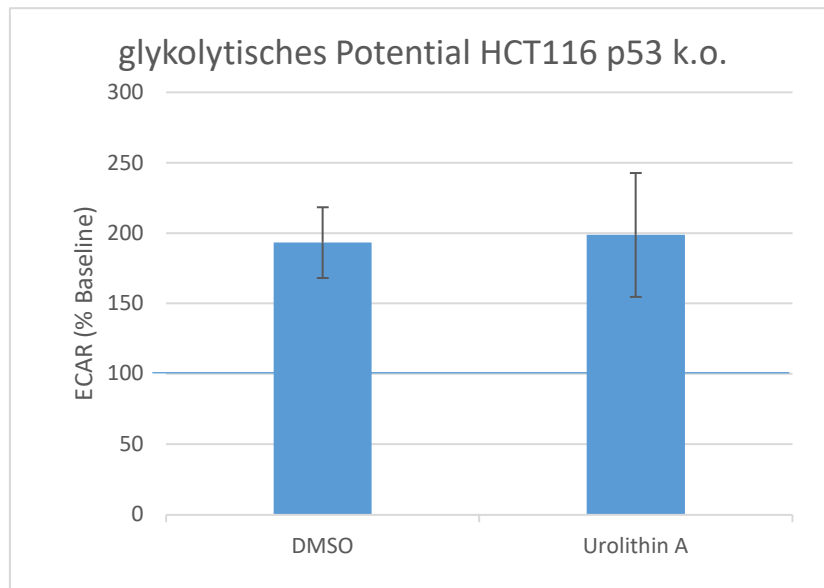


Abbildung 28: Glykolytisches Potential nach Behandlung mit 30 μ M Urolithin A, 0,1% DMSO als Kontrolle, HCT 116 p53 k.o., ECAR=extracellular acidification rate, n=3, Mittelwert $\pm$ SD, t-Test, * $p < 0,05$

Da p53 in einem Großteil der Tumore mutiert oder funktionsuntüchtig ist, spielt es eine große Rolle für die Entwicklung von neuen zytostatischen Substanzen und in weiterer Folge Medikamenten. Die hemmenden Effekte von Urolithin A im WT scheinen in den p53 k.o. Zellen sogar ins Gegenteil zu kehren. Durch eine Mutation von p53 könnte sich ein Tumor also vor Urolithin A schützen. Um mit Sicherheit sagen zu können, ob Urolithin A den zellulären Metabolismus p53-abhängig beeinträchtigt, sind zahlreiche weitere Studien auf jeden Fall notwendig.

3.7. Fazit und Ausblick

Enterolakton und S-Equol zeigten weder als Einzeldosis noch in Kombination mit Oxaliplatin einen wachstumshemmenden Effekt auf HCT116-Kolonkarzinomzellen. S-Equol scheint sogar einen schützenden bzw. antagonistischen Effekt gegenüber Oxaliplatin zu haben v.a. in niedrigeren Konzentrationen von Oxaliplatin bis 5 μM . Die bisher beobachteten und berichteten positiven Effekte von S-Equol (12), könnten durch andere Angriffspunkte als Proliferation zustande kommen, oder die hier getesteten Konzentrationen liegen unterhalb des wirksamen Bereichs.

Einzig Urolithin A konnte einen merklich wachstumshemmenden Effekt auf HCT116 Zellen ausüben. Dieser Effekt scheint in Abhängigkeit zu dem Tumorsuppressorgen TP53 zu stehen, da in den p53 k.o. Zellen höhere IC_{50} -Werte bestimmt wurden. Bisherige Studien konnten den antiproliferativen Effekt von Urolithin A bestätigen, auch wenn die Effekte stark zwischen den unterschiedlichen Darmkrebszelllinien variieren. Urolithin A induzierte einen Zellzyklusarrest in der G2/M-Phase, was ebenfalls mit der bisherigen Studienlage übereinstimmt.

Da niedrige Konzentrationen (1-15 μM) von Urolithin A einen additiven oder gar synergistischen Effekt mit Oxaliplatin haben, könnte das neue Möglichkeiten zur Steigerung der Wirksamkeit und Dosisreduktion von Oxaliplatin – und damit weniger ungewünschte Arzneimittelreaktionen – eröffnen, die die Lebensqualität der Patientinnen und Patienten bedeutsam verbessern könnte.

Wir konnten beobachten, dass Urolithin A die basale Glykolyse-Rate erhöhen und die metabolische Reserve von HCT116 Zellen verringern kann. In p53 k.o. Zellen war dieser Effekt nicht mehr zu beobachten, was einen weiteren Hinweis auf die p53-Abhängigkeit der Urolithin A Wirkung liefert.

Andere vielversprechende Substanzen, wie 3-Bromopyruvat, greifen ebenfalls den zellulären Energiestoffwechsel an. Durch die Alkylierung des Schlüsselenzym der Glykolyse, der Hexokinase II, wird die Glykolyse gehemmt und die ATP-Level v.a. in Krebszellen, die den Warburg-Metabolismus fahren, sinken ab (63). Dadurch werden auch andere Signalwege beeinflusst und es kommt dosisabhängig zum apoptotischen und nekrotischen Zelltod. Allerdings sprechen verschiedene Zelllinien auch unterschiedlich stark an (64).

3-Bromopyruvat und Urolithin A beeinflussen also beide den zellulären Energiestoffwechsel. Um den Wirkmechanismus von Urolithin A näher beschreiben zu können, sind weitere Studien nötig. Ob auch bei Urolithin A und 3-Bromopyruvat eine additive oder gar synergistische Wirkung vorliegt, wird mit Sicherheit Thema weiterer Forschung sein, genauso wie die Frage,

ob und wie die Beobachtungen zu p53, Zellmetabolismus und Zellzyklusarrest kausal zusammenhängen.

4. Literaturverzeichnis

1. B. Martinez K, Mackert J, McIntosh M. Polyphenols and Intestinal Health. In: Nutrition and Functional Foods for Healthy Aging. 2017. S. 191–210.
2. Tomás-Barberán FA, González-Sarrías A, García-Villalba R, Núñez-Sánchez MA, Selma MV, García-Conesa MT, u. a. Urolithins, the rescue of “old” metabolites to understand a “new” concept: Metabotypes as a nexus among phenolic metabolism, microbiota dysbiosis, and host health status. *Mol Nutr Food Res*. 2017;61(1):1500901.
3. Espín JC, Larrosa M, García-Conesa MT, Tomás-Barberán F. Biological Significance of Urolithins, the Gut Microbial Ellagic Acid-Derived Metabolites: The Evidence So Far. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2013;2013:1–15.
4. Tomás-Barberán FA, García-Villalba R, González-Sarrías A, Selma MV, Espín JC. Ellagic Acid Metabolism by Human Gut Microbiota: Consistent Observation of Three Urolithin Phenotypes in Intervention Trials, Independent of Food Source, Age, and Health Status. *J Agric Food Chem*. 16. Juli 2014;62(28):6535–8.
5. González-Sarrías A, Tomé-Carneiro J, Bellesia A, Tomás-Barberán FA, Espín JC. The ellagic acid-derived gut microbiota metabolite, urolithin A, potentiates the anticancer effects of 5-fluorouracil chemotherapy on human colon cancer cells. *Food Funct*. Mai 2015;6(5):1460–9.
6. Kasimsetty SG, Bialonska D, Reddy MK, Ma G, Khan SI, Ferreira D. Colon Cancer Chemopreventive Activities of Pomegranate Ellagitannins and Urolithins. *J Agric Food Chem*. 58(4):2180–7.
7. Cho H, Jung H, Lee H, Yi HC, Kwak H, Hwang KT. Chemopreventive activity of ellagitannins and their derivatives from black raspberry seeds on HT-29 colon cancer cells. *Food Funct*. Mai 2015;6(5):1675–83.
8. Setchell KDR, Clerici C. Equol: History, Chemistry, and Formation. *J Nutr*. Juli 2010;140(7):1355S-1362S.
9. Mayo B, Vázquez L, Flórez AB. Equol: A Bacterial Metabolite from The Daidzein Isoflavone and Its Presumed Beneficial Health Effects. *Nutrients*. September 2019;11(9):2231.

10. Rafii F. The Role of Colonic Bacteria in the Metabolism of the Natural Isoflavone Daidzin to Equol. *Metabolites*. 14. Januar 2015;5(1):56–73.
11. Yang Z-P, Zhao Y, Huang F, Chen J, Yao Y-H, Li J, u. a. Equol inhibits proliferation of human gastric carcinoma cells via modulating Akt pathway. *World J Gastroenterol WJG*. 28. September 2015;21(36):10385–99.
12. Hedlund TE, Johannes WU, Miller GJ. Soy isoflavonoid equol modulates the growth of benign and malignant prostatic epithelial cells in vitro. *The Prostate*. 54(1):68–78.
13. Yang Z, Zhao Y, Yao Y, Li J, Wang W, Wu X. Equol Induces Mitochondria-Dependent Apoptosis in Human Gastric Cancer Cells via the Sustained Activation of ERK1/2 Pathway. *Mol Cells*. 31. Oktober 2016;39(10):742–9.
14. Adolphe JL, Whiting SJ, Juurlink BHJ, Thorpe LU, Alcorn J. Health effects with consumption of the flax lignan secoisolariciresinol diglucoside. *Br J Nutr*. April 2010;103(07):929.
15. Mali AV, Padhye SB, Anant S, Hegde MV, Kadam SS. Anticancer and antimetastatic potential of enterolactone: Clinical, preclinical and mechanistic perspectives. *Eur J Pharmacol*. 5. Juni 2019;852:107–24.
16. Clavel T, Doré J, Blaut M. Bioavailability of lignans in human subjects. *Nutr Res Rev*. Dezember 2006;19(2):187–96.
17. Edel AL, Pierce GN, Aliani M. Age-dependency in the metabolism of flaxseed lignans by healthy adults. *J Funct Foods*. 1. August 2015;17:948–57.
18. Pschyrembel Online | darmkrebs [Internet]. [zitiert 22. Oktober 2020]. Verfügbar unter: <https://www.pschyrembel.de/darmkrebs/K0BFU/doc/>
19. Was ist Darmkrebs? | DKG [Internet]. [zitiert 29. Oktober 2020]. Verfügbar unter: <https://www.krebsgesellschaft.de/onko-internetportal/basis-informationen-krebs/krebsarten/darmkrebs/definition-und-haeufigkeit.html>
20. De Rosa M, Pace U, Rega D, Costabile V, Duraturo F, Izzo P, u. a. Genetics, diagnosis and management of colorectal cancer (Review). *Oncol Rep*. September 2015;34(3):1087–96.
21. Jahrbuch der Gesundheitsstatistik 2018. Statistik Austria;
22. Krebserkrankungen in Österreich 2020. Statistik Austria;

23. S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom. 2019;328.
24. Carethers JM, Jung BH. Genetics and Genetic Biomarkers in Sporadic Colorectal Cancer. *Gastroenterology*. Oktober 2015;149(5):1177-1190.e3.
25. Street W. Colorectal Cancer Facts & Figures 2020-2022. :48.
26. Pardini B, Corrado A, Paolicchi E, Cugliari G, Berndt SI, Bezieau S, u. a. DNA repair and cancer in colon and rectum: Novel players in genetic susceptibility. *Int J Cancer*. 15 2020;146(2):363–72.
27. MUTYH-assoziierte Polyposis (MAP) - Altmeyers Enzyklopädie - Fachbereich Gastroenterologie [Internet]. 2018 [zitiert 16. November 2020]. Verfügbar unter: <https://www.altmeyers.org/de/gastroenterologie-hepatologie/mutyh-assoziierte-polyposis-map-110823>
28. Lima MPC, Gomes-da-Silva MHG. Colorectal cancer: lifestyle and dietary factors. *Nutr Hosp*. 2005;20(4):235–41.
29. Berlau J, Glei M, Pool-Zobel BL. Colon cancer risk factors from nutrition. *Anal Bioanal Chem*. Februar 2004;378(3):737–43.
30. Kohlenhydrate, Ballaststoffe [Internet]. [zitiert 16. Juli 2020]. Verfügbar unter: <https://www.dge.de/wissenschaft/referenzwerte/kohlenhydrate-ballaststoffe/>
31. Nahrungsinhaltstoffe_Kohlenhydrate [Internet]. [zitiert 16. Juli 2020]. Verfügbar unter: <https://www.oege.at/index.php/bildung-information/nahrungsinhaltstoffe/2-uncategorised/1118-nahrungsinhaltstoffe-kohlenhydrate>
32. Leri M, Scuto M, Ontario ML, Calabrese V, Calabrese EJ, Bucciantini M, u. a. Healthy Effects of Plant Polyphenols: Molecular Mechanisms. *Int J Mol Sci*. Januar 2020;21(4):1250.
33. Deng Y. Rectal Cancer in Asian vs. Western Countries: Why the Variation in Incidence? *Curr Treat Options Oncol*. 25. September 2017;18(10):64.
34. Onyoh EF, Hsu W-F, Chang L-C, Lee Y-C, Wu M-S, Chiu H-M. The Rise of Colorectal Cancer in Asia: Epidemiology, Screening, and Management. *Curr Gastroenterol Rep*. 10. Juli 2019;21(8):36.
35. Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr*. 1. Mai 2004;79(5):727–47.

36. Keinan-Boker L, Peeters PHM, Mulligan AA, Navarro C, Slimani N, Consumption ESG on S, u. a. Soy product consumption in 10 European countries: the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) study. *Public Health Nutr.* Dezember 2002;5(6b):1217–26.
37. Pschyrembel Online | oxidative Phosphorylierung [Internet]. [zitiert 14. Oktober 2020]. Verfügbar unter: <https://www.pschyrembel.de/oxidative%20Phosphorylierung/H024X/doc/>
38. Glykolyse: Übersicht, Reaktionen und Energiebilanz [Internet]. via medici: leichter lernen - mehr verstehen. [zitiert 14. Oktober 2020]. Verfügbar unter: <https://viamedici.thieme.de/lernmodul/547091/subject/biochemie/kohlenhydrate/stoffwechsel/glykolyse+übersicht+reaktionen+und+energiebilanz>
39. Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science.* 22. Mai 2009;324(5930):1029–33.
40. Zeng H, Umar S, Rust B, Lazarova D, Bordonaro M. Secondary Bile Acids and Short Chain Fatty Acids in the Colon: A Focus on Colonic Microbiome, Cell Proliferation, Inflammation, and Cancer. *Int J Mol Sci.* 11. März 2019;20(5):1214.
41. Hirschey MD, DeBerardinis RJ, Diehl AME, Drew JE, Frezza C, Green MF, u. a. Dysregulated metabolism contributes to oncogenesis. *Semin Cancer Biol.* 1. Dezember 2015;35:S129–50.
42. Liberti MV, Locasale JW. The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? *Trends Biochem Sci.* März 2016;41(3):211–8.
43. Levine AJ, Oren M. The first 30 years of p53: growing ever more complex. *Nat Rev Cancer.* Oktober 2009;9(10):749–58.
44. Ingaramo MC, Sánchez JA, Dekanty A. Regulation and function of p53: A perspective from *Drosophila* studies. *Mech Dev.* 1. Dezember 2018;154:82–90.
45. Anbarasan T, Bourdon J-C. The Emerging Landscape of p53 Isoforms in Physiology, Cancer and Degenerative Diseases. *Int J Mol Sci.* 11. Dezember 2019;20(24):6257.
46. Yue X, Zhao Y, Xu Y, Zheng M, Feng Z, Hu W. Mutant p53 in Cancer: Accumulation, Gain-of-Function, and Therapy. *J Mol Biol.* Juni 2017;429(11):1595–606.
47. Stein Y, Rotter V, Aloni-Grinstein R. Gain-of-Function Mutant p53: All the Roads Lead to Tumorigenesis. *Int J Mol Sci.* 2019;16.

48. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*. März 2011;144(5):646–74.
49. Müller-Esterl W, Anderka O, Brandt U, Kerscher S. *Biochemie Eine Einführung für Mediziner und Naturwissenschaftler*. 2. Auflage. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag; 2011.
50. Kung C-P, Murphy ME. The role of the p53 tumor suppressor in metabolism and diabetes. *J Endocrinol*. November 2016;231(2):R61–75.
51. Madan E, Gogna R, Bhatt M, Pati U, Kuppusamy P, Mahdi AA. Regulation of glucose metabolism by p53: Emerging new roles for the tumor suppressor. *Oncotarget*. 31. Dezember 2011;2(12):948–57.
52. Correa H. Li–Fraumeni Syndrome. *J Pediatr Genet*. 13. April 2016;05(02):084–8.
53. Riss TL, Moravec RA, Niles AL, Duellman S, Benink HA, Worzella TJ, u. a. Figure 7: [Structure of resazurin substrate and...]. [Internet]. Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2016 [zitiert 1. März 2021]. Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/figure/mttassays.F7/>
54. Arango D, Wilson AJ, Shi Q, Corner GA, Arañes MJ, Nicholas C, u. a. Molecular mechanisms of action and prediction of response to oxaliplatin in colorectal cancer cells. *Br J Cancer*. November 2004;91(11):1931–46.
55. Chou T-C, Talalay P. Quantitative Analysis of Dose-Effect Relationships: The Combined Effects of Multiple Drugs or Enzyme Inhibitors. *Adv Enzyme Regul*. 1. Februar 1984;22:27–55.
56. Abbexa - Antibodies, Proteins, ELISA kits [Internet]. Abbexa. Abbexa.com; [zitiert 2. März 2021]. Verfügbar unter: <https://www.abbexa.com/>
57. Seahorse XF Cell Mito Stress Test Kit User Guide. :20.
58. González-Sarrías A, Núñez-Sánchez MÁ, García-Villalba R, Tomás-Barberán FA, Espín JC. Antiproliferative activity of the ellagic acid-derived gut microbiota isourolithin A and comparison with its urolithin A isomer: the role of cell metabolism. *Eur J Nutr*. 1. März 2017;56(2):831–41.
59. González-Sarrías A, Giménez-Bastida JA, Núñez-Sánchez MÁ, Larrosa M, García-Conesa MT, Tomás-Barberán FA, u. a. Phase-II metabolism limits the antiproliferative activity of urolithins in human colon cancer cells. *Eur J Nutr*. April 2014;53(3):853–64.

60. Villalba KJO, Barka FV, Pasos CV, Rodríguez PE. Food Ellagitannins: Structure, Metabolomic Fate, and Biological Properties. *Tann - Struct Prop Biol Prop Curr Knowl* [Internet]. 26. Juli 2019 [zitiert 12. Februar 2021]; Verfügbar unter: <https://www.intechopen.com/books/tannins-structural-properties-biological-properties-and-current-knowledge/food-ellagitannins-structure-metabolomic-fate-and-biological-properties>
61. Norden E, Heiss EH. Urolithin A gains in antiproliferative capacity by reducing the glycolytic potential via the p53/TIGAR axis in colon cancer cells. *Carcinogenesis*. 12. März 2019;40(1):93–101.
62. Boehning AL, Essien SA, Underwood EL, Dash PK, Boehning D. Cell type-dependent effects of ellagic acid on cellular metabolism. *bioRxiv*. 1. Januar 2018;319533.
63. Sun Y, Liu Z, Zou X, Lan Y, Sun X, Wang X, u. a. Mechanisms underlying 3-bromopyruvate-induced cell death in colon cancer. *J Bioenerg Biomembr*. 1. August 2015;47(4):319–29.
64. Ho N, Morrison J, Silva A, Coomber BL. The effect of 3-bromopyruvate on human colorectal cancer cells is dependent on glucose concentration but not hexokinase II expression. *Biosci Rep*. 1. Februar 2016;36(1):e00299.

5. Anhang

5.1. Abkürzungsverzeichnis

A

AFU	arbitrary fluorescence units, beliebige Fluoreszenzeinheiten
APC-Gen	Adenomatöses Polyposis Coli Gen
ATP	Adenosintriphosphat

B

Bax	Bcl-2-assoziiertes Protein x
-----	------------------------------

C

CDK	Cyclin-abhängige Kinasen
CI	Combinatorial Index, Kombinationsindex
CRC	Colorectal cancer

D

ddH ₂ O	double-distilled water, doppelt-destilliertes Wasser
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure

E

ECAR	Extracellular Acidification Rate
EL	Enterolakton
ER β	Estrogenrezeptor beta

F

FACS	Fluorescence Activated Cell Sorter
FAP	Familiäre adenomatöse Polyposis
FBS	fetales bovines Serum
FSC	forward scatter, Vorwärtsstreulicht

H

HNPCC

hereditary non-polyposis colorectal cancer,
hereditäres kolorektales Karzinom ohne
Polyposis

I

IC₅₀

half maximal inhibitory concentration,
mittlere inhibitorische Konzentration

iUroA

Isourolithin A

K

k.o.

knock-out

KRK

Kolorektales Karzinom

M

MAP

MUTYH-assoziierte Polyposis

MDM2-Gen

mouse double minute 2-Gen

MLH1

MutL Homolog 1

MLH2

MutL Homolog 2

mRNA

messenger-RNA

MSI

Mikrosatelliteninstabilität (MSI)

N

NAD(P)H

Nicotinamidadenindinukleotid(phosphat)

O

OCR

Oxygen Consumption Rate

O-DMA

O-Desmethylangolesin

P

PBS

phosphat-gepufferte Salzlösung

PI

Propidiumiodid

R

RNS

Ribonukleinsäure

ROS

reactive oxygen species, reaktive
Sauerstoffspezies

S

SDG	Secoisolariciresinol-diglycosid
SECO	Secoisolariciresinol
SNP	single nucleotide polymorphism, Einzelnukleotid-Polymorphismus
SSC	side scatter, Seitenstreulicht

T

TIGAR	TP53-induced glycolysis and apoptosis regulator, TP53-induzierte Glykolyse- und Apoptoseregler
TILs	tumor-infiltrating lymphocytes, tumorinfiltrierende Lymphozyten
TP53	Tumorsuppressorgen 53

U

UroA	Urolithin A
UroB	Urolithin B

W

WT	Wildtyp
----	---------

5.2. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Struktur von Urolithin A (eigene Abbildung)	1
Abbildung 2: Urolithin Metabotypen: Metabotyp 0 (orange strichlierte Linie), Metabotyp A (rote Linie) Metabotyp B (blaue strichlierte Linie), modifiziert nach Tomás-Barberán et al. (2)	2
Abbildung 3: Struktur von S-Equol (eigene Abbildung)	3
Abbildung 4: Struktur von Enterolakton (eigene Abbildung)	5
Abbildung 5: Reduktion von Resazurin zu Resorufin in lebenden Zellen (53)	22
Abbildung 6: Formel zu Berechnung des Kombinationsindex	28
Abbildung 7: Prinzip eines Durchflusszytometers (56)	29
Abbildung 8: Darstellung als Dot-Plot	30
Abbildung 9: Darstellung als Histogramm	30
Abbildung 10: Metabolisches Profil des Seahorse Phänotyp Tests	33
Abbildung 11: Seahorse Mito Stress Test Messprofil (57)	36
Abbildung 12: Schema Seahorse Mito Stress Test zur Zellzahloptimierung, 10 000 bis 60 000 Zellen/ Well, A1, B4, C3, D6: leere Wells	37
Abbildung 13: Behandlungsschema zur optimalen FCCP-Konzentration, Zeile A: 0.5 μ M, Zeile B: 1.0 μ M, Zeile C: 1.5, Zeile D: 2.0 μ M FCCP, 50 000 Zellen/ Well, HCT116 WT, A1, B4, C3, D6: leere Wells	38
Abbildung 14: Schema zur optimalen Beschichtung, Spalten 1,2: Poly-L-Lysin, Spalten 3,4: Gelatine, Spalten 5,6: Kollagen, 50 000 Zellen/ Well, HCT116 WT, A1, B4, C3, D6: leere Wells	39
Abbildung 15: DMSO Kontrolle zur Zellzahloptimierung, 24 Stunden, AFU = arbitrary fluorescence units	40
Abbildung 16: DMSO Kontrolle zur Zellzahloptimierung, 48 Stunden, AFU = arbitrary fluorescence units	41

Abbildung 17:DMSO Kontrolle zur Zellzahloptimierung, 72 Stunden, AFU = arbitrary fluorescence units	41
Abbildung 18: Zellzahloptimierung mit den Mito Stress Test, OCR = oxygen consumption rate	42
Abbildung 19: Zellzyklus Phasenverteilung nach 24h, HCT116 WT, UroA= Urolithin A, 0,1% DMSO als Kontrolle, n=2.....	46
Abbildung 20: Zellzyklus Phasenverteilung nach 48h, HCT116 WT, UroA= Urolithin A, 0,1% DMSO als Kontrolle, n=2.....	47
Abbildung 21: Zellzyklus Phasenverteilung nach 72h, HCT116 WT, UroA= Urolithin A, 0,1% DMSO als Kontrolle, n=2.....	47
Abbildung 22:Zellzyklus Phasenverteilung nach 24h, Oxa = Oxaliplatin, 0,1% DMSO als Kontrolle, n=2.....	48
Abbildung 23: Zellzyklus Phasenverteilung nach 48h, Oxa = Oxaliplatin, 0,1% DMSO als Kontrolle, n=2.....	48
Abbildung 24: Zellzyklus Phasenverteilung nach 72h, Oxa = Oxaliplatin, 0,1% DMSO als Kontrolle, n=2.....	49
Abbildung 25: Respiratorisches Potential nach Behandlung mit 30 μ M Urolithin A, 0,1% DMSO als Kontrolle, HCT 116 WT, OCR= Oxygen Consumption Rate, n=3, Mittelwert $\pm$ SD, t-Test, *p < 0,05.....	53
Abbildung 26: Glykolytisches Potential nach Behandlung mit 30 μ M Urolithin A, 0,1% DMSO als Kontrolle, HCT 116 WT, ECAR=extracellular acidification rate, n=3, Mittelwert $\pm$ SD, t-Test, *p < 0,05.....	54
Abbildung 27: Respiratorisches Potential nach Behandlung mit 30 μ M Urolithin A, 0,1% DMSO als Kontrolle, HCT 116 p53 k.o., OCR= Oxygen Consumption Rate, n=3, Mittelwert $\pm$ SD, t-Test, *p < 0,05.....	56
Abbildung 28: Glykolytisches Potential nach Behandlung mit 30 μ M Urolithin A, 0,1% DMSO als Kontrolle, HCT 116 p53 k.o., ECAR=extracellular acidification rate, n=3, Mittelwert $\pm$ SD, t-Test, *p < 0,05.....	57

5.3. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Materialien in der Zellkultur	15
Tabelle 2: Zusammensetzung Wachstumsmedium	15
Tabelle 3: Zusammensetzung PBS-Lösung.....	16
Tabelle 4: Verwendetes Material beim Resazurin Assay	16
Tabelle 5: Zusammensetzung Resazurin-Lösung.....	17
Tabelle 6: Verwendetes Material beim Kristallviolett Assay	17
Tabelle 7: Zusammensetzung Kristallviolett-Lösung	17
Tabelle 8: Verwendetes Material in der Durchflusszytometrie.....	17
Tabelle 9: Zusammensetzung Propidiumiodid-Lösung	18
Tabelle 10: Verwendetes Material für den Seahorse-Assay.....	18
Tabelle 11: Zusammensetzung CellTak-Beschichtung	19
Tabelle 12: Zusammensetzung Seahorse Basalmedium	20
Tabelle 13: Zusammensetzung Seahorse Assay Medium	20
Tabelle 14: Pipettierschema I zur Zellzahloptimierung HCT116 WT; blau: leer; gelb 5 000 Zellen/Well; grün: 10 000 Zellen/Well; orange: 20 000 Zellen/Well; Spalte 2,5,8: 0,1% DMSO, Spalte 3,6,9: 40 µM Urolithin A (UroA), Spalte 4,7,10: 40 µM Enterolakton (EL).....	23
Tabelle 15: Pipettierschema II zur Zellzahloptimierung HCT116 WT; blau: leer; gelb 5 000 Zellen/Well; grün: 7 500 Zellen/Well; orange: 10 000 Zellen/Well; Spalte 2,5,8: 0,1% DMSO, Spalte 3,6,9: 40 µM Urolithin A (UroA), Spalte 4,7,10: 40 µM Enterolakton (EL).....	23
Tabelle 16: Pipettierschema Einfluss unterschiedlicher Konzentrationen von UroA und S-Equol in HCT116 WT: blau: leer; gelb: 10 000 Zellen/well; Spalte 2,7: 0,1% DMSO, Spalten 3-6: Urolithin A in verschiedenen Konzentrationen; Spalten 8-11: S-Equol in verschiedenen Konzentrationen	24

Tabelle 17: Pipettierschema Kombinationswirkung Enterolakton mit Oxaliplatin in HCT116 WT: blau: leer; gelb: 10 000 Zellen/well; Spalte 2,7: 0,1% DMSO, Spalten 3-6: Oxaliplatin in verschiedenen Konzentrationen; Spalten 8-11: Oxaliplatin mit 20 µM Enterolakton.....	25
Tabelle 18: Pipettierschema Kombinationswirkung S-Equol mit Oxaliplatin in HCT116 WT: blau: leer; gelb: 10 000 Zellen/well; Spalte 2,7: 0,1% DMSO, Spalten 3-6: Oxaliplatin in verschiedenen Konzentrationen; Spalten 8-11: Oxaliplatin mit 20 µM Equol	25
Tabelle 19: Pipettierschema Kombinationswirkung S-Equol mit Oxaliplatin in HCT116 WT: blau: leer; gelb: 10 000 Zellen/well; Spalte 2,7: 0,1% DMSO, Spalten 3-6,8-11: Oxaliplatin in verschiedenen Konzentrationen; 5 µM S-Equol, 20 µM S-Equol, 80 µM S-Equol	26
Tabelle 20: Pipettierschema Kombinationswirkung Urolithin A mit Oxaliplatin in HCT116 WT: blau: leer; gelb: 10 000 Zellen/well; Spalte 2,7: 0,1% DMSO, Spalten 3-6,8-11: Oxaliplatin in verschiedenen Konzentrationen; 5 µM UroA, 15 µM UroA, 40 µM Urolithin	26
Tabelle 21: Pipettierschema Einfluss von UroA auf HCT116 p53 k.o. im Vergleich mit Oxaliplatin: blau: leer; gelb: 10 000 Zellen/well; Spalte 2,7: 0,1% DMSO, Spalten 3-6: Oxaliplatin in verschiedenen Konzentrationen; Spalten 8-11: UroA in verschiedenen Konzentrationen	27
Tabelle 22: Pipettierschema Einfluss von UroA und Oxaliplatin auf HCT116 WT und p53 k.o.: blau: leer; gelb: 10 000 Zellen/well; Spalte 2,7: 0,1% DMSO, Spalten 3-6: Oxaliplatin in verschiedenen Konzentrationen; Spalten 8-11: UroA in verschiedenen Konzentrationen; HCT116 WT, HCT116 p53 k.o.	27
Tabelle 23: Pipettierschema Durchflusszytometrie; A1 ,B1:0,1% DMSO, A2: Urolithin A 20 µM, A3: Urolithin A 40 µM, B2: Oxaliplatin 5 µM, B3: Oxaliplatin 10 µM	32
Tabelle 24: Pipettierschema Seahorse Phänotyp Test HCT116 WT; Spalten 1-3: 0,1% DMSO, Spalten 4-6: 30 µM Urolithin A; Zeilen A, C: 1,0 µM Oligomycin, Zeile B: 0,5 µM FCCP, Zeile D: 1,0 µM FCCP; 100 000 Zellen/Well, leere Wells	34
Tabelle 25: Pipettierschema Seahorse Phänotyp Test HCT116 p53 k.o.; Spalten 1-3: 0,1% DMSO, Spalten 4-6: 30 µM Urolithin A; Zeilen A, C: 1,0 µM Oligomycin, Zeile B: 0,5 µM FCCP, Zeile D: 1,0 µM FCCP; 100 000 Zellen/Well, leere Wells.....	35
Tabelle 26: Pipettierschema Seahorse Phänotyp Test HCT116 WT und p53 k.o.; Spalten 1-3: 0,1% DMSO, Spalten 4-6: 30 µM Urolithin A; Zeilen A, C: 1,0 µM Oligomycin, Zeile B: 0,5 µM	

FCCP, Zeile D: 0,5 μ M FCCP; 100 000 Zellen/Well, HCT116 WT, HCT116 p53 k.o., leere Wells	35
Tabelle 27: IC50-Werte ermittelt im Resazurin Assay, HCT116 WT, Werte als Mittelwert $\pm$ SD, n.d. = not determined, n=2	44
Tabelle 28: IC50-Werte ermittelt im Kristallviolett Assay, HCT116 WT, Werte als Mittelwert $\pm$ SD, n.d. = not determined, n=2.....	45
Tabelle 29: IC50-Werte und CI für Oxaliplatin und Urolithin A (UroA) nach 48 und 72 Stunden, Resazurin Assay, Werte als Mittelwert $\pm$ SD.....	50
Tabelle 30:IC50-Werte und CI für Oxaliplatin und Urolithin A (UroA) nach 48 und 72 Stunden, Kristallviolett Assay, Werte als Mittelwert $\pm$ SD.....	51
Tabelle 31: IC50-Werte und CI für Oxaliplatin und S-Equol nach 48 und 72 Stunden, Resazurin Assay, Werte als Mittelwert $\pm$ SD.....	51
Tabelle 32 : IC50-Werte und CI für Oxaliplatin und S-Equol nach 48 und 72 Stunden, Kristallviolett Assay, Werte als Mittelwert $\pm$ SD.....	52
Tabelle 33: IC50-Werte ermittelt im Resazurin Assay, HCT116 p53 k.o., Werte als Mittelwert $\pm$ SD, n.d. = not determined, n=2.....	55
Tabelle 34: IC50-Werte ermittelt im Kristallviolett Assay, HCT116 p53 k.o., Werte als Mittelwert $\pm$ SD, n.d. = not determined, n=2.....	55

5.4. Bildrechte

Ich habe mich bemüht, sämtliche Inhaber*innen der Bildrechte ausfindig zu machen und ihre Zustimmung zur Verwendung der Bilder in dieser Arbeit eingeholt. Sollte dennoch eine Urheberrechtsverletzung bekannt werden, ersuche ich um Meldung bei mir.